



Γενική Γραμματεία Έρευνας Τεχνολογίας

Ειδική Υπηρεσία Διαχείρισης και Εφαρμογής Δράσεων  
στους τομείς Έρευνας, Τεχνολογικής Ανάπτυξης και Καινοτομίας

ΕΝΙΑΙΑ ΔΡΑΣΗ ΚΡΑΤΙΚΩΝ ΕΝΙΣΧΥΣΕΩΝ ΕΡΕΥΝΑΣ, ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ &  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑΣ  
ΕΡΕΥΝΩ – ΔΗΜΙΟΥΡΓΩ – ΚΑΙΝΟΤΟΜΩ

Τίτλος έργου:

**Αξιοποίηση νέας φυσικής Ελληνικής μικροβιακής χλωρίδας προς  
παραγωγή οίνων υψηλής ποιότητας**

**Oenovation**

(Κωδικός Έργου: Τ1ΕΔΚ-04747)

## Αναλυτική παρουσίαση τελικών αποτελεσμάτων-2023

**Φορείς υλοποίησης (αλφαβητικά):**

Ένωση Συνεταιρισμών Θηραϊκών Προϊόντων (SANTO)

Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων Γεωπονικού  
Πανεπιστημίου Αθηνών

Εργαστήριο Οινολογίας Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

Εταιρεία Αξιοποίησης Διαχείρισης Περιουσίας Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

Ινστιτούτο Τεχνολογίας Αγροτικών Προϊόντων Ελληνικού Γεωργικού Οργανισμού-  
ΔΗΜΗΤΡΑ



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

**ΕΠΑνΕΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

## **Ενότητα Εργασίας 1: Απομόνωση, μοριακός χαρακτηρισμός και φυσιολογικά χαρακτηριστικά νέων και ήδη υπαρχόντων στελεχών ζυμών**

### **Φορείς υλοποίησης:**

Ινστιτούτο Τεχνολογίας Αγροτικών Προϊόντων Ελληνικού Γεωργικού Οργανισμού-  
ΔΗΜΗΤΡΑ

Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων Γεωπονικού  
Πανεπιστημίου Αθηνών

**Δράση 1.1: Απομόνωση νέων στελεχών ζυμών.**

**Δράση 1.2: Μοριακός χαρακτηρισμός και οινολογικά χαρακτηριστικά των στελεχών ζυμών.**

**Δράση 1.2.1: Μοριακή ταυτοποίηση ζυμών.**

**Δράση 1.2.2: Αξιολόγηση οινολογικού δυναμικού ζυμών.**



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

## Παραδοτέο Δράσης 1.1: Απομόνωση νέων στελεχών ζυμών.

### Α) Απομονώσεις από διαφορετικές περιοχές της Αττικής και της Σαντορίνης Δείγματα σταφυλιών και ζύμωση γλευκών

Δείγματα σταφυλιών της ποικιλίας 'Ασύρτικο' συλλέχθηκαν από αμπελώνες στις θέσεις «Θηρασία», «Βούρβουλος» και «Πύργος» στη Σαντορίνη (τρυγητός 2018) (Πίνακας 1, Σχήμα 1). Δείγματα σταφυλιών της ποικιλίας 'Σαββατιανό' (τρυγητός 2018) και της ποικιλίας 'Ασύρτικο' (τρυγητός 2018 και 2019) συλλέχθηκαν από τον αμπελώνα στη θέση «Γιαλός» της Αττικής (Πίνακας 1, Σχήμα 1). Πραγματοποιήθηκε εκτενής δειγματοληψία με τρόπο που να διασφαλίζει την αντιπροσωπευτικότητα στους αμπελώνες σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία (Chalvantzi et al. 2021). Συγκεκριμένα, συμπεριλήφθηκαν 2 έως 3 απομακρυσμένα σημεία δειγματοληψίας ανά αμπελώνα και ανά ποικιλία αποφεύγοντας τις άκρες του χωραφιού. Κάθε δείγμα αποτελούνταν από 4-5 kg τσαμπιά ώριμων και υγιών σταφυλιών. Έπειτα από εκτενή βιβλιογραφική ανάλυση και εργαστηριακές δοκιμές η απομόνωση των ζυμών πραγματοποιήθηκε στο στάδιο της τεχνολογικής ωρίμανσης των σταφυλιών δεδομένου ότι οι ώριμες ράγες αποτελούν το μοναδικό τμήμα της αμπέλου που φιλοξενεί είδη ζυμών οινολογικού ενδιαφέροντος που συμμετέχουν στην αλκοολική ζύμωση. Τα δείγματα συλλέχθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες και μεταφέρθηκαν υπό ψύξη στο εργαστήριο για ανάλυση. Τα σταφύλια εκθλίφθηκαν σε ομογενοποιητή τύπου Stomacher και υποβλήθηκαν σε αυθόρμητη ζύμωση σε αποστειρωμένες φιάλες. Η παρακολούθηση της ζύμωσης πραγματοποιήθηκε με ημερήσια ζύγιση για τον προσδιορισμό του εκλυόμενου CO<sub>2</sub>.

Πίνακας 1: Αμπελώνες της Αττικής και της Σαντορίνης από τους οποίους πραγματοποιήθηκαν οι δειγματοληψίες των σταφυλιών.

Περιοχή	Τοποθεσία	Ποικιλία	Ημερομηνία Συλλογής	Δείγμα	Συντεταγμένες	Απομονώσεις ζυμών			
						Ράγα	Αζύμωτο Γλεύκος	Τέλος ζύμωσης	
Σαντορίνη	Θηρασία	Ασύρτικο	30/07/2018	OST1	619022	432396	28	24	16
				OST2			19	19	32
	Βούρβουλος		01/08/2018	OSV1	628872	4034319	<O.A*	40	32
				OSV2			<O.A*	39	23
	Πύργος		09/08/2018	OSP1	629916	4026444	<O.A*	34	32
				OSP2			<O.A*	28	21
Αττική	Γιαλός	Ασύρτικο	22/08/2018	OAK1	37.982764	23.902536	ΔΕΝ ΞΕΚΙΝΗΣΕ Η ΖΥΜΩΣΗ		
				OAK2			<O.A*	<O.A*	16
			09/09/2019	OAK3			<O.A*	16	32
				AK1			<O.A*	36	32
			04/09/2018	OAM1			<O.A*	28	20
				OAM2			<O.A*	16	12

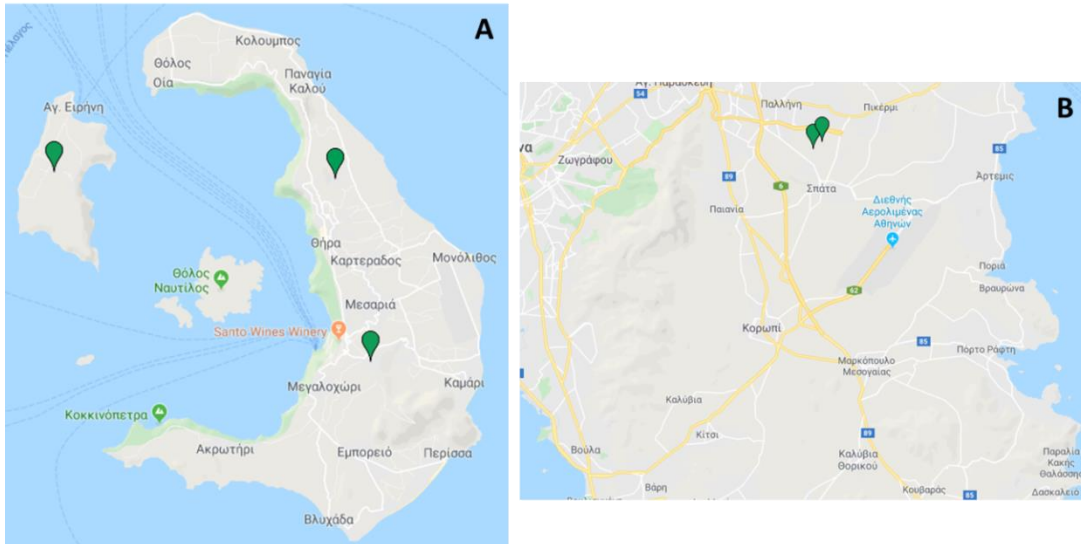
\* Ο πληθυσμός των ζυμών βρίσκεται κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου (<1 log<sub>10</sub> cfu/ml)



**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



Σχήμα 1. Θέσεις των αμπελώνων δειγματοληψίας στις περιοχές της Σαντορίνης (Α) και Αττικής (Β).

### Χημικές αναλύσεις

Στα δείγματα των γλευκών έγινε προσδιορισμός της συγκέντρωσης των σακχάρων, της ολικής οξύτητας και του pH. Στο τέλος κάθε ζύμωσης προσδιορίσθηκε το pH, η ολική οξύτητα και η πτητική οξύτητα. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις μεθόδους του ΟΙV (ΟΙV 2015). Τα οργανικά οξέα (τρυγικό, μηλικό, οξικό, ηλεκτρικό, κιτρικό και γαλακτικό οξύ), η αιθανόλη, η γλυκερόλη, τα υπολειπόμενα σάκχαρα (γλυκόζη και φρουκτόζη), η αμμωνία και το ελεύθερο άζωτο προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (High-performance liquid chromatography-HPLC), με την χρήση ενζυμικών κιτ (R-Biopharm AG) και με ενζυμικό αναλύτη Miura One (I.S.E. S.r.l – Ιταλία Ρώμη) (Σχήμα 2).



Σχήμα 2. Ενζυμικός αναλυτής γλεύκους και οίνου.



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

ΕΠΑνΕΚ 2014-2020  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ

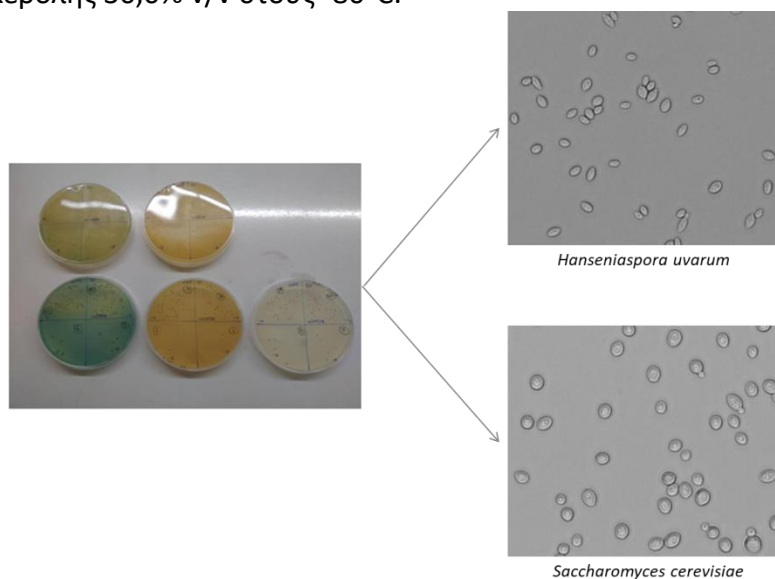


ανάπτυξη - εργασία - αλληλεγγύη

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

### Απαρίθμηση και απομόνωση ζυμών

Η απαρίθμηση και η απομόνωση των ζυμών πραγματοποιήθηκε στα δείγματα των σταφυλιών και στα αντίστοιχα γλεύκη σε δύο διαφορετικά στάδια της αλκοολικής ζύμωσης και πιο συγκεκριμένα στο αρχικό (απελευθέρωση  $\text{CO}_2 \leq 2,0 \text{ g}$ ) και στο τελικό στάδιο (σταθερό βάρος δείγματος έπειτα από δυο διαδοχικές ζυγίσεις). Για τον προσδιορισμό του ολικού πληθυσμού των ζυμών, των *Saccharomyces spp.* και των μη-*Saccharomyces spp.* διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις επιστρώθηκαν σε κατάλληλα θρεπτικά υποστρώματα [W.L. άγαρ, yeast extract peptone dextrose (YPD) άγαρ, άγαρ λυσίνης (LA) και ethanol sulfite (ESA) άγαρ]. Στα θρεπτικά υποστρώματα προστέθηκε χλωραμφαινικόλη (100,0 mg/L) για την παρεμπόδιση της ανάπτυξης των βακτηρίων και διφαινύλιο (10,0 mg/L). Οι αποικίες συλλέχθηκαν τυχαία από κάθε τρυβλίο, απομονώθηκαν με την τεχνική της γραμμικής διασποράς (streaking), εξετάστηκαν μακροσκοπικά και μικροσκοπικά και αποθηκεύτηκαν σε διάλυμα γλυκερόλης 30,0% v/v στους  $-80^\circ\text{C}$ .



Σχήμα 3: Απομόνωση και μικροσκοπική παρατήρηση ζυμών.

### Στατιστική ανάλυση

Οι διαφορές στα οινολογικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων σταφυλιών και των αντίστοιχων προϊόντων ζύμωσης εξετάστηκαν με την ανάλυση διακυμανσης (Analysis of variance -ANOVA,  $p < 0,05$ ) χρησιμοποιώντας το λογισμικό PAST (Hammer *et al* 2001). Η πολυμεταβλητή ανάλυση διακύμανσης (Permutational multivariate analysis of variance, PERMANOVA) χρησιμοποιήθηκε για την σύγκριση των δειγμάτων σταφυλιών λαμβάνοντας υπ' όψιν όλους τους οινολογικούς παράγοντες που αναλύθηκαν. Η μέθοδος PCA εφαρμόστηκε για την



**ΕΠΑνΕΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ

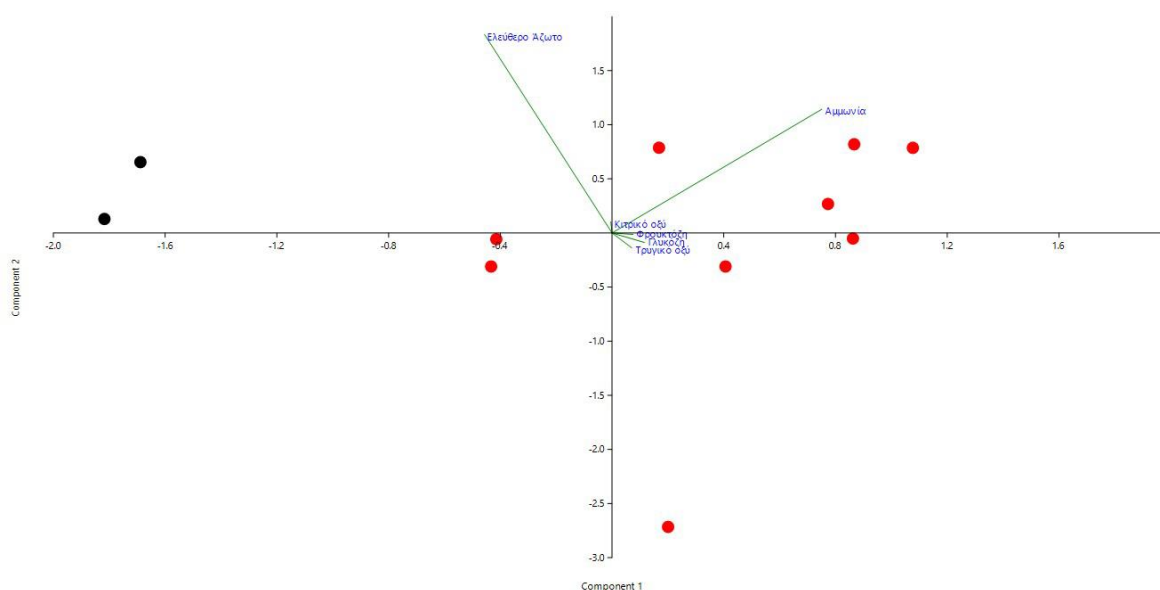


Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

περαιτέρω διερεύνηση των δεδομένων.

## Αποτελέσματα

Τα βασικά οινολογικά χαρακτηριστικά (σάκχαρα, pH, ολική και πτητική οξύτητα) των δειγμάτων σταφυλιών από τους αμπελώνες της Σαντορίνης και της Αττικής και των αντίστοιχων προϊόντων ζύμωσης παρουσιάζονται στους Πίνακες 2 και 3, αντίστοιχα. Τα σταφύλια της ποικιλίας 'Ασύρτικο' από την περιοχή της Σαντορίνης και της Αττικής δεν παρουσίασαν στατιστικώς σημαντική διαφορά ( $p < 0,05$ ) ως προς την συγκέντρωση των σακχάρων ( $219,7 \pm 12,54$  και  $214,2 \pm 15,59$  g/L, αντίστοιχα) και την ολική οξύτητα ( $4,8 \pm 0,60$  και  $5,2 \pm 0,48$  g/L, αντίστοιχα) (Πίνακας 2). Ωστόσο παρουσιάστηκε διαφορά στην τιμή του pH των δειγμάτων ΑΚ και ΟΣΒ ( $3,41 \pm 0,08$  και  $3,02 \pm 0,04$ , αντίστοιχα) (Πίνακας 2). Αντίθετα, τα δείγματα της ποικιλίας 'Ασύρτικο' από την περιοχή της Σαντορίνης και της Αττικής διέφεραν σημαντικά από τα δείγματα της ποικιλίας 'Σαββατιανό' ως προς την σακχαροπεριεκτικότητα ( $F=10,2$ ,  $p=0,0085$ ), το pH ( $F=14,9$ ,  $p=0,0027$ ) και την ολική οξύτητα ( $F=10,4$ ,  $p=0,0081$ ). Τα δεδομένα αναλύθηκαν με την μέθοδο PCA και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Σχήμα 3. Τα δείγματα της ποικιλίας «Σαββατιανό» ομαδοποιήθηκαν ξεχωριστά από τα δείγματα της ποικιλίας «Ασύρτικο».



**Σχήμα 4.** Ανάλυση PCA των βασικών οινολογικών χαρακτηριστικών των γλευκών των ποικιλιών «Ασύρτικο» (κόκκινες κουκκίδες) και «Σαββατιανό» (μαύρες κουκκίδες).



**ΕΠΑΝΕΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Στο τέλος της ζύμωσης, τα δείγματα των αμπελώνων της ποικιλίας 'Ασύρτικο' από την περιοχή της Σαντορίνης δεν παρουσίασαν στατιστικώς σημαντική διαφορά ( $p < 0,05$ ) ως προς το pH, την ολική οξύτητα και την πτητική οξύτητα σε σχέση με τα δείγματα από την περιοχή της Αττικής.

**Πίνακας 2:** Βασικές οινολογικές αναλύσεις (σάκχαρα, pH, ολική οξύτητα) στα δείγματα γλευκών της Σαντορίνης και της Αττικής. Οι τιμές στην ίδια στήλη που δεν συνδέονται με το ίδιο γράμμα διαφέρουν σημαντικά σύμφωνα με την δοκιμή Tukey's HSD ( $p < 0,05$ ).

Περιοχή	Ποικιλία	Δείγμα	Βασικές οινολογικές αναλύσεις		
			Σάκχαρα (g/l)	pH	Ολική οξύτητα (g/L)
Σαντορίνη	Ασύρτικο	OST1	232,3	3,15	4,2
		OST2	201,1	3,04	4,7
		<b>OST</b>	<b>216,7 ± 22,06<sup>ab</sup></b>	<b>3,10 ± 0,08<sup>bc</sup></b>	<b>4,5 ± 0,35<sup>a</sup></b>
		OSV1	227,6	2,99	5,0
		OSV2	231,1	3,04	4,6
		<b>OSV</b>	<b>229,4 ± 2,47<sup>a</sup></b>	<b>3,02 ± 0,04<sup>c</sup></b>	<b>4,8 ± 0,28<sup>a</sup></b>
		OSP1	212,5	3,12	4,4
		OSP2	213,6	2,97	5,9
Αττική	Ασύρτικο	<b>OSP</b>	<b>213,1 ± 0,78<sup>ab</sup></b>	<b>3,05 ± 0,11<sup>bc</sup></b>	<b>5,2 ± 1,06<sup>a</sup></b>
		OAK1	198,8	3,17	5,4
		OAK2	210,3	3,25	4,7
		OAK3	201,1	2,95	5,9
		<b>OAK</b>	<b>203,4 ± 6,09<sup>ab</sup></b>	<b>3,12 ± 0,16<sup>bc</sup></b>	<b>5,3 ± 0,60<sup>a</sup></b>
		AK1	227,6	3,47	4,9
		AK2	233,4	3,35	5,0
		<b>AK</b>	<b>230,5 ± 4,10<sup>a</sup></b>	<b>3,41 ± 0,08<sup>ab</sup></b>	<b>4,93 ± 0,04<sup>a</sup></b>
Σαββατιανό	Σαββατιανό	OAM1	177,2	3,58	3,7
		OAM2	191,9	3,63	3,6
		<b>OAM</b>	<b>184,6 ± 10,39<sup>b</sup></b>	<b>3,61 ± 0,04<sup>a</sup></b>	<b>3,7 ± 0,07<sup>a</sup></b>



**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
**ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ**  
**ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ**  
**ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ**  
**ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ**



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

**Πίνακας 3:** Βασικές οινολογικές αναλύσεις (pH, ολική και πτητική οξύτητα) στα δείγματα της Σαντορίνης και της Αττικής στο τέλος των αυθόρμητων ζυμώσεων. Οι τιμές στην ίδια στήλη που δεν συνδέονται με το ίδιο γράμμα διαφέρουν σημαντικά σύμφωνα με την δοκιμή Tukey's HSD ( $p < 0,05$ ).

Περιοχή	Ποικιλία	Δείγμα	Βασικές οινολογικές αναλύσεις		
			pH	Ολική οξύτητα (g/L)	Πτητική οξύτητα (g/L)
Σαντορίνη	Ασύρτικο	OST1	3,05	6,6	0,80
		OST2	2,98	7,2	0,71
		<b>OST</b>	<b>3,02 ± 0,05<sup>a</sup></b>	<b>6,9 ± 0,42<sup>a</sup></b>	<b>0,75 ± 0,67<sup>a</sup></b>
		OSV1	3,01	8,1	0,22
		OSV2	2,99	6,9	0,72
		<b>OSV</b>	<b>3,00 ± 0,01<sup>a</sup></b>	<b>7,5 ± 0,88<sup>a</sup></b>	<b>0,47 ± 0,36<sup>a</sup></b>
		OSP1	3,02	6,1	0,41
		OSP2	2,93	8,4	0,66
		<b>OSP</b>	<b>2,98 ± 0,06<sup>a</sup></b>	<b>7,3 ± 1,62<sup>a</sup></b>	<b>0,53 ± 0,18<sup>a</sup></b>
		Αττική	Ασύρτικο	OAK1	ΑΔ*
OAK2	ΑΔ			ΑΔ	ΑΔ
OAK3	2,95			9,8	0,21
<b>OAK</b>	<b>2,95<sup>a</sup></b>			<b>9,8<sup>a</sup></b>	<b>0,21<sup>a</sup></b>
AK1	ΑΔ			ΑΔ	ΑΔ
AK2	ΑΔ			ΑΔ	ΑΔ
<b>AK</b>	ΑΔ			ΑΔ	ΑΔ
Σαββατιανό	OAM1		ΑΔ	ΑΔ	ΑΔ
	OAM2		ΑΔ	ΑΔ	ΑΔ
	<b>OAM</b>		ΑΔ	ΑΔ	ΑΔ

\*Αζύμωτο δείγμα

Στην περίπτωση της Σαντορίνης, το 100,0% των δειγμάτων γλευκών αποζυμώθηκε, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό για τα δείγματα της Αττικής ήταν 14,3%. Τα υπόλοιπα δείγματα της Αττικής δεν κατάφεραν να ξεκινήσουν την ζύμωση (28,6%) ή ζυμώθηκαν μερικώς αφήνοντας υπολειμματικά σάκχαρα (57,1%). Τα προφίλ ζυμώσεων και από τις δύο περιοχές παρουσιάζονται στο Σχήμα 4 και 5.



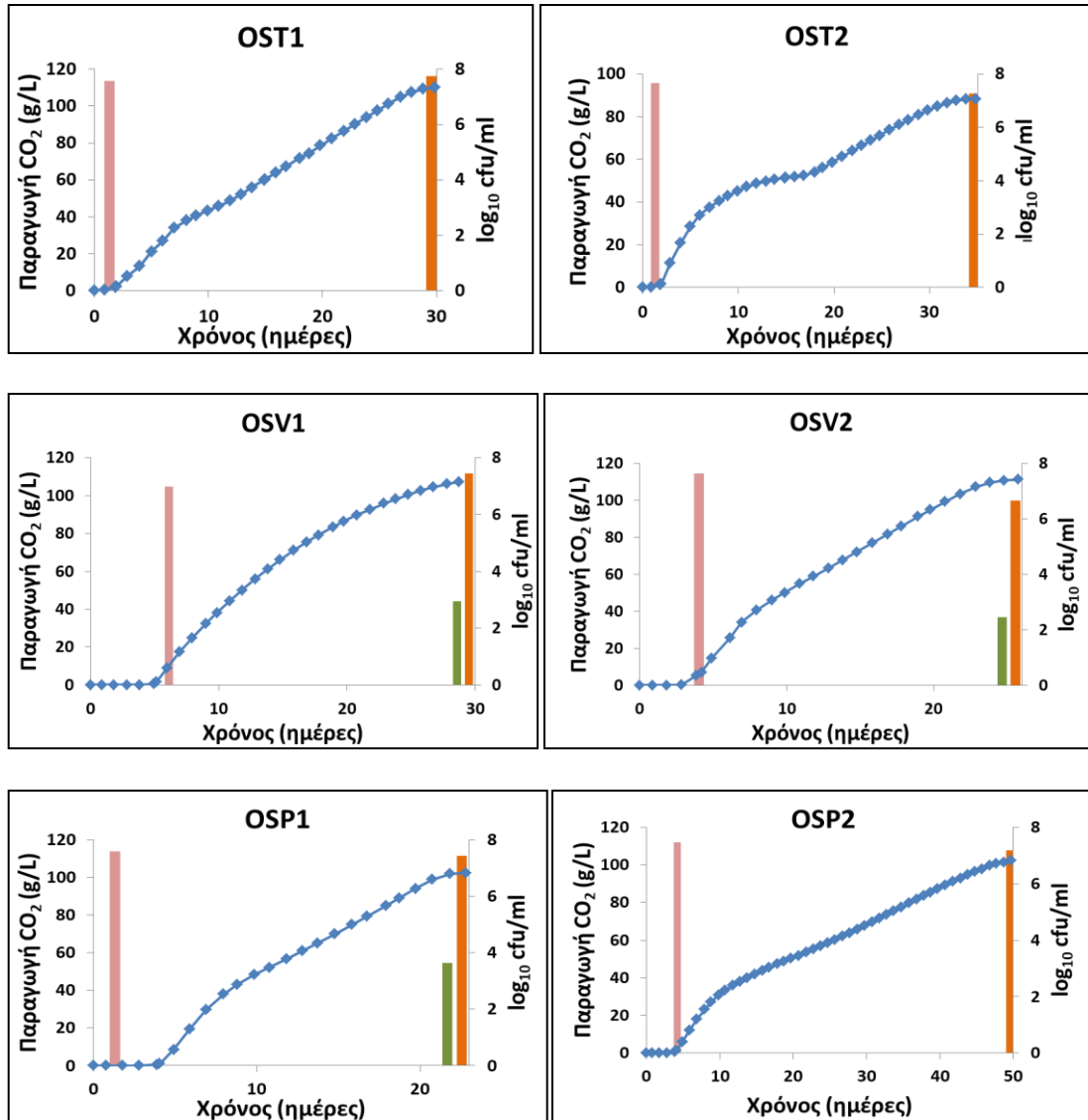


Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

ΕΠΑνεΚ 2014-2020  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ

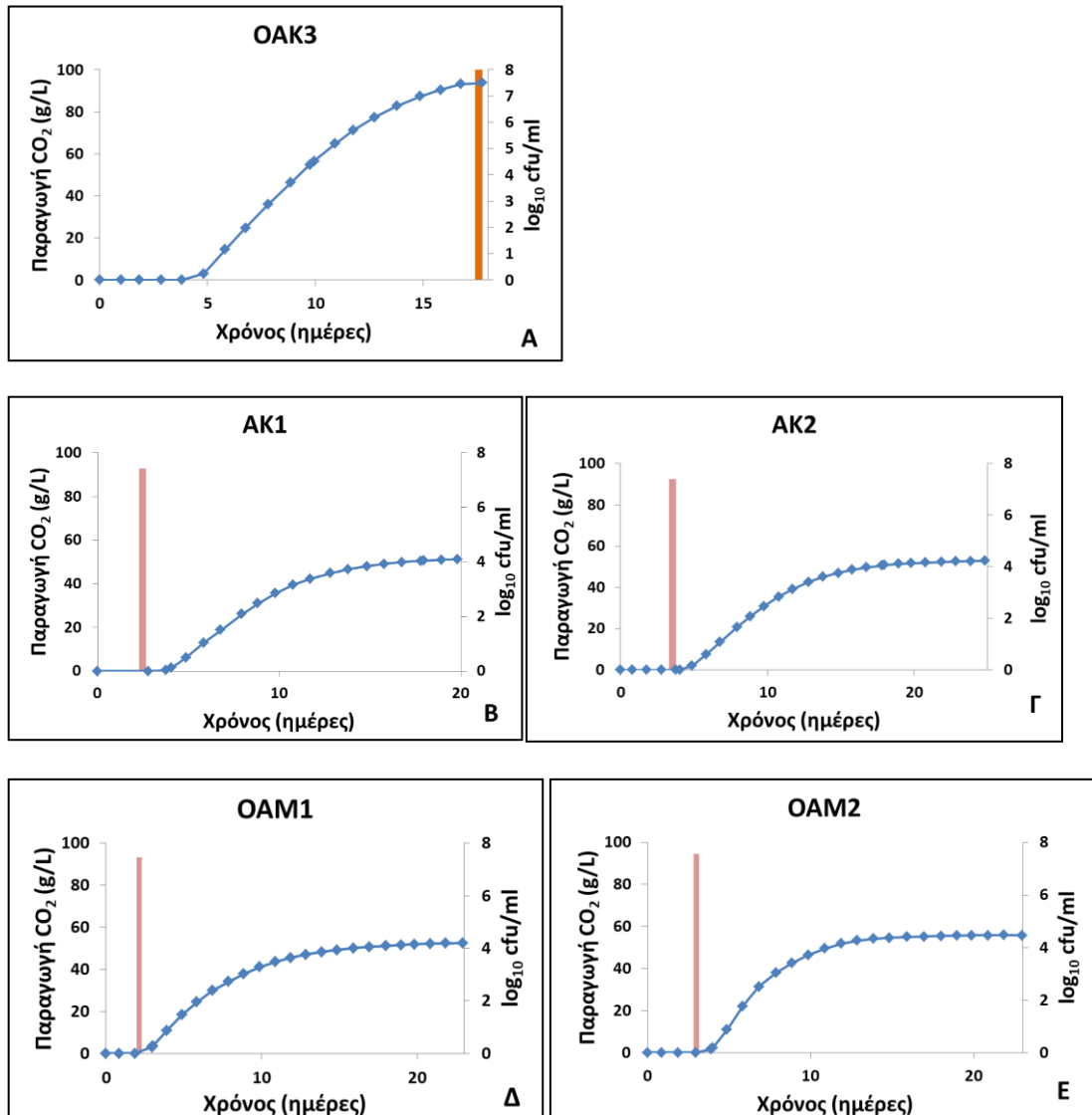


Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



Σχήμα 4. Προφίλ ζύμωσης γλευκών της ποικιλίας 'Ασύρτικο' από την Σαντορίνη και πληθυσμοί ζυμών στο αρχικό και τελικό στάδιο της αλκοολικής ζύμωσης τα οποία απαριθμήθηκαν σε WL (●), LA (●) και YPD (●) άγαρ.

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



**Σχήμα 5.** Προφίλ ζύμωσης γλευκών της ποικιλίας 'Ασύρτικο' (Α,Β,Γ) και της ποικιλίας 'Σαββατιανό' (Δ, Ε) από την περιοχή της Αττικής και πληθυσμοί ζυμών στο αρχικό και τελικό στάδιο της αλκοολικής ζύμωσης τα οποία απариθμήθηκαν σε WL (●), LA (●) και YPD (●) άγαρ.

Στα δείγματα σταφυλιών OST1 και OST2 της Σαντορίνης οι πληθυσμοί των ζυμών ήταν  $6,07 \pm 0,27 \log_{10} \text{ cfu/ml}$  και  $4,91 \pm 0,06 \log_{10} \text{ cfu/ml}$ , αντίστοιχα (Πίνακας 4). Στα υπόλοιπα δείγματα σταφυλιών της Σαντορίνης (OSV1, OSV2, OSP1 και OSP2) καθώς και της Αττικής (AK1, AK2, OAM1 και OAM2) οι πληθυσμοί των ζυμών ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης ( $<1 \log_{10} \text{ cfu/ml}$ ).



**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Στο αρχικό στάδιο της ζύμωσης οι ζύμες απαντήθηκαν σε πληθυσμούς που κυμαίνονταν από  $6,97 \pm 0,18 \log_{10}$  cfu/mL έως  $7,66 \pm 0,01 \log_{10}$  cfu/mL για τα δείγματα από την Σαντορίνη. Στα δείγματα ΟΑΜ1 και ΟΑΜ2 της ποικιλίας 'Σαββατιανό' από την περιοχή της Αττικής οι πληθυσμοί των ζυμών ήταν  $7,46 \pm 0,04 \log_{10}$  cfu/mL και  $7,57 \pm 0,01 \log_{10}$  cfu/mL, αντίστοιχα, ενώ για τα δείγματα ΑΚ1 και ΑΚ2 της ποικιλίας 'Ασύρτικο' οι πληθυσμοί των ζυμών ήταν  $7,42 \pm 0,03 \log_{10}$  cfu/mL και  $7,39 \pm 0,10 \log_{10}$  cfu/mL (Πίνακας 4).

Στο τελικό στάδιο της αλκοολικής ζύμωσης απαντήθηκαν πληθυσμοί *S. cerevisiae* και μη-*Saccharomyces* ζυμών. Πιο συγκεκριμένα, για τα δείγματα της Σαντορίνης η αλκοολική ζύμωση ολοκληρώθηκε στο 100,0% του συνόλου των δειγμάτων από το *S. cerevisiae* το οποίο κυμαινόταν από  $7,26 \pm 0,06$  έως  $7,74 \pm 0,19 \log_{10}$  cfu/mL ενώ στο 50,0% των δειγμάτων ανιχνεύθηκαν και αρκετά είδη μη-*Saccharomyces*, αν και σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις, που κυμαίνονταν από  $2,45 \pm 0,21$  έως  $3,63 \pm 0,02 \log_{10}$  cfu/mL (Πίνακας 4). Στα δείγματα της Αττικής, η αλκοολική ζύμωση δεν πραγματοποιήθηκε στα δείγματα ΟΑΚ1 και ΟΑΚ2 ενώ τα δείγματα ΟΑΜ1, ΟΑΜ2, ΑΚ1 και ΑΚ2 ζυμώθηκαν μερικώς αφήνοντας υπολειμματικά σάκχαρα. Στο δείγμα ΟΑΚ3 που ολοκληρώθηκε η αλκοολική ζύμωση ο πληθυσμός του είδους *S. cerevisiae* έφτασε τα  $8,17 \pm 0,01 \log_{10}$  cfu/mL (Πίνακας 4).

Από τα ανωτέρω προκύπτει ότι το γλεύκος κατά το στάδιο έναρξης της ζύμωσης αποτελεί καταλληλότερο μέσο για την απομόνωση μη-Σακχαρομυκήτων σε σχέση με τις ράγες ή το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης. Αντιθέτως, η απομόνωση *S. cerevisiae* πραγματοποιήθηκε αποκλειστικά στο ζυμωμένο γλεύκος και ποτέ από τις ράγες ή από το αζύμωτο γλεύκος.

Στα δείγματα σταφυλιών από τους αμπελώνες της Σαντορίνης και της Αττικής και στα αντίστοιχα προϊόντα ζύμωσης προσδιορίστηκαν τα κυριότερα οργανικά οξέα (τρυγικό, μηλικό, οξικό, ηλεκτρικό, κιτρικό και γαλακτικό οξύ), η αιθανόλη, η γλυκερόλη, τα σάκχαρα (γλυκόζη και φρουκτόζη), η αμμωνία και το ελεύθερο άζωτο με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (High-performance liquid chromatography-HPLC), με την χρήση ενζυμικών κιτ και με τον ενζυμικό αναλυτή (Πίνακας 5 και 6). Στα δείγματα σταφυλιών από τους αμπελώνες της Σαντορίνης και της Αττικής η αιθανόλη, η γλυκερόλη, το οξικό οξύ, το γαλακτικό οξύ και το μηλικό οξύ ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης.



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

**Πίνακας 4:** Πληθυσμοί ζυμών ( $\log_{10}$  cfu/mL) στα δείγματα σταφυλιών της Σαντορίνης και της Αττικής και στα αντίστοιχα γλεύκη σε δύο διαφορετικά στάδια της αλκοολικής ζύμωσης (αρχικό και τελικό στάδιο).

Περιοχή	Ποικιλία	Δείγμα	Πληθυσμοί ζυμών ( $\log_{10}$ cfu/mL)			
			Δείγματα σταφυλιών	Αρχικό στάδιο ζύμωσης *	Τελικό στάδιο ζύμωσης	Non - <i>Saccharomyces</i> <i>S. cerevisiae</i>
Σαντορίνη	Ασύρτικο	OST1	6,07 ± 0,27	7,57 ± 0,03	<OA**	7,74 ± 0,19
		OST2	4,91 ± 0,06	7,66 ± 0,01	<OA	7,26 ± 0,06
		<b>OST</b>	<b>&lt;OA</b>	<b>7,62 ± 0,06</b>	<b>&lt;OA</b>	<b>7,50 ± 0,34</b>
		OSV1	<OA	6,97 ± 0,18	2,95	7,45 ± 0,02
		OSV2	<OA	7,63 ± 0,04	2,45 ± 0,21	6,64 ± 0,14
		<b>OSV</b>	<b>&lt;OA</b>	<b>7,30 ± 0,47</b>	<b>2,70 ± 0,35</b>	<b>7,05 ± 0,57</b>
	Σαββατιανό	OSP1	<OA	7,57 ± 0,06	3,63 ± 0,02	7,42 ± 0,01
		OSP2	<OA	7,47 ± 0,03	<OA	7,17 ± 0,07
		<b>OSP</b>	<b>&lt;OA</b>	<b>7,52 ± 0,07</b>	<b>3,63</b>	<b>7,30 ± 0,18</b>
		OAM1	<OA	7,46 ± 0,04	ΑΔ***	ΑΔ
		OAM2	<OA	7,57 ± 0,01	ΑΔ	ΑΔ
		<b>OAM</b>	<b>&lt;OA</b>	<b>7,52 ± 0,08</b>	<b>ΑΔ</b>	<b>ΑΔ</b>
Αττική	Ασύρτικο	OAK1	<OA	ΑΔ	ΑΔ	ΑΔ
		OAK2	<OA	ΑΔ	ΑΔ	ΑΔ
		OAK3	<OA	7,49 ± 0,06	<OA	8,17 ± 0,01
	<b>OAK</b>	<b>&lt;OA</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>8,17</b>	
	AK1	<OA	7,42 ± 0,03	ΑΔ	ΑΔ	
	AK2	<OA	7,39 ± 0,10	ΑΔ	ΑΔ	
<b>AK</b>	<b>&lt;OA</b>	<b>7,41 ± 0,02</b>	<b>ΑΔ</b>	<b>ΑΔ</b>		

\* Αρχικό στάδιο ζύμωσης = Πληθυσμός non- *Saccharomyces* ζυμών

\*\* <OA: Ο πληθυσμός των ζυμών βρίσκεται κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου (<1  $\log_{10}$  cfu/mL)

\*\*\*ΑΔ: Αζύμωτο δείγμα

\*\*\*\*ΕΔ: Έλλειψη δεδομένων

Τα δείγματα της ποικιλίας 'Ασύρτικο' από τη Σαντορίνη και την Αττική δεν παρουσίασαν στατιστικώς σημαντική διαφορά ( $p < 0,05$ ) ως προς την σακχαροπεριεκτικότητα, την συγκέντρωση του κιτρικού, τρυγικού οξέος, της αμμωνίας και του ελεύθερου αζώτου (Πίνακας 5). Τα δείγματα της ποικιλίας 'Ασύρτικο' από την περιοχή της Σαντορίνης και της Αττικής διέφεραν από τα δείγματα των αμπελώνων της ποικιλίας 'Σαββατιανό' ως προς την συγκέντρωση της γλυκόζης ( $F=18,9$ ,  $p=0,02$ ), της φρουκτόζης ( $F=9,7$ ,  $p=0,01$ ), της αμμωνίας ( $F=8,1$ ,  $p=0,02$ ) και του ελεύθερου αζώτου ( $F=30,8$ ,  $p=0,02$ ). Λαμβάνοντας υπ' όψιν όλους τους παράγοντες που αναλύθηκαν, η ανάλυση PERMANOVA αποκάλυψε σημαντικές διαφορές στα οινολογικά χαρακτηριστικά των διαφορετικών ποικιλιών ( $F=15,54$ ,  $p=0,02$ ).

Στο τέλος της ζύμωσης, τα δείγματα των αμπελώνων της ποικιλίας 'Ασύρτικο' από την περιοχή της Σαντορίνης και της Αττικής παρουσίασαν διαφορά ως προς το γαλακτικό οξύ ( $0,24 \pm 0,07$  και  $0,42$  g/L αντίστοιχα), το οξικό οξύ ( $0,73 \pm 0,25$  και  $0,37$  g/L, αντίστοιχα) και την γλυκερόλη ( $8,67 \pm 1,01$  και  $6,73$  g/L, αντίστοιχα) (Πίνακας 6).

**Πίνακας 5:** Οινολογικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων σταφυλιών από τους αμπελώνες της Σαντορίνης και της Αττικής. Οι τιμές στην ίδια στήλη που δεν συνδέονται με το ίδιο γράμμα διαφέρουν σημαντικά σύμφωνα με την δοκιμή Tukey's HSD ( $p < 0,05$ ).

Δείγμα	Οινολογικά χαρακτηριστικά						
	Κιτρικό οξύ (g/L)	Φρουκτόζη (g/L)	Γλυκόζη (g/L)	Ηλεκτρικό οξύ (g/L)	Τρυγικό οξύ (g/L)	Αμμωνία (mg/L)	Ελεύθερο Άζωτο (mg/L)
OST1	0,08	110,0	121,0	<OA*	4,71	86,5	59,0
OST2	0,10	96,0	105,0	<OA	5,19	78,5	51,5
<b>OST</b>	<b>0,09 ± 0,01<sup>a</sup></b>	<b>103,0 ± 9,91<sup>a</sup></b>	<b>113,0 ± 11,36<sup>ab</sup></b>	<b>&lt;OA</b>	<b>4,95 ± 0,34<sup>ab</sup></b>	<b>82,5 ± 5,66<sup>a</sup></b>	<b>55,3 ± 5,30<sup>ab</sup></b>
OSV1	<OA	108,9	120,0	<OA	5,70	77,0	47,0
OSV2	0,16	110,0	121,6	<OA	5,38	95,5	54,0
<b>OSV</b>	<b>0,08 ± 0,11<sup>a</sup></b>	<b>109,5 ± 0,77<sup>a</sup></b>	<b>120,82 ± 1,15<sup>a</sup></b>	<b>&lt;OA</b>	<b>5,54 ± 0,22<sup>a</sup></b>	<b>86,3 ± 13,08<sup>a</sup></b>	<b>50,5 ± 4,94<sup>b</sup></b>
OSP1	0,07	101,0	111,1	<OA	5,20	59,0	74,5
OSP2	<OA	102,3	113,1	0,49	6,28	32,0	27,0
<b>OSP</b>	<b>0,03 ± 0,05<sup>a</sup></b>	<b>101,6 ± 0,96<sup>a</sup></b>	<b>112,1 ± 1,45<sup>ab</sup></b>	<b>0,49</b>	<b>5,74 ± 0,76<sup>a</sup></b>	<b>45,5 ± 19,09<sup>ab</sup></b>	<b>50,8 ± 33,59<sup>b</sup></b>
OAM1	0,10	88,6	90,48	<OA	3,76	11,0	123,0
OAM2	0,09	94,6	97,07	<OA	3,59	7,0	117,0
<b>OAM</b>	<b>0,10 ± 0,01<sup>a</sup></b>	<b>91,6 ± 4,23<sup>a</sup></b>	<b>93,77 ± 4,66<sup>b</sup></b>	<b>&lt;OA</b>	<b>3,68 ± 0,12<sup>bc</sup></b>	<b>9,0 ± 2,83<sup>b</sup></b>	<b>120,0 ± 4,24<sup>a</sup></b>
<b>OAK3</b>	<b>&lt;OA<sup>a</sup></b>	<b>98,7<sup>a</sup></b>	<b>107,0<sup>ab</sup></b>	<b>&lt;OA</b>	<b>6,63<sup>a</sup></b>	<b>58,0<sup>ab</sup></b>	<b>52,0<sup>ab</sup></b>
AK1	0,07	111,0	120,2	<OA	2,11	33,0	75,0
AK2	0,08	105,0	121,0	<OA	2,01	31,0	71,0
<b>AK</b>	<b>0,08 ± 0,01<sup>a</sup></b>	<b>108,0 ± 4,24<sup>a</sup></b>	<b>120,6 ± 0,57<sup>a</sup></b>	<b>&lt;OA</b>	<b>2,06 ± 0,07<sup>c</sup></b>	<b>32,0 ± 1,41<sup>b</sup></b>	<b>73,0 ± 2,83<sup>ab</sup></b>

\*<OA: Κάτω από το όριο ανίχνευσης



**ΕΠΑνΕΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

**Πίνακας 6:** Οινολογικά χαρακτηριστικά των προϊόντων ζύμωσης της Σαντορίνης και της Αττικής. Οι τιμές στην ίδια στήλη που δεν συνδέονται με το ίδιο γράμμα διαφέρουν σημαντικά σύμφωνα με την δοκιμή Tukey's HSD ( $p < 0,05$ ).

Οινολογικά χαρακτηριστικά												
Δείγμα	Οξικό οξύ (g/L)	Κιτρικό οξύ (g/L)	Αιθανόλη (g/L)	Φρουκτόζη (g/L)	Γλυκόζη (g/L)	Γλυκερόλη (g/L)	Γαλακτικό οξύ (g/L)	Μηλικό οξύ (g/L)	Ηλεκτρικό οξύ (g/L)	Τρυγικό οξύ (g/L)	Αμμωνία (mg/L)	Ελεύθερο Άζωτο (mg/L)
OST1	0,99	0,51	116,2	2,0	0,4	9,55	0,27	1,38	1,23	2,61	<3	9
OST2	0,88	0,50	101,1	1,6	0,4	8,61	0,27	1,31	1,38	3,06	<3	4
<b>OST</b>	<b>0,93 ± 0,07<sup>a</sup></b>	<b>0,50 ± 0,01<sup>a</sup></b>	<b>108,6 ± 10,67<sup>a</sup></b>	<b>1,8 ± 0,30<sup>a</sup></b>	<b>0,4 ± 0,06<sup>b</sup></b>	<b>9,08 ± 0,67<sup>a</sup></b>	<b>0,27 ± 0,01<sup>ab</sup></b>	<b>1,35 ± 0,05<sup>a</sup></b>	<b>1,30 ± 0,11<sup>a</sup></b>	<b>2,83 ± 0,32<sup>a</sup></b>	-	<b>6.5 ± 3.55<sup>a</sup></b>
OSV1	0,33	0,60	112,3	6,8	0,7	7,04	0,34	1,93	1,49	4,19	<3	7
OSV2	0,91	0,42	116,8	1,8	0,6	9,52	0,24	1,20	1,08	3,11	<3	8
<b>OSV</b>	<b>0,62 ± 0,40<sup>a</sup></b>	<b>0,51 ± 0,13<sup>a</sup></b>	<b>114,6 ± 3,23<sup>a</sup></b>	<b>4,3 ± 3,57<sup>a</sup></b>	<b>0,7 ± 0,08<sup>ab</sup></b>	<b>8,28 ± 1,75<sup>a</sup></b>	<b>0,29 ± 0,08<sup>ab</sup></b>	<b>1,56 ± 0,52<sup>a</sup></b>	<b>1,28 ± 0,29<sup>a</sup></b>	<b>3,65 ± 0,76<sup>a</sup></b>	-	<b>7.5 ± 0.71<sup>a</sup></b>
OSP1	0,54	0,28	107,7	1,0	0,5	7,95	0,15	1,16	0,71	3,25	<3	16
OSP2	0,76	0,30	107,1	2,8	0,7	9,34	0,18	1,27	1,34	4,09	<3	2
<b>OSP</b>	<b>0,65 ± 0,16<sup>a</sup></b>	<b>0,29 ± 0,02<sup>a</sup></b>	<b>107,4 ± 0,45<sup>a</sup></b>	<b>1,9 ± 1,28<sup>a</sup></b>	<b>0,6 ± 0,19<sup>ab</sup></b>	<b>8,65 ± 0,99<sup>a</sup></b>	<b>0,16 ± 0,02<sup>b</sup></b>	<b>1,21 ± 0,08<sup>a</sup></b>	<b>1,03 ± 0,44<sup>a</sup></b>	<b>3,67 ± 0,59<sup>a</sup></b>	-	<b>9 ± 9.90<sup>a</sup></b>
OAM1	0,46	0,24	56,9	33,8	32,7	5,69	<0A*	0,05	0,43	1,57	9	74
OAM2	0,55	0,47	58,8	28,7	45,6	6,31	<0A	0,05	0,80	1,74	<3	67
<b>OAM</b>	<b>0,51 ± 0,06</b>	<b>0,36 ± 0,16</b>	<b>57,8 ± 1,31</b>	<b>31,3 ± 3,60</b>	<b>39,1 ± 9,16</b>	<b>6,00 ± 0,44</b>	<b>&lt;0A</b>	<b>0,05 ± 0,00</b>	<b>0,61 ± 0,26</b>	<b>1,65 ± 0,12</b>	-	<b>70,5 ± 4,95</b>
<b>OAK3</b>	<b>0,37<sup>a</sup></b>	<b>0,61<sup>a</sup></b>	<b>102,5<sup>a</sup></b>	<b>1,0<sup>a</sup></b>	<b>1,0<sup>a</sup></b>	<b>6,73<sup>a</sup></b>	<b>0,43<sup>a</sup></b>	<b>2,19<sup>a</sup></b>	<b>1,34<sup>a</sup></b>	<b>5,24<sup>a</sup></b>	<b>&lt;3,0</b>	<b>5,0<sup>a</sup></b>
AK1	0,51	0,30	53,4	127,3	0,82	0,14	1,29	0,62	0,63	13,0	40,0	
AK2	0,53	0,27	55,2	124,5	0,79	0,13	1,18	0,59	0,93	18,0	39,0	
<b>AK</b>	<b>0,52 ± 0,01</b>	<b>0,29 ± 0,02</b>	<b>54,3 ± 1,27</b>	<b>125,9 ± 2,02</b>		<b>0,81 ± 0,02</b>	<b>0,14 ± 0,01</b>	<b>1,24 ± 0,08</b>	<b>0,61 ± 0,02</b>	<b>0,78 ± 0,21</b>	<b>15,5 ± 3,5<sup>d</sup></b>	<b>39,5 ± 0,70</b>



**ΕΠΑνΕΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

## **Β) Απομονώσεις από τις αυθόρμητες ζυμώσεις που έγιναν στο οινοποιείο «Santo Wines»**

Σκοπός της συγκεκριμένης δράσης ήταν η απομόνωση ζυμών με χαμηλή και υψηλή ζυμωτική ικανότητα από αυθόρμητη ζύμωση που έλαβε χώρα στο οινοποιείο του Santo Wines στη Σαντορίνη. Η αυθόρμητη ζύμωση πραγματοποιήθηκε σε ανοξείδωτη δεξαμενή 10 τόνων του συνεταιρισμού θηραϊκών προϊόντων (βλέπε και Δράση 5.1). Τα σταφύλια ήταν της ποικιλίας Ασύρτικο και αποτελούσαν αντιπροσωπευτικό δείγμα της Σαντορίνης καθώς προέρχονταν από πολλούς μικρούς παραγωγούς διαφορετικών περιοχών του νησιού. Τα δύο δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για τις απομονώσεις προήλθαν από την αρχή (48 ώρες) και το τέλος της ζύμωσης (εναπομείναντα σάκχαρα <2 g/l). Για την απομόνωση των ζυμών *Saccharomyces* spp. και των μη-*Saccharomyces* spp. διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις των δειγμάτων επιστρώθηκαν σε κατάλληλα στερεά μέσα ανάπτυξης [W.L. άγαρ, yeast extract, peptone, dextrose (YPD) άγαρ και YPD lysine άγαρ]. Στα θρεπτικά υποστρώματα προστέθηκε χλωραμφαινικόλη (100 mg/l) για την παρεμπόδιση της ανάπτυξης των βακτηρίων. Οι αποικίες συλλέχθηκαν τυχαία (περίπου το 25% του συνόλου) από κάθε τρυβλίο, απομονώθηκαν με την τεχνική της γραμμικής διασποράς (streaking) και αποθηκεύτηκαν σε διάλυμα γλυκερόλης 30% v/v στους -80°C. Συνολικά απομονώθηκαν 56 αποικίες από το δείγμα της έναρξης της ζύμωσης και 40 από δείγμα από το τέλος της ζύμωσης.



**ΕΠΑνΕΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

## **Δράση 1.2: Μοριακός χαρακτηρισμός και οινολογικά χαρακτηριστικά των στελεχών ζυμών.**

### **Δράση 1.2.1: Μοριακή ταυτοποίηση ζυμών**

#### **Περίληψη**

Στην παρούσα δράση πραγματοποιήθηκε η ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους των νέων ζυμών που απομονώθηκαν από τους αμπελώνες των συμμετεχουσών εταιρειών (SANTO στη Σαντορίνη και της ΕΑΔΠ-ΓΠΑ στην Αττική). Ακολούθως πραγματοποιήθηκε η μοριακή τυποποίηση και ο τεχνολογικός χαρακτηρισμός των νέων αλλά και υπαρχόντων στελεχών ζυμών. Συνολικά 595 νέες απομονώσεις ζυμών από δείγματα σταφυλιών και γλευκών από δύο διαφορετικά στάδια της αλκοολικής ζύμωσης (αρχικό και τελικό) ταυτοποιήθηκαν σε επίπεδο είδους με την μέθοδο της ανάλυσης μήκους θραυσμάτων περιορισμού (RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism) της 5.8S-ITS περιοχής του ριβοσωμικού DNA, ενισχυμένης με PCR. Οι απομονώσεις των ζυμών ταξινομήθηκαν στα είδη: *Candida friedrichii*, *C. glabrata*, *Debaromyces* sp., *Hanseniaspora guilliermondii*, *H. opuntiae*, *H. uvarum*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Meyerozyma caribbica*, *Pichia kudriavzevii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* και *Wickerhamomyces subpelliculosus*. Ακολούθως συνολικά 772 νέες αλλά και υπάρχουσες απομονώσεις ταυτοποιήθηκαν σε επίπεδο στελέχους με την βοήθεια κατάλληλων μοριακών μεθόδων. Οι απομονώσεις που αντιστοιχούν στο είδος *Saccharomyces cerevisiae* διαχωρίστηκαν σε επίπεδο στελέχους με την ανάλυση των  $\delta$  αλληλουχιών καθώς και με τη μέθοδο γονοτύπησης με αλληλούχηση τεχνολογίας επόμενης γενιάς ddRADseq. Στους αμπελώνες της Σαντορίνης εντοπίστηκαν 8 διαφορετικοί γονότυποι *S. cerevisiae* μετά από την ανάλυση 165 απομονώσεων. Τέσσερις εκ των





**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

γονοτύπων βρέθηκαν αποκλειστικά σε συγκεκριμένους αμπελώνες ενώ οι υπόλοιποι παρουσίασαν ευρύτερη γεωγραφική διασπορά. Το ποσοστό της βιοποικιλότητας για το είδος *S. cerevisiae* εκτιμήθηκε στο 4.8%. Στον αμπελώνα της Αττικής (ποικιλία 'Ασύρτικο') εντοπίστηκε ένας γονότυπος *S. cerevisiae*. Το ποσοστό της βιοποικιλότητας του είδους για την Αττική εκτιμήθηκε στο 6.3% (1 γονότυπος από τις 16 απομονώσεις). Η γονοτύπηση των μη-*Saccharomyces* ζυμών πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο της τυχαίας ενίσχυσης τμημάτων πολυμορφικού DNA (Randomly amplified polymorphic DNA – RAPD) είτε με την ανάλυση μικροδορυφορικού DNA (microsatellites), ενώ για το είδος *M. pulcherrima* αναπτύχθηκε μια νέα μέθοδος μικροδορυφορικού DNA. Τα είδη *H. uvarum*, *H. oruntiae* και *H. guilliermondii* ήταν τα πιο διαδεδομένα μη-*Saccharomyces* είδη στους αμπελώνες της Σαντορίνης και της Αττικής. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό τους είναι η ανάλυση με τυχαία ενίσχυση τμημάτων πολυμορφικού DNA από την οποία προέκυψαν 15 διαφορετικοί γονότυποι. Το είδος *T. delbrueckii* απομονώθηκε μόνο από τους αμπελώνες της Σαντορίνης. Συνολικά 128 νέες και παλιότερες απομονώσεις *T. delbrueckii* υποβλήθηκαν σε ανάλυση μικροδορυφορικού DNA. Προέκυψε 1 γονότυπος από τις 17 νέες απομονώσεις. Το είδος *M. pulcherrima* απομονώθηκε μόνο από τα δείγματα σταφυλιών από τους αμπελώνες της Σαντορίνης και από το αρχικό στάδιο της αλκοολικής ζύμωσης. Για την γονοτύπηση του συγκεκριμένου είδους αναπτύχθηκε μια νέα μέθοδος βασισμένη στην ανάλυση μικροδορυφορικού DNA. Συνολικά 74 νέες και παλιότερες απομονώσεις *M. pulcherrima* υποβλήθηκαν σε ανάλυση με την νέα μέθοδο από την οποία προέκυψε 1 γονότυπος από τις 8 νέες απομονώσεις. Ακολούθως, τα διαφορετικά στελέχη των απομονωθέντων ζυμών αξιολογήθηκαν ως προς τις τεχνολογικές τους ιδιότητες, όπως η αντίσταση στην αιθανόλη και το θειώδη ανυδρίτη, η παραγωγή υδρόθειου και β-γλυκοσιδάσης καθώς και η



**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

ικανότητα σχηματισμού βιογενών αμινών. Επίσης, αξιολογήθηκε η ικανότητα παραγωγής τοξίνης “killer”. Τέλος, προκειμένου να διερευνηθεί εάν η γενετική ποικιλομορφία των στελεχών *T. delbrueckii* έχει αντίκτυπο στους οινολογικούς φαινοτύπους, διαφορετικοί γονότυποι *T. delbrueckii* δοκιμάστηκαν σε ζυμώσεις εργαστηριακής κλίμακας. Λαμβάνοντας υπ’ όψη τα κινητικά και τα μεταβολικά προφίλ των στελεχών *T. delbrueckii* που αναλύθηκαν, η ανάλυση PERMANOVA αποκάλυψε σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών στελεχών ( $F=14.77$ ,  $p<0.001$ ).

## Ερευνητική δραστηριότητα

### Στελέχη ζυμών

Συνολικά 595 νέες απομονώσεις ζυμών από δείγματα σταφυλιών και από γλεύκη σε δύο διαφορετικά στάδια της αλκοολικής ζύμωσης και πιο συγκεκριμένα στο αρχικό και στο τελικό στάδιο ταυτοποιήθηκαν σε επίπεδο είδους με την μέθοδο της ανάλυσης μήκους θραυσμάτων περιορισμού (RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism) της 5.8S-ITS περιοχής του ριβοσωμικού DNA (Chalvantzi et al. 2021). Οι απομονώσεις που αντιστοιχούν στο είδος *Saccharomyces cerevisiae* διαχωρίστηκαν σε επίπεδο στελέχους με την ανάλυση των δ αλληλουχιών καθώς και με ddRADseq (Double Digest Restriction-Site Associated DNA), μια μέθοδο γονοτύπησης με αλληλούχηση που βασίζεται στην τεχνολογία αλληλούχησης επόμενης γενιάς. Η γονοτύπηση των μη-*Saccharomyces* ζυμών πραγματοποιήθηκε με την τυχαία ενίσχυση τμημάτων πολυμορφικού DNA (Randomly amplified polymorphic DNA – RAPD) είτε με την ανάλυση μικροδορυφορικού DNA (microsatellites). Για την γονοτύπηση του *M. pulcherrima* αναπτύχθηκε μια νέα μέθοδος βασισμένη στην ανάλυση μικροδορυφορικού DNA.



**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

### Ενίσχυση της 5.8S - ITS περιοχής του rDNA με PCR

Για την λύση του κυτταρικού τοιχώματος των ζυμών προστέθηκαν σε μικροσωληνάρια 3μl NaOH 0.02N και μικρή ποσότητα βιομάζας. Στην συνέχεια τέθηκαν για 10 λεπτά σε βρασμό στους 99°C σε θερμοκυκλοποιητή (Biorad T100TM Thermal Cycler). Για την ενίσχυση της 5.8S-ITS rDNA περιοχής χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') και ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al., 1990). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 50 μl το οποίο περιλάμβανε 10 ng DNA, 1X Buffer Kara A, 20 pmol από κάθε εκκινητή, 0.1 mM από κάθε dNTP και 1 U DNA πολυμεράση (KAPA Taq DNA Polymerase, KAPA Biosystems). Η ενίσχυση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκυκλοποιητή (Biorad T100™ Thermal Cycler) σύμφωνα με τις ακόλουθες συνθήκες: αρχική αποδιάταξη στους 94 °C για 3 λεπτά, ακολουθούμενη από 35 κύκλους αποδιάταξης στους 94 °C για 30 δευτερόλεπτα, υβριδισμού των εκκινητών στους 52 °C για 30 δευτερόλεπτα και επιμήκυνσης στους 72 °C για 1 λεπτό, πριν την τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 10 λεπτά. Τα προϊόντα της αντίδρασης διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτη αγαρόζης 1.2% w/v και απεικονίστηκαν με υπεριώδες φως (GelDoc system, Bio-Rad Laboratories). Τα μοριακά μεγέθη προσδιορίστηκαν με την βοήθεια του δείκτη μοριακών βαρών (100 bp DNA ladder, New England Biolabs).

### Ανάλυση μήκους θραυσμάτων περιορισμού της 5.8S - ITS περιοχής

Για τις αντιδράσεις περιορισμού της 5.8S-ITS περιοχής, τα προϊόντα PCR επωάστηκαν με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *HinfI*, *HaeIII* και *HhaI* (Πίνακας 1). Για την ταυτοποίηση των ζυμών του γένους *Hanseniaspora* τα προϊόντα PCR επωάστηκαν και με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *DdeI* και *DraI* (Πίνακας 1) (Nisiotou et al., 2007a). Περίπου 500 ng προϊόντος PCR επωάστηκαν με 1 U ενζύμου



**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

για 1 h σε θερμοκρασία 37 °C σε ρυθμιστικό διάλυμα που παρείχε ο προμηθευτής του ενζύμου.

Τα θραύσματα περιορισμού διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 2.5% w/v και απεικονίστηκαν με υπεριώδες φως. Τα μεγέθη τους προσδιορίστηκαν με την βοήθεια του δείκτη μοριακών βαρών 100 bp DNA ladder.

**Πίνακας 1:** Ένζυμα περιορισμού και οι αλληλουχίες που αναγνωρίζουν

Περιοριστικές ενδονουκλεάσες	Προέλευση ενζύμου	Αλληλουχία αναγνώρισης
<i>HinfI</i>	<i>Haemophilus influenza</i>	5'...GATC...3' 3'...CTNAG...5'
<i>HaeIII</i>	<i>Haemophilus aegyptius</i>	5'...GGCC...3' 3'...CCGG...5'
<i>HhaI</i>	<i>Haemophilus haemolyticus</i>	5'...GCGC...3' 3'...CGCG...5'
<i>DdeI</i>	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	5'...CTNAG...3' 3'...GATC...5'
<i>DraI</i>	<i>Deinococcus radiophilus</i>	5'...TTTAAA...3' 3'...AAATTT...5'

#### Αλληλούχιση και ανάλυση ακολουθιών DNA

Αντιδράσεις αλληλούχισης πραγματοποιήθηκαν σε αντιπροσωπευτικά δείγματα ζυμών ως προς κάθε είδος που εντοπίστηκε. Τα προϊόντα της ενίσχυσης της 5.8S ITS περιοχής καθαρίστηκαν με το QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Με την βοήθεια αυτόματης συσκευής αλληλούχισης (ABI 3730XL, Macrogen) προσδιορίστηκαν οι αλληλουχίες της αλυσίδας του DNA χρησιμοποιώντας τον εμπρόσθιο (ITS1) ή τον ανάστροφο (ITS4) εκκινητή. Η αναζήτηση ακολουθιών (Blast Search) έγινε με την επιλογή nucleotide-nucleotide στην βάση δεδομένων NCBI GenBank data library.



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

ΕΠΑνεΚ 2014-2020  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

### Γονοτύπηση *Saccharomyces cerevisiae* με ενίσχυση των δ αλληλουχιών

Για την λύση του κυτταρικού τοιχώματος των απομονώσεων *S. cerevisiae* προστέθηκαν σε μικροσωληνάρια 3μl NaOH 0.02N και μικρή ποσότητα βιομάζας. Στην συνέχεια τέθηκαν για 10 λεπτά σε βρασμό στους 99 °C σε θερμοκυκλοποιητή (Biorad T100TM Thermal Cycler). Για την ενίσχυση των δ αλληλουχιών του είδους *S. cerevisiae* χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές delta12 (5'-TCAACAATGGAATCCCAAC-3') και delta 21 (5'-CATCTTAACACCGTATATGA-3') (Legras & Karst, 2003). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 25μl το οποίο περιλάμβανε 20 ng DNA, 1X Buffer Kara A, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2x BSA, 25 pmol από κάθε εκκινητή, 0.2 mM από κάθε dNTP και 1 U DNA πολυμεράση. Η ενίσχυση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκυκλοποιητή σύμφωνα με τις ακόλουθες συνθήκες: αρχική αποδιάταξη στους 94 °C για 3 λεπτά, ακολουθούμενη από 35 κύκλους αποδιάταξης στους 94 °C για 30 δευτερόλεπτα, υβριδισμού των εκκινητών στους 46 °C για 30 δευτερόλεπτα και επιμήκυνσης στους 72 °C για 90 δευτερόλεπτα, πριν την τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 10 λεπτά.

Τα προϊόντα της αντίδρασης διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτη αγαρόζης (2% w/v) και απεικονίστηκαν με υπεριώδες φως. Τα μοριακά μεγέθη προσδιορίστηκαν με την βοήθεια του δείκτη μοριακών βαρών (100 bp DNA ladder, New England Biolabs).

### Διαχωρισμός των μη-*Saccharomyces* ζυμών σε επίπεδο στελέχους με τυχαία ενίσχυση τμημάτων πολυμορφικού DNA

Για την απομόνωση του DNA των μη- *Saccharomyces* ζυμών ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο όπως περιγράφεται από τους Nisiotou et al. (2007 b):

- Η ζύμη αναπτύσσεται για 16 ώρες στους 28 °C σε 30ml YPD broth.
- Συλλέγονται κύττατα με φυγοκέντρηση 2 ml καλλιέργειας στα (8.000 rpm, 3 min, 4 °C).



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

- Στην συνέχεια επαναδιαλύονται τα κύτταρα σε 300 μl breaking buffer (2% Triton, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM TrisHCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8).
- Η καλλιέργεια μεταφέρεται σε φιαλίδια που περιέχουν περίπου 0.24 g σφαιρίδια υάλου (0.5 mm acid washed).
- Προστίθενται 300 μl φαινόλη: χλωροφόρμιο: ισοαμυλική αλκοόλη (25:24:1).
- Ακολουθεί έντονη ανάδευση (vortex) για 2 λεπτά.
- Προστίθενται 300μl TE pH 8 (100mM Tris-HCl pH 8, 10mM EDTA pH 8)
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στην μέγιστη ταχύτητα για 10 min στους 20 °C.
- Το υπερκείμενο (500 μl) μεταφέρεται σε καινούργιο φιαλίδιο και προστίθεται 1ml αιθανόλης 100 % (από κατάψυξη) και αναδεύεται ελαφρά για 2 λεπτά.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στην μέγιστη ταχύτητα για 10 λεπτά στους 4°C.
- Αφαιρείται το υπερκείμενο και ακολουθεί φυγοκέντρηση στην μέγιστη ταχύτητα για 1 λεπτό στους 4 °C.
- Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 30μl ddH<sub>2</sub>O (ανάδευση).

Για την ενίσχυση τμημάτων πολυμορφικού DNA του είδους *Hanseniaspora guilliermondii* χρησιμοποιήθηκε ο εκκινητής R5 (5'-AACGCGCAAC-3') (Martin et al., 2006). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 25 μl το οποίο περιλάμβανε 10 ng DNA, 1X Buffer Kara B, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 pmol από τον εκκινητή, 0.2 mM από κάθε dNTP και 1 U από την DNA πολυμεράση. Η ενίσχυση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκυκλοποιητή σύμφωνα με τις ακόλουθες συνθήκες: αρχική αποδιάταξη στους 94 °C για 3 λεπτά, ακολουθούμενη από 39 κύκλους αποδιάταξης στους 94 °C για 30 δευτερόλεπτα, υβριδισμού των εκκινητών στους 29 °C για 60 δευτερόλεπτα και επιμήκυνσης στους 72 °C για 90 δευτερόλεπτα, πριν την τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 10 λεπτά.

Για την ενίσχυση τμημάτων πολυμορφικού DNA του είδους *H. oruntiae* και *H. unarum* χρησιμοποιήθηκε ο εκκινητής (GTG)<sub>3</sub> (5'-GTGGTGGTG-3') (Senses-Ergul et al., 2006). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 30 μl το οποίο



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

περιλάμβανε 10 ng DNA, 1X Buffer Kara B, 20 pmol από τον εκκινητή, 0.2 mM από κάθε dNTP και 1 U από την DNA πολυμεράση. Η ενίσχυση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκυκλοποιητή σύμφωνα με τις ακόλουθες συνθήκες: αρχική αποδιάταξη στους 94°C για 5 λεπτά, ακολουθούμενη από 34 κύκλους αποδιάταξης στους 94 °C για 30 δευτερόλεπτα, υβριδισμού των εκκινητών στους 36 °C για 45 δευτερόλεπτα και επιμήκυνσης στους 72 °C για 90 δευτερόλεπτα, πριν την τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 10 λεπτά.

Τα προϊόντα της αντίδρασης διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτη αгарόζης 1.8% ή 2% w/v και απεικονίστηκαν με υπεριώδες φως. Τα μοριακά μεγέθη προσδιορίστηκαν με την βοήθεια του δείκτη μοριακών βαρών (100 bp DNA ladder).

#### Γονοτύπηση *Torulasporea delbrueckii* με ανάλυση μικροδορυφορικού DNA

Για την απομόνωση του DNA ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο όπως περιγράφεται από τους Nisiotou et al. 2007a. Για την γονοτύπηση του είδους *T. delbrueckii* χρησιμοποιήθηκαν 7 μικροδορυφορικοί τόποι όπως περιγράφεται από τους Albertin et al. (2014). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 30 μl το οποίο περιλάμβανε 5 ng μητρικού DNA, 1X Buffer Kara A, 0,04 μM από τον εμπρόσθιο εκκινητή, 0.16 μM από τους ανάστροφους και M13 (5'-CACGACGTTGTAAAACGAC-3') εκκινητές, 0.1 mM από κάθε dNTP και 1 U από την DNA πολυμεράση (KAPA Taq DNA Polymerase, KAPA Biosystems). Ο σημασμένος εκκινητής ήταν ο M13 επισημασμένος είτε με FAM είτε με HEX (Eurofins) (Schuelke et al., 2000). Η ενίσχυση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκυκλοποιητή σύμφωνα με τις ακόλουθες συνθήκες: αρχική αποδιάταξη στους 95 °C για 5 λεπτά, ακολουθούμενη από 35 κύκλους αποδιάταξης στους 95 °C για 35 δευτερόλεπτα, υβριδισμού των εκκινητών για 50 δευτερόλεπτα στην κατάλληλη θερμοκρασία πρόσδεσης για κάθε ζεύγος εκκινητών (Πίνακας 4) και επιμήκυνσης στους 72 °C για 40 δευτερόλεπτα,



**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

πριν την τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 7 λεπτά.

Τα προϊόντα της αντίδρασης διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτη αгарόζης 1.2% w/v και απεικονίστηκαν με υπεριώδες φως. Τα μοριακά μεγέθη προσδιορίστηκαν με την βοήθεια του δείκτη μοριακών βαρών (100 bp DNA ladder).

Τα προϊόντα της αντίδρασης αναλύθηκαν με τον αναλυτή DNA ABI3730xl (Macrogen Inc. Seoul, South Korea) με την χρήση του 600 LIZ™ ως πρότυπο μεγέθους (Applied Biosystems). Η οπτικοποίηση και ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε μέσω του λογισμικού Peak Scanner™ ver. 2.0 (Applied Biosystems).

**Πίνακας 4:** Μικροδορυφορικοί τόποι για την γονοτύπηση του είδους *T. delbrueckii*.

Μικροδορυφορικοί τόποι	Μοτίβο επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών	Αλληλουχία εκκινήτων		Φθορίζουσα χρωστική	Θερμοκρασία πρόσδεσης
		Forward	Reverse		
TD1A	CAA	AGATGCAACCACAATGGCAA	TGCGATTGAAACTGTTGATTG	HEX	50
TD1B	GT	TTCACAAGTAGATGCCGATGT	TCCCCTCCTTCAAGTTAAACA	HEX	51
TD2A	GTT	GATGATGATGGTGATGCGAA	TCTTACAGAAGTTTCCCGA	FAM	51
TD5A	GT	AGGGACCCCCACCTAAATTA	CGAAAAAGTGAAACTACCTCGT	FAM	51
TD6A	CAA/CAG	AACAAGGGCTTATCATCCATT	ACCCGCTTCTTCTTCTTT	FAM	55
TD7A	TTAA	GAGGGAGTGGTACTATGGTGG	ACGCAGTGGTGTCTTGAAT	HEX	48
TD8A	TTG/CTG	AAATCAGTCGAGTAGGTTGCG	TCCACCGGGAATGTTCACT	FAM	53

#### Τεχνολογικά χαρακτηριστικά

Μετά την ταυτοποίηση των απομονωθέντων ζυμών ακολούθησε η αξιολόγηση των τεχνολογικών και οιολογικών χαρακτηριστικών τους. Στον Πίνακα 7 φαίνεται το σύνολο και η κωδικοποίηση των στελεχών που αντιστοιχεί στο κάθε είδος και για τα οποία πραγματοποιήθηκε ο χαρακτηρισμός του οιολογικού τους δυναμικού. Συγκεκριμένα εξετάστηκαν η αντίσταση στην αιθανόλη και το θειώδη ανυδρίτη. Επιπλέον ελέγχθηκε η παραγωγή υδροθείου, β-γλυκοσιδάσης καθώς και βιογενών αμινών. Επίσης, αξιολογήθηκε η αντοχή σε και η ικανότητα παραγωγής τοξίνης “killer”.





**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

**Πίνακας 7:** Λίστα απομονωθέντων *Sachharomyces* και μη-*Sachharomyces* ζυμών που αξιολογήθηκαν ως προς τις τεχνολογικές τους ιδιότητες.

Είδη ζυμών	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Hanseniaspora spp.</i>			<i>T. delbrueckii</i>
		<i>H. opuntiae</i>	<i>H. uvarum</i>	<i>H. gulliermondii</i>	
Στελέχη ζυμών	OST2EFW1	OST1GW15	OST2BFW15	OSV2BFL1	OSV1EFL1
	OST1EFW3	OST2GW3	OSP2BFW5	OSV2EFL5	
	OST1EFW2	OST2GW9	OAM2BFW4	OAM1BFW16	
	OSP1EFW5	OST2GW11	OAM2BFW16		
	OST1EFW8	OAM1MFW1	OAM2MFW12		
	OST1EFW5				
	OSV1EFW1				
	OSP2EFW1				
	OAKEFW1				

Πριν από κάθε δοκιμή πραγματοποιήθηκε:

- Ανανέωση καλλιεργειών σε υγρό εργαστηριακό υπόστρωμα Yeast Peptone Dextrose (YPD) broth (24h, ολονύκτια, 28°C /180rpm)
- Προσδιορισμός πληθυσμού μικροσκοπικά (αιματοκυττόμετρο)
- Προσαρμογή του πληθυσμού στα επιθυμητά κατά περίπτωση (είδος δοκιμής) επίπεδα

### Δοκιμές

#### Αντοχή στην αιθανόλη

- 1lt γλεύκος διηθημένο
- Προσθήκη άγαρ (15 g/L) και ρύθμιση του pH στο 3.6 (HCl, 4N)
- Παστερίωση (20 min, 100 °C)
- Προσθήκη αιθανόλης στις επιθυμητές συγκεντρώσεις (10%, 12%, 14%, 16%, 18%) για ζύμες του είδους *S. cerevisiae* και (6, 8, 10, 12%) για μη-*Sachharomyces* ζύμες
- Εναπόθεση βιομάζας στελεχών (σταγονίδια, 10<sup>5</sup> cfu/ml) στο υπόστρωμα



**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

- Επώαση τρυβλίων (72 h, 26 °C)
- Ο βαθμός ανθεκτικότητας του κάθε στελέχους στην αιθανόλη αναφέρεται ως η ελάχιστη συγκέντρωση της αιθανόλης η οποία επιτρέπει την ανάπτυξή τους

#### Αντοχή στο SO<sub>2</sub>

- 1lt γλεύκος διηθημένο
- Προσθήκη αγαρ (15 g/L) και ρύθμιση του pH στο 3.6 (HCl, 4 N)
- Παστερίωση (20 min, 100 °C)
- Προσθήκη potassium metabisulfite (αποστείρωση με φίλτρο 0.2 μm) στις επιθυμητές συγκεντρώσεις (100 mg/l, 150 mg/l, 200 mg/l, 250 mg/l, 300 mg/l) για *S. cerevisiae* και (25, 50, 75, 100, 150 mg/l) για μη-*Sachharomyces* ζύμες
- Εναπόθεση βιομάζας στελεχών (σταγονίδια, 10<sup>5</sup> cfu/ml) στο υπόστρωμα
- Επώαση τρυβλίων (72 h, 26 °C)
- Ο βαθμός ανθεκτικότητας του κάθε στελέχους στο SO<sub>2</sub> αναφέρεται ως η ελάχιστη συγκέντρωση του SO<sub>2</sub> η οποία επιτρέπει την ανάπτυξή τους

#### Παραγωγή H<sub>2</sub>S

- Biggy agar (bismuth glucose glycine yeast)
- Ενοφθαλμισμός στελεχών (σταγονίδια) 10<sup>5</sup> cfu/ml
- Επώαση (24 h, 28 °C)
- Η αξιολόγηση γίνεται με την εξής κλίμακα: λευκό (0): καθόλου παραγωγή, υποκίτρινο/ώχρα (1): χαμηλή παραγωγή, καστανό (2): μεσαία παραγωγή, σκούρο καφέ (3): υψηλή παραγωγή



**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

#### *Παραγωγή β-γλυκοσιδάσης*

- GPY agar (αρβουτίνη, pH:5)
- Προσθήκη iron chloride (αποστείρωση με φίλτρο 0.2 μm) μετά την αποστείρωση του υλικού
- Γραμμική επίστρωση (streaking) του κάθε στελέχους σε τρυβλίο με GPY agar
- 15 μέρες επώαση στους 28 °C
- Στελέχη με δραστηριότητα β-γλυκοσιδάσης υδρολύουν την αρβουτίνη με αποτέλεσμα εμφάνιση καφέ σκούρου χρώματος γύρω από το streaking
- Η αξιολόγηση γίνεται με την εξής κλίμακα: λευκό(0):καθόλου παραγωγή, κίτρινο(1):μέτρια παραγωγή, καφέ(2):υψηλή παραγωγή

#### *Παραγωγή βιογενών αμινών*

- YPD (bromocresol purple)
- Αφήνεται βιομάζα ( $10^5$  cfu/ml) από κάθε στέλεχος σε τρυβλίο με διαφορετικό αμινοξύ (Ιστιδίνη, Φαινυλαλανίνη, Αργινίνη, Τρυπτοφάνη, Τυροσίνη, Λυσίνη)
- Επώαση (25 °C, 7 ημέρες)
- Ο σχηματισμός βιογενών αμινών υποδεικνύεται από μωβ φωτοστέφανο γύρω από την αποικία ως αποτέλεσμα αποκαρβοξυλίωσης των αμινοξέων.

#### *Φαινότυπος “killer”*

- YEPD-MB agar (pH:4.5, citrate: 1M)
- Προσθήκη χρωστικής (0.015% methylene blue) η οποία έχει αποστειρωθεί με φίλτρο 0.2 μm
- Επίστρωση στο YPD-MB του “ευαίσθητου” στελέχους  $10^4$  cfu/ml (CONTROL: UVAFERM NEMEA\_SENSITIVE)



**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

- Ενοφθαλμισμός (σταγονίδια,  $10^4$  cfu/ml) των στελεχών killer (CONTROL: Vin 13 και ZYMAFLORE VIN BLANC)
- Επώαση στους 18 για 5 μέρες
- Τα στελέχη χαρακτηρίζονται ως killer (K+) όταν το spot περιβάλλεται από μια ευκρινή ζώνη αναστολής. Τα στελέχη ελέγχονται και ως προς την αντοχή (R+-R)

#### Οιολογικά χαρακτηριστικά των στελεχών *T.delbrueckii*

Προκειμένου να διερευνηθεί εάν η γενετική ποικιλομορφία των στελεχών *T. delbrueckii* έχει αντίκτυπο στους οιολογικούς φαινοτύπους, διαφορετικοί γονότυποι *T. delbrueckii* δοκιμάστηκαν σε ζυμώσεις εργαστηριακής κλίμακας. Οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν με διπλή επανάληψη στους 20°C σε φιάλες που περιείχαν 110 ml παστεριωμένου γλεύκους σταφυλιών της λευκής ποικιλίας “Μοσχοφίλερο” (σάκχαρα 213.6 g/L; pH=3.35; ολική οξύτητα 3.6 g/L, ως τρυγικό οξύ; αφομοίωσιμο άζωτο (YAN) 230 mg/L). Το γλεύκος εμβολιάστηκε με στελέχη *T. delbrueckii* σε τελική συγκέντρωση  $10^6$  cfu/ml. Η πορεία της ζύμωσης παρακολούθηθηκε καθημερινά από την απώλεια του βάρους λόγω της εξάτμισης του διοξειδίου του άνθρακα και οι ζυμώσεις θεωρήθηκαν πλήρεις όταν ο ρυθμός της απώλειας του βάρους ήταν σταθερός για 2 ημέρες. Ο ρυθμός της ζύμωσης εκτιμήθηκε με το πρόγραμμα DMfit. Το pH, η ολική και η πτητική οξύτητα προσδιορίστηκε σύμφωνα με τα πρωτόκολλα του Διεθνούς Οργανισμού Αμπέλου και Οίνου (OIV). Το μηλικό και το οξικό οξύ, η γλυκερόλη, η ακεταλδεΐδη, το αμμωνιακό άζωτο και το ολικό θειώδες προσδιορίστηκαν με ενζυμικό αναλυτή Miura One (I.S.E. S.r.l – Ιταλία Ρώμη). Τα σάκχαρα (γλυκόζη, φρουκτόζη), η αιθανόλη και η παραγωγή ηλεκτρικού οξέος ποσοτικοποιήθηκαν με χρήση ενζυμικών κιτ (R-Biopharm AG).

#### Ανάλυση δεδομένων



**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Οι διαφορές στη σύνθεση των κοινοτήτων των ζυμών ανά αμπελώνα και περιοχή εξετάστηκαν με ανάλυση ομοιοτήτων (Analysis of Similarities – ANOSIM) με το λογισμικό PAST (Hammer et al., 2001). Ως δείκτης για την εκτίμηση της βιοποικιλότητας, ορίστηκε ο λόγος των διαφορετικών γονοτύπων (*Saccharomyces* ή μη-*Saccharomyces* ζυμών) και των συνολικών απομονώσεων (Schuller et al. 2005). Τα δενδρογράμματα κατασκευάστηκαν με την ιεραρχική μέθοδο ομαδοποίησης (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean – UPGMA), με βάση το συντελεστή συσχέτισης Dice χρησιμοποιώντας το λογισμικό PAST (Hammer et al., 2001). Ο ρυθμός της ζύμωσης των στελεχών *T. delbrueckii* εκτιμήθηκαν με το πρόγραμμα DMfit. Οι διαφορές στα κινητικά και οινολογικά προφίλ των στελεχών *T. delbrueckii* αξιολογήθηκαν με την ανάλυση διασποράς (Analysis of Variance, ANOVA). Η πολυμεταβλητή ανάλυση διακύμανσης (Permutational multivariate analysis of variance, PERMANOVA) χρησιμοποιήθηκε για την σύγκριση των στελεχών *T. delbrueckii* λαμβάνοντας υπ' όψιν όλους τους κινητικούς και οινολογικούς παράγοντες που αναλύθηκαν. Η ανάλυση γραμμικής διάκρισης (Linear discriminant analysis, LDA) εφαρμόστηκε στα κινητικά και οινολογικά χαρακτηριστικά των στελεχών *T. delbrueckii*.

## **Αποτελέσματα**

### Σύσταση της ζυμοχλωρίδας στους αμπελώνες της Σαντορίνης και της Αττικής

Συνολικά 595 απομονώσεις ζυμών από δείγματα σταφυλιών και από το αρχικό και το τελικό στάδιο της αλκοολικής ζύμωσης ταυτοποιήθηκαν με ανάλυση πολυμορφισμού μήκους θραυσμάτων περιορισμού της 5.8S-ITS περιοχής του ριβοσωμικού DNA (Σχήμα 1 & 2). Τα μεγέθη των προϊόντων PCR ομαδοποιούνται σε 5 ομάδες με μήκη 380, 750, 800, 830 και 900 bp. Με την χρήση των περιοριστικών ενδονουκλεασών *Hinfl*, *HaeIII*, *HhaI* και *DdeI* ή *DraI* προέκυψαν 12 διαφορετικά

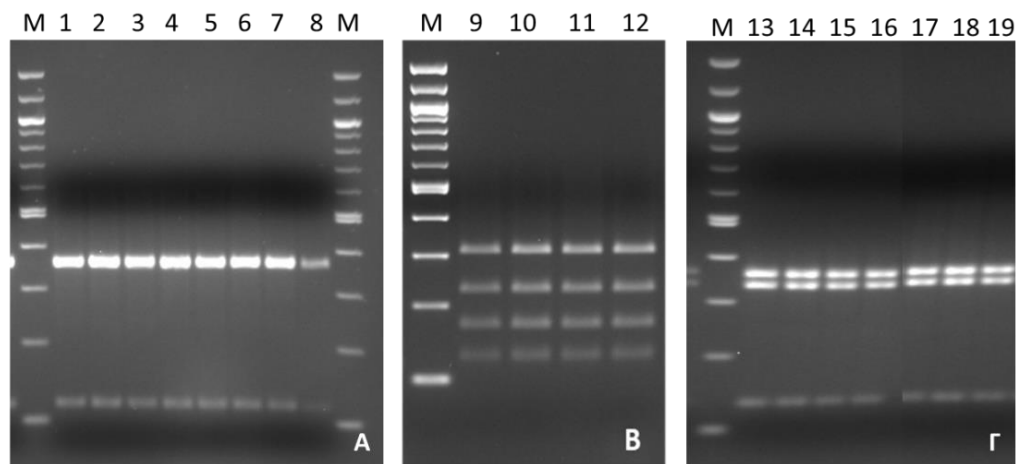


**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



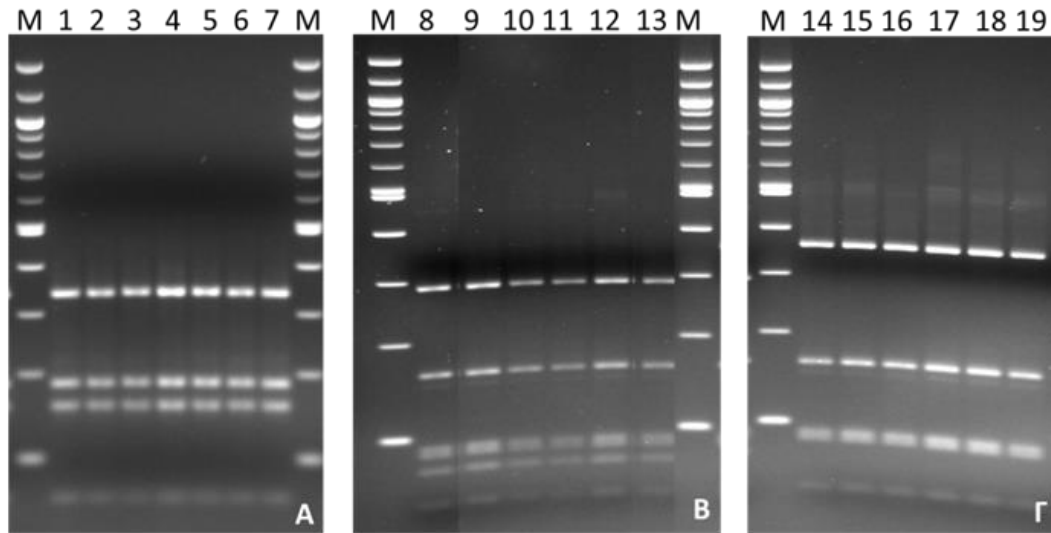
Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

πρότυπα περιορισμού. Η σύγκριση των προτύπων περιορισμού των απομονωμένων ζυμών με αντίστοιχα δημοσιευμένων στελεχών ταξινόμησε τις ομάδες των απομονώσεων στα είδη *Candida friedrichii*, *C. glabrata*, *Debaromyces* sp., *Hanseniaspora guilliermondii*, *H. opuntiae*, *H. uvarum*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Meyerozyma caribbica*, *Pichia kudriavzevii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* και *Wickerhamomyces subpelliculosus* (Esteve-Zarzoso et al. 1999) (Πίνακας 8).



**Σχήμα 1:** Αντιπροσωπευτικά πρότυπα περιορισμού της 5.8S-ITS περιοχής των απομονώσεων *S. cerevisiae* με *Hinfl* (Α), *HaeIII* (Β) και *HhaI* (Γ). Μ: δείκτης μοριακών βαρών 100 bp DNA Ladder (New England Biolabs), 1: OSP2BFY1, 2: OSP2BFY2, 3: OSP2BFY3, 4 OSP2BFY4, 5: OSP2BFY5, 6: OSP2BFY6, 7: OSP2BFY7, 8: OSP2BFY8, 9: OSV1BFW1, 10: OSV1BFW2, 11: OSV1BFW3, 12: OSV1BFW4, 13: OST2EFY1, 14: OST2EFY2, 15: OST2EFY3, 16: OST2EFY4, 17: OST2EFY9, 18: OST2EFY10, 19: OST2EFY11

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



**Σχήμα 2:** Αντιπροσωπευτικά πρότυπα περιορισμού της 5.8S-ITS περιοχής των απομονώσεων *Hanseniaspora* sp. με *HinfI* (A) και *DdeI* (B&Γ). M: δείκτης μοριακών βαρών 100 bp DNA Ladder (New England Biolabs), 1: OSV2BFL1, 2: OSV2BFL2, 3: OSV2BFL3, 4 OSV2BFL4, 5: OSV2BFL5, 6: OSV2BFL6, 7: OSV2BFL7, 8: OST2BFW1, 9: OST2BFW5, 10: OST2BFW8, 11: OST2BFW9, 12: OST2BFW12, 13: OST2BFW14, 14: OSP1BFW1, 15: OSP1BFW2, 16: OSP1BFW3, 17: OSP1BFW12, 18: OSP1BFW13, 19: OSP1BFW14



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



ανάπτυξη - εργασία - αλληλεγγύη

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

**Πίνακας 8:** Μεγέθη της 5.8S-ITS περιοχής και των θραυσμάτων περιορισμού των ζυμών.

Είδος	Προϊόν PCR (bp)	Θραύσματα περιορισμού (bp)				
		<i>Hinfl</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HhaI</i>	<i>DdeI</i>	<i>DraI</i>
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	380	200+190	280+100	220+90		
<i>Pichia kudriavzevii</i>	500		390+90	210+180+80+70		
<i>Candida friedrichii</i>	600	320+320	400+120+90	290+210+60		
<i>Wickerhamomyces subpelliculosus</i>	600		600	310+270+95+70		
<i>Debaryomyces sp.</i>	620		500	290+280		
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	750	330+190+170	750	320+315+100	360+180+85+70+50	420+150+130+30
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	750	330+190+170	750	320+315+100	360+180+85+70+50	420+300+30
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	750	330+190+170	750	320+315+100	290+180+90+85+75+50	
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	800	410+390	800	315+220+140+100		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	830	385+380+120	320+230+170+135	380+370+130		
<i>Meyerozyma caribbica</i>	850		670+230	400+180+160		
<i>Candida glabrata</i>	900	350+270+265	390+200+170+150	420+140+80		

Οι ζύμες που απομονώθηκαν από τους αμπελώνες της Σαντορίνης αντιστοιχούν στα είδη *H. guilliermondii*, *H. opuntiae*, *H. uvarum*, *M. pulcherrima*, *S. cerevisiae* και *C. glabrata* (Σχήμα 3). Στα δείγματα σταφυλιών OST1 και OST2 της Σαντορίνης απομονώθηκε το είδος *H. opuntiae* ενώ στα υπόλοιπα δείγματα σταφυλιών της Σαντορίνης (OSV1, OSV2, OSP1 και OSP2) οι πληθυσμοί των ζυμών ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης ( $<1 \log_{10}$  cfu/ml) (Σχήμα 3). Σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις απομονώθηκαν και τα είδη *Meyerozyma caribbica*, *Pichia kudriavzevii*, *Wickerhamomyces subpelliculosus* και *Debaromyces sp.* Στο αρχικό στάδιο της αλκοολικής ζύμωσης κυρίαρχο ήταν το είδος *H. uvarum* (54%), ενώ σημαντικό ποσοστό κατείχαν και τα είδη *H. guilliermondii* (25%) και *S. cerevisiae* (18.3%) (Σχήμα 3). Σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις απομονώθηκε το είδος *Candida*



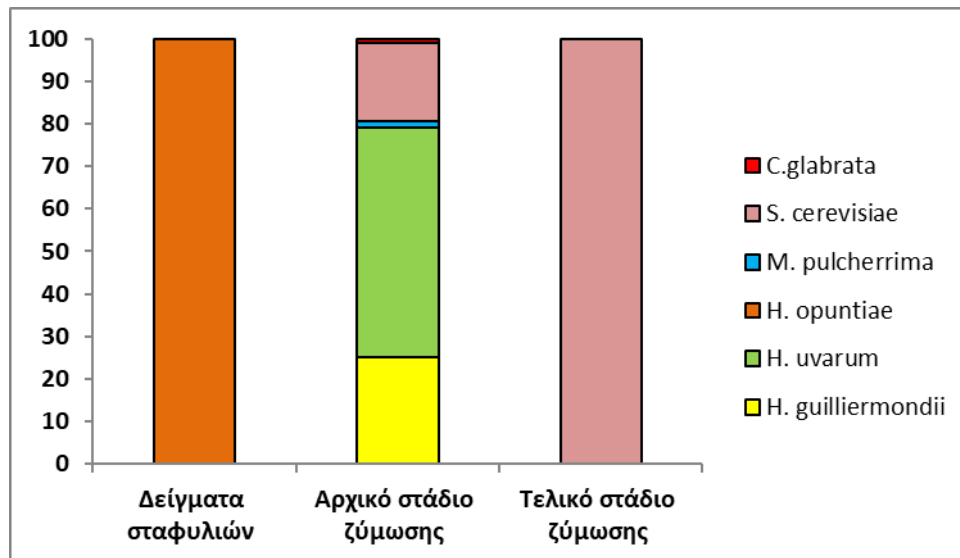


**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

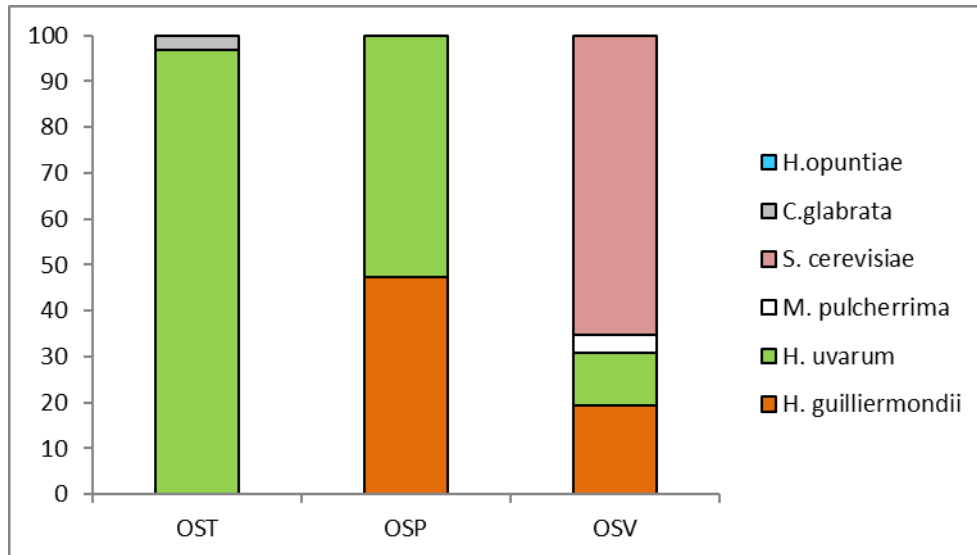
*friedrichii*. Παρατηρήθηκε ότι το είδος *H. uvarum* βρέθηκε σε όλους τους αμπελώνες της Σαντορίνης αλλά κατείχε υψηλό ποσοστό στους αμπελώνες OST και OSP. Στον αμπελώνα OSV υψηλό ποσοστό κατείχε το είδος *S.cerevisiae* (Σχήμα 4). Στα δείγματα της Σαντορίνης η αλκοολική ζύμωση ολοκληρώθηκε από το *S. Cerevisiae*. Στο 50% των δειγμάτων ανιχνεύθηκαν σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις τα είδη *T. delbrueckii* και *H. guilliermondii*.



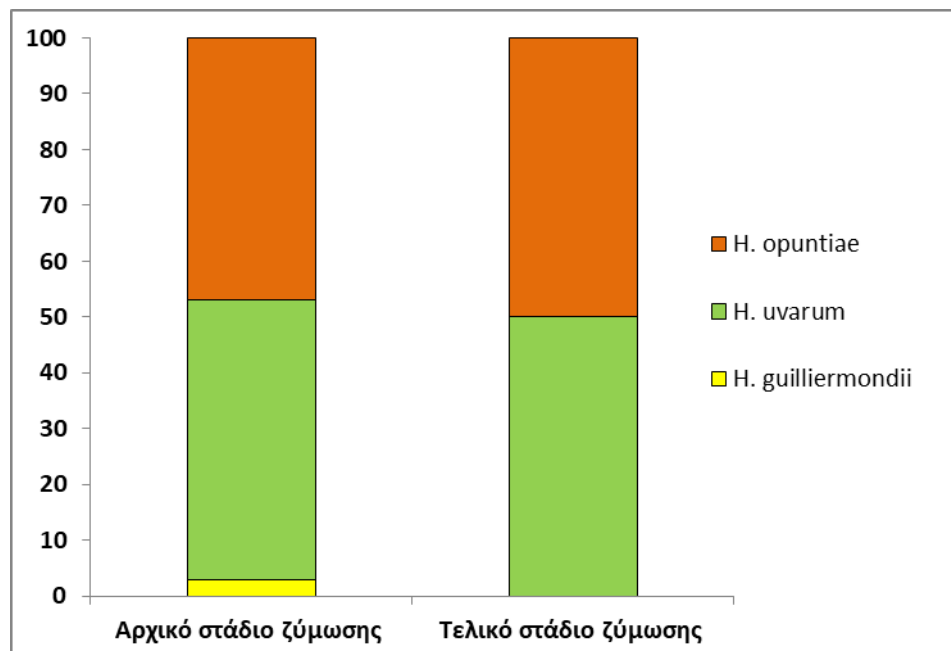
**Σχήμα 3:** Σύνθεση των κοινοτήτων των ζυμών στις ράγες, στα γλεύκη και τους οίνους της Σαντορίνης.

Στους αμπελώνες της Αττικής (ποικιλία 'Σαββατιανό') βρέθηκαν τα είδη που ανήκουν στο γένος *Hanseniaspora* (Σχήμα 5). Στα δείγματα σταφυλιών της Αττικής (OAM1 και OAM2) οι πληθυσμοί των ζυμών ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης ( $<1 \log_{10}$  cfu/ml). Στο αρχικό στάδιο της αλκοολικής ζύμωσης κυρίαρχα ήταν τα είδη *H. uvarum* (50%) και *H. opuntiae* (47%). Τα δείγματα της Αττικής ζυμώθηκαν μερικώς και τα είδη *H. uvarum* και *H. opuntiae* παρέμειναν κυρίαρχα καθ' όλη την διάρκεια της ζύμωσης.

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



**Σχήμα 4:** Σύθεση των κοινοτήτων των ζυμών των αμπελώνων της Σαντορίνης στο αρχικό στάδιο της αλκοολικής ζύμωσης.



**Σχήμα 5:** Σύθεση των κοινοτήτων των ζυμών στους αμπελώνες της Αττικής (ποικιλία 'Σαββατιανό').



**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Στους αμπελώνες της Αττικής (ποικιλία 'Ασύρτικο'- τρυγητός 2018), το 33.3% των δειγμάτων γλευκών αποζυμώθηκε, ενώ το 66.7% δεν ζυμώθηκε. Στο δείγμα που ολοκληρώθηκε η αλκοολική ζύμωση απομονώθηκε το είδος *S. cerevisiae*. Αντίθετα, στους αμπελώνες της Αττικής την χρονιά 2019 τα δείγματα γλευκών ζυμώθηκαν μερικώς. Στα δείγματα σταφυλιών (AK1 και AK2) οι πληθυσμοί των ζυμών ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης ( $<1 \log_{10} \text{ cfu/ml}$ ). Στο αρχικό και τελικό στάδιο της αλκοολικής ζύμωσης απομονώθηκε το είδος *H. guilliermondii* (100%).

Η ανάλυση ομοιότητας (ANOSIM) δεν αποκάλυψε διαφορές στη σύνθεση των κοινοτήτων των ζυμών ανά αμπελώνα, χρονιά και περιοχή ( $p > 0.05$ ). Περαιτέρω εξετάστηκε εάν υπάρχει διαφορά μεταξύ της ζυμοχλωρίδας της Σαντορίνης που παρόντος τρυγητού και με τις αντίστοιχες προηγούμενων τρυγητών. Σε γενικές γραμμές, η ζυμοχλωρίδα της Σαντορίνης παρουσίασε σταθερή δομή στον χρόνο με την διαφορά να εντοπίζεται ως προς το κυρίαρχο είδος μεταξύ των τρυγητών, όπου παρατηρήθηκε εναλλαγή μεταξύ των ειδών *H. oruntiae*, *H. guilliermondii* και *H. unarum*. Στην συνέχεια εξετάστηκε εάν υπάρχει διαφορά μεταξύ των κοινοτήτων των ζυμών της Σαντορίνης και άλλων αμπελουργικών περιοχών της Ελλάδας. Τόσο η ανάλυση (ANOSIM) όσο και οι δοκιμές μεταβλητής ανάλυσης διακύμανσης (PERMANOVA) έδειξαν ότι η σύνθεση των ειδών των κοινοτήτων ζυμών διέφερε σημαντικά μεταξύ των περιοχών (ANOSIM:  $R = 0.401$ ,  $p = 0.001$ ) (Chalvantzi et al 2021).

#### Βιοποικιλότητα των πληθυσμών *S. cerevisiae* στους αμπελώνες της Σαντορίνης και της Αττικής

Στους αμπελώνες της Σαντορίνης εντοπίστηκαν 8 διαφορετικοί γονότυποι από τις 165 απομονώσεις που αντιστοιχούν στο είδος *S. cerevisiae* (Σχήμα 6). Το ποσοστό της βιοποικιλότητας του *S. cerevisiae* στους αμπελώνες της Σαντορίνης εκτιμήθηκε στο 4.8%. Από τους 8 γονότυπους οι 4 είναι μοναδικοί ενώ οι υπόλοιποι



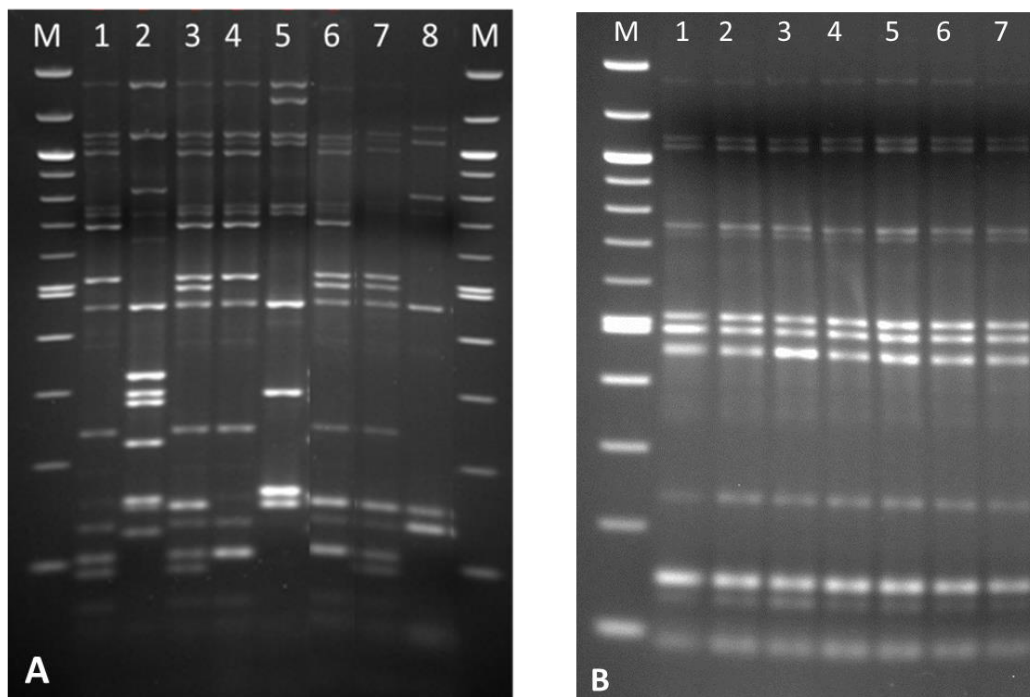
**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

4 βρέθηκαν σε παραπάνω από έναν αμπελώνα (Σχήμα 7). Στο τέλος κάθε ζύμωσης βρέθηκαν 1 έως 6 διαφορετικοί γονότυποι, ενώ κάθε αμπελώνας φιλοξένησε 3 έως 6 διαφορετικούς γονότυπους (Σχήμα 7). Ο γονότυπος G1 ήταν ο μοναδικός που απομονώθηκε και από τους 3 αμπελώνες της Σαντορίνης, ακολουθούμενος από τους γονότυπους G2, G3 και G4 (Πίνακας 9).

Στον αμπελώνα της Αττικής (ποικιλία 'Ασύρτικο') εντοπίστηκε 1 γονότυπος από τις 16 απομονώσεις *S. cerevisiae* (Σχήμα 6). Το ποσοστό της βιοποικιλότητας του *S. cerevisiae* εκτιμήθηκε στο 6.3%.



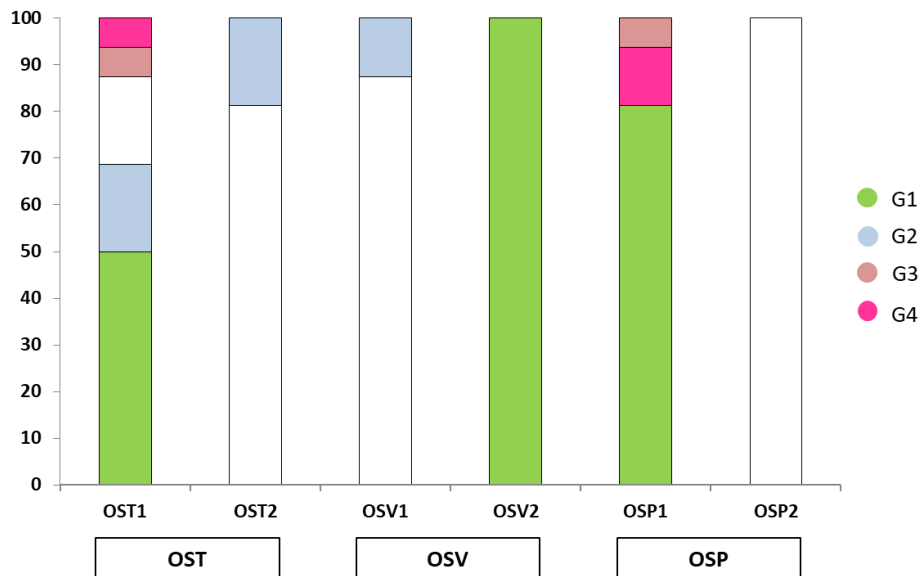
**Σχήμα 6:** Αντιπροσωπευτικά gel των διαφορετικών γονοτύπων *S. cerevisiae* με ανάλυση 8 αλληλουχιών. Α) Μ: δείκτης μοριακών βαρών 100 bp DNA Ladder 1: OSP1EFW 5 (G4), 2: OST1EFW 3 (G2), 3: OSV2EFW 1 (G1), 4: OST1EFW 5 (G5), 5: OST2EFW 1 (G6), 6: OST1EFW 8 (G3), 7: OSP2EFW 1 (G8), 8: OAK3EFW 1 (G9) Β) Μ: δείκτης μοριακών βαρών 100 bp DNA Ladder 1: OSV1EFW 1 (G7), 2: OSV1EFW 2 (G7), 3: OSV1EFW 3 (G7), 4: OSV1EFW 4 (G7), 5: OSV1EFW 5 (G7), 6: OSV1EFW 6 (G7), 7: OSV1EFW 7 (G7).



**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



**Σχήμα 7:** Εμφάνιση των γονοτύπων *S. cerevisiae* (%) σε διαφορετικά δείγματα (OST1, OST2, OSV1, OSV2, OSP1, OSP2) στους 3 αμπελώνες της Σαντορίνης (OST, OSV, OSP). Τα διαφορετικά χρώματα αντιστοιχούν σε γονότυπους που απομονώθηκαν από τουλάχιστον δύο αμπελώνες, ενώ τα λευκό υποδεικνύει γονότυπους απομονωμένους από έναν μόνο αμπελώνα.

**Πίνακας 9:** Εμφάνιση των διαφορετικών γονότυπων *S. cerevisiae* στους αμπελώνες της Σαντορίνης (%).

Γονότυποι	Αμπελώνες (%)
G1	100
G2	66.7
G3	66.7
G4	66.7
G5	33.3
G6	33.3
G7	33.3
G8	33.3

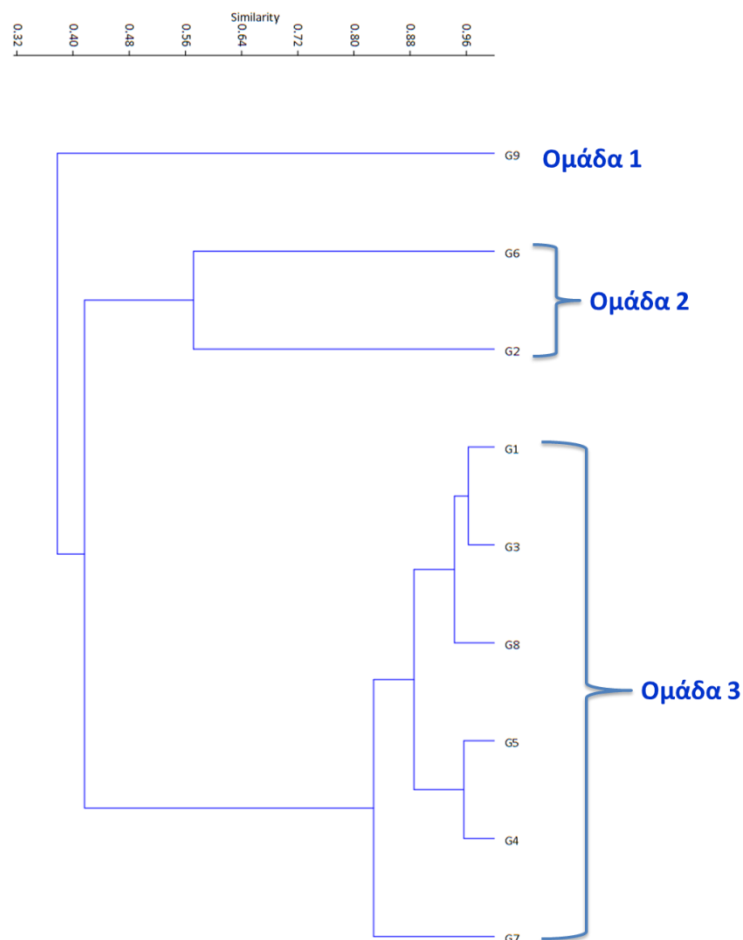


**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Οι γενετικές αποστάσεις μεταξύ των απομονώσεων *S. cerevisiae* εκτιμήθηκαν με την κατασκευή δενδρογράμματος (Σχήμα 8). Το δενδρογράμμα των διαφορετικών γονοτύπων *S. cerevisiae* αποκάλυψε τρεις διακριτές ομάδες. Οι ομάδες 2 και 3 αποτελούνται αποκλειστικά από γονοτύπους που απομονώθηκαν από τους αμπελώνες της Σαντορίνης. Στην ομάδα 1 τοποθετήθηκε ο γονότυπος που απομονώθηκε από την Αττική. Οι γονότυποι της ομάδας 3 έδειξαν υψηλή γενετική ομοιότητα μεταξύ τους. Ο γονότυπος G9 ομαδοποιήθηκε ξεχωριστά από τους γονοτύπους που απομονώθηκαν από την Σαντορίνη.



**Σχήμα 8:** Δενδρογράμμα των διαφορετικών γονοτύπων *S. cerevisiae* που προέκυψε με την μέθοδο ομαδοποίησης UPGMA.



**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ

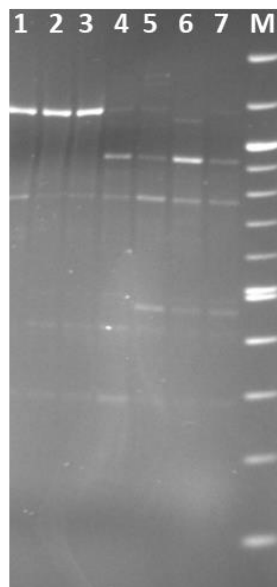


Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

## Βιοποικιλότητα των μη-*Saccharomyces* ζυμών στους αμπελώνες της Σαντορίνης και της Αττικής

### 1. Γένος *Hanseniaspora*

Τα *H. uvarum*, *H. oruntiae* και *H. guilliermondii* αποτέλεσαν τα πιο συχνά απαντώμενα είδη στους αμπελώνες της Σαντορίνης και της Αττικής τόσο στα δείγματα σταφυλιών όσο και στα αντίστοιχα γλεύκη στο αρχικό και τελικό στάδιο της αλκοολικής ζύμωσης. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμός τους είναι η ανάλυση με τυχαία ενίσχυση τμημάτων πολυμορφικού DNA από την οποία προέκυψαν διαφορετικοί γονότυποι (Σχήμα 10, 11 & 12). Ο αριθμός των διαφορετικών στελεχών των ειδών του γένους *Hanseniaspora* παρουσιάζεται στον Πίνακα 10.



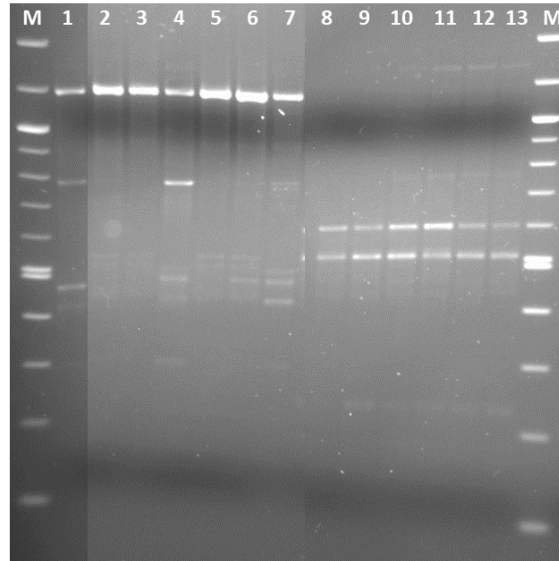
**Σχήμα 10:** Αντιπροσωπευτικό gel των γονοτύπων *H. uvarum* με τυχαία ενίσχυση τμημάτων πολυμορφικού DNA. M: δείκτης μοριακών βαρών 100 bp DNA Ladder 1: OSV2BFL 3 (Σαντορίνη), 2: OSV2BFL 4 (Σαντορίνη), 3: OSV2BFL 5 (Σαντορίνη), 4: OAM2BFW 1 (Αττική), 5: OAM2BFW 4 (Αττική), 6: OAM2BFW 16 (Αττική), 7: OAM2BFW 8 (Αττική).



**ΕΠΑνΕΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



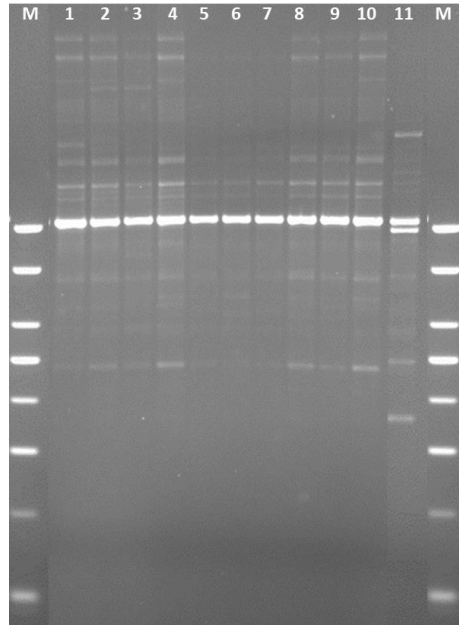
Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



**Σχήμα 11:** Αντιπροσωπευτικό gel των γονοτύπων *H. oruntiae* με τυχαία ενίσχυση τμημάτων πολυμορφικού DNA. M: δείκτης μοριακών βαρών 100 bp DNA Ladder 1: OST1GW 1 (Σαντορίνη), 2: OST1GW 15 (Σαντορίνη), 3: OST2GW 1 (Σαντορίνη), 4: OST2GW 3 (Σαντορίνη), 5: OST2GW 6 (Σαντορίνη), 6: OST2GW 9 (Σαντορίνη) 7: OST2GW 11 (Σαντορίνη), 8: OAM1BFW 15 (Αττική), 9: OAM1EFW 1 (Αττική), 10: OAM1EFW 4 (Αττική), 11: OAM1EFW 8 (Αττική), 12: OAM1EFW 11 (Αττική), 13: OAM1EFW 12 (Αττική).



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



**Σχήμα 12:** Αντιπροσωπευτικό gel των γονοτύπων *H. guilliermondii* που απομονώθηκαν από αμπελώνες της Αττικής την χρονιά 2019. M: δείκτης μοριακών βαρών 100 bp DNA Ladder 1: AK2BFW6, 2: AK2BFW12, 3: AK2BFW14, 4: AK2BFW16, 5: AK1EFW1, 6: AK1EFW3, 7: AK1EFW9, 8: AK1EFW15, 9: AK1EFW16, 10: AK2EFW1, 11: AK2EFW8.

**Πίνακας 10:** Ο αριθμός των διαφορετικών γονοτύπων των ειδών του γένους *Hanseniaspora* στους αμπελώνες της Σαντορίνης και της Αττικής.

Περιοχή	Έτος δειγματοληψίας	Είδος	Αριθμός των απομονώσεων	Αριθμός των διαφορετικών γονοτύπων	Ποσοστό βιοποικιλότητας (%)
Σαντορίνη	1 <sup>ο</sup>	<i>H. uvarum</i>	56	2	3.6%
		<i>H. oruntiae</i>	26	4	15.4%
		<i>H. guilliermondii</i>	82	2	2.4%
Αττική	1 <sup>ο</sup>	<i>H. uvarum</i>	28	3	10.7%
		<i>H. oruntiae</i>	46	1	2.2%
	2 <sup>ο</sup>	<i>H. guilliermondii</i>	2	1	-
		<i>H. guilliermondii</i>	116	2	1.7%



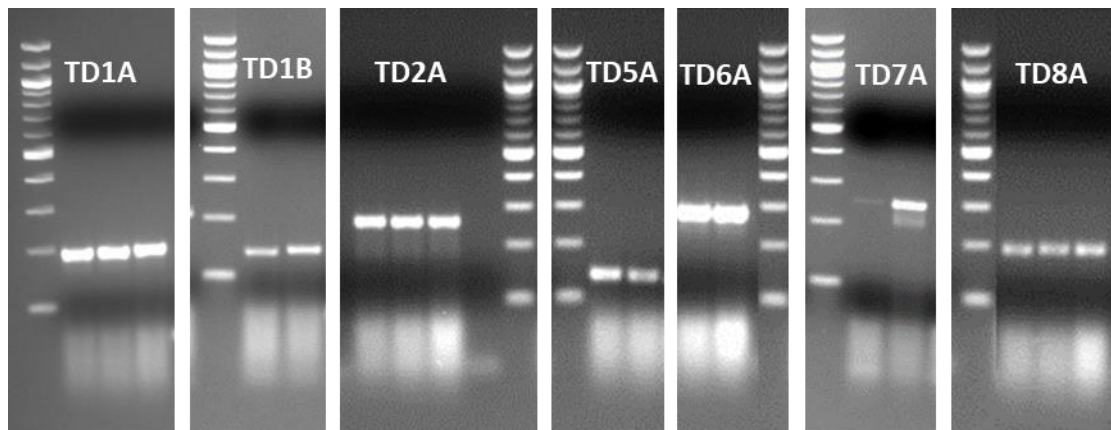
**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

## 2. *Torulaspota delbrueckii*

Το είδος *T. delbrueckii* απομονώθηκε μόνο από τους αμπελώνες Σαντορίνης. Η ανάλυση μικροδορυφορικού DNA απέδειξε την παρουσία 1 γονότυπου από τις 17 συνολικές απομονώσεις. Τα προϊόντα ενίσχυσης των στελεχών *T. delbrueckii* απεικονίζεται στο Σχήμα 13. Το ακριβές μέγεθος (bp) των προϊόντων ενίσχυσης του στελέχους OSV1EFL1 παρουσιάζονται στο Πίνακα 11.



**Σχήμα 13:** Τα προϊόντα ενίσχυσης των στελεχών *T. delbrueckii* με ανάλυση μικροδορυφορικού DNA.

**Πίνακας 11:** Ακριβές μήκος (bp) των προϊόντων ενίσχυσης του στελέχους OSV1EFL1.

Μικροδορυφορικοί τόποι	Μήκος (bp)
TD1A	185
TD1B	142
TD2A	260
TD5A	129
TD6A	277
TD7A	250
TD8A	188



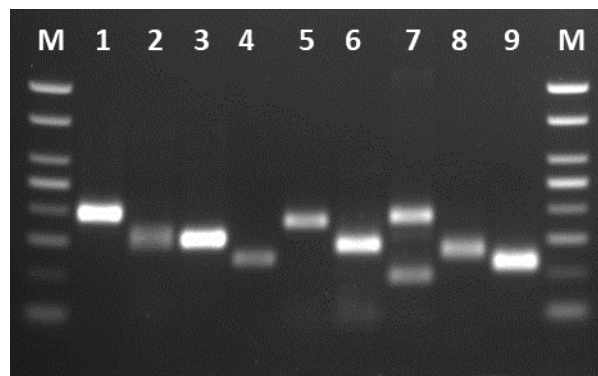
**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

### 3. *Metschnikowia pulcherrima*

Το είδος *M. pulcherrima* απομονώθηκε μόνο από τους αμπελώνες Σαντορίνης στα δείγματα σταφυλιών και στο αρχικό στάδιο της αλκοολικής ζύμωσης. Η ανάλυση μικροδορυφορικού DNA απέδειξε την παρουσία 1 γονότυπου από τις 8 συνολικές απομονώσεις. Τα προϊόντα ενίσχυσης και το ακριβές μήκος (bp) των προϊόντων ενίσχυσης του στελέχους OSV2BFW9 παρουσιάζονται στο Σχήμα 14 και στον Πίνακα 12.



**Σχήμα 14:** Τα προϊόντα ενίσχυσης του στελέχους OSV2BFW9 με ανάλυση μικροδορυφορικού DNA. M: δείκτης μοριακών βαρών 100 bp DNA Ladder 1: MP1, 2: MP2, 3: MP3, 4: MP5, 5: MP6, 6: MP9, 7: MP12, 8: MP14, 9: MP15.



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

**ΕΠΑνΕΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



ανάπτυξη - εργασία - αλληλεγγύη

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Τεχνολογικά χαρακτηριστικά απομονωθέντων ζυμών

Αντοχή σε αιθανόλη και SO<sub>2</sub>

**Πίνακας 13:** Αντοχή απομονωθέντων ζυμών σε αιθανόλη και SO<sub>2</sub>

Είδη ζυμών	Απομονώσεις	Συγκέντρωση αιθανόλης%	Συγκέντρωση SO <sub>2</sub> (mg)
<i>S. cerevisiae</i>	OST2EFW1	10	300
	OST1EFW3	10	300
	OST1EFW2	12	300
	OSP1EFW5	12	300
	OST1EFW8	12	300
	OST1EFW5	10	300
	OSV1EFW1	10	300
	OSP2EFW1	12	300
	OAKEFW1	10	300
	OST1GW15	<6	100
<i>H. opuntiae</i>	OST2GW3	<6	100
	OST2GW9	<6	100
	OST2GW11	<6	100
	OAM1MFW1	6	100
	OST2BFW15	<6	100
	OSP2BFW5	<6	100
	OAM2BFW4	<6	100
<i>H. uvarum</i>	OAM2BFW16	6	100
	OAM2MFW12	<6	100
	OSV2BFL1	6	100
<i>H. gulliermondii</i>	OSV2EFL5	6	100
	OAM1BFW16	<6	100
<i>T. delbrueckii</i>	OSV1EFL1	6	200



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

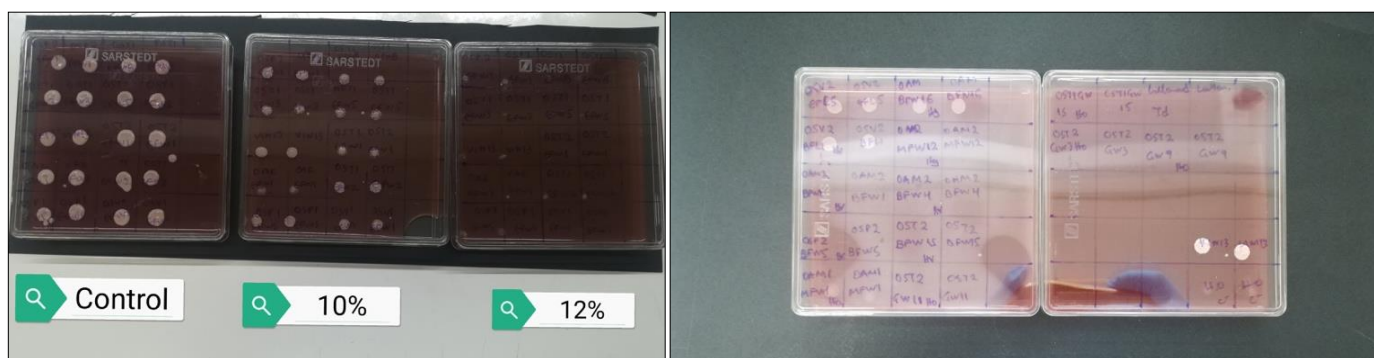
ΕΠΑνΕΚ 2014-2020  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



ανάπτυξη - εργασία - αλληλεγγύη

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Οι δοκιμές αντοχής των απομονωθέντων ζυμών σε αιθανόλη και SO<sub>2</sub> έδειξαν μικρή παραλλακτικότητα -ως προς την ανθεκτικότητα- μεταξύ απομονώσεων του ίδιου είδους (Πίνακας 13 και Σχήμα 15 και 16) με το 55% των *S. cerevisiae* να εμφανίζει ικανότητα ανάπτυξης σε συγκέντρωση αιθανόλης 12% και το 45% σε συγκέντρωση 10%. Ως προς τις μη-*Saccharomyces* ζύμες δε βρέθηκε κάποια απομόνωση ανθεκτική σε συγκέντρωση αιθανόλης μεγαλύτερη του 6%. Σε ότι αφορά την ανθεκτικότητα σε SO<sub>2</sub> τα αποτελέσματα ανέδειξαν τα 300, 200 και 100mg ως τις μέγιστες επιτρεπόμενες συγκεντρώσεις για την ανάπτυξη των *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii* και *Hanseniaspora spp.* αντίστοιχα.



**Σχήμα 15:** Ικανότητα αύξησης απομονωθέντων ζυμών σε τρυβλία μούστου με διαφορετικές συγκεντρώσεις αιθανόλης. Α) Αντοχή απομονώσεων *S. cerevisiae* σε συγκεντρώσεις αιθανόλης 10 και 12%, Β) Αντοχή απομονώσεων *Hanseniaspora* σε συγκέντρωση αιθανόλης 6%.



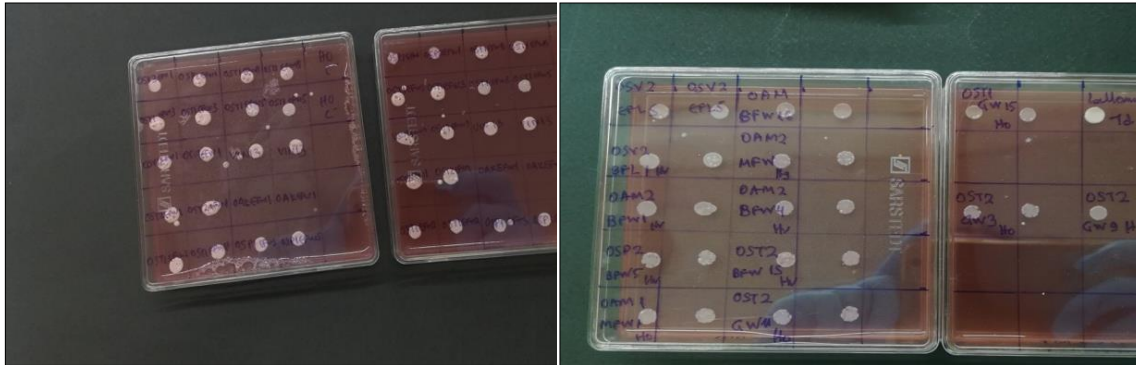
Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

ΕΠΑνεΚ 2014-2020  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



ανάπτυξη - εργασία - αλληλεγγύη

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



**Σχήμα 16:** Ικανότητα αύξησης απομονωθέντων ζυμών σε τρυβλία μούστου με διαφορετικές συγκεντρώσεις αιθανόλης. Α) Αντοχή απομονώσεων *S. cerevisiae* σε συγκέντρωση SO<sub>2</sub> 300mg, Β) Αντοχή απομονώσεων *Hanseniaspora* σε συγκέντρωση SO<sub>2</sub> 100mg.

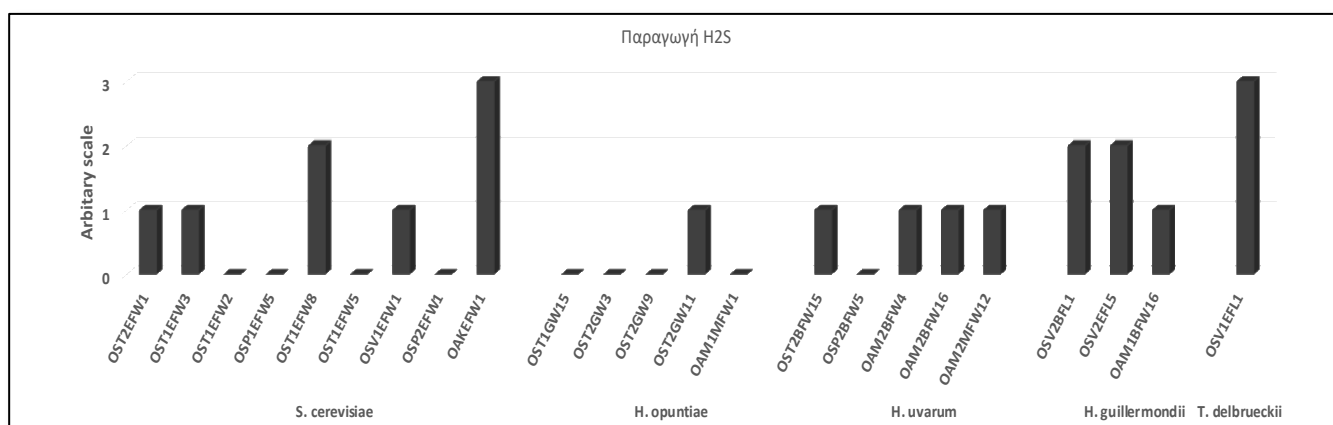
### Παραγωγή H<sub>2</sub>S

Για την αξιολόγηση της παραγωγής H<sub>2</sub>S από τις απομονωθέντες ζύμες εκτιμήθηκε όπως αναφέρθηκε παραπάνω το χρώμα των αποικιών τους σε BIGGY agar (Σχήμα 17). Μεταξύ των απομονώσεων *S. cerevisiae* εντοπίστηκαν δυο στελέχη που εμφάνισαν μέτρια και υψηλή παραγωγή διοξειδίου του θείου αντίστοιχα ενώ τα υπόλοιπα έδειξαν χαμηλή ή καθόλου παραγωγή (Σχήμα 18). Οι απομονώσεις του γένους *Hanseniaspora* είχαν διαφορές μεταξύ των ειδών στην παραγωγή H<sub>2</sub>S με τα *H. oruntiae* σχεδόν στο σύνολό τους να μην παράγουν καθόλου H<sub>2</sub>S, τα *H. uvarum* να δείχνουν μικρή παραγωγή ενώ τα *H. guillermondii* να εμφανίζουν μικρή έως μέτρια παραγωγή. Το *T. delbrueckii* εμφάνισε υψηλή παραγωγή H<sub>2</sub>S.

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



**Σχήμα 17:** Ικανότητα αύξησης και παραγωγής καστανού χρωματισμού των απομονωθέντων ζυμών σε τρυβλία με BIGGY άγαρ.



**Σχήμα 18:** Ικανότητα παραγωγής H<sub>2</sub>S από τις απομονωθέντες ζύμες. Οι κάθετες μπάρες μπορεί να έχουν ακέραιες τιμές από 0 έως 3 οι οποίες αντιστοιχούν σε αποχρώσεις του καφέ και περιγράφουν το βαθμό παραγωγής H<sub>2</sub>S.

### Παραγωγή β-γλυκοσιδάσης

Σχετικά με την παραγωγή β-γλυκοσιδάσης τα αποτελέσματα της δοκιμής έδειξαν χαμηλή ικανότητα των απομονωθέντων ζυμών ως προς την υδρόλυση της αρβουτίνης και άρα χαμηλή ικανότητα παραγωγής του ενζύμου. Συγκεκριμένα μόνο



**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

4 απομονώσεις του γένους *Hanseniaspora* (% του συνόλου των απομονωθέντων ζυμών) φαίνεται πως παράγουν β-γλυκοσιδάση (Πίνακας 14).

**Πίνακας 14:** Ικανότητα παραγωγής β-γλυκοσιδάσης από τις απομονωθέντες ζύμες. Η χρωματική κλίμακα περιγράφει το βαθμό ικανότητας παραγωγής του ενζύμου\*. (0:χαμηλή παραγωγή, 1:μέτρια παραγωγή, 2:υψηλή παραγωγή)

Είδη ζυμών	Απομονώσεις	Ικανότητα παραγωγής β-γλυκοσιδάσης
<i>S. cerevisiae</i>	OST2EFW1	
	OST1EFW3	
	OST1EFW2	
	OSP1EFW5	
	OST1EFW8	
	OST1EFW5	
	OSV1EFW1	
	OSP2EFW1	
	OAKEFW1	
<i>H. opuntiae</i>	OST1GW15	
	OST2GW3	
	OST2GW9	
	OST2GW11	
	OAM1MFW1	
	OST2BFW15	
	OSP2BFW5	
<i>H. uvarum</i>	OAM2BFW4	
	OAM2BFW16	
	OAM2MFW12	
<i>H. guilliermondii</i>	OSV2BFL1	
	OSV2EFL5	
	OAM1BFW16	
<i>T. delbrueckii</i>	OSV1EFL1	

\*Παραγωγή β-γλυκοσιδάσης





Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



ανάπτυξη - εργασία - αλληλεγγύη

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

### Παραγωγή βιογενών αμινών

Τα αποτελέσματα των δοκιμών που πραγματοποιήθηκαν για την εκτίμηση της αποκαρβοξυλίωσης των υπό εξέταση αμινοξέων και παραγωγής βιογενών αμινών από τις απομονωθέντες ζύμες έδειξαν πως ένα χαμηλό ποσοστό των απομονώσεων ήταν ικανό να αποκαρβοξυλιώσει ορισμένα αμινοξέα και άρα να παράξει τις αντίστοιχες βιογενείς αμίνες (Πίνακας 15).

**Πίνακας 15:** Ικανότητα παραγωγής βιογενών αμινών από τις απομονωθέντες ζύμες.

Είδη ζυμών	Απομονώσεις	Ικανότητα παραγωγής βιογενών αμινών					
		Ισταμίνη	Τυραμίνη	Πουτρεσκίνη	Κανταβερίνη	Φαινυλαιθυλαμίνη	Τρυπταμίνη
<i>S. cerevisiae</i>	OST2EFW1	-	-	-	+	+	-
	OST1EFW3	+	-	-	-	-	-
	OST1EFW2	-	-	-	-	-	-
	OSP1EFW5	-	-	-	-	-	-
	OST1EFW8	-	-	-	+	-	-
	OST1EFW5	-	-	-	-	-	-
	OSV1EFW1	-	-	-	-	+	-
	OSP2EFW1	-	-	-	-	-	-
	OAKEFW1	-	+	-	+	-	-
	OST1GW15	-	-	-	-	-	-
<i>H. opuntiae</i>	OST2GW3	-	-	-	-	-	-
	OST2GW9	-	-	-	-	-	-
	OST2GW11	-	-	-	-	-	-
	OAM1MFW1	-	-	-	-	-	-
<i>H. uvarum</i>	OST2BFW15	-	-	-	-	-	-
	OSP2BFW5	-	-	-	-	-	-
	OAM2BFW4	-	-	-	-	-	-
	OAM2BFW16	-	-	-	-	-	-
	OAM2MFW12	-	-	-	-	-	-
<i>H. gulliermondii</i>	OSV2BFL1	-	-	-	-	-	-
	OSV2EFL5	-	-	-	-	-	-
	OAM1BFW16	-	-	-	+	-	-
<i>T. delbrueckii</i>	OSV1EFL1	+	-	-	-	-	-

+ παραγωγή βιογενών αμινών – μη παραγωγή βιογενών αμινών

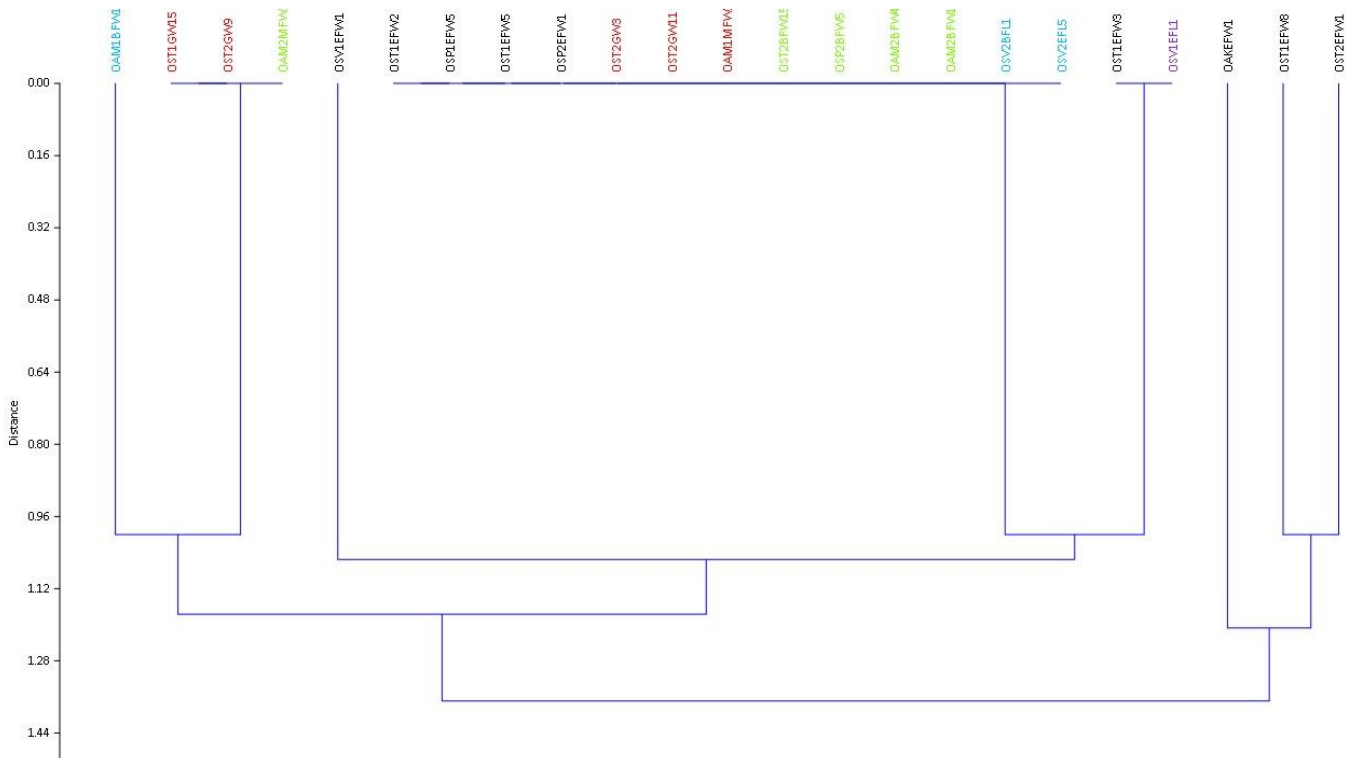


**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Η ικανότητα διαφορετικών ειδών ζυμών να αποκαρβοξυλιώσουν ορισμένα αμινοξέα και άρα να παράξουν τις αντίστοιχες βιογενείς αμίνες εκτιμήθηκε με την κατασκευή δενδρογράμματος (Σχήμα 19). Η παραγωγή βιογενών αμινών φαίνεται πως εξαρτάται περισσότερο από το στέλεχος ζυμών, παρά από το είδος των ζυμών.



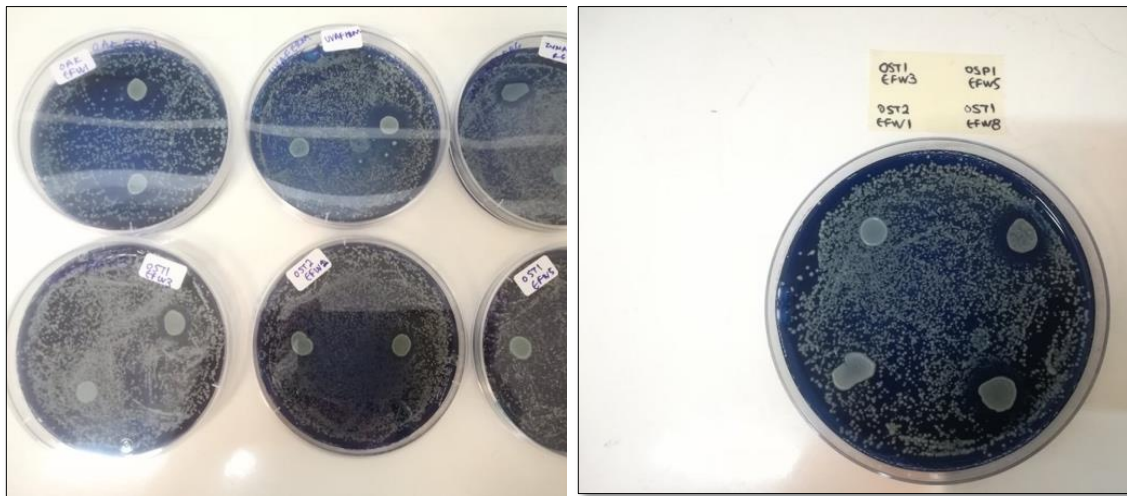
**Σχήμα 19:** Δενδρόγραμμα των διαφορετικών ειδών για την ικανότητα παραγωγής βιογενών αμινών που προέκυψε με την μέθοδο ομαδοποίησης UPGMA. Τα στελέχη που απεικονίζονται με μαύρο χρώμα ανήκουν στο είδος *S. cerevisiae*, με κόκκινο χρώμα στο είδος *H. oruntiae*, με πράσινο χρώμα στο είδος *H. uvarum*, με μπλε χρώμα στο είδος *H. guilliermondii* και με μωβ χρώμα στο είδος *T. delbrueckii*.

### Φαινότυπος “killer”

Η αλληλεπίδραση μεταξύ των ειδών και των στελεχών ζυμών αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την έκβαση της αλκοολικής ζύμωσης (Zilelidou &

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Nisiotou 2022). Η απελευθέρωση τοξίνης 'killer' μπορεί να συμβάλει στη διακοπή της ανάπτυξης των ζυμών κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του οίνου. Μετά τη διεξαγωγή της δοκιμής για το χαρακτηρισμό των απομονώσεων *S. cerevisiae* ως έχοντα τον φαινότυπο killer ή ως ευαίσθητα σε αυτόν (Σχήμα 20) διαπιστώθηκε ότι το 66% των απομονώσεων που φάνηκε να χαρακτηρίζεται από την ικανότητα παραγωγής της τοξίνης είχε ταυτόχρονα και ανθεκτικότητα στην επίδραση της (Πίνακας 16). Το 33% των απομονώσεων έδειξε ευαισθησία στην τοξίνη ενώ δεν είχε και τον φαινότυπο killer.



**Σχήμα 20:** Ανάπτυξη στελεχών *S. cerevisiae* σε τρυβλία με bromocresol blue. Α) Παρεμπόδιση αύξησης του υπό εξέταση στελέχους (υποδεικνύεται από τη δημιουργία διαυγούς ζώνης γύρω από την αποικία του στελέχους μάρτυρα  $K^+$ ) και άρα ευαισθησία στην επίδραση της τοξίνης killer, Β) Ικανότητα παρεμπόδισης αύξησης του ευαίσθητου στην τοξίνη στελέχους (υποδεικνύεται από τη δημιουργία διαυγούς ζώνης γύρω από την αποικία του υπό εξέταση στελέχους) και άρα παραγωγής τοξίνης killer.



**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

**Πίνακας 16:** Φαινότυπος killer των απομονώσεων του *S. cerevisiae*.

Απομονώσεις <i>S. cerevisiae</i>	Φαινότυπος Killer
OST2EFW1	R-K-
OST1EFW3	R-K-
OST1EFW2	R+K+
OSP1EFW5	R+K+
OST1EFW8	R+K+
OST1EFW5	R+K+
OSV1EFW1	R+K+
OSP2EFW1	R+K+
ΟΑΚΕFW1	R-K-

R-: ευαίσθησία στην τοξίνη killer

R+: αντοχή στην τοξίνη killer

K+: παραγωγή τοξίνης killer

K-: αρνητικό σε παραγωγή τοξίνης killer



**ΕΠΑνΕΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

## Βιβλιογραφία

1. Albertin, W., Chasseriaud, L., Comte G., Panfili, A., Delcamp, A., Salin, F., Marullo, P., Bely, M. Winemaking and bioprocesses strongly shaped the genetic diversity of the ubiquitous yeast *Torulaspora delbrueckii*. PLoS ONE 2014a, 9, e94246.
2. Amberg, D.C., Burke, D.J., and Strathern, J.N. Yeast DNA Isolation: Miniprep. Cold Spring Harb. Protoc. 2006.
3. Chalvantzi, I., Banilas, G., Tassou, C., Nisiotou A. 2021. Biogeographical regionalization of wine yeast communities in Greece and environmental drivers of species distribution at a local scale. *Frontiers in microbiology*, 12, DOI: 10.3389/fmicb.2021.705001.
4. Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., Querol, A. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1999, 49, 329-337.
5. Hammer, O., Harper, D.A.T., Ryan, P.D. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol. Electron.* 2001, 4, 1-9.
6. Hyma, K. E., and J. C. Fay, 2013. Mixing of vineyard and oak-tree ecotypes of *Saccharomyces cerevisiae* in North American vineyards. *Mol. Ecol.* 22, 2917-2930.
7. Legras, J.L., Karst, F. Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterization. *FEMS Microbiol. Lett.* 2003, 221, 249-255.
8. Martín, B., Garriga, M., Hugas, M., Bover-Cid, S., Veciana-Nogués, M.T., Aymerich, T. Molecular, technological and safety characterization of gram-



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

- positive catalase-positive cocci from slightly fermented sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 2006, 107, 148-158.
9. Nisiotou, A. A., and Nychas, G. J. E. (2007a). Yeast populations residing on healthy or botrytis-infected grapes from a vineyard in Greece. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 2765–2768. doi: 10.1128/AEM.01864-06.
  10. Nisiotou, A. A., Spiropoulos, A. E., and Nychas, G. J. E. (2007b). Yeast community structures and dynamics in healthy and botrytis-affected grape must fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 6705–6713. doi: 10.1128/AEM.01279-07.
  11. Paffetti, D., Barberio, C., Casalone, E., Cavalieri, D., Fani, R., Fia, G., Mori, E., Polsinelli, M. DNA fingerprinting by random amplified polymorphic DNA and restriction fragment length polymorphism is useful for yeast typing. *Res. Microbiol.* 1995, 146, 587-594.
  12. Peterson, B. K., Weber, J. N., Kay, E. H., Fisher, H. S., & Hoekstra, H. E. Double digest RADseq: An inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species. *PLoS One* 2012, 7(5), e37135.
  13. Schuelke, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nat. biotechnol.* 2000, 18, 233-234.
  14. Schuller, D., Alves, H., Dequin, S., Casal, M. Ecological survey of *Saccharomyces cerevisiae* strains from vineyards in the Vinho Verde Region of Portugal. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2005, 51, 167-177.
  15. White, T. J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protoc.* 1990, 315–322. doi: 10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1
  16. Zilelidou E. & Nisiotou A. Understanding Wine through Yeast Interactions. *Microorganisms* **2021**, 9(8), 1620;



**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

## Δράση 1.2.2: Αξιολόγηση οινολογικού δυναμικού ζυμών

### Τεχνολογικά χαρακτηριστικά

Μετά την ταυτοποίηση των απομονωθέντων ζυμών ακολούθησε η αξιολόγηση των τεχνολογικών και οινολογικών χαρακτηριστικών τους. Στον Πίνακα 1 (Παράρτημα) φαίνεται το σύνολο και η κωδικοποίηση των στελεχών που αντιστοιχεί στο κάθε είδος και για τα οποία πραγματοποιήθηκε ο χαρακτηρισμός του οινολογικού τους δυναμικού. Συγκεκριμένα εξετάστηκαν η αντίσταση στην αιθανόλη και το θειώδη ανυδρίτη. Επιπλέον ελέγχθηκε η παραγωγή υδροθείου, β-γλυκοσιδάσης καθώς και βιογενών αμινών. Επίσης, αξιολογήθηκε η αντοχή σε και η ικανότητα παραγωγής τοξίνης “killer”.

Πριν από κάθε δοκιμή πραγματοποιήθηκε:

- Ανανέωση καλλιέργειών σε υγρό εργαστηριακό υπόστρωμα Yeast Peptone Dextrose (YPD) broth (24h, ολονύκτια, 28°C /180rpm)
- Προσδιορισμός πληθυσμού μικροσκοπικά (αιματοκυττόμετρο)
- Προσαρμογή του πληθυσμού στα επιθυμητά κατά περίπτωση (είδος δοκιμής) επίπεδα

### Δοκιμές

#### Αντοχή στην αιθανόλη

- 1lt γλεύκος διηθημένο
- Προσθήκη άγαρ (15 g/L) και ρύθμιση του pH στο 3.6 (HCl, 4N)
- Παστερίωση (20 min, 100 °C)
- Προσθήκη αιθανόλης στις επιθυμητές συγκεντρώσεις (10%, 12%, 14%, 16%, 18%) για ζύμες του είδους *S. cerevisiae* και (6, 8, 10, 12%) για μη-*Sachharomyces* ζύμες
- Εναπόθεση βιομάζας στελεχών (σταγονίδια, 10<sup>5</sup> cfu/ml) στο υπόστρωμα
- Επώαση τρυβλίων (72 h, 26 °C)
- Ο βαθμός ανθεκτικότητας του κάθε στελέχους στην αιθανόλη αναφέρεται ως η ελάχιστη συγκέντρωση της αιθανόλης η οποία επιτρέπει την ανάπτυξή τους

#### Αντοχή στο SO<sub>2</sub>

- 1lt γλεύκος διηθημένο
- Προσθήκη άγαρ (15 g/L) και ρύθμιση του pH στο 3.6 (HCl, 4 N)
- Παστερίωση (20 min, 100 °C)



**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

- Προσθήκη potassium metabisulfite (αποστείρωση με φίλτρο 0.2 μm) στις επιθυμητές συγκεντρώσεις (100 mg/l, 150 mg/l, 200 mg/l, 250 mg/l, 300 mg/l) για *S. cerevisiae* και (25, 50, 75, 100, 150 mg/l) για μη-*Sachharomyces* ζύμες
- Εναπόθεση βιομάζας στελεχών (σταγονίδια, 10<sup>5</sup> cfu/ml) στο υπόστρωμα
- Επάωση τρυβλίων (72 h, 26 °C)
- Ο βαθμός ανθεκτικότητας του κάθε στελέχους στο SO<sub>2</sub> αναφέρεται ως η ελάχιστη συγκέντρωση του SO<sub>2</sub> η οποία επιτρέπει την ανάπτυξή τους

#### Παραγωγή H<sub>2</sub>S

- Biggy agar (bismuth glucose glycine yeast)
- Ενοφθαλμισμός στελεχών (σταγονίδια) 10<sup>5</sup> cfu/ml
- Επάωση (24 h, 28 °C)

Η αξιολόγηση γίνεται με την εξής κλίμακα: λευκό (0): καθόλου παραγωγή, υποκίτρινο/ώχρα (1): χαμηλή παραγωγή, καστανό (2): μεσαία παραγωγή, σκούρο καφέ (3): υψηλή παραγωγή

#### Παραγωγή β-γλυκοσιδάσης

- GPY agar (αρβουτίνη, pH:5)
- Προσθήκη iron chloride (αποστείρωση με φίλτρο 0.2 μm) μετά την αποστείρωση του υλικού
- Γραμμική επίστρωση (streaking) του κάθε στελέχους σε τρυβλίο με GPY agar
- 15 μέρες επάωση στους 28 °C
- Στελέχη με δραστηριότητα β-γλυκοσιδάσης υδρολύουν την αρβουτίνη με αποτέλεσμα εμφάνιση καφέ σκούρου χρώματος γύρω από το streaking
- Η αξιολόγηση γίνεται με την εξής κλίμακα: λευκό(0):καθόλου παραγωγή, κίτρινο(1):μέτρια παραγωγή, καφέ(2):υψηλή παραγωγή

#### Παραγωγή βιογενών αμινών

- YPD (bromocresol purple)
- Αφήνεται βιομάζα (10<sup>5</sup> cfu/ml) από κάθε στέλεχος σε τρυβλίο με διαφορετικό αμινοξύ (Ιστιδίνη, Φαινυλαλανίνη, Αργινίνη, Τρυπτοφάνη, Τυροσίνη, Λυσίνη)
- Επάωση (25 °C, 7 ημέρες)
- Ο σχηματισμός βιογενών αμινών υποδεικνύεται από μωβ φωτοστέφανο γύρω από την αποικία ως αποτέλεσμα αποκαρβοξυλίωσης των αμινοξέων.

#### Φαινότυπος "killer"

- YEPD-MB agar (pH:4.5, citrate: 1M)





**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

- Προσθήκη χρωστικής (0.015% methylene blue) η οποία έχει αποστειρωθεί με φίλτρο 0.2 μm
- Επίστρωση στο YPD-MB του “ευαίσθητου” στελέχους  $10^4$  cfu/ml (CONTROL: UVAFERM NEMEA\_SENSITIVE)
- Ενοφθαλμισμός (σταγονίδια,  $10^4$  cfu/ml) των στελεχών killer (CONTROL: Vin 13 και ZYMAFLORE VIN BLANC)
- Επώαση στους 18 για 5 μέρες
- Τα στελέχη χαρακτηρίζονται ως killer (K+) όταν το spot περιβάλλεται από μια ευκρινή ζώνη αναστολής. Τα στελέχη ελέγχονται και ως προς την αντοχή (R+-R)

#### Οινολογικά χαρακτηριστικά των στελεχών *T.delbrueckii*

Προκειμένου να διερευνηθεί εάν η γενετική ποικιλομορφία των στελεχών *T. delbrueckii* έχει αντίκτυπο στους οινολογικούς φαινοτύπους, διαφορετικοί γονότυποι *T. delbrueckii* δοκιμάστηκαν σε ζυμώσεις εργαστηριακής κλίμακας. Οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν με διπλή επανάληψη στους 20°C σε φιάλες που περιείχαν 110 ml παστεριωμένου γλεύκους σταφυλιών της λευκής ποικιλίας “Μοσχοφίλερο” (σάκχαρο 213.6 g/L; pH=3.35; ολική οξύτητα 3.6 g/L, ως τρυγικό οξύ; αφομοίωσιμο άζωτο (YAN) 230 mg/L). Το γλεύκος εμβολιάστηκε με στέλεχη *T. delbrueckii* σε τελική συγκέντρωση  $10^6$  cfu/ml. Η πορεία της ζύμωσης παρακολούθηθηκε καθημερινά από την απώλεια του βάρους λόγω της εξάτμισης του διοξειδίου του άνθρακα και οι ζυμώσεις θεωρήθηκαν πλήρεις όταν ο ρυθμός της απώλειας του βάρους ήταν σταθερός για 2 ημέρες. Ο ρυθμός της ζύμωσης εκτιμήθηκε με το πρόγραμμα DMfit. Το pH, η ολική και η πτητική οξύτητα προσδιορίστηκαν σύμφωνα με τα πρωτόκολλα του Διεθνούς Οργανισμού Αμπέλου και Οίνου (OIV). Το μηλικό και το οξικό οξύ, η γλυκερόλη, η ακεταλδεΐδη, το αμμωνιακό άζωτο και το ολικό θειώδες προσδιορίστηκαν με ενζυμικό αναλυτή Miura One (I.S.E. S.r.l – Ιταλία Ρώμη). Τα σάκχαρα (γλυκόζη, φρουκτόζη), η αιθανόλη και η παραγωγή ηλεκτρικού οξέος ποσοτικοποιήθηκαν με χρήση ενζυμικών κιτ (R-Biopharm AG).

- Στελέχη με δραστηριότητα β-γλυκοσιδάσης υδρολύουν την αρβουτίνη με αποτέλεσμα εμφάνιση καφέ σκούρου χρώματος γύρω από το streaking
- Η αξιολόγηση γίνεται με την εξής κλίμακα: λευκό(0):καθόλου παραγωγή, κίτρινο(1):μέτρια παραγωγή, καφέ(2):υψηλή παραγωγή

#### *Παραγωγή βιογενών αμινών*

- YPD (bromocresol purple)
- Αφήνεται βιομάζα ( $10^5$  cfu/ml) από κάθε στέλεχος σε τρυβλίο με διαφορετικό αμινοξύ (Ιστιδίνη, Φαινυλαλανίνη, Αργινίνη, Τρυπτοφάνη, Τυροσίνη, Λυσίνη)



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

- Επώαση (25 °C, 7 ημέρες)
- Ο σχηματισμός βιογενών αμινών υποδεικνύεται από μωβ φωτοστέφανο γύρω από την αποικία ως αποτέλεσμα αποκαρβοξυλίωσης των αμινοξέων.

#### Φαινότυπος “killer”

- YEPD-MB agar (pH:4.5, citrate: 1M)
- Προσθήκη χρωστικής (0.015% methylene blue) η οποία έχει αποστειρωθεί με φίλτρο 0.2 μm
- Επίστρωση στο YPD-MB του “ευαίσθητου” στελέχους 10<sup>4</sup> cfu/ml (CONTROL: UVAFERM NEMEA\_SENSITIVE)
- Ενοφθαλμισμός (σταγονίδια, 10<sup>4</sup> cfu/ml) των στελεχών killer (CONTROL: Vin 13 και ZYMAFLORE VIN BLANC)
- Επώαση στους 18 για 5 μέρες
- Τα στελέχη χαρακτηρίζονται ως killer (K+) όταν το spot περιβάλλεται από μια ευκρινή ζώνη αναστολής. Τα στελέχη ελέγχονται και ως προς την αντοχή (R+-R)

#### Οινολογικά χαρακτηριστικά των στελεχών *T.delbrueckii*

Προκειμένου να διερευνηθεί εάν η γενετική ποικιλομορφία των στελεχών *T. delbrueckii* έχει αντίκτυπο στους οινολογικούς φαινοτύπους, διαφορετικοί γονότυποι *T. delbrueckii* δοκιμάστηκαν σε ζυμώσεις εργαστηριακής κλίμακας. Οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν με διπλή επανάληψη στους 20°C σε φιάλες που περιείχαν 110 ml παστεριωμένου γλεύκους σταφυλιών της λευκής ποικιλίας “Μοσχοφίλερο” (σάκχαρο 213.6 g/L; pH=3.35; ολική οξύτητα 3.6 g/L, ως τρυγικό οξύ; αφομοιώσιμο άζωτο (YAN) 230 mg/L). Το γλεύκος εμβολιάστηκε με στελέχη *T. delbrueckii* σε τελική συγκέντρωση 10<sup>6</sup> cfu/ml. Η πορεία της ζύμωσης παρακολούθηθηκε καθημερινά από την απώλεια του βάρους λόγω της εξάτμισης του διοξειδίου του άνθρακα και οι ζυμώσεις θεωρήθηκαν πλήρεις όταν ο ρυθμός της απώλειας του βάρους ήταν σταθερός για 2 ημέρες. Ο ρυθμός της ζύμωσης εκτιμήθηκε με το πρόγραμμα DMfit. Το pH, η ολική και η πτητική οξύτητα προσδιορίστηκε σύμφωνα με τα πρωτόκολλα του Διεθνούς Οργανισμού Αμπέλου και Οίνου (OIV). Το μηλικό και το οξικό οξύ, η γλυκερόλη, η ακεταλδεΐδη, το αμμωνιακό άζωτο και το ολικό θειώδες προσδιορίστηκαν με ενζυμικό αναλυτή Miura One (I.S.E. S.r.l – Ιταλία Ρώμη). Τα σάκχαρα (γλυκόζη, φρουκτόζη), η αιθανόλη και η παραγωγή ηλεκτρικού οξέος πολιτικοποιήθηκαν με χρήση ενζυμικών κιτ (R-Biopharm AG).



**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

### Ανάλυση δεδομένων

Τα δένδρογράμματα κατασκευάστηκαν με την ιεραρχική μέθοδο ομαδοποίησης (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean – UPGMA), με βάση το συντελεστή συσχέτισης Dice χρησιμοποιώντας το λογισμικό PAST (Hammer et al., 2001). Ο ρυθμός της ζύμωσης των στελεχών *T. delbrueckii* εκτιμήθηκαν με το πρόγραμμα DMfit. Οι διαφορές στα κινητικά και οινολογικά προφίλ των στελεχών *T. delbrueckii* αξιολογήθηκαν με την ανάλυση διασποράς (Analysis of Variance, ANOVA). Η πολυμεταβλητή ανάλυση διακύμανσης (Permutational multivariate analysis of variance, PERMANOVA) χρησιμοποιήθηκε για την σύγκριση των στελεχών *T. delbrueckii* λαμβάνοντας υπ' όψιν όλους τους κινητικούς και οινολογικούς παράγοντες που αναλύθηκαν. Η ανάλυση γραμμικής διάκρισης (Linear discriminant analysis, LDA) εφαρμόστηκε στα κινητικά και οινολογικά χαρακτηριστικά των στελεχών *T. delbrueckii*.

### **Αποτελέσματα**

#### Τεχνολογικά χαρακτηριστικά απομονωθέντων ζυμών

##### Αντοχή σε αιθανόλη και SO<sub>2</sub>

Οι δοκιμές αντοχής των απομονωθέντων ζυμών σε αιθανόλη και SO<sub>2</sub> έδειξαν μικρή παραλλακτικότητα -ως προς την ανθεκτικότητα- μεταξύ απομονώσεων του ίδιου είδους (Πίνακας 2, Παράρτημα) με το 55% των *S. cerevisiae* να εμφανίζει ικανότητα ανάπτυξης σε συγκέντρωση αιθανόλης 12% και το 45% σε συγκέντρωση 10%. Ως προς τις μη-*Saccharomyces* ζύμες δε βρέθηκε κάποια απομόνωση ανθεκτική σε συγκέντρωση αιθανόλης μεγαλύτερη του 6%. Σε ότι αφορά την ανθεκτικότητα σε SO<sub>2</sub> τα αποτελέσματα ανέδειξαν τα 300, 200 και 100mg ως τις μέγιστες επιτρεπόμενες συγκεντρώσεις για την ανάπτυξη των *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii* και *Hanseniaspora spp.* αντίστοιχα.

##### Παραγωγή H<sub>2</sub>S

Για την αξιολόγηση της παραγωγής H<sub>2</sub>S από τις απομονωθέντες ζύμες εκτιμήθηκε όπως αναφέρθηκε παραπάνω το χρώμα των αποικιών τους σε BIGGY agar. Μεταξύ των απομονώσεων *S. cerevisiae* εντοπίστηκαν δυο στελέχη που εμφάνισαν μέτρια και υψηλή παραγωγή διοξειδίου του θείου αντίστοιχα ενώ τα υπόλοιπα έδειξαν χαμηλή ή καθόλου παραγωγή (Σχήμα 1, Παράρτημα). Οι απομονώσεις του γένους *Hanseniaspora* είχαν διαφορές μεταξύ των ειδών στην παραγωγή H<sub>2</sub>S με τα *H. oruntiae* σχεδόν στο σύνολό τους να μην παράγουν καθόλου H<sub>2</sub>S, τα *H. uvarum* να δείχνουν μικρή παραγωγή ενώ τα *H. guilliermondii* να εμφανίζουν μικρή έως μέτρια παραγωγή. Το *T. delbrueckii* εμφάνισε υψηλή παραγωγή H<sub>2</sub>S.



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



ανάπτυξη - εργασία - αλληλεγγύη

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

### Παραγωγή β-γλυκοσιδάσης

Σχετικά με την παραγωγή β-γλυκοσιδάσης τα αποτελέσματα της δοκιμής έδειξαν χαμηλή ικανότητα των απομονωθέντων ζυμών ως προς την υδρόλυση της αρβουτίνης και άρα χαμηλή ικανότητα παραγωγής του ενζύμου. Συγκεκριμένα μόνο 4 απομονώσεις του γένους *Hanseniaspora* (% του συνόλου των απομονωθέντων ζυμών) φαίνεται πως παράγουν β-γλυκοσιδάση (Πίνακας 3. Παράρτημα).

### Παραγωγή βιογενών αμινών

Τα αποτελέσματα των δοκιμών που πραγματοποιήθηκαν για την εκτίμηση της αποκαρβοξυλίωσης των υπό εξέταση αμινοξέων και παραγωγής βιογενών αμινών από τις απομονωθέντες ζύμες έδειξαν πως ένα χαμηλό ποσοστό των απομονώσεων ήταν ικανό να αποκαρβοξυλιώσει ορισμένα αμινοξέα και άρα να παράξει τις αντίστοιχες βιογενείς αμίνες (Πίνακας 4, Παράρτημα).

Η ικανότητα διαφορετικών ειδών ζυμών να αποκαρβοξυλιώσουν ορισμένα αμινοξέα και άρα να παράξουν τις αντίστοιχες βιογενείς αμίνες εκτιμήθηκε με την κατασκευή δένδρογράμματος (Σχήμα 2, Παράρτημα). Η παραγωγή βιογενών αμινών φαίνεται πως εξαρτάται περισσότερο από το στέλεχος ζυμών, παρά από το είδος των ζυμών.

### Φαινότυπος “killer”

Η αλληλεπίδραση μεταξύ των ειδών και των στελεχών ζυμών αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την έκβαση της αλκοολικής ζύμωσης (Zilelidou & Nisiotou 2022). Η απελευθέρωση τοξίνης ‘killer’ μπορεί να συμβάλει στη διακοπή της ανάπτυξης των ζυμών κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του οίνου. Μετά τη διεξαγωγή της δοκιμής για το χαρακτηρισμό των απομονώσεων *S. cerevisiae* ως έχοντα τον φαινότυπο killer ή ως ευαίσθητα σε αυτόν διαπιστώθηκε ότι το 66% των απομονώσεων που φάνηκε να χαρακτηρίζεται από την ικανότητα παραγωγής της τοξίνης είχε ταυτόχρονα και ανθεκτικότητα στην επίδραση της (Πίνακας 5, Παράρτημα). Το 33% των απομονώσεων έδειξε ευαισθησία στην τοξίνη ενώ δεν είχε και τον φαινότυπο killer.

### Ζυμωτικά και οινολογικά χαρακτηριστικά των στελεχών *T. delbrueckii*

Συνολικά, έχουν αξιολογηθεί 12 διαφορετικοί γονότυποι *T. delbrueckii* σε μικροζυμώσεις. Η ζυμωτική απόδοση των στελεχών *T. delbrueckii* κυμαινόταν από 6,63 έως 9,97 g CO<sub>2</sub>/110ml υποδηλώνοντας ατελή ζύμωση δεδομένου αρχικά των 213.6g σακχάρων στο γλεύκος. Οι κινητικές της ζύμωσης των στελεχών *T. delbrueckii* εικονίζονται στο Σχήμα 3 (Παράρτημα). Παρατηρήθηκε ότι στελέχη που απομονώθηκαν από αμπελώνες της Νεμέας παρουσίασαν παρόμοια ζυμωτική ικανότητα. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και για τα στελέχη *T. delbrueckii* που απομονώθηκαν από αμπελώνες της Σαντορίνης με εξαίρεση του στέλεχος

OSV1EFL1. Η ανάλυση ANOVA αποκάλυψε σημαντικές διαφορές στην παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα στις 72 h ζύμωσης ( $F= 28.6$ ,  $p=0.0001$ ) αλλά και στο τέλος της ζύμωσης ( $F=72.3$ ,  $p=0.0001$ ), στο ρυθμό ( $F= 53.6$ ,  $p=0.0001$ ) και στην διάρκεια της ζύμωσης ( $F= 157$ ,  $p=0.0001$ ) μεταξύ των στελεχών *T. delbrueckii*.

Τα κύρια οινολογικά χαρακτηριστικά που ανιχνεύθηκαν στους οίνους που λαμβάνονται από διαφορετικά στελέχη *T. delbrueckii* φαίνονται στον Πίνακα 6 (Παράρτημα). Τα οινολογικά χαρακτηριστικά υποβλήθηκαν επίσης σε ανάλυση ANOVA για την αξιολόγηση της συμβολής τους στη διαφοροποίηση μεταξύ των στελεχών *T. delbrueckii* (Πίνακας 7, Παράρτημα). Λαμβάνοντας υπ' όψιν όλους τους παράγοντες που αναλύθηκαν, η ανάλυση PERMANOVA αποκάλυψε σημαντικές διαφορές στους φαινοτύπους των πληθυσμών *T. delbrueckii* ( $F=14.77$ ,  $p=0.0001$ ).

Τα κινητικά και τα μεταβολικά προφίλ των στελεχών *T. delbrueckii* αναλύθηκαν με την ανάλυση γραμμικής διάκρισης (Linear Discriminant Analysis - LDA) (Σχήμα , Παράρτημα). Οι φαινότυποι των στελεχών *T. delbrueckii* που προέρχονται από την Νεμέα σχημάτισαν μια ομάδα, εμφανίζοντας θετικές βαθμολογίες στον Axis 2 για την ακεταλδεΐδη, με εξαίρεση το στέλεχος SE2AFLa11. Οι φαινότυποι των στελεχών OSV1EFL1 και SE2AFLa11 εμφάνισαν θετικές βαθμολογίες στον Axis 1 για την γλυκόζη και φρουκτόζη.

## **B) Απομονώσεις από τις αυθόρμητες ζυμώσεις που έγιναν στο οινοποιείο «Santo Wines»**

### **Δράση 1.2: Μοριακός χαρακτηρισμός και οινολογικά χαρακτηριστικά των στελεχών ζυμών**

Η συγκεκριμένη δράση αφορά την ταυτοποίηση σε επίπεδο στελέχους των νέων ζυμών από τις αυθόρμητες ζυμώσεις οι οποίες έλαβαν χώρα στο οινοποιείο «Santo Wines». Εγένετο φυλογενετική ανάλυση και μοριακός χαρακτηρισμός των 96 απομονώσεων, ταυτοποιήθηκαν 3 είδη ζυμών στην αρχή και στο τέλος της ζύμωσης με διαφορετικά ποσοστά το καθένα. Πιο συγκεκριμένα το 63,54% των απομονώσεων ανήκει στο είδος *Saccharomyces cerevisiae*, το 14,58% στο είδος *Pichia membranifaciens* και το 21,88% στο είδος *Nakazawaea ishiwadae*. Περισσότερες πληροφορίες εμφανίζονται στο επισυναπτόμενο αρχείο «ΠΑΡΑΔΟΤΕΑ\_Oenovation\_ENOHTA\_1», ενώ η ανάλυση σχετικά με τον υπολογισμό του κόστους απομόνωσης και αξιολόγησης των άγριων ζυμών οινοποίησης οι οποίες θα τελούσαν σε μεγάλης κλίμακας οινοποίηση, στηρίχτηκε στα αποτελέσματα αυτά.

## **Βιοϋμένια στην βιομηχανία Οίνου**

Η οινοποιία αντιμετωπίζει ένα επίμονο πρόβλημα με το *Brettanomyces bruxellensis*, ένα ενοχλητικό μικροοργανισμό (μ/ο) που μπορεί να αλλοιώσει το κρασί. Αυτό είναι εφικτό επειδή ο συγκεκριμένος μ/ο μπορεί να δημιουργήσει βιοϋμένια στα κελάρια /βαρέλια, Βέβαια υπάρχουν ακόμη πολλά να μάθουμε για το πώς αυτός ο μ/ο τα σχηματίζει.

Για το λόγο αυτό, η ομάδα μας μελέτησε την δυνατότητα σχηματισμού του βιοϋμένιου σε 11 διαφορετικά στελέχη του *B. bruxellensis* σε επιφάνειες από



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



ανάπτυξη - εργασία - αλληλεγγύη

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

ανοξείδωτο χάλυβα, για να διαπιστώσουμε αν όλα τα στελέχη ήταν ικανά να δημιουργήσουν βιοϋμένια.

Παράλληλα χρησιμοποιήσαμε FTIR για να μελετήσουμε αν θα μπορούσαμε να διαφοροποιήσουμε τα ελεύθερα βακτηριακά κύτταρα από εκείνα που δημιουργούσαν βιοϋμένια στα κουπόνια.

Συγκρίνοντας τα προκύπτοντα φάσματα, μπόρεσαμε να αναγνωρίσουμε περιοχές φασμάτων που σχετίζονταν με το σχηματισμό βιοφίλμ. Ανακάλυψαμε ότι τα προσκολλημένα κύτταρα στις επιφάνειες είχαν μεγαλύτερη παρουσία πολυσακχαριτών και λιπιδίων, υποδεικνύοντας τη συμμετοχή τους στο σχηματισμό βιοφίλμ. Επιπλέον, βρήκαμε συγκεκριμένες κορυφές απορρόφησης σε συγκεκριμένα μήκη κύματος, υποδηλώνοντας την παρουσία ουσιών όπως οι β-γλυκάνες και η εργοστερόλη.

Για περαιτέρω ανάλυση των δεδομένων, χρησιμοποιήσαμε τεχνικές ομαδοποίησης και ταξινόμησης για να εντοπίσουμε χαρακτηριστικούς κυματαριθμούς/μήκη κύματος στα φάσματα. Ενδιαφέρουσα παρατήρηση είναι ότι τα μεταβολικά δακτυλικά αποτυπώματα των προσκολλημένων κυττάρων ήταν παρόμοια στην ίδια κατηγορία φαινοτύπου αλλά διαφορετικά από τα μη προσκολλημένα (αιωρούμενα) κύτταρα, υπογραμμίζοντας μια σαφή διάκριση μεταξύ των δύο φαινοτύπων.

Αυτά τα ευρήματα επιβεβαιώθηκαν περαιτέρω από τα αποτελέσματα ενός μοντέλου ταξινόμησης που αναπτύξαμε. Αυτή η πρωτοποριακή μελέτη είναι η πρώτη που χρησιμοποίησε επιτυχώς μια μη επεμβατική τεχνική για να αποκαλύψει το μεταβολικό δακτυλικό αποτύπωμα που σχετίζεται με την ικανότητα σχηματισμού βιοφίλμ του *B. bruxellensis*.



**ΕΠΑνΕΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

## **Ενότητα Εργασίας 2: Απομόνωση, μοριακός χαρακτηρισμός και φυσιολογικά χαρακτηριστικά νέων και ήδη υπαρχόντων στελεχών ζυμών**

### **Φορέας υλοποίησης:**

Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων Γεωπονικού  
Πανεπιστημίου Αθηνών

**Δράση 2.1:** Αύξηση σε αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες των νέων ή υπαρχουσών απομονώσεων κατά την καλλιέργεια σε φιάλες.

**Δράση 2.2:** Μελέτη των πιο δυναμικών στελεχών σε εργαστηριακής κλίμακας κλειστού τύπου βιοαντιδραστήρες.

**Δράση 2.3:** Προσομοίωση οινοποίησης σε εργαστηριακής κλίμακας κλειστού τύπου βιοαντιδραστήρες.



**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο διεθνής και συνεχόμενος ανταγωνισμός στην αγορά οίνου, σε συνδυασμό με τις απαιτήσεις του καταναλωτικού κοινού για νέα, πολύπλοκα και ενδιαφέροντα προϊόντα, έχουν δημιουργήσει στην επιστήμη της Οινολογίας, νέες προκλήσεις. Η ενασχόληση με αλκοολικές ζυμώσεις χωρίς την παρουσία του μικροοργανισμού *Saccharomyces cerevisiae* αποτελεί μία υποσχόμενη βιοδιεργασία σχετιζόμενη τόσο με την Οινολογία όσο και με τη Λευκή Βιοτεχνολογία. Επομένως, είναι σημαντική η διερεύνηση των ειδών των μικροοργανισμών που μπορούν να συμμετάσχουν στη διαδικασία παραγωγής οίνου και αλκοόλης. Η συνεισφορά πλήθους ζυμομυκήτων που δεν ανήκουν στο γένος *Saccharomyces* στην αλκοολική ζύμωση είναι ένα θέμα που εξετάζεται από τη σύγχρονη οινολογική επιστήμη σε πολλές εκφάνσεις και προσεγγίσεις (φυσιολογία αύξησης, κινητική διεργασίας, μοριακή μικροβιολογία των non-*Saccharomyces* στελεχών, κλπ). Οι ζυμομύκητες αυτοί υπάρχουν αρχικά σε όλες τις ζυμώσεις των γλευκών τα οποία θα μετασηματιστούν σε οίνους, είναι μεταβολικά ενεργοί και τα προϊόντα τους επηρεάζουν την τελική ποιότητα του οίνου. Παρότι κάποιες φορές θεωρούνται μικροβιακή προσβολή, υπάρχουν ισχυρές αποδείξεις για το αντίθετο και έτσι θεωρείται πως οι ειρημένοι non-*Saccharomyces* μικροοργανισμοί έχουν θετικό αντίκτυπο στους οίνους κατά τη διεργασία παραγωγής αυτών.

Στην Ελλάδα, η πρώτη διεργασία που λαμβάνει χώρα κατά την οινοποίηση μετά τον τρυγητό, είναι εκείνη της ψύξης των σταφυλιών. Η εποχή της συγκομιδής είναι η καλοκαιρινή περίοδος, (Ιούλιος-Σεπτέμβριος), κι έτσι, λόγω των υψηλών εξωτερικών θερμοκρασιών είναι απαραίτητη η ψύξη πριν την έναρξη των διεργασιών. Μετά την ψύξη ακολουθεί η διαλογή, με σκοπό την βελτίωση της ποιότητας κατά 3-5%. Η ταινία διαλογής οδηγεί τα σταφύλια στη σταφυλοδόχο, από όπου συνεχίζουν την πορεία τους προς το εκφραγιστήριο. Εκεί πραγματοποιείται η αποβοστρίχωση (προαιρετικά), δηλαδή ο διαχωρισμός από τα στέμφυλα. Στη συνέχεια λαμβάνει χώρα η έκθλιψη των ραγών και η απελευθέρωση της σάρκας. Οι λευκοί οίνοι παράγονται από την ζύμωση του γλεύκους που αποτελείται αποκλειστικά από το χυμό, διαφόρων ποικιλιών σταφυλής. (Υπάρχουν και περιπτώσεις παραγωγής λευκών οίνων από ερυθρές ποικιλίες) (Ribéreau-Gayon *et al* 2006). Από την άλλη πλευρά, η παραγωγή των ερυθρών οίνων σχετίζεται με τη διεργασία ζύμωσης παρουσία των στεμφύλων. Κατόπιν, η σταφυλομάζα εισέρχεται στα πιεστήρια όπου και γλευκοποιείται. Ο χυμός που συλλέγεται από το πιεστήριο χωρίς να ασκηθεί πίεση ή με την εφαρμογή χαμηλής πίεσης στη σταφυλομάζα καλείται πρόρογος χυμός και είναι διαφορετικός





**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

από τους χυμούς που προκύπτουν έπειτα από πίεση. Οι διαφορές του εντοπίζονται στην τιμή της ενεργού οξύτητας (pH), της περιεκτικότητας σε κάλιο, της περιεκτικότητας σε πολυφαινόλες κ.α.. Σε πολλές περιπτώσεις οινοποιείται ξεχωριστά, αφού δίνει ανώτερης ποιότητας προϊόντα. Όταν πλέον έχει ληφθεί το γλεύκος, υποβάλλεται στη διαδικασία της απολάσπωσης. Η διαδικασία αυτή έχει ως σκοπό την απομάκρυνση από το γλεύκος αιωρούμενων σε αυτό σωματιδίων, όπως πηκτινικές ουσίες, στερεά σωματίδια που προέρχονται από τη σταφυλή κ.α.. Μετά από την απολάσπωση ο οίνος είναι πιο διαυγής, ενώ ενισχύεται το αρωματικό προφίλ του. Η οινοποίηση δεν αποτελεί απλώς την αλκοολική ζύμωση του γλεύκους, αλλά κυρίως τη διαδικασία εξαγωγής του καλύτερου μέρους των ραγών, ώστε να περιοριστεί η διάχυση συστατικών, ικανών να προκαλέσουν οσφρητικά και γευστικά ελαττώματα. Όταν ολοκληρωθούν οι προαναφερθείσες διεργασίες εκκινεί η αλκοολική ζύμωση συνήθως υπό στελεχών του μικροοργανισμού *Saccharomyces cerevisiae*, ενώ στην περίπτωση της ερυθρής οινοποίησης συνήθως μετά από το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης χωρεί η μηλικογαλακτική βιομετατροπή (Ribéreau-Gayon *et al* 2006, Compagno *et al* 2014).

Στην παρούσα δράση πραγματοποιήθηκε η μελέτη νέων στελεχών ζυμών και έγινε διερεύνηση των νέων αυτών ειδών μικροοργανισμών σχετικά με το εάν και κατά πόσο μπορούν να συμμετάσχουν στη διαδικασία παραγωγής οίνου καθώς και στη διεργασία παραγωγής αλκοόλης μέσω της αλκοολικής ζύμωσης. Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν και μελετήθηκαν είναι οι ακόλουθοι: *Candida boidinii* ATCC 32195, *C. oleophila* NRRL Y1613, *C. tropicalis* NRRL Y12968, *Kazachstania hellenica* Y8, *K. hellenica* Y58, *K. hellenica* Y59, *K. hellenica* Y60, *K. zonata* Y31, *K. zonata* Y32, *Metschnikowia (Candida) pulcherrima* LFMB 1, *Pichia ciferrii* F-60-10A, *Williopsis saturnus* NRRL Y17396, *Saccharomyces cerevisiae* Merlot, *Saccharomyces cerevisiae* Rhones, *Saccharomyces cerevisiae* Y16, *Saccharomyces cerevisiae* Y17, *Saccharomyces cerevisiae* Y18, *Saccharomyces cerevisiae* Y35, *Saccharomyces cerevisiae* Y25, *Saccharomyces cerevisiae* Y54, *Saccharomyces cerevisiae* Y10, *Saccharomyces cerevisiae* Y9, *Saccharomyces cerevisiae* Y13, *Saccharomyces cerevisiae* Y24, *Saccharomyces cerevisiae* MAK-1, *Saccharomyces cerevisiae* MAK-2, *Saccharomyces cerevisiae* CROSS-X, *Saccharomyces cerevisiae* X5, *Saccharomyces cerevisiae* Passion Fruit, *Saccharomyces cerevisiae* Sc9, *Saccharomyces cerevisiae* Sc13 και *Saccharomyces cerevisiae* Sc24. Ως θετικοί «μάρτυρες» μικροοργανισμοί παραγωγοί αιθανόλης είναι τα στελέχη του μικροοργανισμού *Saccharomyces cerevisiae* (Ribéreau-Gayon *et al* 2006, Kopsahelis *et al* 2012, Compagno *et al* 2014, Sarris & Papanikolaou, 2016). Ως αρνητικός



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



ανάπτυξη - εργασία - αλληλεγγύη

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

«μάρτυρας» μικροοργανισμός ο οποίος σίγουρα και υπό ουδεμία προϋπόθεση παράγει αλκοόλη ήταν ο μικροοργανισμός *Yarrowia lipolytica* (Paranikolaou & Aggelis 2010, 2019). Το στέλεχος του ανωτέρω είδους το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη ήταν το ACA-DC 50109, το οποίο σε παλαιότερες εργασίες έχει δείξει ότι είναι ικανό να παράγει σε υψηλές ποσότητες λιπίδια και κιτρικό οξύ κατά την καλλιέργειά του σε υδρόφιλα υποστρώματα υπό αερόβιες συνθήκες (Paranikolaou *et al* 2002, Makri *et al* 2010). Τα στελέχη με τα χαρακτηριστικά LMBF, MAK, LFMB, Merlot, Rhones και Υ είναι απομονώσεις του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γ.Π.Α., τα στελέχη *Saccharomyces cerevisiae* Sc9, *Saccharomyces cerevisiae* Sc13 και *Saccharomyces cerevisiae* Sc24 απομονώθηκαν από αυθόρμητες ζυμώσεις εγένοντο στο οινοποιείο «Santo Wines» (βλ. προηγούμενη ενότητα εργασίας) ενώ το στέλεχος με κωδικό ACA-DC προέρχεται από τη συλλογή του Εργαστηρίου Γαλακτοκομίας του Γ.Π.Α.. Τα στελέχη CROSS-X, X5 και Passion Fruit είναι εμπορικά στελέχη σακχαρομύκητα τα οποία χρησιμοποιούνται στην παραγωγή οίνου. Τα στελέχη με κωδικό NRRL Y, ATCC και F-60-10A προέρχονται από συλλογές των Η.Π.Α.

Εκκινώντας από την ικανότητα των μικροοργανισμών να καταβολίσουν συγκεκριμένους υδατάνθρακες, τα στελέχη ερευνήθηκαν ως προς την αύξησή τους σε συγκεκριμένη αρχική ποσότητα σακχάρου και απολύτως αερόβιες συνθήκες, υπό περιοριστικές σε άνθρακα συνθήκες. Σε αερόβιες καλλιέργειες μικροοργανισμών όπου η συγκέντρωση της πηγής άνθρακα (γλυκόζη) είναι σχετικά περιορισμένη (συγκέντρωση  $\leq 5,0$  g/L), η παραγωγή του CO<sub>2</sub> ισούται με την κατανάλωση του O<sub>2</sub>. Το επίπεδο της παραγόμενης βιομάζας είναι υψηλό υπό συνθήκες τέτοιες (περίπου 0,5 g ξηράς ουσίας δύνανται να παραχθούν από 1,0 g αναλωθείσας γλυκόζης, ο δε συντελεστής βιομετατροπής δύνανται να φθάσει και έως 0,80 g/g - Paranikolaou & Aggelis 2019), όπου, ως αναφέρθηκε, η αρχική συγκέντρωση των δυνάμενων να καταβολιστούν σακχάρων είναι χαμηλή. Όσο η συγκέντρωση της γλυκόζης ανεβαίνει, ο μικροοργανισμός αναγκάζεται να αναπαραχθεί ταχύτερα ώστε να διατηρήσει ένα σταθερό πληθυσμό στο θρεπτικό μέσο. Τόσο η παραγωγή του CO<sub>2</sub> όσο και η κατανάλωση του O<sub>2</sub> αυξάνονται αναλογικά με την αύξηση της συγκέντρωσης των σακχάρων, αλλά παραμένουν αλληλένδετες έως μια συγκεκριμένη τιμή ορισμένου κρίσιμου σημείου ( $\approx 2,0-9,0$  g/L). Για μια συγκεκριμένη κατηγορία ζυμών, από τη στιγμή που η συγκέντρωση της γλυκόζης θα ξεπεράσει το ανωτέρω κρίσιμο σημείο ξεκινά η ζύμωση παρά το γεγονός των οξειδωτικών συνθηκών οι οποίες ενυπάρχουν στο περιβάλλον της καλλιέργειας (Piškur *et al* 2006, Sarris *et al* 2014, Hagman & Piškur 2015). Τα πρώτα ένζυμα του κύκλου των τρικαρβοξυλικών



**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

οξέων (π.χ. η α-κετογλουταρική αφυδρογονάση) καθώς και ορισμένα ένζυμα της οξειδωτικής φωσφορύλιωσης, υπό τις συνθήκες αύξησης αυτές υφίστανται καταβολική καταστολή λόγω της περίσσειας γλυκόζης στο περιβάλλον της αύξησης (Piškur *et al* 2006, Sarris & Papanikolaou 2016). Η παραγωγή του CO<sub>2</sub> εξακολουθεί να αυξάνεται ταχέως αλλά δεν είναι πλέον συνυφασμένη με την κατανάλωση του O<sub>2</sub>. Η έναρξη της ζύμωσης ακολουθείται από κατακόρυφη πτώση της παραγόμενης βιομάζας σε επίπεδα του συντελεστή απόδοσης βιομάζας κάτω από 0,20 g/g (ενίοτε η τιμή αυτή είναι =0,02-0,05 g/g). Συνελόντι ειπείν, τα κύτταρα «διαισθάνονται» την παρουσία της (σχετικά υψηλής) συγκέντρωσης γλυκόζης και μεταδίδουν το σήμα για την παύση της αναπνευστικής δραστηριότητας. Η ικανότητα της σύνθεσης αιθανόλης από σάκχαρα αποτελεί την κύρια μεταβολική οδό των ανωτέρω ζυμών. Υπό αερόβιες συνθήκες συνεπώς, η κυτταρική αναπνοή είναι δυνατή καθώς το οξυγόνο είναι ο τελικός αποδέκτης των ηλεκτρονίων, μόνον όταν η αρχική συγκέντρωση γλυκόζης (ή άλλων σακχάρων τα οποία μεταβολίζονται τοιουτοτρόπως, όπως είναι η φρουκτόζη η σακχαρόζη, κλπ) στο μέσο ευρίσκεται χαμηλότερα από μια κρίσιμη τιμή (ως αναφέρθηκε πριν η κρίσιμη τιμή του σακχάρου είναι ≈2,0-9,0 g/L). Υπό αερόβιες συνθήκες και συγκέντρωση σακχάρου στο μέσο μεγαλύτερη από την κρίσιμη τιμή, ο μικροοργανισμός *Saccharomyces cerevisiae* και άλλοι μικροοργανισμοί εξακολουθούν να εκτελούν αλκοολική ζύμωση έως ότου η γλυκόζη (σάκχαρο) εξαιφθεί από το μέσο. Η ικανότητα αυτή καλείται φαινόμενο Crabtree (Hagman & Piškur 2015, Sarris & Papanikolaou 2016). Η δυνατότητα των μικροοργανισμών αυτών να επιδίδονται σε αλκοολική ζύμωση τόσο σε αναερόβιες όσο και σε αερόβιες συνθήκες αποτελεί μια από τις πιο υποσχόμενες ιδιότητές τους με πολλές εφαρμογές στη Βιομηχανική Βιοτεχνολογία (Hagman *et al* 2013).

### **Δράση 2.1: Αύξηση σε αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες των νέων ή υπαρχουσών απομονώσεων κατά την καλλιέργεια σε φιάλες.**

Στο παρόν εδάφιο, πλείστα των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν θετικά στο φαινόμενο Crabtree, και μελετήθηκε η φυσιολογική συμπεριφορά των σε υποστρώματα σακχάρων μεγαλύτερης συγκέντρωσης από την κρίσιμη, ώστε ο μεταβολισμός να οδεύσει προς την παραγωγή αιθανόλης. Δυο από τα πιο ενδιαφέροντα στελέχη, ήτοι τα νέα απομονωθέντα Ελληνικά στελέχη *Saccharomyces cerevisiae* Y16 και Y18 καλλιεργήθηκαν υπό αερόβιες συνθήκες σε υποστρώματα τύπου γλεύκου στα οποία ενίοτε υπήρχε μεγάλη αρχική συγκέντρωση σακχάρων και μελετήθηκε η παραγωγή αλκοόλης σε αυτές τις συνθήκες. Περαιτέρω, το βιοκτόνο



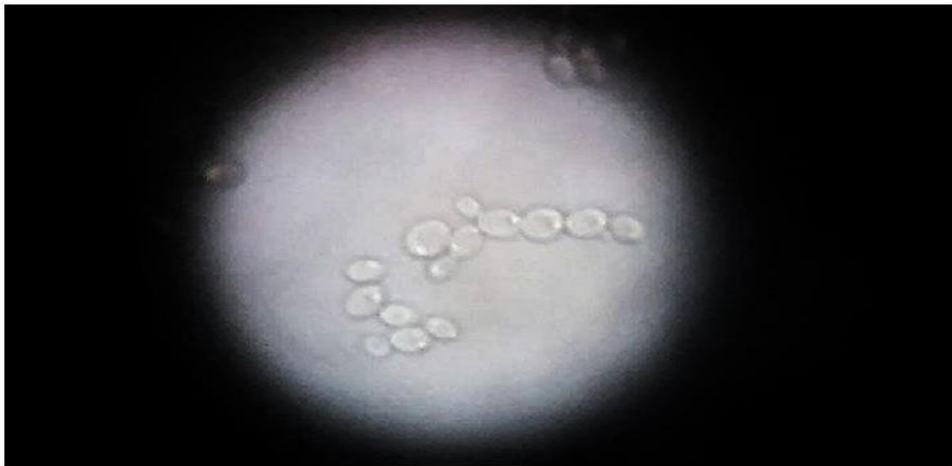
**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



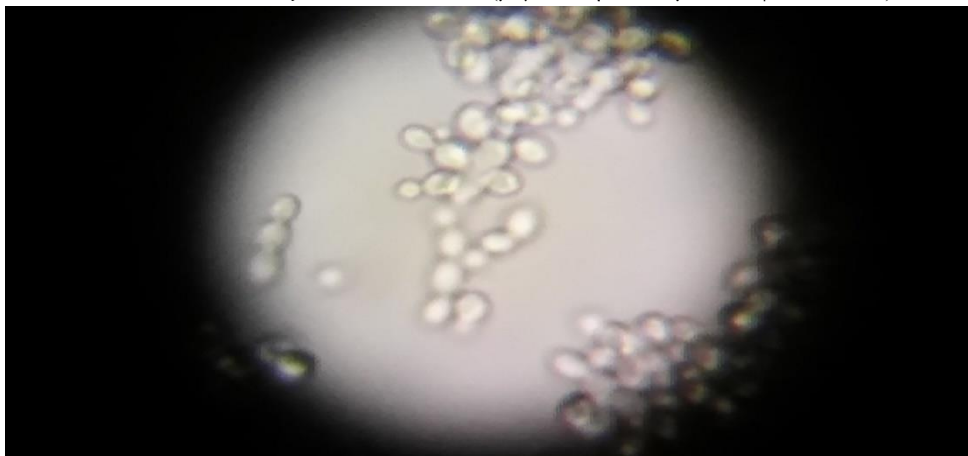
Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Myclobutanil προστέθηκε σε μη-αμελητέες ποσότητες και μελετήθηκε η «απαγωγή» του («removal») κατά τη διεργασία όλες αερόβιας αλκοολικής ζύμωσης από τα ανωτέρω στελέχη. Τέλος, το εμπορικό στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae* Passion Fruit καλλιεργήθηκε υπό αρχικώς μικρο-αερόφιλες και κατόπιν αναερόβιες συνθήκες σε φιάλες σε συνθήκες που προσομοίαζαν με λευκή οινοποίηση χρησιμοποιώντας Ασύρτικο γλεύκος και μελετήθηκε η παραγωγή μεταβολιτών από το στέλεχος αυτό, καθώς και τελικά η παραγωγή οίνου σε αυτές τις συνθήκες εργαστηριακής οινοποίησης.

Στις πιο κάτω εικόνες βλέπουμε χαρακτηριστικά στελέχη μικροοργανισμών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.



Εικόνα 1. *Saccharomyces cerevisiae* Y18 (μεγέθυνση αντικειμενικού φακού X 100).



Εικόνα 2. *Pichia ciferrii* F-60-10A (μεγέθυνση αντικειμενικού φακού X 100).



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



ανάπτυξη - εργασία - αλληλεγγύη

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Έκαστος των μικροοργανισμών, αναπτύχθηκε αρχικά σε προκαλλιέργεια για 24 ώρες. Οι προκαλλιέργειες ετοιμάζονται σε κωνικές φιάλες οι οποίες περιέχουν 50,0 mL απιονισμένο νερό ( $d H_2O$ ) και 1% (w/v) D-Glucose, 1% (w/v) peptone και 1% (w/v) yeast extract. Εν συνεχεία, αποστειρώνονται και όταν έλθουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος εμβολιάζονται με κύτταρα των μικροοργανισμών, υπό ασηπτικές συνθήκες. Τέλος, τοποθετούνται σε αναδευτήρα και αφήνονται να αναπτυχθούν υπό σταθερές και αερόβιες συνθήκες ( $T=29\pm 1^\circ C$ , ανάδευση  $180\pm 5$  rpm). Μετά το πέρας των 24 ωρών που χρειάζονται οι μικροοργανισμοί για να φτάσουν στη φάση εκθετικής αύξησης, γίνεται η προετοιμασία και παρασκευή των κυρίων καλλιιεργειών σε κωνικές φιάλες των 250,0 mL που περιείχαν θρεπτικό υλικό αποτελούμενο από 50,0 mL  $d H_2O$  και θρεπτικά συστατικά που παρατίθενται στον Πίνακα 1. Πεπτόνη και εκχύλισμα ζύμης σε διάφορες συγκεντρώσεις χρησιμοποιήθηκαν ως πηγές αζώτου.

Στην πρώτη σειρά πειραμάτων το υπόστρωμα αποτελούνταν από γλυκόζη διαφόρων συγκεντρώσεων (40,0-120,0 g/L). Τα άλατα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στις ζυμώσεις αναγράφονται στον Πίνακα 1. Στο δεύτερο set πειραμάτων υπήρξε καλλιέργεια κάποιων από όλους τους ανωτέρω μικροοργανισμούς σε συν-υπόστρωμα αποτελούμενο από γλυκόζη 30,0 g/L και φρουκτόζη 30,0 g/L, σε γλυκόζη συγκέντρωσης 180,0-240,0 g/L καθώς και σε χυμό σταφυλής εμπλουτισμένο με γλυκόζη και φρουκτόζη χωρίς τα άλατα. Όλες οι ζυμώσεις αυτές έλαβαν χώρα σε φιάλες των 250,0 mL, πεπληρωμένες με 50,0 mL μέσου υπό ανάδευση (αερόβιες διεργασίες).

Στην τρίτη σειρά πειραμάτων, έγιναν ζυμώσεις σε φιάλες των 2,0 L πεπληρωμένες με 1,450 L όπου εγένετο εμβολιασμός με 50,0 mL προκαλλιέργειας. Και εδώ οι ζυμώσεις ήταν υπό αεροβίωση (ανάδευση  $180\pm 5$  rpm). Στην τρίτη αυτή σειρά των πειραμάτων, αξιολογήθηκαν τα Ελληνικής προέλευσης στελέχη Y16 και Y18 και κατά τη διάρκεια των ζυμώσεων μελετήθηκε και η απαγωγή του βιοκτόνου Myclobutanil που είχε προστεθεί σε μη-αμελητέες ποσότητες στο υγρό της καλλιέργειας. Στο set αυτό των πειραμάτων, η συγκέντρωση του σακχάρου που χρησιμοποιήθηκε ως υλικό εκκίνησης ενίοτε ήταν πολύ υψηλή ( $\approx 250,0$  g/L - ήταν δηλαδή οι λεγόμενες «very high gravity fermentations»).

Τέλος έλαβαν χώρα σε αναερόβιες φιάλες μικροοινοποιήσεις υπό μικρο-αερόφιλες και κατόπιν αναερόβιες συνθήκες σε πρωτόλειο βιοαντιδραστήρα (φιάλες Duran) από τα στελέχη *Saccharomyces cerevisiae* Sc9, *Saccharomyces cerevisiae* Sc13, *Saccharomyces cerevisiae* Sc24, *Saccharomyces cerevisiae* Rhones, *Saccharomyces cerevisiae* *Saccharomyces cerevisiae* Merlot, *Saccharomyces cerevisiae* MAK-2,

*Saccharomyces cerevisiae* Y54 και *Saccharomyces cerevisiae* Passion fruit. Συγκεκριμένα, τα στελέχη *Saccharomyces cerevisiae* Sc9, *Saccharomyces cerevisiae* Sc13, *Saccharomyces cerevisiae* Sc24, *Saccharomyces cerevisiae* Rhones, *Saccharomyces cerevisiae* Merlot, *Saccharomyces cerevisiae* MAK-2 εμβολιάστηκαν και αναπτύχθηκαν σε T=25°C και ανάδευση 70rpm προς παραγωγή αιθανόλης. Κατόπιν στα στελέχη Sc13, Sc24 & Y54 πραγματοποιήθηκαν μικροβιακές ζυμώσεις σε βιοαντιδραστήρα, με ενεργό όγκο 1,5 L και υπόστρωμα εμπορική γλυκόζη, σε αναερόβιες συνθήκες. Η θερμοκρασία ήταν σταθερή στους 28°C και το pH ρυθμιζόταν στο 4,0 με χρήση 5 M NaOH. Για τις αναερόβιες συνθήκες ο αερισμός ήταν στα 0,1 vvm για 3 h και στη συνέχεια εφαρμόστηκε αναεροβίωση. Επίσης, επιλέχθηκε το εμπορικό στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae* Passion fruit και εμβολιάστηκε σε αζύμωτο γλεύκος τύπου Ασύρτικο. Η θερμοκρασία ήταν αυτή της λευκής οινοποίησης (T=18°C). Πραγματοποιήθηκε μικροοινοποίηση με ταυτόχρονο προσδιορισμό της παραγόμενης αιθανόλης, κατανάλωση των σακχάρων και προσδιορισμό των αρωματικών χαρακτηριστικών του παραγόμενου οίνου με την αέρια χρωματογραφία-φασματοσκοπία μαζών (GC-MS).

**Πίνακας 1.** Θρεπτικά συστατικά ανάπτυξης ζυμών (Papanikolaou *et al* 2002).

Αντιδραστήριο	Ποσότητα (g/L)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7,0
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,5
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	3,0
FeCl <sub>3</sub>	0,15
CaCl <sub>2</sub>	0,15
ZnSO <sub>4</sub>	0,02
MnSO <sub>4</sub>	0,06



**Εικόνα 3.** Αποστειρωμένες κωνικές φιάλες Erlenmeyer με υγρό θρεπτικό μέσο προκαλλιέργειας (φιάλες των 250,0 mL πεπληρωμένες με 50,0 mL υλικού).



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

### Α) Μελέτες επιλογής (screening) μικροοργανισμών σε ποικίλες αρχικές συγκεντρώσεις γλυκόζης ή/και φρουκτόζης

Για όλες τις αρχικές συνθήκες επιλογής (screening) οι δοθέντες μικροοργανισμοί καλλιεργήθηκαν σε περιοριστικές σε άνθρακα συνθήκες χρησιμοποιώντας τη γλυκόζη ως υλικό εκκίνησης με αρχική συγκέντρωση σακχάρου κυμαινόμενη από ~30,0 έως ~120,0 g/L. Πραγματοποιήθηκαν κινητικές με όλα τα στελέχη, και οι μέγιστες συγκεντρώσεις αιθανόλης καθώς και οι, στο αντίστοιχο σημείο της ζύμωσης, συγκεντρώσεις ξηράς μικροβιακής μάζας ( $X$ , g/L) και αναλωθείσας γλυκόζης ( $Glc_{cons}$ , g/L) φαίνονται στον κατωτέρω Πίνακα 2.

**Πίνακας 2.** Κινητικά δεδομένα κατά την αύξηση ποικίλων μικροοργανισμών σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκόζη. Παρουσιάζονται: Χρόνος (h),  $Glc_{cons}$ : συγκέντρωση καταναλωθέντος σακχάρου (g/L),  $X$ : ξηρά βιομάζα (g/L), EtOH: αιθανόλη (g/L),  $Y_{EtOH/Glc}$  (g/g): ποσότητα αιθανόλης ανά καταναλωθέν υπόστρωμα. Όλες οι τιμές εμφανίζονται όταν επιτυγχάνεται η μέγιστη τιμή αιθανόλης ( $EtOH_{max}$ , g/L). Κάθε σημείο που εμφανίζεται είναι ο μέσος όρος 2 ανεξαρτήτων μετρήσεων.

Στέλεχος	Χρόνος (h)	$Glc_{cons}$ (g/L)	$X$ (g/L)	EtOH (g/L)	$Y_{EtOH/Glc}$ (g/g)
<i>K. hellenica</i> Y8	21,0	26,1	2,8	11,9	0,45
<i>K. hellenica</i> Y58	17,0	26,4	3,5	12,1	0,46
<i>K. hellenica</i> Y59	17,0	26,1	2,5	12,7	0,49
<i>K. hellenica</i> Y60	17,0	26,5	4,1	12,4	0,48
<i>K. zonata</i> Y31	25,0	26,2	2,6	12,1	0,46
<i>K. zonata</i> Y32	17,0	25,9	4,5	11,7	0,45
<i>C. boidinii</i> ATCC 32195	32,0	55,6	5,5	22,2	0,40
<i>C. tropicalis</i> NRRL Y-12968	48,0	54,4	7,9	23,3	0,43
<i>M. pulcherrima</i> LFMB 1	26,0	54,6	8,7	17,4	0,32
<i>C. oleophila</i> NRRL Y-1613	26,0	55,5	8,4	18,8	0,34
<i>W. saturnus</i> NRRL Y-17396	24,0	55,3	7,5	21,0	0,38
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y16	22,0	55,1	5,3	21,2	0,39
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Merlot	21,0	82,1	5,7	29,1	0,35
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y17	21,0	84,2	5,7	29,1	0,35
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y18	32,0	85,9	4,5	40,2	0,47

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y35	72,0	75,6	3,9	30,1	0,40
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y25	51,0	57,0	2,9	26,7	0,47
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y54	52,0	112,2	7,1	41,0	0,37
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y10	48,0	78,0	3,2	30,5	0,39
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> MAK-1	30,0	88,3	5,0	36,3	0,41
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> MAK-2	30,0	88,0	4,4	39,6	0,45
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CROSS-X	34,0	89,1	4,0	40,0	0,45
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Passion Fruit	24,0	92,9	5,1	43,1	0,46
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> X5	32,0	84,6	4,5	40,2	0,48
<i>P. ciferrii</i> F-60-10A*	252,0	59,6	31,3	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Sc9	240,0	118,4	8,2	29,8	0,25
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Sc13	152,0	117,8	10,2	53,2	0,45
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Sc24	175,0	120,9	13,8	55,7	0,46
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Rhone	91,0	108,6	8,3	29,6	0,27
<i>Y. lipolytica</i> ACA-DC 50109*	216,0	59,7	13,2	-	-

\*: Τα στελέχη *P. ciferrii* F-60-10A και *Y. lipolytica* ACA-DC 50109 προφανώς απεδείχθησαν ως αρνητικά στο φαινόμενο Crabtree. Παρουσιάζεται στον πίνακα το χρονικό σημείο στο οποίο επιτυγχάνεται η μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας ( $X_{max}$ , g/L).

Με βάση τα πρώτα κινητικά αποτελέσματα τα οποία είχαμε στη διάθεσή μας (βλ. Πίνακας 2), τα στελέχη του γένους *Kazachstania* (ήτοι τα *K. hellenica* Y8, *K. hellenica* Y58, *K. hellenica* Y59, *K. hellenica* Y60, *K. zonata* Y31 και *K. zonata* Y32), τα οποία είναι νέες απομονώσεις από το Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων και αντίστοιχου τέτοιου τύπου μικροοργανισμοί δεν είχαν σε προηγούμενες εργασίες μελετηθεί ως προς την τέλεση αλκοολικής ζύμωσης και τη δυνατότητα παραγωγής αλκοόλης υπό αερόβιες συνθήκες, ενεφανίσθησαν όλα ως αρκετά ενδιαφέροντα ως προς τη δυνατότητα παραγωγής αλκοόλης. Συγκεκριμένα, σε όλα τα ειρημένα στελέχη ο συντελεστής απόδοσης της παραγόμενης αλκοόλης προς το καταναλωθέν σάκχαρο  $Y_{EtOH/Glc}$  ήταν  $\geq 0,45$  g/g, σε ορισμένες δε περιπτώσεις όπως σε αυτή του μικροοργανισμού *K. hellenica* Y59 ήταν  $=0,49$  g/g, τη στιγμή όπου ο μέγιστος θεωρητικός συντελεστής της ζύμωσης είναι 0,51 g/g (Ratledge 1991, Lin & Tanaka 2006, Sarris & Papanikolaou 2016). Όλοι οι ανωτέρω μικροοργανισμοί





**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ

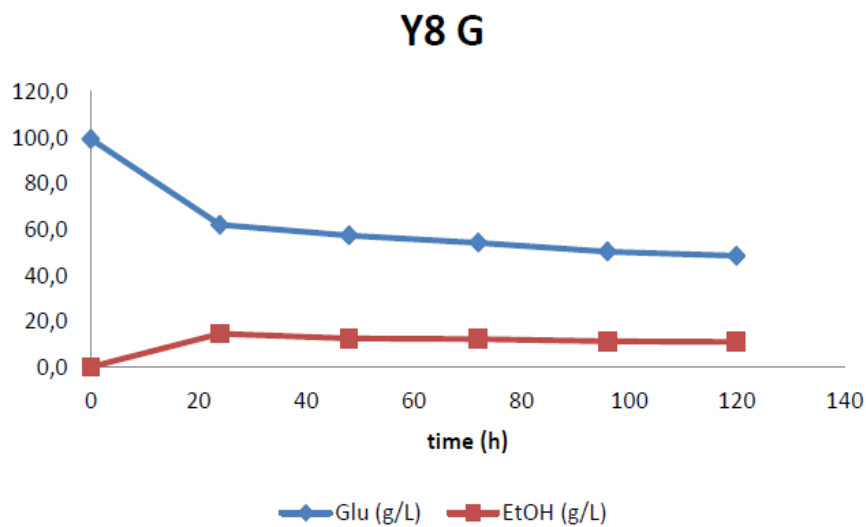


Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

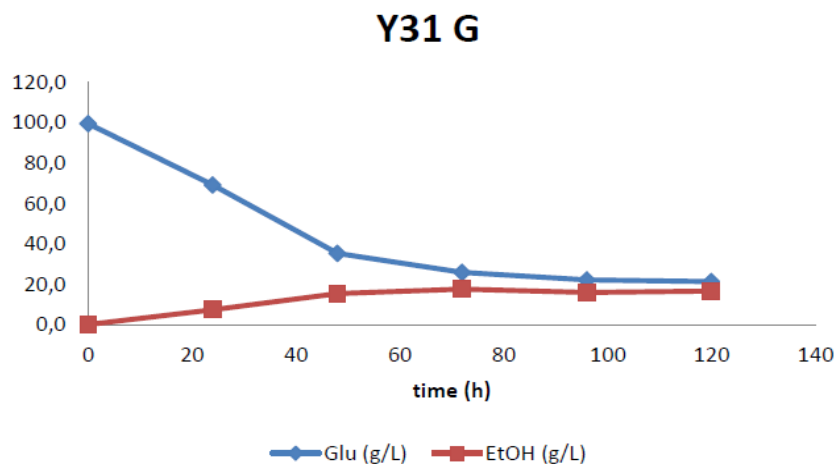
(*Kazachstania* sp.) καλλιεργήθηκαν και σε αντιστοιχού τύπου ζυμώσεις (αναδεδυόμενων φιαλών) με υλικό εκκίνησης τη φρουκτόζη, με αντίστοιχα κινητικά αποτελέσματα όπως αυτά της γλυκόζης (οι κινητικές δεν δίνονται).

Δεδομένης της πολύ ικανοποιητικής παραγωγής αλκοόλης από τα στελέχη του γένους αυτού ως προς το συντελεστή απόδοσης της παραγόμενης αιθανόλης προς την αναλυσκόμενη γλυκόζη, αλλά και της σχετικά χαμηλής αρχικής συγκέντρωσης γλυκόζης η οποία έλαβε χώραν για αυτούς τους μικροοργανισμούς (στον Πίνακα 2, μόνον για τους μικροοργανισμούς του γένους *Kazachstania* η αρχική συγκέντρωση γλυκόζης – Glc<sub>0</sub> ήταν ≈30,0 g/L ενώ στα άλλα στελέχη η αντίστοιχη συγκέντρωση ήταν 60,0-100,0 g/L), στο ίδιο εδάφιο και υπό τις ίδιες συνθήκες ανάδευσης και αερισμού πραγματοποιήθηκε για τους ανωτέρω μικροοργανισμούς καλλιέργεια με Glc<sub>0</sub>≈100,0 g/L, με τα αποτελέσματα να μην είναι το ίδιο ενθαρρυντικά (π.χ. βλ. ενδεικτικά κινητικές παραγωγής αιθανόλης και αφομοίωσης γλυκόζης για τα στελέχη *K. hellenica* Y8 και *K. zonata* Y31 στο Γράφημα 1 α και β).

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



1α



1β

**Γράφημα 1.** Καλλιέργεια των μικροοργανισμών *Kazachstania hellenica* Y8 και *Kazachstania zonata* Y31 σε υποστρώματα με βάση τη γλυκόζη και αρχική συγκέντρωση σακχάρου  $\approx 100,0$  g/L. Καλλιέργεια σε αναδεδυμένες φιάλες των 250,0 mL πεπληρωμένες κατά το  $\frac{1}{5}$  των.

Σε όλα τα στελέχη του γένους *Kazachstania* τα οποία μελετήθηκαν κατά την παρούσα εργασία, στις σχετικά αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκόζης παρατηρήθηκε το ίδιο κινητικό profile όπως στα στελέχη *K. hellenica* Y8 και *K. zonata* Y31, ήτοι μειωμένη κατανάλωση της γλυκόζης και παρουσία σχετικά υψηλών συγκεντρώσεων σακχάρου όταν η ζύμωση φαινόταν ότι σταματούσε, είτε συνολικά γενικά αργή κατανάλωση της γλυκόζης με αντιστοίχως πολύ μικρότερη παραγωγή αιθανόλης συγκριτικά με το



**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

πείραμα με τις χαμηλές συγκεντρώσεις σακχάρου. Ενδεικτικά για το μικροοργανισμό *K. zonata* Y31 (Γράφημα 1β), η υψηλότερη συγκέντρωση αιθανόλης η οποία παρατηρήθηκε ήταν  $\approx 19,0$  g/L (ταυτόχρονος συντελεστής απόδοσης  $Y_{EtOH/Glc}=0,25$  g/g) ενώ η αντίστοιχη διεργασία ζύμωσης για  $Glc_0 \approx 30,0$  g/L συνοδευόταν από  $Y_{EtOH/Glc}=0,46$  g/g.

Με εξαίρεση τα στελέχη *P. ciferrii* F-60-10A και *Y. lipolytica* ACA-DC 50109, τα οποία με βάση τα αποτελέσματα τα οποία επετεύχθησαν (Πίνακας 2) φαίνονται ως αρνητικά στο φαινόμενο Crabtree (για τη ζύμη *Y. lipolytica* τούτο ήταν αναμενόμενο, από την άλλη πλευρά, στελέχη της ζύμης *P. ciferrii* έχουν αναφερθεί να τελούν σε αλκοολική ζύμωση – Paranikolaou *et al* 2017) όλοι οι άλλοι μελετηθέντες μικροοργανισμοί παρήγαγαν αλκοόλη παρά το γεγονός των αεροβίων συνθηκών της διεργασίας, όντες θετικοί στο φαινόμενο Crabtree. Σε όλες τις περιπτώσεις, παρατηρήθηκε ταχεία κατανάλωση γλυκόζης, ταχεία παραγωγή αλκοόλης, και αξιοσημείωτη μείωση του κορεσμού σε οξυγόνο (Dissolved oxygen tension – DOT, % v/v) σε αρκετές περιπτώσεις σε επίπεδα αρκετά χαμηλά (π.χ.  $DOT \geq 10\%$  v/v). Μετά δε από την αποζύμωση της γλυκόζης, επέρχεται η ανακατανάλωση της αιθανόλης (φαινόμενο «make – accumulate – consume» - Piškur *et al* 2006, Sarris *et al* 2014), και εκ νέου παραγωγή βιομάζας με κινητική διαύξεσης (Sarris *et al* 2013, 2014). Τα κινητικά αποτελέσματα για το μικροοργανισμό *Saccharomyces cerevisiae* Y16, φαίνονται στο Γράφημα 2.



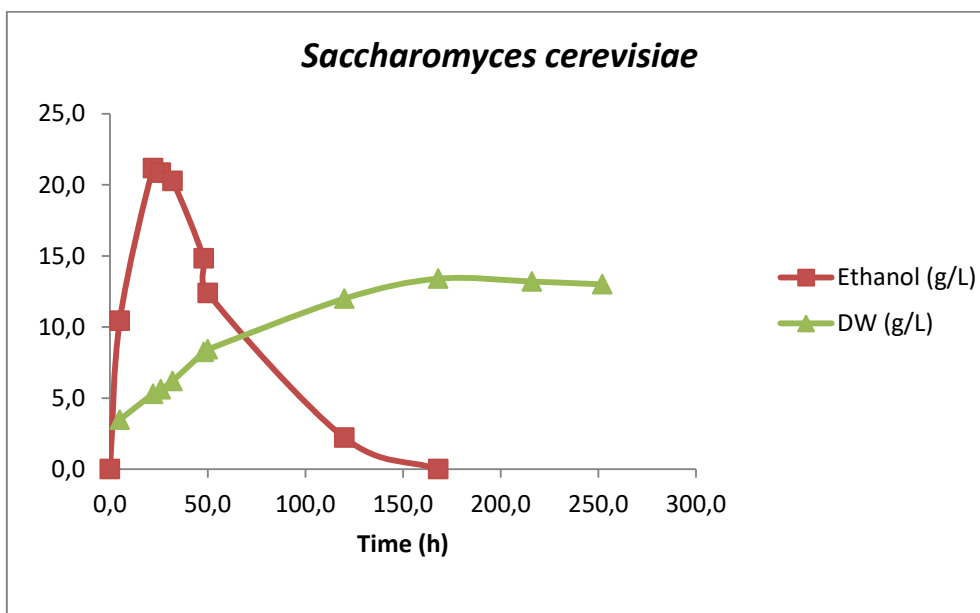
Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

ΕΠΑνεΚ 2014-2020  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ

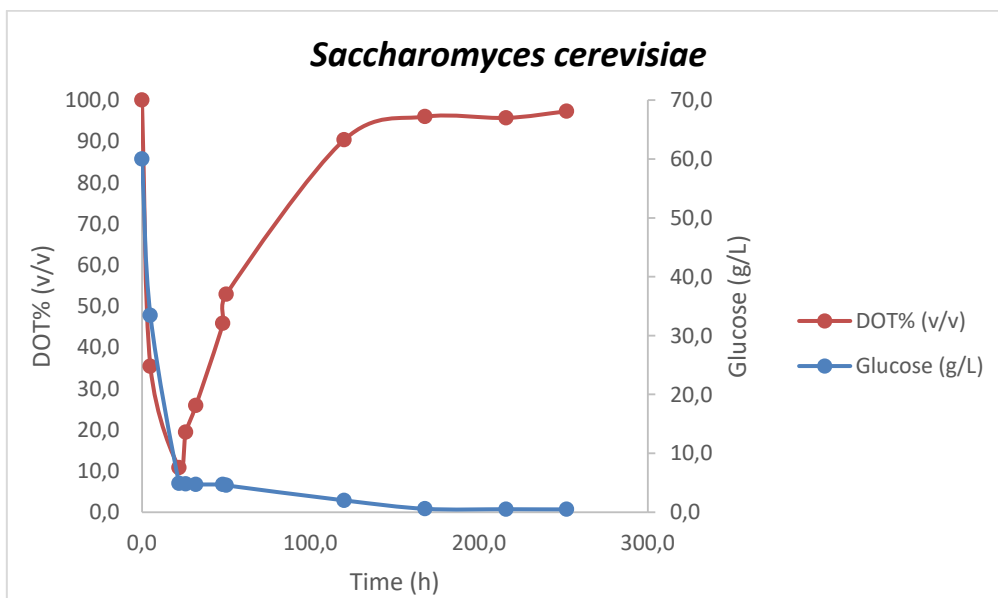


ανάπτυξη - εργασία - αλληλεγγύη

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



2α

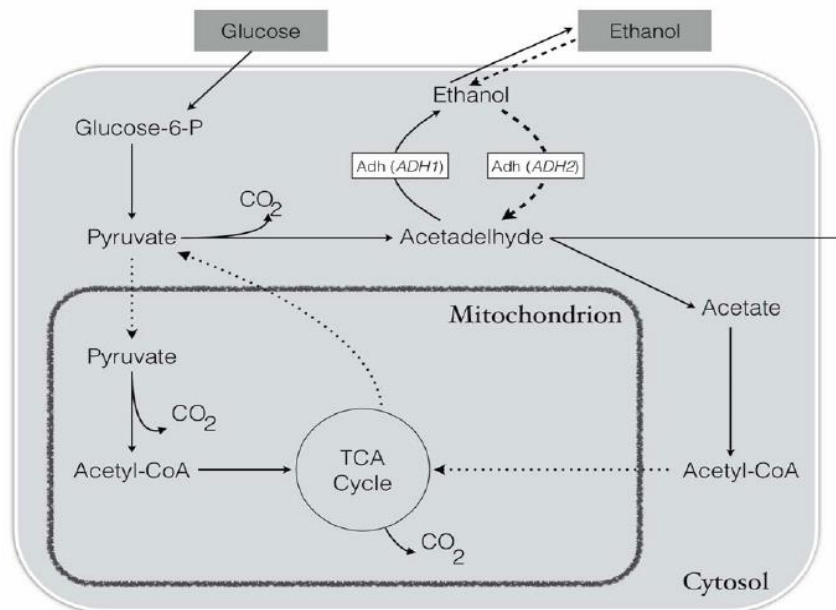


2β

**Γράφημα 2.** Καλλιέργεια του μικροοργανισμού *Saccharomyces cerevisiae* LMBF Y-16 σε υποστρώματα με βάση τη γλυκόζη και αρχική συγκέντρωση σακχάρου  $\approx 60,0$  g/L. Εξέλιξη της βιομάζας (DW, g/L) και της αιθανόλης (g/L) (α) και εξέλιξη της γλυκόζης (g/L) και της τάσης του διαλυτού οξυγόνου (DOT % v/v): στο μέσο καλλιέργειας. Καλλιέργεια σε αναδευόμενες φιάλες των 250,0 mL πεπληρωμένες κατά το  $\frac{1}{3}$  των.

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

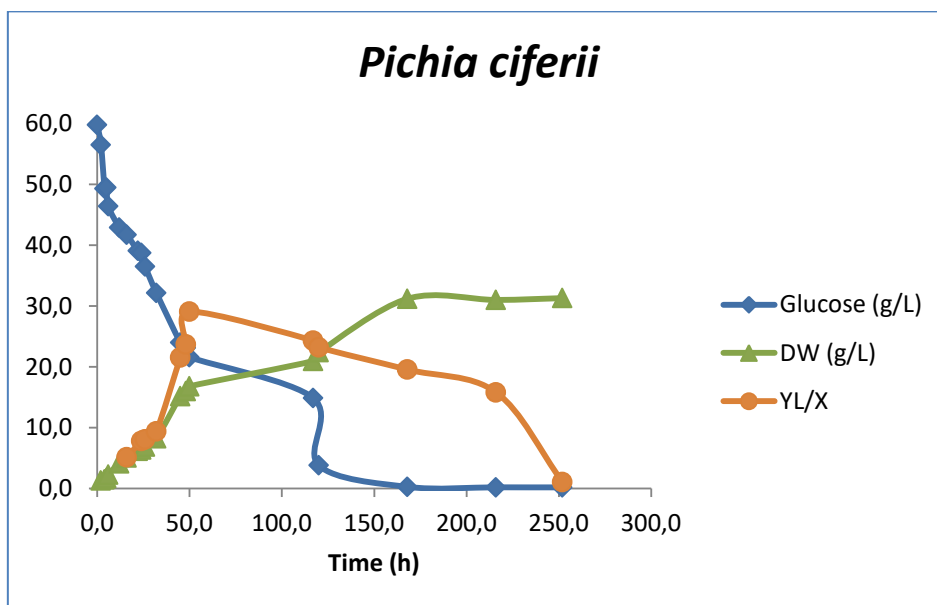
Το φαινόμενο «make – accumulate – consume» παρουσιάζεται στην Εικόνα 4.



**Εικόνα 4.** Αλκοολική ζύμωση, παραγωγή αλκοόλης και συνακόλουθη οξείδωση αυτής με χρήση του μικροοργανισμού *Saccharomyces cerevisiae* (Hagman *et al* 2013, Sarris *et al* 2014).

Από την άλλη πλευρά, ο μικροοργανισμός *P. ciferrii* F-60-10A εμφανίστηκε αρνητικός στο φαινόμενο Crabtree, αναλώνοντας με πολύ βραδύτερο ρυθμό τη γλυκόζη σε σχέση με τους θετικούς στο φαινόμενο Crabtree μικροοργανισμούς, ενώ παρήγαγε και μεγάλη ποσότητα βιομάζας ( $X=31,3$  g/L) (Γράφημα 3).

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



**Γράφημα 3.** Καλλιέργεια του μικροοργανισμού *P. ciferii* F-60-10A σε υποστρώματα με βάση τη γλυκόζη και αρχική συγκέντρωση σακχάρου  $\approx 60,0$  g/L. Εξέλιξη της βιομάζας (DW, g/L), της γλυκόζης (g/L) και του λίπους επί ξηράς βιομάζας (YL/X, % w/w) για το μικροοργανισμό αυτό. Καλλιέργεια σε αναδευόμενες φιάλες των 250,0 mL πεπληρωμένες κατά το  $\frac{1}{5}$  των.

Με ενδιαφέρον επίσης βλέπουμε το γεγονός ότι ο μικροοργανισμός συσσωρεύει λιπίδια ( $Y_{L/X} \approx 30\%$  w/w), παρά το γεγονός ότι, όπως αναφέρθηκε, οι καλλιέργειες ήταν περιοριστικές σε άνθρακα, ενώ με βάση τη βιβλιογραφία, για τη συσσώρευση λιπιδίων είναι αναγκαία προϋπόθεση ο περιορισμός σε άζωτο (Paranikolaou & Aggelis 2010, 2019). Περαιτέρω μελέτη για το μικροοργανισμό αυτό θα ήταν αναγκαία.

Ενδιαφέρον εστιάζεται και σχετικά με το μικροοργανισμό *W. saturnus* NRRL Y17396, ο οποίος παρήγαγε σε αρκετά ικανοποιητικά ποσά, τόσο βιομάζα όσο και αιθανόλη (βλ. Πίνακα 2). Ο μικροοργανισμός αυτός έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, λόγω της ικανότητάς του να μετατρέπει τις ανώτερες αλκοόλες στους αντίστοιχους αιθυλεστέρες. Παράγει υψηλά επίπεδα πτητικών εστέρων, ενώ σε υποστρώματα YPD (yeast extract-peptone-Glucose) δίνει υψηλές ποσότητες ισοαμυλικού αιθυλεστέρα. Έχουν επίσης πραγματοποιηθεί μελέτες σε κοινές καλλιέργειες του μικροοργανισμού με το μικροοργανισμό *Saccharomyces cerevisiae*, στις οποίες έχει αποδειχθεί η συνεισφορά του πρώτου στη σύνθεση πτητικών ενώσεων, όμως αναφέρεται αυξημένη και η παραγωγή οξικού οξέος. Σε δεύτερο χρόνο και στα πλαίσια προγράμματος που



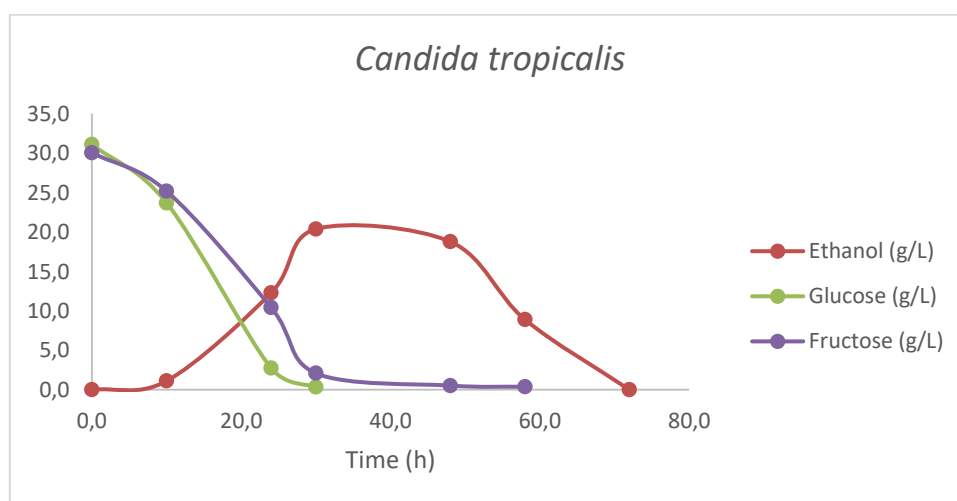
**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

θα ακολουθούσε την παρούσα ερευνητική προσπάθεια, ο μικροοργανισμός αυτός θα μπορούσε να αξιολογηθεί ως προς τη δυνατότητα παραγωγής οίνου υψηλής ποιότητας σε συνδυασμό με νεο-απομονωμένα στελέχη του *Saccharomyces cerevisiae*. Στον οίνο, αυτό θα είχε ως αποτέλεσμα πιθανή αύξηση της πτητικής οξύτητας, του παραγόμενου προϊόντος. Επιπλέον, θεωρείται από τους μικροοργανισμούς που παράγουν αρκετά μεγάλο εύρος αρωματικών και γευστικών συστατικών, που ενισχύουν την πολυπλοκότητα των οίνων.

Σε επόμενο στάδιο, ορισμένα στελέχη τα οποία δεν ήταν τύπου *Saccharomyces cerevisiae* ή *Kazachstania* sp. καλλιεργήθηκαν σε μίγματα γλυκόζης / φρουκτόζης (το γλεύκος περιέχει ισομοριακό μίγμα αυτών των σακχάρων) προκειμένου να αξιολογηθεί η εκλεκτικότητα στην ανάλωση των σακχάρων από τους μικροοργανισμούς αυτούς. Σε πολλές περιπτώσεις, η ανάλωση της γλυκόζης ήταν ελαφρώς ταχύτερη σε σχέση με αυτή της φρουκτόζης (Γράφημα 4).



**Γράφημα 4.** Καλλιέργεια του μικροοργανισμού *C. tropicalis* NRRL Y-12968 σε υποστρώματα με βάση τη γλυκόζη και τη φρουκτόζη και αρχική συγκέντρωση συνολικών σακχάρων  $\approx 60,0$  g/L. Εξέλιξη της γλυκόζης (g/L), της φρουκτόζης (g/L) και της αιθανόλης (g/L) για το μικροοργανισμό αυτό. Καλλιέργεια σε αναδευόμενες φιάλες των 250,0 mL πεπληρωμένες κατά το  $\frac{1}{3}$  των.

Στελέχη του είδους *Saccharomyces cerevisiae* καλλιεργήθηκαν σε αναδευόμενες φιάλες (250,0 mL) με υψηλή αρχική συγκέντρωση γλυκόζης (180,0-240,0 g/L) προκειμένου να αξιολογηθεί περαιτέρω η δυνατότητα παραγωγής αλκοόλης από τα στελέχη αυτά σε τέτοιου είδους διεργασίες, που προσομοιάζουν της «high gravity fermentation». Τα αποτελέσματα αναλύονται στον Πίνακα 3.



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

ΕΠΑνεΚ 2014-2020  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



ανάπτυξη - εργασία - αλληλεγγύη

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

**Πίνακας 3.** Κινητικά δεδομένα κατά την αύξηση μικροοργανισμών του είδους *Saccharomyces cerevisiae* σε υποστρώματα υψηλής αρχικής συγκέντρωσης γλυκόζης. Παρουσιάζονται: Χρόνος (h),  $Glc_{cons}$ : συγκέντρωση καταναλωθέντος σακχάρου (g/L),  $X$ : ξηρά βιομάζα (g/L), EtOH: αιθανόλη (g/L),  $Y_{EtOH/Glc}$  (g/g): ποσότητα αιθανόλης ανά καταναλωθέν υπόστρωμα. Όλες οι τιμές εμφανίζονται όταν επιτυγχάνεται η μέγιστη τιμή αιθανόλης ( $EtOH_{max}$ , g/L). Κάθε σημείο που εμφανίζεται είναι ο μέσος όρος 2 ανεξαρτήτων μετρήσεων.

Στέλεχος	Χρόνος (h)	$Glc_{cons}$ (g/L)	$X$ (g/L)	EtOH (g/L)	$Y_{EtOH/Glc}$ (g/g)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y35	95,0	166,8	2,7	52,1	0,31
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y25	94,0	164,7	2,6	46,9	0,29
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y54	168,0	179,3	6,1	68,5	0,38
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y10	72,0	117,1	3,9	40,0	0,34
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CROSS-X	72,0	178,6	6,4	82,2	0,46
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y16	67,0	172,3	4,8	78,3	0,45
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y17	69,0	190,4	6,4	84,3	0,44
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y18	72,0	177,5	5,1	82,9	0,47
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> MAK-1	72,0	176,8	5,1	79,9	0,45
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> MAK-2	96,0	145,2	3,6	66,4	0,46
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> X5	60,0	171,6	5,1	82,9	0,48
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Sc9	280,0	235,5	9,5	47,1	0,20
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Sc13	312,0	241,7	12,9	111,7	0,46
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Sc24	336,0	237,4	16,8	112,8	0,48
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Rhone	192,0	234,6	14,7	98,9	0,42
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Passion Fruit	76,0	200,5	6,4	91,1	0,45

Ως φαίνεται, τόσο από τα αποτελέσματα του Πίνακα 3 όσο και από αυτά του Πίνακα 2, όλα τα στελέχη του μικροοργανισμού *Saccharomyces cerevisiae* που καλλιεργήθηκαν υπό αερόβιες συνθήκες σε σύστημα αναδεδυόμενων φιαλών με υψηλή αρχική συγκέντρωση γλυκόζης (180,0-240,0 g/L), ανάλωσαν μεγάλες ποσότητες του σακχάρου με αρκετά ικανοποιητική ταχύτητα αφομοίωσης, ενώ παράχθηκαν ποικίλες ποσότητες αιθανόλης (ενίοτε πάρα πολύ υψηλές) από τους ειρημένους μικροοργανισμούς (40,0-112,8 g/L). Με ενδιαφέρον παρατηρήθηκε το γεγονός ότι ορισμένα νέα απομονωμένα στελέχη (π.χ. Y10, Y25, Y35, Y54) εμφάνισαν μάλλον χαμηλότερο συντελεστή απόδοσης παραχθείσας αιθανόλης προς αναλωθέν σάκχαρο ( $Y_{EtOH/Glc}$ , g/g) όταν η συγκέντρωση της γλυκόζης αυξήθηκε στο μέσο της ζύμωσης. Έτσι, επί παραδείγματι, για το στέλεχος Y25 ο συντελεστής  $Y_{EtOH/Glc}$  ήταν =0,47 g/g για αρχική συγκέντρωση γλυκόζης ( $Glc_0$ )  $\approx$ 100,0 g/L (Πίνακας 2), πέφτοντας στα 0,29 g/g για  $Glc_0 \approx$ 240 g/L (Πίνακας 3). Σε αμφοτέρως τις ανωτέρω ζυμώσεις, η γλυκόζη δεν αποζυμώθηκε αφού σημαντικές ποσότητες σακχάρου έμειναν ακατανάλωτες χωρίς τάση κατανάλωσης από το μικροοργανισμό. Ακατανάλωτα σάκχαρα σε αρκετά υψηλά ποσά, παρά την αξιοσημείωτη αφομοίωση



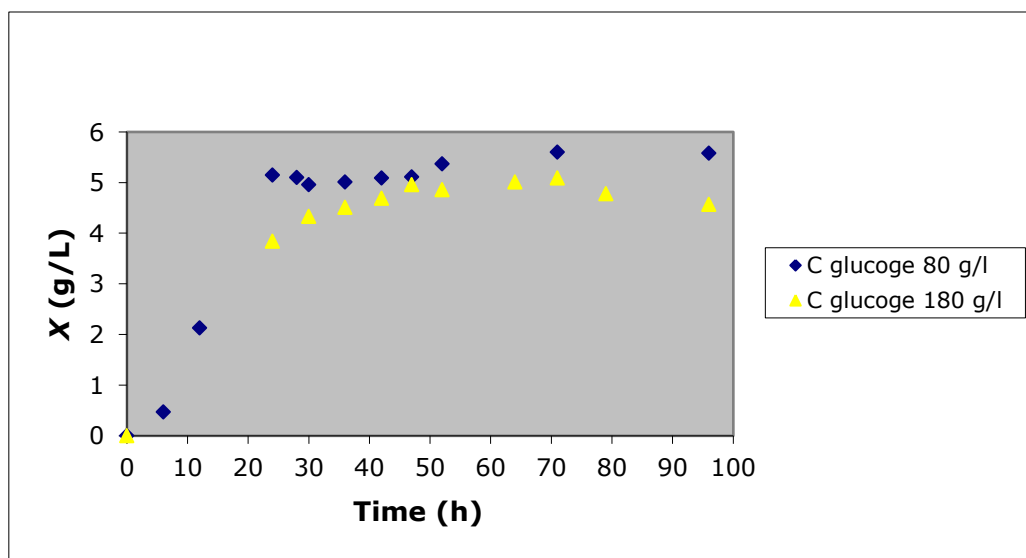


**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ

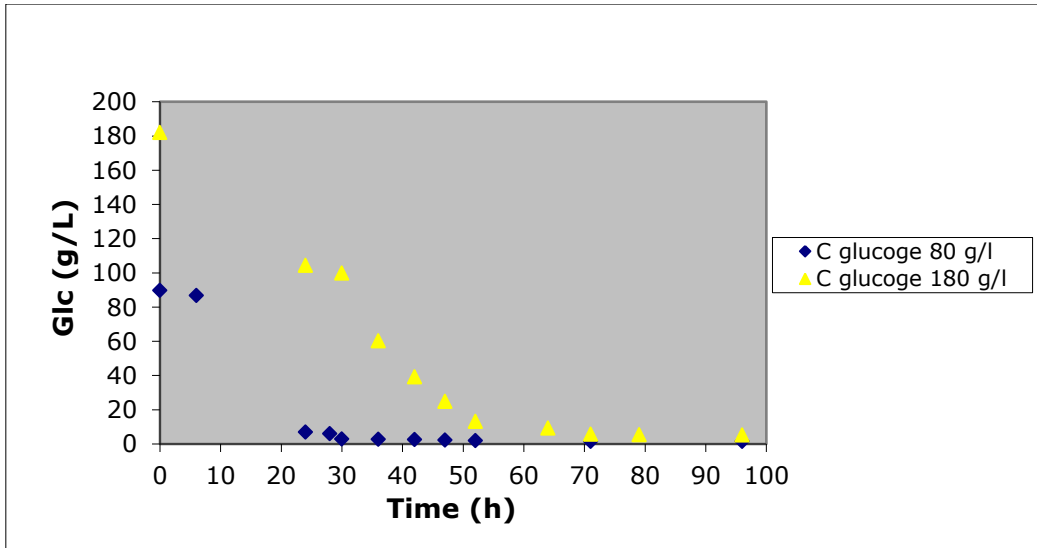


Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

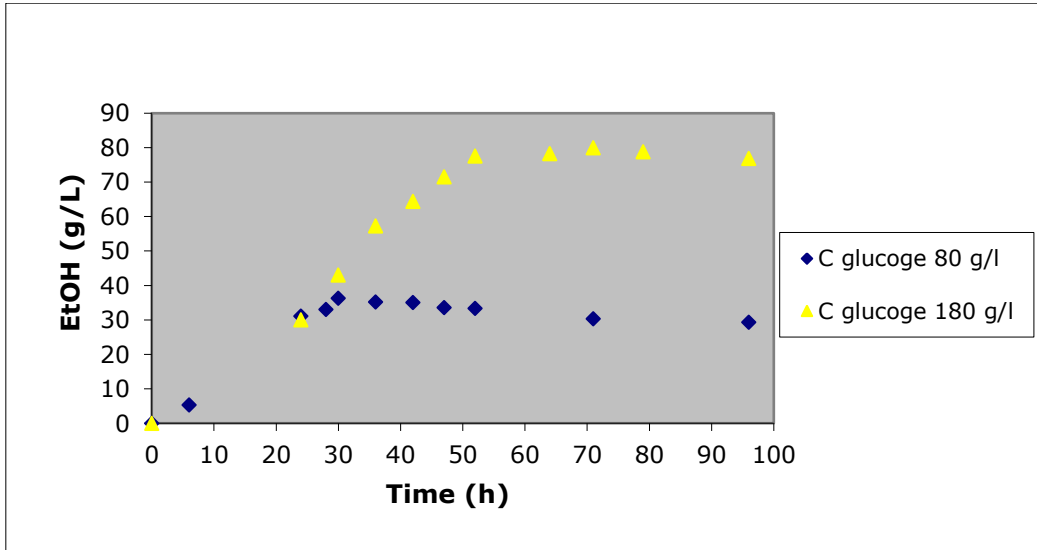
γλυκόζης (βλ. Πίνακα 3) παρατηρήθηκαν και σε άλλους μικροοργανισμούς (π.χ. στελέχη Y35, Y25, MAK-2). Η μείωση του συντελεστή απόδοσης της παραγόμενης αιθανόλης ως προς την καταναλωθείσα γλυκόζη, θα μπορούσε να εξηγηθεί δυνάμει της αύξησης του λόγου C/N μεταξύ των 2 καλλιεργειών (σε αμφότερα τα sets των ζυμώσεων, όλα τα συστατικά παρέμειναν σταθερά, όπως και η πηγή αζώτου, αλλά αυξήθηκε αξιοσημείωτα η συγκέντρωση της γλυκόζης, ως εκ τούτου αυξήθηκε ο λόγος C/N), ή λόγω παρεμπόδισης εκ του υποστρώματος (Sarris *et al* 2009, 2013). Από την άλλη πλευρά, αρκετά από τα εναπομείναντα στελέχη, τόσο τα άγρια (π.χ. Y16, Y17, Y18, MAK-1) όσο και τα εμπορικά (CROSS-X, Passion Fruit, X5), έδειξαν εξαιρετική κατανάλωση γλυκόζης, πολύ υψηλή παραγωγή αιθανόλης (έως 91,0 g/L, από τις υψηλότερες της βιβλιογραφίας - Sarris & Paranikolaou 2016) και πολύ ικανοποιητικό συντελεστή απόδοσης της αιθανόλης προς την αναλωθείσα γλυκόζη. Για όλους τους μικροοργανισμούς, ποσοτικοποιήθηκαν όλα τα δεδομένα της μικροβιακής αύξησης (π.χ. παραγωγή γλυκερόλης, οργανικών οξέων, κλπ). Χαρακτηριστική κινητική για το στέλεχος MAK-1, αυξανόμενο τόσο σε χαμηλή ( $\approx 80,0$  g/L) όσο και σε υψηλή ( $\approx 180,0$  g/L) αρχική συγκέντρωση γλυκόζης φαίνεται στο Γράφημα 5 (α-ε).



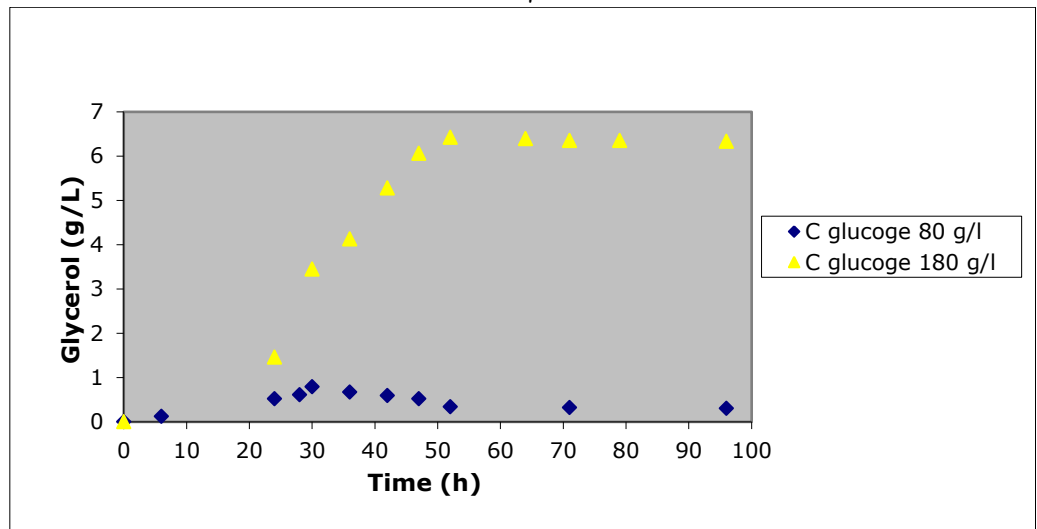
5α



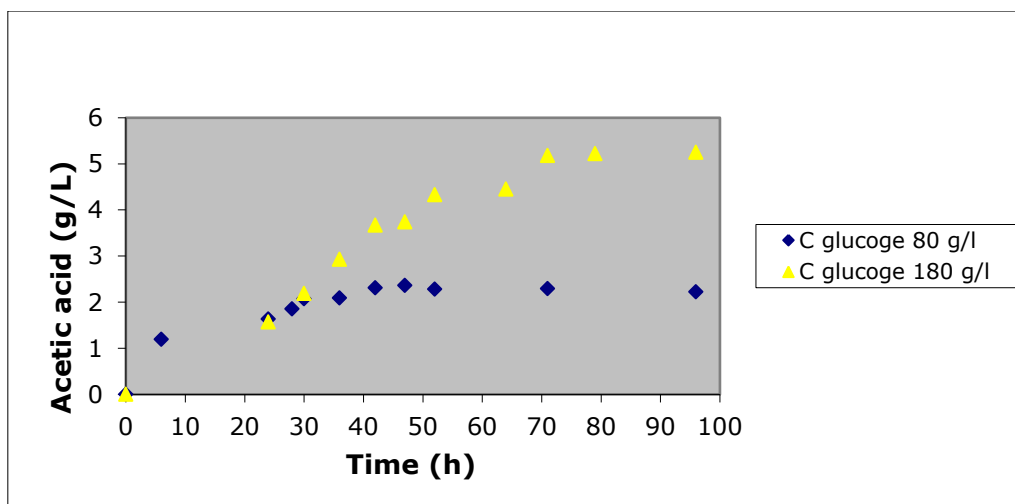
5β



5γ



5δ



5ε

**Γράφημα 5.** Καλλιέργεια του μικροοργανισμού *Saccharomyces cerevisiae* MAK-1 σε υποστρώματα με βάση τη γλυκόζη και αρχική συγκέντρωση συνολικών σακχάρων  $\approx 80,0$  g/L και  $\approx 180,0$  g/L. Εξέλιξη της βιομάζας (g/L) (α), της γλυκόζης (g/L) (β), της αιθανόλης (g/L) (γ), της γλυκερόλης (δ) και του οξικού οξέος (ε) για το μικροοργανισμό αυτό. Καλλιέργεια σε αναδευόμενες φιάλες των 250,0 mL πεπληρωμένες κατά το  $\frac{1}{3}$  των.

Περαιτέρω, η δυναμική παραγωγής αιθανόλης και βιομάζας κατά την αύξηση επιλεγμένων στελεχών ζυμών του είδους *Saccharomyces cerevisiae* (στελέχη Sc9, Sc13, Sc24, Merlot, MAK-2 και Rhone), αξιολογήθηκε κατά την αύξηση αυτών των μικροοργανισμών σε υποστρώματα με βάση τη γλυκόζη σε αναδευόμενες φιάλες Duran υπό μικροαερόφιλες (αρχικώς) και αναερόβιες (όσο χωρούσε η ζύμωση) συνθήκες, προκειμένου να αξιολογηθεί η βιοχημική συμπεριφορά των στελεχών αυτών υπό συνθήκες περιοριστικές σε οξυγόνο. Χρησιμοποιήθηκε υπόστρωμα γλυκόζης με δυο αρχικές συγκεντρώσεις (120 και 240 g/L), τα δε αποτελέσματα των καλλιεργειών εμφανίζονται στον Πίνακα 4. Με βάση τα αποτελέσματα τα οποία εμφανίζονται, η παραγωγή αιθανόλης η οποία εγένετο υπό ορισμένες συνθήκες ήταν πραγματικά πάρα πολύ υψηλή, ειδικά όταν η αρχική συγκέντρωση γλυκόζης ήταν  $\approx 240$  g/L (σε κάθε περίπτωση η παραχθείσα αιθανόλη εμφάνισε τιμές  $>100$  g/L, ενώ σε μια περίπτωση η επιτευχθείσα συγκέντρωση αιθανόλης ήταν  $\approx 120$  g/L). Από την άλλη πλευρά, και ο συντελεστής απόδοσης της παραγόμενης αιθανόλης προς την αναλίσκόμενη γλυκόζη σε ορισμένες περιπτώσεις ήταν εξαιρετικά υψηλός (σε μια περίπτωση, του στελέχους *Saccharomyces cerevisiae* Sc9 ήταν  $=0,51$  g/g, όσος ο μέγιστος θεωρητικός συντελεστής).



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

**Πίνακας 4.** Κινητικά δεδομένα υπό αναερόβιες συνθήκες κατά την αύξηση ποικίλων μικροοργανισμών σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκόζη υπό μικροαερόφιλες / αναερόβιες συνθήκες. Παρουσιάζονται: Χρόνος (h),  $Glc_{cons}$ : συγκέντρωση καταναλωθέντος σακχάρου (g/L), X: ξηρά βιομάζα (g/L), EtOH: αιθανόλη (g/L),  $Y_{EtOH/Glc}$  (g/g): ποσότητα αιθανόλης ανά καταναλωθέν υπόστρωμα. Όλες οι τιμές εμφανίζονται όταν επιτυγχάνεται η μέγιστη τιμή αιθανόλης ( $EtOH_{max}$ , g/L). Κάθε σημείο που εμφανίζεται είναι ο μέσος όρος 2 ανεξαρτήτων μετρήσεων.

Αρχική συγκέντρωση γλυκόζης	Στέλεχος	Χρόνος (h)	$Glc_{cons}$ (g/L)	X (g/L)	EtOH (g/L)	$Y_{EtOH/Glc}$ (g/g)
≈120 g/L	<i>S. cerevisiae</i> Sc9	214,0	120,5	3,3	61,3	0,51
	<i>S. cerevisiae</i> Sc13	140,0	119,6	11,3	56,3	0,47
	<i>S. cerevisiae</i> Sc24	140,0	121,9	10,6	57,8	0,47
	<i>S. cerevisiae</i> Merlot	72,0	121,1	4,8	50,8	0,42
	<i>S. cerevisiae</i> MAK-2	96,0	116,4	6,8	52,6	0,45
	<i>S. cerevisiae</i> Rhone	96,0	110,1	2,6	33,9	0,31
≈240 g/L	<i>S. cerevisiae</i> Sc9	280,0	231,3	7,5	102,2	0,44
	<i>S. cerevisiae</i> Sc13	190,0	241,6	14,1	111,8	0,46
	<i>S. cerevisiae</i> Sc24	190,0	237,6	12,7	114,9	0,48
	<i>S. cerevisiae</i> Merlot	192,0	225,9	11,7	119,1	0,49
	<i>S. cerevisiae</i> MAK-2	192,0	235,5	10,9	111,7	0,47
	<i>S. cerevisiae</i> Rhone	234,0	234,8	15,2	102,5	0,44

B) «Στοχευμένες» μελέτες καλλιέργειας επιλεγμένων μικροοργανισμών σε μεγαλύτερης κλίμακας διεργασίες - Αερόβιες και αναερόβιες ζυμώσεις

Στα πλαίσια της παρούσας δράσης πραγματοποιήθηκαν πιο «στοχευμένες» ζυμώσεις από ορισμένα από τα στελέχη τα οποία έδειξαν πολύ καλά αποτελέσματα στα



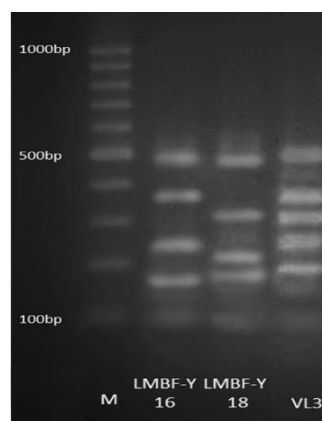
**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

προηγούμενα sets πειραμάτων. Έτσι, στο παρόν εδάφιο, μελετήθηκε η βιοχημική συμπεριφορά (παραγωγή βιομάζας, κατανάλωση υποστρώματος, παραγωγή αιθανόλης και λοιπών μεταβολιτών) σε δυο από τα «Ελληνικά» προσφάτως απομονωμένα στελέχη του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* (τα στελέχη Y16 και Y18) κατά την αύξησή τους σε υπόστρωμα γλεύκους σταφυλής το οποίο, σε ορισμένες ζυμώσεις, εμπλουτίστηκε με εμπορική γλυκόζη και φρουκτόζη μέχρι της αρχικής συγκέντρωσης των σακχάρων  $\approx 250,0$  g/L (είναι μια σχετικά συνήθης συγκέντρωση στα γλεύκη που προορίζονται για οινοποίηση) έτσι ώστε να υπάρξει και η δυνατότητα οινολογικής προσέγγισης της διεργασίας. Οι ζυμώσεις αυτές (ειδικά όπου η αρχική συγκέντρωση των συνολικών σακχάρων – TS<sub>0</sub>, είναι  $\approx 250,0$  g/L) μπορούν να χαρακτηριστούν και ως «very high gravity fermentations». Το υλικό εκκίνησης, ως αναφέρθηκε, ήταν χυμός σταφυλής ο οποίος, εμπλουτίστηκε με εμπορική γλυκόζη και φρουκτόζη μέχρι TS<sub>0</sub>  $\approx 150,0$  και  $\approx 250,0$  g/L. Περαιτέρω, το βιοκτόνο Myclobutanil προστέθηκε σε μη-αμελητέες ποσότητες και μελετήθηκε η «απαγωγή» του («removal») κατά τη διεργασία της αερόβιας αλκοολικής ζύμωσης από τα ανωτέρω στελέχη.

Αρχικώς, τα δυο νέα απομονωμένα στελέχη (Y16 και Y18) ταυτοποιήθηκαν ως ανήκοντα στο είδος *Saccharomyces cerevisiae* με βάση τα δεδομένα της ανάλυσης αλληλούχισης των D1/D2 περιοχών του γονιδίου 26S rRNA.



**Εικόνα 5.** Προφίλ ηλεκτροφόρησης για τα δυο στελέχη Y16 and Y18, με τους εκκινητές delta12-delta21. Το εμπορικό στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae* VL3 (Laffort) ήταν ο θετικός μάρτυρας.



**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι τα απομονωμένα στελέχη Y16 και Y18 αντιστοιχούσαν όντως σε δύο διαφορετικά στελέχη, η ενίσχυση (amplification) της περιοχής interdelta πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τους εκκινητές delta 12 και delta 21 (Legras & Karst 2003). Τω όντι τα 2 νέα απομονωμένα στελέχη ήσαν διαφορετικά (ο θετικός μάρτυρας ήταν το εμπορικό στέλεχος VL3 Laffort) (Εικόνα 5).

Στο δεύτερο μέρος αυτής της μελέτης, πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση της σύνθεσης του μέσου καθώς και του τύπου της καλλιέργειας αναδευομένων φιαλών που έλαβε χώρα. Σε αυτό το μέρος του πειράματος, χρησιμοποιήθηκε μόνον ο μικροοργανισμός *Saccharomyces cerevisiae* Y16 και έλαβαν χώρα συγκρίσεις μεταξύ του μέσου στο οποίο η γλυκόζη χρησιμοποιήθηκε ως υλικό εκκίνησης ενώ το μέσο αυτό ήταν συμπληρωμένο με άλατα (Πίνακας 1) σε σχέση με το μέσο που αποτελείται από γλεύκος σταφυλιών εμπλουτισμένο με σάκχαρα. Περαιτέρω, αξιολογήθηκε η κινητική κατά την αύξηση σε φιάλες των 250,0 mL πεπληρωμένες με 50,0 mL σε σχέση με φιάλες των 2,0 L πεπληρωμένες με 1,5 L. Επίσης, στο εδάφιο αυτό, τα θρεπτικά μέσα τα οποία αποτελούνταν από συμπληρωμένο με σάκχαρα χυμό σταφυλής, είχαν προηγουμένως υποστεί παστερίωση (10 min, T=95°C). Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 5.

**Πίνακας 5.** Κινητικά δεδομένα κατά την αύξηση του στελέχους *Saccharomyces cerevisiae* LMBF-Y 16 σε υποστρώματα υψηλής αρχικής συγκέντρωσης σακχάρου. Παρουσιάζονται: Χρόνος (h), TS<sub>0</sub>: Αρχική συγκέντρωση σακχάρων (g/L), TS<sub>f</sub>: Τελική συγκέντρωση σακχάρων (g/L), X: ξηρά βιομάζα (g/L), EtOH<sub>max</sub>: μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης (g/L), Y<sub>EtOH/TS</sub>: ποσότητα αιθανόλης ανά καταναλωθέν υπόστρωμα (g/g), Glol: Γλυκερόλη (g/L). Όλες οι τιμές εμφανίζονται όταν η μέγιστη τιμή αιθανόλης (EtOH<sub>max</sub>, g/L) επιτυγχάνεται στην πραγματοποιηθείσα διεργασία. Κάθε σημείο που εμφανίζεται είναι ο μέσος όρος 2 ανεξαρτήτων μετρήσεων.

Medium type	Χρόνος (h)	Flask type	TS <sub>0</sub> (g/L)	TS <sub>f</sub> (g/L)	X (g/L)	EtOH <sub>max</sub> (g/L)	Y <sub>EtOH/TS</sub> (g/g)	Glol (g/L)
Glucose-based, salts added	72,0	250 mL	214,7	92,5	5,5	47,6	0,39	3,9
Enriched grape must, no salts	73,0	250 mL	222,6	6,6	7,9	82,3	0,38	4,1
Enriched grape must, no salts	49,0	2.0 L	211,8	2,6	9,8	85,8	0,41	4,2

Με βάση τα δεδομένα τα οποία αναλύονται στον Πίνακα 5, σαφώς καλύτερα αποτελέσματα επιτεύχθηκαν στο set πειραμάτων με χρήση του εμπλουτισμένου με σάκχαρα σταφυλοχυμού σε σχέση με το συνθετικό μέσο στο οποίο είχε προστεθεί γλυκόζη. Θα πρέπει να σημειωθεί επίσης ότι τελικά οι ζυμώσεις οι οποίες εγένοντο στις φιάλες των 2,0 L επέτυχαν σαφώς μεγαλύτερη συγκέντρωση βιομάζας και

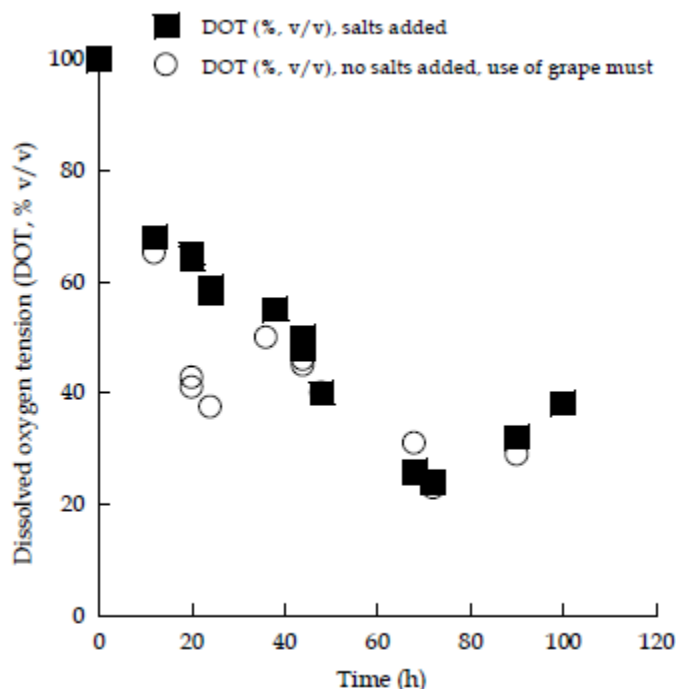


**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

ελάχιστα μεγαλύτερη συγκέντρωση αιθανόλης (βλ. Πίνακα 5) υποδηλώνοντας την καταλληλότητα της διεργασίας αυτής με τη χρήση των φιαλών 2,0 L προς την παραγωγή αιθανόλης. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι μεγαλύτερες ποσότητες βιομάζας επιτεύχθηκαν κατά τη ζύμωση με τις φιάλες των 2,0 L, ενώ η διεργασία η οποία πραγματοποιήθηκε στις φιάλες των 250,0 mL ήταν αυστηρώς αερόβια (Γράφημα 6).



**Γράφημα 6.** Εξέλιξη του κορεσμού σε οξυγόνο κατά την καλλιέργεια του μικροοργανισμού *Saccharomyces cerevisiae* Y16 σε υποστρώματα με βάση τη γλυκόζη ή το χυμό σταφυλής εμπλουτισμένο με σάκχαρο. Καλλιέργεια σε αναδεδυόμενες φιάλες των 250,0 mL πεπληρωμένες κατά το 1/3 των.

Κατόπιν, αμφότεροι οι μικροοργανισμοί Y16 και Y18 καλλιεργήθηκαν σε υποστρώματα τύπου χυμού σταφυλής εμπλουτισμένα με σάκχαρο ( $TS_0 \approx 150,0$  και  $\approx 250,0$  g/L) στα οποία προστέθηκε το μυκητοκτόνο Myclobutanil. Τα αποτελέσματα των ζυμώσεων φαίνονται στους Πίνακες 6 (στέλεχος Y16) και 7 (Y18).

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

**Πίνακας 6.** Κινητικά δεδομένα κατά την αύξηση του στελέχους *Saccharomyces cerevisiae* Y16 σε υποστρώματα υψηλής αρχικής συγκέντρωσης σακχάρου με βάση το χυμό της σταφυλής. Παρουσιάζονται: Χρόνος (h),  $TS_0$ : Αρχική συγκέντρωση σακχάρων (g/L),  $TS_f$ : Τελική συγκέντρωση σακχάρων (g/L), X: ξηρά βιομάζα (g/L),  $EtOH_{max}$ : μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης (g/L),  $Y_{EtOH/TS}$ : ποσότητα αιθανόλης ανά καταναλωθέν υπόστρωμα (g/g), Glol: Γλυκερόλη (g/L). Όλες οι τιμές εμφανίζονται όταν η μέγιστη τιμή αιθανόλης ( $EtOH_{max}$ , g/L) επιτυγχάνεται στην καλλιέργεια. Κάθε σημείο που εμφανίζεται είναι ο μέσος όρος 2 ανεξαρτήτων μετρήσεων. Ο πίνακας δα αντιστοιχεί σε  $TS_0 \approx 150,0$  g/L, ενώ ο βδ αντιστοιχεί σε  $TS_0 \approx 250,0$  g/L.

Χρόνος (h)	Myclobutanil (mg/L)	$TS_0$ (g/L)	$TS_f$ (g/L)	X (g/L)	Glol (g/L)	$EtOH_{max}$ (g/L)	$Y_{EtOH/TS}$ (g/g)
45	-	147,8	2,4	9,1	3,8	68,0	0,47
46	0,1	150,2	1,7	9,3	4,4	60,1	0,40
44	1,0	156,2	5,1	8,4	4,2	62,2	0,41

α

Χρόνος (h)	Myclobutanil (mg/L)	$TS_0$ (g/L)	$TS_f$ (g/L)	X (g/L)	Glol (g/L)	$EtOH_{max}$ (g/L)	$Y_{EtOH/TS}$ (g/g)
68	-	243,2	1,0	7,6	5,4	112,3	0,46
73	0,1	248,3	3,2	10,2	5,2	105,2	0,43
69	1,0	252,2	3,0	9,5	5,3	105,0	0,42

β

**Πίνακας 7.** Κινητικά δεδομένα κατά την αύξηση του στελέχους *Saccharomyces cerevisiae* Y18 σε υποστρώματα υψηλής αρχικής συγκέντρωσης σακχάρου με βάση το χυμό της σταφυλής. Παρουσιάζονται: Χρόνος (h),  $TS_0$ : Αρχική συγκέντρωση σακχάρων (g/L),  $TS_f$ : Τελική συγκέντρωση σακχάρων (g/L), X: ξηρά βιομάζα (g/L),  $EtOH_{max}$ : μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης (g/L),  $Y_{EtOH/TS}$ : ποσότητα αιθανόλης ανά καταναλωθέν υπόστρωμα (g/g),  $Y_{X/TS}$ : ποσότητα ξηράς βιομάζας ανά καταναλωθέν υπόστρωμα (g/g), Glol: Γλυκερόλη (g/L). Όλες οι τιμές εμφανίζονται όταν η μέγιστη τιμή αιθανόλης ( $EtOH_{max}$ , g/L) επιτυγχάνεται στην καλλιέργεια. Κάθε σημείο που εμφανίζεται είναι ο μέσος όρος 2 ανεξαρτήτων μετρήσεων. Ο πίνακας δα αντιστοιχεί σε  $TS_0 \approx 150,0$  g/L, ενώ ο βδ αντιστοιχεί σε  $TS_0 \approx 250,0$  g/L.

Χρόνος (h)	Myclobutanil (mg/L)	$TS_0$ (g/L)	$TS_f$ (g/L)	X (g/L)	Glol (g/L)	$EtOH_{max}$ (g/L)	$Y_{EtOH/TS}$ (g/g)
46	-	167,6	3,5	9,6	2,4	79,0	0,48
48	0,1	160,0	2,2	10,0	2,4	62,6	0,40
48	1,0	160,6	5,2	9,8	2,2	62,4	0,40

α

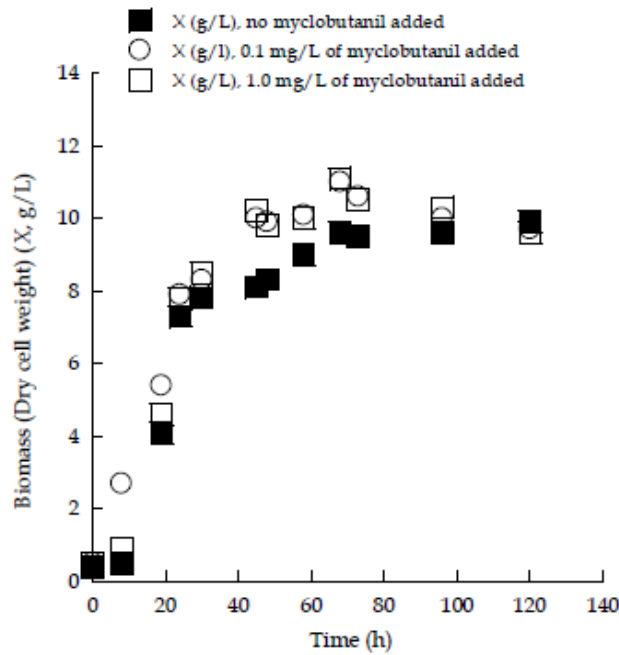
Χρόνος (h)	Myclobutanil (mg/L)	$TS_0$ (g/L)	$TS_f$ (g/L)	X (g/L)	Glol (g/L)	$EtOH_{max}$ (g/L)	$Y_{EtOH/TS}$ (g/g)
68	-	259,3	2,5	9,6	3,5	125,0	0,49
73	0,1	250,0	3,8	10,6	3,5	112,2	0,45
73	1,0	255,2	4,0	10,5	3,0	112,0	0,45

β

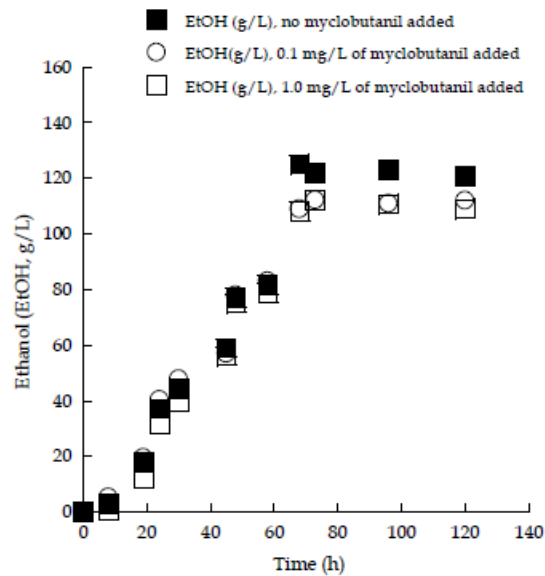
Ενδεικτικές κινητικές του στελέχους Y18 κατά την αύξηση του σε υποστρώματα τύπου χυμού σταφυλής ( $TS_0 \approx 250,0$  g/L) εμφανίζονται στο Γράφημα 7 (α-γ).



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

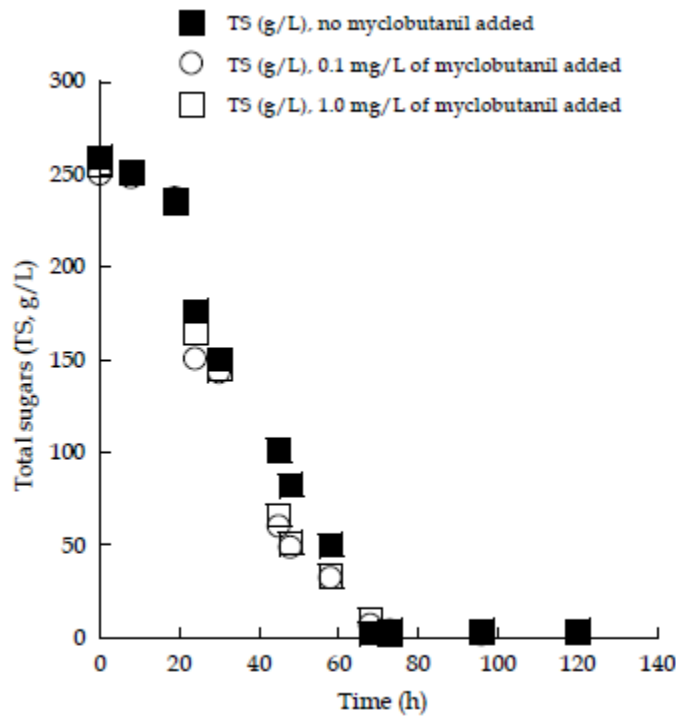


α



β

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



γ

**Γράφημα 7.** Εξέλιξη της βιομάζας (X, g/L) (α), της αιθανόλης (EtOH, g/L) (β) και των συνολικών σακχάρων (TS, g/L) (γ) κατά την καλλιέργεια του μικροοργανισμού *Saccharomyces cerevisiae* Y18 σε υποστρώματα με το χυμό σταφυλής εμπλουτισμένο με σάκχαρα σε αρχική συγκέντρωση σακχάρων  $\approx 250,0$  g/L. Καλλιέργεια σε αναδεδυόμενες φιάλες των 2,0 L πεπληρωμένες με 1,5 L καλλιέργειας.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αμφότερα τα στελέχη παρουσίασαν υψηλή ζυμωτική ικανότητα δεδομένου ότι ανεξαρτήτως του στελέχους που χρησιμοποιήθηκε καθώς και της αρχικής συγκέντρωσης σε σάκχαρα στο μέσο της ζύμωσης, καταναλώθηκε το σύνολο σχεδόν της διαθέσιμης πηγής άνθρακα ενώ παράχθηκε σημαντική ποσότητα βιομάζας και αλκοόλης (Πίνακας 6 και 7). Η παραγωγή αλκοόλης από αμφότερα τα στελέχη ήταν από τις υψηλότερες της διεθνούς βιβλιογραφίας (βλ. σύνθεση βιβλιογραφίας στο άρθρο από Τερπου *et al* 2019 - Πίνακας 8).



**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

**Πίνακας 8.** Βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με την αλκοολική ζύμωση και την παραγωγή αιθανόλης από στελέχη του είδους *Saccharomyces cerevisiae*. Σύγκριση των αποτελεσμάτων με την παραγωγή που επιτεύχθηκε από τα στελέχη *Saccharomyces cerevisiae* Y16 και Y18.

Yeast Strain	Carbon source	Initial sugar concentration (g/L)	EtOH (g/L)	
Bakers' yeast	Carob pod	200,0-350,0	~62,0	
Bakers' yeast	Molasses	150,0-300,0	53,0	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Carob Pod Extracts (Saccharose)	200,0	95,0	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NP01	Sweet sorghum juice	280,0-300,0	134,3	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> BY4741	Sweet sorghum juice concentrated	278,6	113,7	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NP01	Sucrose	280,0	95,3	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 27817	Glucose	50,0-200,0	5,1-91,8	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 2.399	Glucose	32,0	13,7	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 24860	Glucose	150,0	48,0	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CMI237	Sugar	160,0	70,0	
<i>K. marxianus</i>	Lactose	170,0-190,0	83,2	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 24860	Molasses	2,0-50,0	5,0-18,4	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCYC 1119	Molasses	100,0	40,0	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> AXAZ-1	Molasses	~216,0	71,3	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 26602	Flour hydrolysates	150,0	76,0	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> sp. & <i>K. marxianus</i> blends	Henequen juice & molasses blends	~215,0	41,2	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y16	Grape must	250,0	112,3	Έργο Oenovation
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y18	Grape must	250,0	125,0	Έργο Oenovation

Ωστόσο η προσθήκη Myclobutanil φαίνεται ότι επέδρασε ελαφρώς αρνητικά στη βιοσύνθεση αιθανόλης για αμφότερα τα στελέχη. Συγκεκριμένα, και παρά τη μεγάλη παραγωγή αιθανόλης (60,0-112,0 g/L για το στέλεχος Y16 και 62,0-125,0 g/L για το στέλεχος Y18) ο συντελεστής απόδοσης της παραγόμενης αιθανόλης προς το αναλωθέν σάκχαρο έβαινε σχετικά μειούμενος με την αύξηση του Myclobutanil στο μέσο της καλλιέργειας (Πίνακας 6 και 7). Από την άλλη πλευρά, υπήρξε μια σχετική αύξηση στην παραγωγή κυτταρικής μάζας με την προσθήκη του βιοκτόνου στο μέσο της αύξησης. Αντιθέτως η αιθανόλη παράχθηκε σε σημαντικά υψηλές ποσότητες σε τιμές που πλησιάζουν τα μέγιστα θεωρητικά δεδομένα ειδικά όταν δεν υπήρχε το



**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
**ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ**  
**ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ**  
**ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ**  
**ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ**



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

βιοκτόνο στο μέσο της αύξησης (μέγιστο ποσοστό απόδοσης 49%). Τέλος, υπήρξε απαγωγή του βιοκτόνου κατά τη διάρκεια της ζύμωσης (Πίνακας 9).

**Πίνακας 9.** Απαγωγή του μυκητοκτόνου Myclobutanil κατά την αλκοολική ζύμωση εμπλουτισμένων με σάκχαρα χυμών σταφυλής από τα στελέχη *Saccharomyces cerevisiae* Y16 και Y18.

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y16				
Initial sugars (g/L)	~150,0	~250,0	~150,0	~250,0
Myclobutanil (mg/L)	1,0	1,0	0,1	0,1
Ethanol (g/L)	62,2	105,0	60,1	105,2
Biomass (g/L)	8,4	9,5	9,3	10,2
Myclobutanil decomposition %	5,0	16,0	23,0	27,0
α				
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y18				
Sugars (g/L)	~150,0	~250,0	~150,0	~250,0
Myclobutanil (mg/L)	1,0	1,0	0,1	0,1
Ethanol (g/L)	62,0	112,0	62,6	112,2
Biomass (g/L)	9,8	10,5	10,0	10,6
Myclobutanil decomposition %	6,0	9,0	16,0	19,0

β



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

ΕΠΑνΕΚ 2014-2020  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



ανάπτυξη - εργασία - αλληλεγγύη

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

## Δράση 2.2: Μελέτη των πιο δυναμικών στελεχών σε εργαστηριακής κλίμακας κλειστού τύπου βιοαντιδραστήρες.

### Α) Καθαρές (αξενικές) καλλιέργειες σε συστήματα βιοαντιδραστήρων

Έλαβαν χώρα αλκοολικές αναερόβιες ζυμώσεις βιοαντιδραστήρα εργαστηριακής κλίμακας για τους ακόλουθους μικροοργανισμούς Sc13 & Sc24 που καλλιεργήθηκαν σε περιοριστικές σε άνθρακα συνθήκες χρησιμοποιώντας τη γλυκόζη ως υλικό εκκίνησης με αρχική συγκέντρωση σακχάρου ~240,0 g/L. Πραγματοποιήθηκαν κινητικές με όλα τα στελέχη, και οι μέγιστες συγκεντρώσεις αιθανόλης καθώς και οι, στο αντίστοιχο σημείο της ζύμωσης, συγκεντρώσεις ξηράς μικροβιακής μάζας (X, g/L) και αναλωθείσας γλυκόζης (Glc<sub>cons</sub>, g/L) φαίνονται στον κατωτέρω Πίνακα 10.

**Πίνακας 10.** Κινητικά δεδομένα υπό αναερόβιες συνθήκες κατά την αύξηση μικροοργανισμών σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκόζη. Παρουσιάζονται: Χρόνος (h), Glc<sub>cons</sub>: συγκέντρωση καταναλωθέντος σακχάρου (g/L), X: ξηρά βιομάζα (g/L), EtOH: αιθανόλη (g/L), Y<sub>EtOH/Glc</sub> (g/g): ποσότητα αιθανόλης ανά καταναλωθέν υπόστρωμα. Όλες οι τιμές εμφανίζονται όταν επιτυγχάνεται η μέγιστη τιμή αιθανόλης (EtOH<sub>max</sub>, g/L). Κάθε σημείο που εμφανίζεται είναι ο μέσος όρος 2 ανεξαρτήτων μετρήσεων.

Στέλεχος	Χρόνος (h)	Glc <sub>cons</sub> (g/L)	X (g/L)	EtOH (g/L)	Y <sub>EtOH/Glc</sub> (g/g)
Sc13	71,0	258,0	11,3	131,6	0,51
Sc24	70,0	264,9	9,9	127,1	0,48

Μικροβιακές ζυμώσεις κλειστού τύπου σε βιοαντιδραστήρα πραγματοποιήθηκαν από το στέλεχος Y54 κάτω από αερόβιες συνθήκες. Το μικροβιακό στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae* Y54 δοκιμάστηκε ως προς την ικανότητα παραγωγής αιθανόλης σε ζύμωση κλειστού τύπου σε βιοαντιδραστήρα με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης ίση με 120,0 g/L. Η γλυκόζη καταναλώθηκε ικανοποιητικά από το μικροοργανισμό, φτάνοντας τα 6,79 g/L στις 96 h, ενώ η αιθανόλη έφτασε μέγιστη τιμή ίση με 27,56 g/L. Η παραχθείσα βιομάζα ήταν ίση με 9,83 g/L, ενώ το ενδοκυτταρικό περιεχόμενο λιπιδίων έφτασε το 1,6%. Η απόδοση της ζύμωσης ήταν 0,27 g αιθανόλης/g καταναλωθέντων σακχάρων και η παραγωγικότητα ίση με 0,29 g/L\*h. Επίσης δοκιμάστηκε και κάτω από αναερόβιες συνθήκες σε ζύμωση κλειστού τύπου σε βιοαντιδραστήρα με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης ίση με 120,0 g/L. Το υπόστρωμα καταναλώθηκε ικανοποιητικά, φτάνοντας τα 4,6 g/L στις 23 h ζύμωσης. Η μέγιστη παραγωγή βιοαιθανόλης έφτασε τα 55,0 g/L στις 25 h, ενώ η βιομάζα έφτασε τα 4,29 g/L και το ενδοκυτταρικό ποσοστό λιπιδίων έφτασε το 0,6% της



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



ανάπτυξη - εργασία - αλληλεγγύη

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

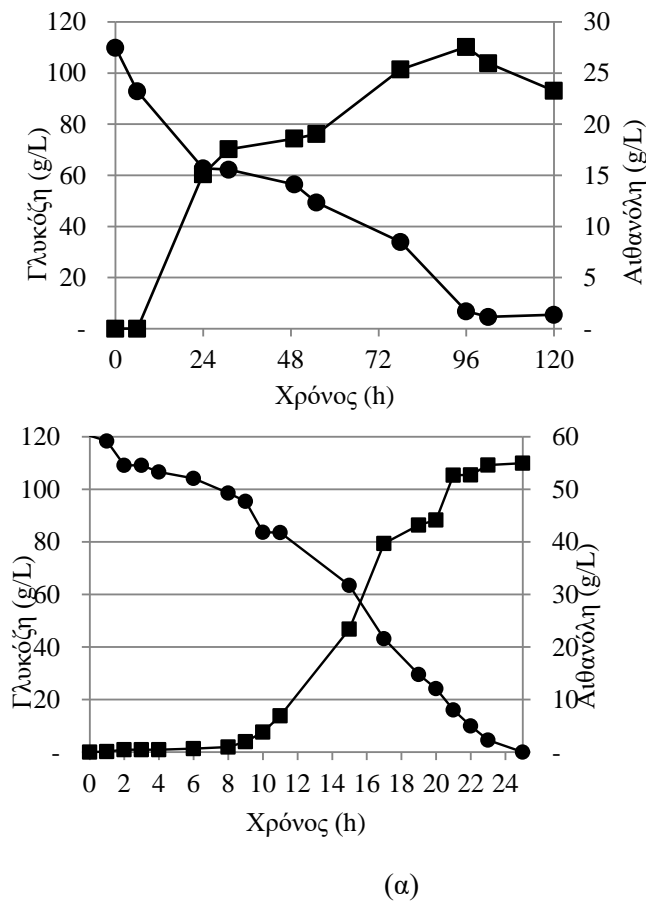
βιομάζας. Η απόδοση της ζύμωσης έφτασε τα 0,46 g αιθανόλης/g καταναλωθείσας γλυκόζης και η παραγωγικότητα ήταν ίση με 4,8 g/L\*h. Η αντίστοιχη ζύμωση κλειστού τύπου σε βιοαντιδραστήρα πραγματοποιήθηκε σε αναερόβιες συνθήκες με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης ίση με 240,0 g/L. Το υπόστρωμα καταναλώθηκε πλήρως από τον μικροοργανισμό στις 67 h. Η μέγιστη παραγωγή αιθανόλης έφτασε τα 119,06 g/L στις 67 h, ενώ η παραχθείσα βιομάζα έφτασε τα 3,87 g/L. Το ενδοκυτταρικό ποσοστό λιπιδίων ήταν ίσο με 1,03%, ενώ οι ενδοπολυσακχαρίτες έφτασαν στο 18,61%. Η μέγιστη απόδοση της ζύμωσης ήταν 0,5 g αιθανόλης/g καταναλωθέντων σακχάρων και η παραγωγικότητα ήταν ίση με 1,82 g/L\*h. Μικροβιακές ζυμώσεις ημισυνεχούς λειτουργίας σε βιοαντιδραστήρα έγιναν με βάση τα παραπάνω πειράματα και πραγματοποιήθηκε ζύμωση ημισυνεχούς λειτουργίας σε βιοαντιδραστήρα υπό αναερόβιες συνθήκες με τον μικροοργανισμό *Saccharomyces cerevisiae* Y54 προς παραγωγή αιθανόλης με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης ίση με 180,0 g/L. Όταν η συγκέντρωση της γλυκόζης έφτανε περίπου τα 60,0-70,0 g/L πραγματοποιούνταν feeding με στερεή γλυκόζη μέχρι η συγκέντρωση να φτάσει περίπου στα 100,0 g/L. Η μέγιστη παραγωγή αιθανόλης σημειώθηκε στις 93 h και ήταν ίση με 122,67 g/L, ενώ η μέγιστη παραγωγή βιομάζας ήταν 3,9 g/L στις 116 h ζύμωσης. Το ενδοκυτταρικό περιεχόμενο λιπιδίων ήταν ίσο με 1,84% και οι ενδοπολυσακχαρίτες ίσοι με 15,82% της βιομάζας. Η μέγιστη απόδοση της ζύμωσης ήταν ίση με 0,5 g αιθανόλης/g καταναλωθέντων σακχάρων, ενώ η παραγωγικότητα ίση με 1,31 g/L\*h (93 h). Ακολουθεί συγκεντρωτικός πίνακας 8 των ζυμώσεων που παρουσιάζονται τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα των μικροβιακών ζυμώσεων που πραγματοποιήθηκαν με τον μικροοργανισμό *Saccharomyces cerevisiae* Y54 προς παραγωγή βιοαιθανόλης.

**Πίνακας 10.** Συγκεντρωτικός πίνακας παραγωγής βιοαιθανόλης μέσω ζυμώσεων κλειστού τύπου και ημισυνεχούς λειτουργίας, υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες σε υπόστρωμα γλυκόζης διαφόρων συγκεντρώσεων με το μικροβιακό στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae* Y54.

	Τύπος ζύμωσης	Αρχική συγκέντρωση γλυκόζης (g/L)	X (g/L)	EtOH (g/L)	Y <sub>EtOH/Glc</sub> (g/g)
Αερόβιες συνθήκες	Κωνικές (batch)	120,0	7,9	24,1	0,27
	Βιοαντιδραστήρας (batch)		9,8	27,1	0,27
Αναερόβιες συνθήκες	Κωνικές (batch)	120,0	2,6	47,7	0,41
		240,0	1,8	97,8	0,47
	Βιοαντιδραστήρας (batch)	120,0	4,3	55,0	0,46
		240,0	3,9	119,1	0,50
	Βιοαντιδραστήρας (fed-batch)	180,0	3,9	122,7	0,50

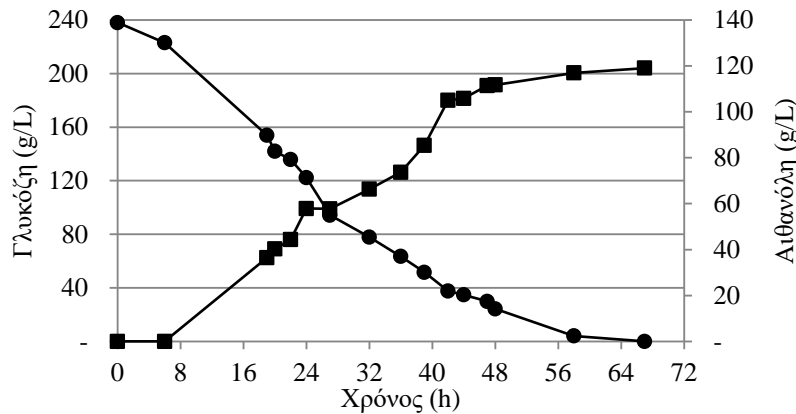
Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Το Γράφημα 8 δείχνει την καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης  $\approx 120$  g/L υπό αερόβιες συνθήκες (α) και αναερόβιες συνθήκες (β), το γράφημα 9 δείχνει την καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης  $\approx 240$  g/L υπό αναερόβιες συνθήκες ενώ το γράφημα 10 δείχνει την καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα με ημισυνεχή τροφοδοτούμενη καλλιέργεια γλυκόζης.

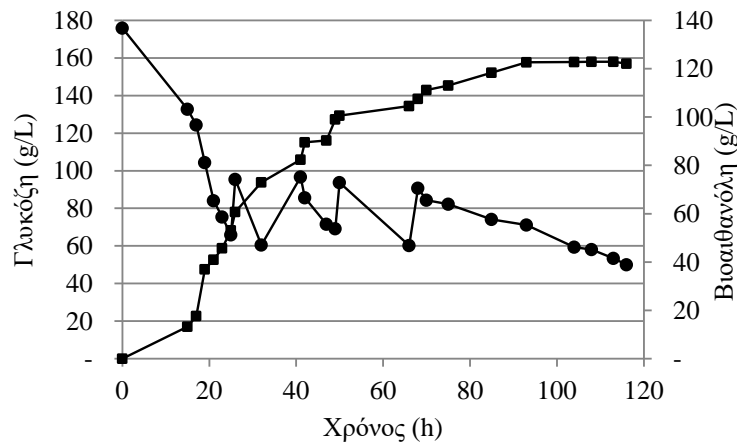


**Γράφημα 8.** Κατανάλωση γλυκόζης και παραγωγή βιοαιθανόλης κατά τη διάρκεια αερόβιας ζύμωσης (α) και αναερόβιας ζύμωσης (β) κλειστού τύπου σε βιοαντιδραστήρα με το στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae* Y-54. Αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 120 g/L: ■ Αιθανόλη, ● Γλυκόζη.

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



**Γράφημα 9.** Κατανάλωση γλυκόζης και παραγωγή βιοαιθανόλης κατά τη διάρκεια αναερόβιας ζύμωσης κλειστού τύπου σε βιοαντιδραστήρα με το στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae* Y-54 Αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 240 g/L: ■ Αιθανόλη, ● Γλυκόζη.



**Γράφημα 10.** Κατανάλωση γλυκόζης και παραγωγή βιοαιθανόλης κατά τη διάρκεια αναερόβιας ζύμωσης ημισυνεχούς λειτουργίας σε βιοαντιδραστήρα με το στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae* Y-54: ■ Αιθανόλη, ● Γλυκόζη.

## Β) Σχηματισμός βιοϋμενίων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

Τα είδη των στελεχών Ζυμομυκήτων, που ευθύνονται για την εκδήλωση & εξέλιξη των αλκοολικών ζυμώσεων κατά την οινοποίηση, αλλά και η αλληλουχία διαδοχής αυτών των στελεχών κατά την αλκοολική ζύμωση, αποτελούν σημαντικότετους παράγοντες που τελικά καθορίζουν τόσο την ποιότητα όσο και την τυπικότητα των παραγόμενων οίνων. Σε αυτό το εξελισσόμενο οικοσύστημα, υπάρχουν πολλά είδη ζυμομυκήτων που ανήκουν στο γένος *Saccharomyces* αλλά και άλλα είδη που ταξινο-





**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

μούνται ως «μη-*Saccharomyces*», καθώς επίσης και γαλακτικά και οξικά βακτήρια. Πιο συγκεκριμένα, εκτός από τον *Saccharomyces cerevisiae* που είναι η κυριότερη ζύμη του κρασιού, άλλα γένη/είδη που αναφέρονται συχνότερα είναι η *Candida*, *Hanseniaspora*, *Torulaspora*, *Pichia*, και *Issatchenkia Metschnikowia*, *Brettanomyces bruxellensis* και *Hanseniaspora uvarum*. Ενώ τα πιο γνωστά είδη βακτηρίων που συναντώνται ανήκουν στο είδος *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus plantarum* και *Pediococcus parvulus*. Η κατανόηση του είδους της αλληλεπίδρασης μεταξύ των ειδών θα μπορούσε να οδηγήσει στην καλύτερη διαχείριση της παραγωγικής διαδικασίας του οίνου και αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο για την τεχνολογική αξιολόγηση αυτών των ειδών. Στα πλαίσια αυτής της δράσης είχε αρχική μελετηθεί το προηγούμενο χρονικό διάστημα η πιθανή αλληλεπίδραση μεταξύ των μικροοργανισμών, στελέχη ζυμών και βακτηρίων αναπτύχθηκαν σε μονοκαλλιέργειες και σε μεικτές καλλιέργειες (δύο είδη μικροοργανισμών) σε εργαστηριακό μέσο ανάπτυξης και ο μεταβολικός τους ρυθμός μελετήθηκε με την μέτρηση της αλλαγής αγωγιμότητας του μέσου ανάπτυξης. Η κινητική ζύμωσης ακολουθείται από το σύστημα Malthus (Malthus 2000 analyser system) βασισμένο στην αλλαγή αγωγιμότητας λόγω μικροβιακού μεταβολισμού, σε μέσο NZ Αμίνης συμπληρωμένο με γλυκόζη στους 25°C. Επιπρόσθετα, ο χρόνος ανίχνευσης (detection time) του συστήματος Malthus ορίζεται ως το χρονικό διάστημα μεταξύ της έναρξης της παρακολούθησης της αγωγιμότητας στο μέσο και της έναρξης της φάσης επιτάχυνσης των τιμών της αγωγιμότητας. Η κινητική ανάπτυξης των μονοκαλλιεργειών συγκρίθηκε με την κινητική των μεικτών καλλιεργειών. Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν στελέχη από διαφορετικά είδη μικροοργανισμών που είτε απομονώθηκαν στα πλαίσια του προγράμματος Oenovation είτε ανήκαν ήδη στη συλλογή του EMBT του Γεωπονικού πανεπιστημίου. Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν στελέχη από τα είδη *Torulaspora delbrueckii* και *Brettanomyces bruxellensis* όσο αφορά τις ζύμες και *Enterobacter spp.*, *Oenococcus oeni* και *Pediococcus parvulus* όσο αφορά τα είδη των βακτηρίων. Σύμφωνα με τα πρώτα αποτελέσματα η συνύπαρξη άλλων ειδών μαζί με το *Brettanomyces bruxellensis*, μπορεί να μεταβάλει το μεταβολικό ρυθμό της συγκεκριμένης ζύμης αλλοίωσης του οίνου. Πιο συγκεκριμένα όταν το είδος *Brettanomyces bruxellensis* αναπτύσσεται παρουσία της ζύμης *Torulaspora delbrueckii* ή των βακτηρίων *Enterobacter spp.*, *Oenococcus oeni* και *Pediococcus parvulus*, παρουσιάζει πιο αργή μεταβολή της αγωγιμότητας του μέσου ανάπτυξης υποδηλώνοντας πιο αργό μεταβολικό ρυθμό. Η συγκεκριμένη ένδειξη μπορεί να αποτελέσει πολύ σημαντική πληροφορία για την τεχνολογική αξιολόγηση των μικροοργανισμών που μελετήθηκαν. Επιπρόσθετα στα



**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

πλαίσια της αξιολόγησης τεχνολογικών χαρακτηριστικών ζυμών μελετήθηκε η ικανότητα προσκόλλησης των μικροοργανισμών του οίνου σε επιφάνειες με οινολογικό ενδιαφέρον όπως ο ανοξείδωτος χάλυβας και η πιθανή επιμόλυνση του εξοπλισμού του οινοποιείου αποτελούν πρόβλημα για την παραγωγική διαδικασία. Στη δράση αυτή πραγματοποιήθηκε η μελέτη της ικανότητας προσκόλλησης των ζυμών σε συνθήκες οινοποίησης και η πιθανή εύρεση των εμπλεκόμενων μεταβολιτών. Αρχικά τα κουπόνια από ανοξείδωτο χάλυβα (πλακίδια διαστάσεων 3,0cm×0,8cm×0,1cm, τύπου AISi-304, Χαλυβουργική Α.Ε., Αθήνα, Ελλάδα) τοποθετήθηκαν εντός δοκιμαστικών σωλήνων, όπου και αποστειρώθηκαν εμβαπτισμένα σε 4,5 ml διαλύματος Ringer. Κάθε δοκιμαστικός σωλήνας ενοφθαλμίστηκε με 0,5 mL εμβολίου (μονοκαλλιέργειες/μικτές καλλιέργειες) ούτως ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι κατά προσέγγιση ίση με 107 CFU/ml. Στη συνέχεια, οι δοκιμαστικοί σωλήνες επωάστηκαν στους 15°C για 3 h, εντός κλιβάνων υψηλής ακρίβειας (MIR-153 Sanyo Electric Co., Osaka, Japan), ώστε να επιτραπεί η προσκόλληση (attachment) των κυττάρων επάνω στα κουπόνια σε διαφορετικά μέσα με οινολογικό ενδιαφέρον. Μετά το πέρας των 3 h (φάση προσκόλλησης) τα κουπόνια ανοξείδωτου ατσάλιου μεταφέρονταν, με τη βοήθεια λαβίδας και εντός θαλάμου νηματικής ροής, σε αποστειρωμένους δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν 5,0 mL αποστειρωμένου διαλύματος Ringer για να εφαρμοστεί η bead vortex method. Δεκαδικές αραιώσεις του εναιωρήματος πριν και μετά την εφαρμογή του bead vortex method πραγματοποιήθηκαν σε στερεό θρεπτικό υλικό μέσο ανάπτυξης για την καταμέτρηση των πλανκτονικών και προσκολλημένων κυττάρων αντίστοιχα. Παράλληλα λήφθηκαν δείγματα για εξέταση με φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR), πριν και μετά την εφαρμογή της bead vortex method με σκοπό την σύγκριση του μεταβολικού αποτυπώματος μεταξύ κυττάρων προερχόμενα από βιοϋμένια και πλανκτονικών κυττάρων της ίδιας καλλιέργειας. Σε πρώτο στάδιο η ικανότητα προσκόλλησης και τα αντίστοιχα φάσματα μελετήθηκαν για ένα στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae* (Y10) και ένα στέλεχος *Brettanomyces bruxellensis* (33,1) ενώ στη συνέχεια μελετήθηκαν περισσότερα στελέχη του ίδιου είδους. Η προσκόλληση μελετήθηκε σε:



**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

1) διαφορετικές συνθήκες οινολογικού stress.

Συνθήκη	Περιγραφή
Μάρτυρας	Ringer pH:5
pH	Ringer pH: 3,2
Αιθανόλη	Ringer, pH:5, αιθανόλη 5%
Θειώδης ανυδρίτης	Ringer pH: 5, SO <sub>2</sub> : 100,0mg/L
Κρασί	Αγιοργίτικο, pH: 3,3
Μούστος	Αγιοργίτικο, pH: 3,5

2) διαφορετικές χρονικές στιγμές (κινητική δημιουργίας biofilm).

Με βάση τα αποτελέσματα η προσκόλληση των κυττάρων του στελέχους *B. bruxellensis* 33,1 διαφέρει στατιστικά σημαντικά μεταξύ των δοκιμασμένων συνθηκών και διακρίνονται 4 ομάδες. Πιο συγκεκριμένα, στην ομάδα με τη μεγαλύτερη προσκόλληση ανήκουν ο μάρτυρας ( $\log_{10} 5,16 \pm 0,38$  cfu/cm<sup>2</sup>) και το Ringer με 5% αιθανόλη ( $\log_{10} 5,04 \pm 0,49$  cfu/cm<sup>2</sup>). Στην ομάδα με τη μικρότερη προσκόλληση ανήκουν το Ringer με 100,0 mg/L θειώδες ( $\log_{10} 100,57 \pm 0,30$  cfu/cm<sup>2</sup>) και το κόκκινο κρασί ( $\log_{10} 1,27 \pm 0,80$  cfu/cm<sup>2</sup>). Η προσκόλληση των κυττάρων του στελέχους *Saccharomyces cerevisiae* Y10 διαφέρει στατιστικά σημαντικά μεταξύ των συνθηκών και διακρίνονται 4 ομάδες. Πιο συγκεκριμένα, στην ομάδα με τη μεγαλύτερη προσκόλληση ανήκει το Ringer με 5% αιθανόλη ( $\log_{10} 3,99 \pm 0,54$  cfu/cm<sup>2</sup>). Στην ομάδα με τη μικρότερη προσκόλληση ανήκουν το Ringer με 100,0 mg/L θειώδες ( $\log_{10} 1,27 \pm 0,20$  cfu/cm<sup>2</sup>) και ο μούστος ( $\log_{10} 0,81 \pm 0,1$  cfu/cm<sup>2</sup>).

Στη συνέχεια, εξετάστηκε η ικανότητα ανάπτυξης βιοϋμενίου με το πέρασμα του χρόνου (0, 24, 48, 72 και 144 ώρες) και η επιβίωση των πλανκτονικών κυττάρων. Με βάση τα αποτελέσματα ο σχηματισμός του βιοϋμενίου του στελέχους *B. bruxellensis* 33,1 διαφέρει στατιστικά σημαντικά μεταξύ των διαφορετικών χρονικών στιγμών και διακρίνονται 2 ομάδες. Πιο συγκεκριμένα, στην ομάδα με τη μεγαλύτερη ανάπτυξη ανήκουν οι 0 ώρες ( $\log_{10} 5,16 \pm 0,38$  cfu/cm<sup>2</sup>) και οι 144 ώρες ( $\log_{10} 4,84 \pm 0,22$  cfu/cm<sup>2</sup>). Στα πλανκτονικά κύτταρα δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των χρονικών στιγμών της δειγματοληψίας. Από τα παραπάνω διαγράμματα και πίνακες, παρατηρείται ότι ο σχηματισμός του βιοϋμενίου του στελέχους *Saccharomyces cerevisiae* Y10 διαφέρει στατιστικά σημαντικά στη χρονική περίοδο των 144 ωρών. Πιο συγκεκριμένα, στην ομάδα με τη μεγαλύτερη ανάπτυξη ανήκουν οι 144 ώρες ( $\log_{10} 3,92 \pm 0,37$  cfu/cm<sup>2</sup>), ενώ στην ομάδα με την μικρότερη ανάπτυξη οι 24 ώρες ( $\log_{10} 2,14 \pm 0,28$  cfu/cm<sup>2</sup>) και οι 48 ώρες ( $\log_{10} 1,82 \pm 0,67$  cfu/cm<sup>2</sup>). Η ανάπτυξη του βιοϋμενίου δεν μεταβάλλεται με το πέρασμα του



**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

χρόνου δεδομένου ότι δεν διαφέρει μεταξύ των ημερών πάνω από 1 λογάριθμο και επιπλέον επειδή η τιμή των 0 ωρών δεν διαφέρει στατιστικά σημαντικά με αυτή των 144 ωρών. Στα πλανκτονικά κύτταρα δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των χρονικών στιγμών. Τα αντίστοιχα δεδομένα των φασμάτων είναι υπό επεξεργασία.

### Γ) Ποσοτικός προσδιορισμός ενδοκυτταρικών λιπιδίων και πολυσακχαριτών κατά τη διάρκεια της ζύμωσης σε επιλεγμένους μικροοργανισμούς – αναλύσεις λιπαρών οξέων μικροοργανισμών που πραγματοποιούν αλκοολικές ζυμώσεις

Σε αρκετές περιπτώσεις μη-*Saccharomyces* μικροοργανισμών (και κάποιων *Saccharomyces*) κατά την καλλιέργειά τους σε υποστρώματα γλυκόζης υπό αερόβιες συνθήκες (τα κινητικά δεδομένα για τις καλλιέργειες υπάρχουν στα προηγούμενα εδάφια), παρατηρήθηκε στα πρώτα στάδια της αύξησης σχετικά υψηλή παραγωγή πολυσακχαριτών επί ξηράς μικροβιακής μάζας, οι τιμές των οποίων μειώνοντας όσο χωρούσε η ζύμωση. Ταυτοχρόνως αυξανόταν η τιμή (σε ποσοστό επί ξ.ο.) των λιπιδίων. Μπορούμε να δούμε τέτοια παραδείγματα στον Πίνακα 11:

**Πίνακας 11.** Κινητικά δεδομένα κατά την αύξηση μικροοργανισμών σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκόζη. Συνθήκες αύξησης: time (h), Glccons: συγκέντρωση καταναλωθέντος σακχάρου (g/L), DW: ξηρά βιομάζα (g/L), EtOH: αιθανόλη (g/L),  $Y_{L/DW}$ : (w/w) % περιεκτικότητα ξηράς βιομάζας σε ενδοκυτταρικό λίπος,  $Y_{IPS/DW}$ : (g/g) % περιεκτικότητα ξηράς βιομάζας σε ενδοκυτταρικούς πολυσακχαρίτες,  $Y_{EtOH/Glc}$  (g/g): ποσότητα αιθανόλης ανά καταναλωθέν υπόστρωμα. a: DW max (g/L), b: EtOH (g/L) c:  $Y_{L/DW}$  max, d:  $Y_{IPS/DW}$  max.

<i>C. tropicalis</i> (≈60 g/L Glc)	Time (h)	Glccons (g/L)	DW (g/L)	EtOH (g/L)	$Y_{L/DW}$ (% w/w)	$Y_{IPS/DW}$ (% w/w)	$Y_{EtOH/Glc}$
a	168,0	58,8	15,2	0,0	16,4	11,8	0,0
b	48,0	54,4	7,9	23,3	2,4	32,9	0,43
c	120,0	54,6	11,2	1,4	17	20,5	0,03
d	26,0	54,4	7,1	19,9	1,1	49,3	0,37

<i>C. boidinii</i> (≈60 g/L Glc)	Time (h)	Glccons (g/L)	DW (g/L)	EtOH (g/L)	$Y_{L/DW}$ (% w/w)	$Y_{IPS/DW}$ (% w/w)	$Y_{EtOH/Glc}$
a, c	252,0	60,0	13,1	0,0	24,8	7,6	0,0
b	32,0	55,6	5,5	22,2	3,9	30,9	0,40
d	22,0	47,1	3,0	15,3	3,4	43,6	0,32



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

<i>S. cerevisiae</i> (Rhone) (≈60 g/L Glc)	Time (h)	Glccons (g/L)	DW (g/L)	EtOH (g/L)	$Y_{L/DW}$ (% w/w)	$Y_{IPS/DW}$ (% w/w)	$Y_{EtOH/Glc}$
a	168,0	59,4	13,4	0,0	15,7	15,9	0,0
b	22,0	55,1	5,3	21,2	1,0	35,8	0,38
c	216,0	59,5	13,2	0,0	16,4	17,1	0,0
d	5,0	25,6	3,5	10,4	0,2	57,2	0,39

Σε άλλες περιπτώσεις (π.χ. στελέχη Y-10, Y-25, Y-35, Y-54, Symphony, Cross X και Passion Fruit) όταν η ζύμωση ελάμβανε χώρα υπό αερόβιες συνθήκες, συστηματικώς και σε όλες τις φάσεις του αυξητικού κύκλου το ποσοστό των ενδοπολυσακχαριτών παρέμενε <12% κ.β., όπως και αυτό των λιπιδίων χωρίς να παρατηρείται η ανωτέρω τάση.

Η ανάλυση σε λιπαρά οξέα ποικίλων μικροοργανισμών (μη-*Saccharomyces*) κατά την αύξησή τους στη γλυκόζη στη στάσιμη φάση του αυξητικού κύκλου εμφανίζεται στον Πίνακα 12.

**Πίνακας 12.** Σχετικά ποσοστά λιπαρών οξέων που εκχυλίστηκαν από τους μικροοργανισμούς. Παλμιτικό οξύ (C16:0), Παλμιτελαϊκό οξύ (C16:1), Στεατικό οξύ (C18:0), Ελαϊκό οξύ (C18:1), Λινελαϊκό οξύ (C18:2)

	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2
<i>C. boidinii</i>	21,2	6,4	9,1	42,4	21,1
<i>C. oleophila</i>	13,5	2,6	8,5	64,3	12,4
<i>C. tropicalis</i>	26,6	4,8	16,5	40,2	11,9
<i>M. pulcherrima</i>	24,1	4,3	5,4	45,1	17,8
<i>P. ciferrii</i>	20,9	7,5	15,7	10,2	13,6
<i>W. saturnus</i>	18,4	6,5	13,6	33,1	28,4
<i>Y. lipolytica</i>	15,6	10,9	11,1	19,6	31,7

Η επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης γλυκόζης, επηρέασε τη σύσταση σε λιπαρά οξέα επιλεγμένων μικροοργανισμών του είδους *Saccharomyces cerevisiae* (βλ. Πίνακα 13 και 14).



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



ανάπτυξη - εργασία - αλληλεγγύη

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

**Πίνακας 13.** Σύσταση σε λιπαρά οξέα των κυτταρικών λιπιδίων του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* MAK 2 σε θρεπτικό μέσο με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης τα 80 g/L και 180 g/L αντίστοιχα.

S <sub>0</sub> (g/L)	Χρόνος (h)	Αναλογία Λιπαρών Οξέων (% κ.β.)				Σύνολο Ακόρεστων Λ.Ο. (% κ.β.) ΣΥ
		C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	
91.40	30-40	13.3	34.6	8.5	41.4	76.0
	80-120	16.2	39.3	5.4	37.0	76.3
178.65	30-40	13.9	41.7	5.0	33.9	75.6
	80-120	18.1	37.1	4.8	39.9	77.0

**Πίνακας 14.** Σύσταση σε λιπαρά οξέα των κυτταρικών λιπιδίων του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* MAK 1 σε θρεπτικό μέσο με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης τα 80 g/L και 180 g/L αντίστοιχα.

S <sub>0</sub> (g/L)	Χρόνος (h)	Αναλογία Λιπαρών Οξέων (% κ.β.)				Σύνολο Ακόρεστων Λ.Ο. (% κ.β.) ΣΥ
		C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	
89.71	30-40	14.4	25.2	5.8	54.7	79.9
	80-120	15.9	41.8	6.1	36.3	78.1
182.02	30-40	12.7	41.6	5.7	42.6	79.0
	80-120	15.9	35.5	9.3	39.3	74.8

Από τους παραπάνω πίνακες φαίνεται ότι τα κυριότερα λιπαρά οξέα που απαντώνται στα κυτταρικά λιπίδια του ζυμομύκητα είναι το παλμιτελαϊκό (C16:1), το ελαϊκό (C18:1) και το παλμιτικό (C16:0). Αντίθετα σε μικρότερα ποσά εντοπίζεται το στεατικό οξύ (C18:0). Παρατηρείται επίσης ότι η σύσταση σε λιπαρά οξέα των λιπιδίων του κυττάρου του ζυμομύκητα δεν παραμένει σταθερή κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Έτσι, στην περίπτωση του στελέχους MAK 1, η συγκέντρωση του παλμιτικού οξέος εμφανίζεται ελαφρά αυξημένη στο τέλος της αλκοολικής ζύμωσης ενώ του ελαϊκού μειώνεται στο τέλος της ζύμωσης και μάλιστα η μείωση είναι πολύ μεγαλύτερη όταν η αρχική συγκέντρωση της γλυκόζης είναι 80 g/L. Το παλμιτελαϊκό οξύ αυξάνεται στο τέλος της ζύμωσης όταν η αρχική συγκέντρωση σακχάρων είναι μικρή ενώ μειώνεται όταν η γλυκόζη του υποστρώματος είναι αυξημένη.

Η σύσταση των λιπαρών οξέων του παραχθέντος μικροβιακού λίπους αναλύθηκε και για το μικροοργανισμό Y54 στην περίπτωση των αερόβιων ζυμώσεων, τόσο σε κωνικές φιάλες όσο και σε βιοαντιδραστήρα. Όπως πριν, το κυρίαρχο λιπαρό οξύ



**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

ήταν το ελαϊκό οξύ (C18:1) με εύρος από 42,3-44,8%, ενώ ακολουθεί το παλμιτελαϊκό οξύ (16:1) και το παλμιτικό οξύ (16:0), τα οποία κυμάνθηκαν σε ποσοστά μεταξύ 27,9 – 28,5% και 18 – 23% αντίστοιχα. Το μυριστικό οξύ (C14:0), το στεατικό οξύ (C 18:0) και το λινελαϊκό οξύ (C18:2) εμφάνισαν ποσοστό μικρότερο του 10% (Πίνακας 15).

**Πίνακας 15.** Σύσταση σε λιπαρά οξέα των κυτταρικών λιπιδίων του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* Y54 σε θρεπτικό μέσο γλυκόζης σε καλλιέργεια φιαλών και βιοαντιδραστήρα .

Τύπος ζύμωσης	Χρόνος ζύμωσης (h)	Μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων (% w/w)					
		C 14:0	C 16:0	C 16:1	C 18:0	C 18:1	C 18:2
Κωνικές φιάλες	24	0.5	23.3	28.4	5.4	42.3	-
	120	1.3	19.1	28.5	6.5	44.6	-
Βιοαντιδραστήρας	144	1.9	17.8	27.9	5.9	44.8	1.6

Τέλος, το μικροβιακό λίπος του μικροοργανισμού Y54 που παράχθηκε κατά την καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα (t=144 h) αναλύθηκε με τη μέθοδο της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC). Η ανάλυση των κλασμάτων του παραγόμενου λίπους έδειξε την παρουσία χοληστερόλης (εργοστερόλη στην περίπτωση του μικροβιακού λίπους, ελεύθερων λιπαρών οξέων (FFAs) και τριγλυκεριδίων (TAG). Η κηλίδα που βρίσκεται πάνω από το ύψος της κηλίδας των TAG αφορά εστέρες χοληστερόλης, σύμφωνα με την ανάλυση λιπιδίων του Cyberlipid (<http://cyberlipid.gerli.com/>).



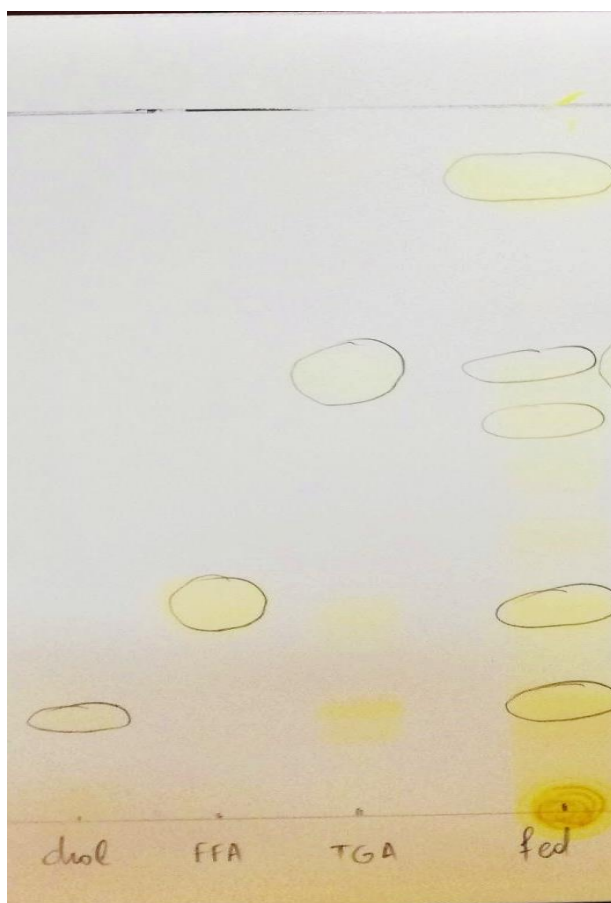
Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

ΕΠΑνεΚ 2014-2020  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



ανάπτυξη - εργασία - αλληλεγγύη

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



**Εικόνα 6.** Ανάλυση μικροβιακού λίπους με TLC του μικροοργανισμού *Saccharomyces cerevisiae* Y54 μετά από 144 h ζύμωσης σε κλειστό βιοαντιδραστήρα. Όπου TAG – Τριγλυκερίδια, FFA – ελεύθερα λιπαρά οξέα, Chol – χοληστερόλη.

### **Δράση 2.3: Προσομοίωση οινοποίησης σε εργαστηριακής κλίμακας κλειστού τύπου βιοαντιδραστήρες.**

Στα πλαίσια τέλος της Δράσης 2.3., πραγματοποιήθηκε προσομοίωση της οινοποίησης σε εργαστηριακής κλίμακας κλειστού τύπου βιοαντιδραστήρα που να προσομοιάζει με τις συνθήκες αληθινής οινοποίησης (κλειστή φιάλη τύπου Duran). Συγκεκριμένα, μετά από μελέτη των βιοχημικών χαρακτηριστικών επιλεγμένων άγριων και εμπορικών στελεχών σακχαρομυκήτων στα πλαίσια της Δράσης 2.1. επιλέχθηκε σε πρώτο επίπεδο το εμπορικό στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae* Passion Fruit καθώς και το ιθαγενές και εξαιρετικά αποτελεσματικό στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae* Y54 για τη ζύμωση γλεύκους με στόχο την προσομοίωση





**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
**ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ**  
**ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ**  
**ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ**  
**ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ**



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

οινοποίησης σε εργαστηριακής κλίμακας κλειστού τύπου συστήματα. Το στέλεχος πραγματοποίησε μικροοινοποίηση υπό μικροαερόφιλες αρχικώς και αναερόβιες συνθήκες σε μούστο Ασύρτικο και Μαυροτράγανο (προέλευση: Σαντορίνη, Santo Wines).

Σκοπός του συγκεκριμένου πειράματος ήταν η μελέτη του οινολογικού δυναμικού των ειρημένων στελεχών με χρήση μούστου από Σαντορίνη (Ασύρτικο και Μαυροτράγανο) που περιείχε και τις γηγενείς ζύμες. Ο αρχικός πληθυσμός των αυτόχθονων ζυμών του μούστου ανέρχονταν σε  $\approx 10^3$  cfu/ml σύμφωνα με την καταμέτρηση των αποικιών σε στερεό μέσο ανάπτυξης (YPD agar). Η πιθανή συμμετοχή στη ζύμωση των αυτόχθονων ζυμών κατέστησε απαραίτητο το μοριακό χαρακτηρισμό των ζυμών σε επίπεδο στελέχους σε διαφορετικά στάδια της ζύμωσης. Οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε κλειστού τύπου αντιδραστήρα (φιάλη 1,0 L) σε σταθερή θερμοκρασία ( $T=18$  °C) χρησιμοποιώντας αζύμωτα, μη παστεριωμένα γλεύκη της ποικιλίας Ασύρτικο Μαυροτράγανο. Οι ζύμες (Passion Fruit και Y54) εμβολιάστηκαν σε πληθυσμό  $10^6$  cfu/mL ενώ πραγματοποιήθηκαν 2 βιολογικές επαναλήψεις. Τα αποτελέσματα της κινητικής φαίνονται στον Πίνακα 16.

*Πίνακας 16. Κινητικά αποτελέσματα κατά την αύξηση των μικροοργανισμών Saccharomyces cerevisiae Passion Fruit και Y54 στο γλεύκος του Ασύρτικου και του Μαυροτράγανου υπό μικροαερόφιλες / αναερόβιες συνθήκες. Συνθήκες αύξησης: καλλιέργεια σε Duran 1000 mL,  $T=18$  °C,  $pH=3,4\pm 0,1$ . Μη-αναλωθείσα γλυκόζη ως Glc (g/L), Μη-αναλωθείσα φρουκτόζη ως Fru (g/L), συνολικά αναλωθέντα σάκχαρα ως TScons (g/L), παραχθείσα αιθανόλη ως EtOH (g/L), παραχθείσα γλυκερόλη ως Glyc (g/L), και συντελεστής απόδοσης αιθανόλης ως  $Y_{EtOH/TS}$  (g/g).*

	Time (h)	Glc (g/L)	Fru (g/L)	TS <sub>cons</sub> (g/L)	EtOH (g/L)	Glyc (g/L)	$Y_{EtOH/TS}$ (g/g)
Assyrtiko must							
Passion Fruit; TS <sub>0</sub> ≈221.5 g/L	310	3.7	8.0	209.8	102.7	2.2	0.49
Y54; TS <sub>0</sub> ≈221.5 g/L	310	3.9	3.7	213.9	106.3	3.5	0.50
Mavrotragano must							
Passion Fruit; TS <sub>0</sub> ≈213.5 g/L	286	1.8	5.8	205.9	97.8	5.2	0.47
Y54; TS <sub>0</sub> ≈213.5 g/L	240	2.2	1.9	209.4	99.7	5.9	0.48

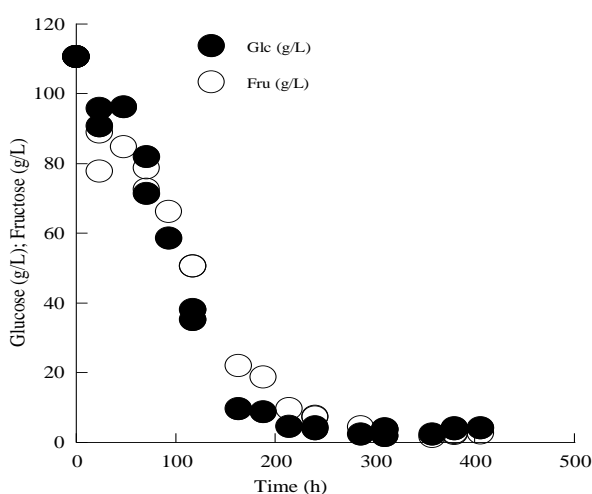


**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Η κινητική της γλυκόζης και της φρουκτόζης για το μικροοργανισμό Y54 φαίνεται στο Γράφημα 11.



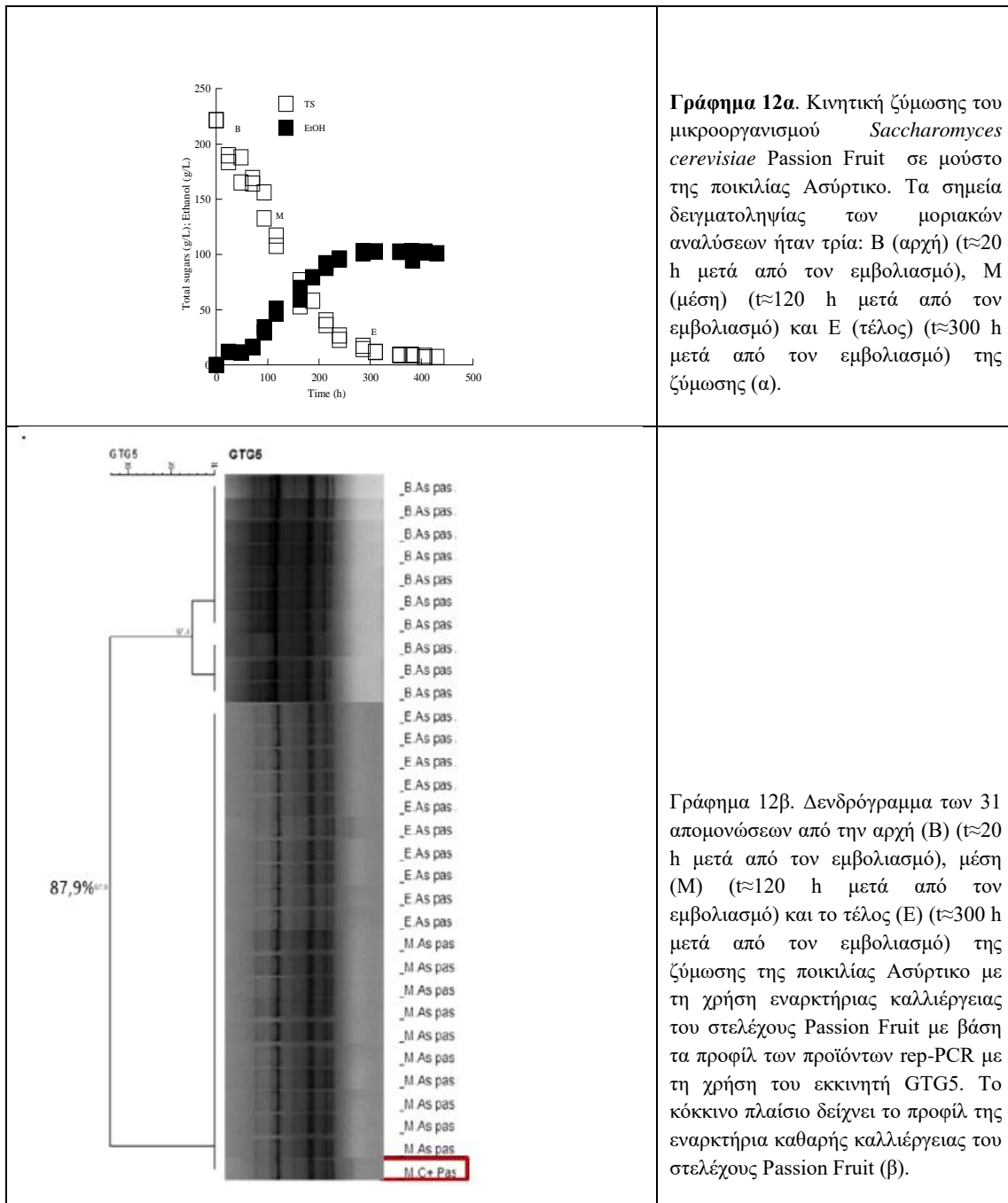
**Γράφημα 11.** Εξέλιξη της γλυκόζης (Glc, g/L) της φρουκτόζης (Fru, g/L) κατά την καλλιέργεια του μικροοργανισμού *Saccharomyces cerevisiae* Y54 στο γλεύκος του Ασύρτικου υπό αναερόβιες συνθήκες. Συνθήκες αύξησης: καλλιέργεια σε Duran 1000 mL, T=18 °C, pH=3,4±0,1.

Περαιτέρω, ήταν επιθυμητό να δούμε, δεδομένου του γεγονότος ότι δεν προηγήθηκε στα γλεύκη θερμική επεξεργασία, ποια ήταν η πραγματική «συνεισφορά» των στελεχών Passion Fruit και Y54 στην ειρηνόμενη διεργασία. Η ταυτοποίηση της μικροχλωρίδας πραγματοποιήθηκε σε τρία στάδια: αρχή (B) ( $t \approx 20$  h μετά από τον εμβολιασμό), μέση (M) ( $t \approx 120$  h μετά από τον εμβολιασμό), και τέλος (E) ( $t \approx 300$  h μετά από τον εμβολιασμό) της ζύμωσης με μοριακές τεχνικές (rep-PCR) ενώ η κινητική της ζύμωσης ακολουθήθηκε με καθημερινή δειγματοληψία και μέτρηση των σακχάρων και της αλκοόλης με υγρή χρωματογραφία (HPLC), ως αναφέρθηκε στα προηγούμενα. Για τις μοριακές αναλύσεις επιλέχθηκαν τυχαία 10 αποικίες από κάθε σημείο της δειγματοληψίας για όλες τις ζυμώσεις με σκοπό την μετέπειτα ταυτοποίηση σε επίπεδο στελέχους. Σαν πρότυπο προφίλ χρησιμοποιήθηκε η καθαρή καλλιέργεια της ζύμης.

Με βάση τις μοριακές αναλύσεις σε επίπεδο στελέχους με εφαρμογή της rep-PCR, σε όλες τις περιπτώσεις επικράτησε από την αρχή έως το τέλος της ζύμωσης η εναρκτήρια καλλιέργεια καθώς όλες οι απομονώσεις παρουσιάζουν ομοιότητα πάνω

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

από 80% με την αντίστοιχη εναρκτήρια καλλιέργεια. Έτσι πιο συγκεκριμένα για τη ζύμωση της ποικιλίας Ασύρτικο με το στελέχος *Saccharomyces cerevisiae* Passion Fruit η ομοιότητα όλων των απομονώσεων ανέρχεται στο 87,9% (Γράφημα 12α και β).



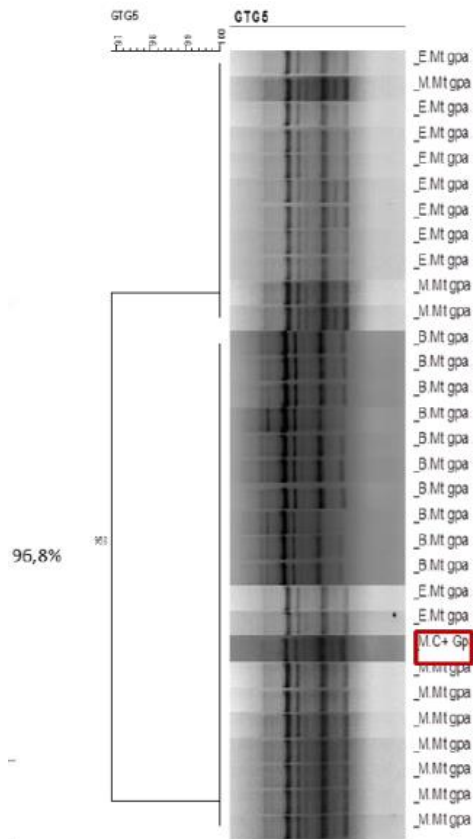
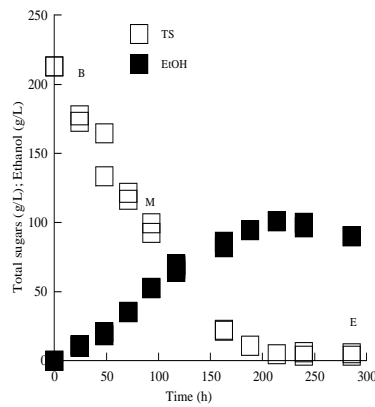


**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
**ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ**  
**ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ**  
**ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ**  
**ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ**



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Τα αντίστοιχα για την ποικιλία Μαυροτράγανο με χρήση του μικροοργανισμού Y54 με την ομοιότητα όλων των απομονώσεων ανέρχεται στο 96,8% αναδεικνύεται στο Γράφημα 13 (α και β).



α

β



**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ

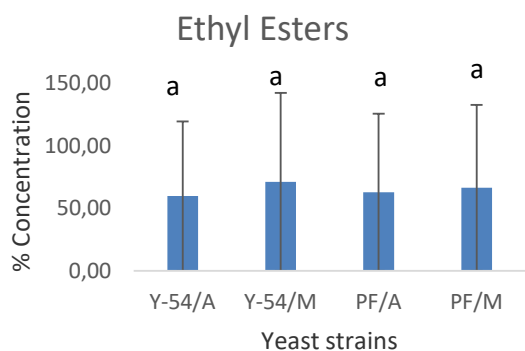
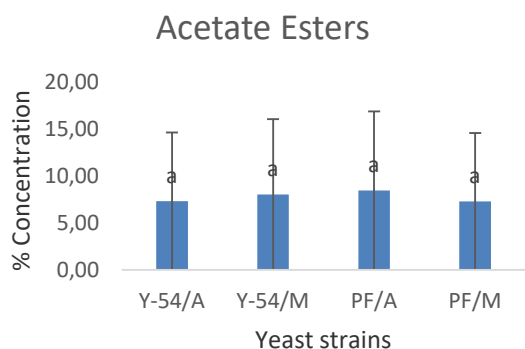


Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

**Γράφημα 13.** Κινητική ζύμωσης του μικροοργανισμού *Saccharomyces cerevisiae* Passion Fruit σε μούστο της ποικιλίας Μαυροτράγανο. Τα σημεία δειγματοληψίας των μοριακών αναλύσεων ήταν τρία: Β (αρχή) ( $t \approx 20$  h μετά από τον εμβολιασμό), Μ (μέση) ( $t \approx 120$  h μετά από τον εμβολιασμό) και Ε (τέλος) ( $t \approx 300$  h μετά από τον εμβολιασμό) της ζύμωσης ( $\alpha$ ).

Δενδρόγραμμα των 31 απομονώσεων από την αρχή (Β) ( $t \approx 20$  h μετά από τον εμβολιασμό), μέση (Μ) ( $t \approx 120$  h μετά από τον εμβολιασμό) και το τέλος (Ε) ( $t \approx 300$  h μετά από τον εμβολιασμό) της ζύμωσης της ποικιλίας Μαυροτράγανο με τη χρήση εναρκτήριας καλλιέργειας του στελέχους Y54 με βάση τα προφίλ των προϊόντων qPCR με τη χρήση του εκκινήτη GTG5. Το κόκκινο πλαίσιο δείχνει το προφίλ της εναρκτήρια καθατής καλλιέργειας του στελέχους Y54 ( $\beta$ ).

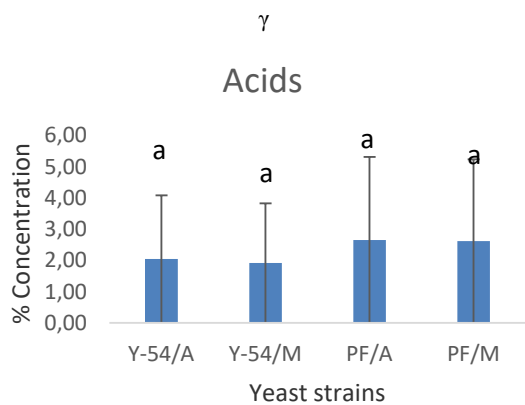
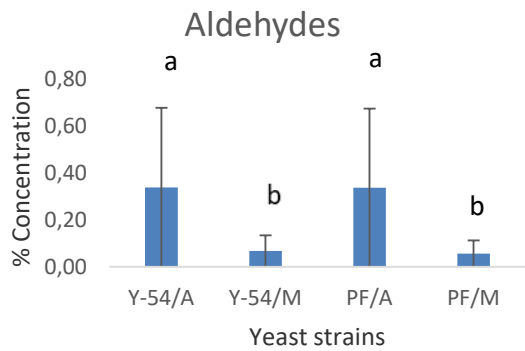
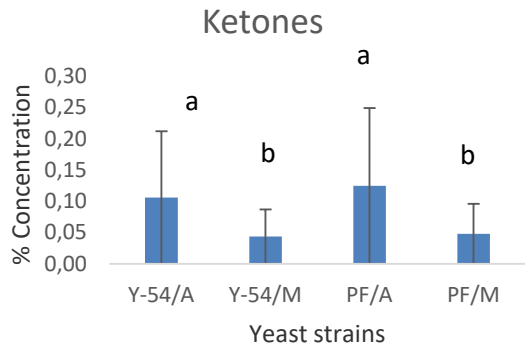
Στο τέλος των ζυμώσεων, τόσο για το Ασύρτικο όσο και για το Μαυροτράγανο γλεύκος, για αμφοτέρους του μικροοργανισμούς (Y54 και Passion Fruit) εγένοντο αναλύσεις των αρωματικών συστατικών (Γράφημα 14 α-ζ).



$\alpha$

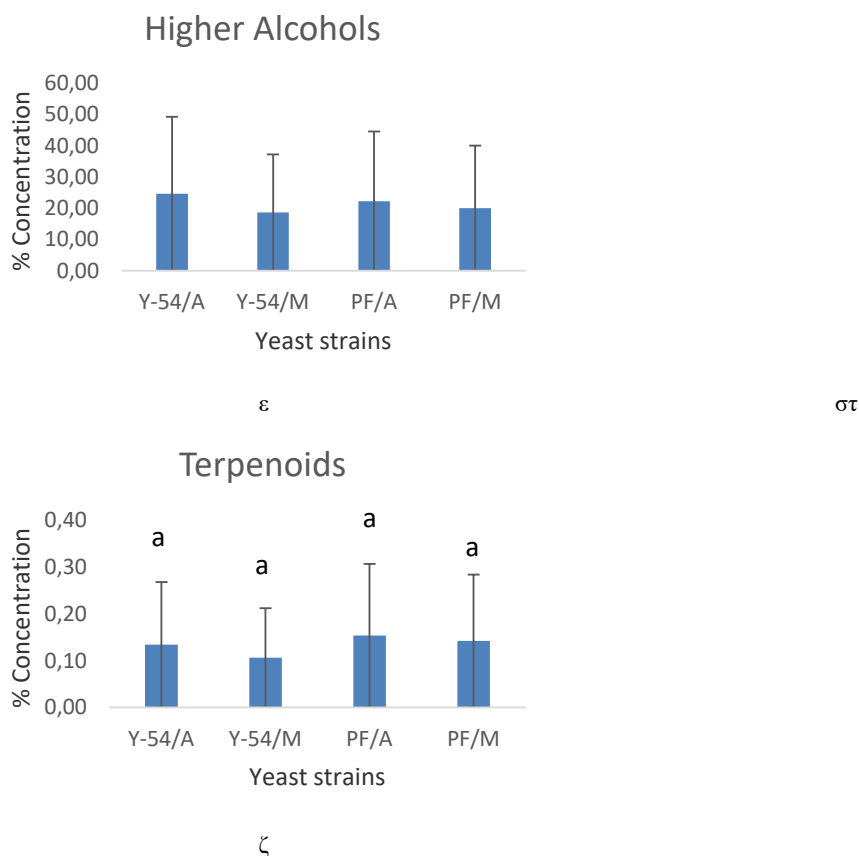
$\beta$

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



γ

δ



**Γράφημα 14.** Κύρια αρωματικά συστατικά (%) για το Ασύρτικο (A) και Μαυροτράγανο (M) γλεύκος που επετεύχθησαν στο τέλος της ζύμωσης από το μικροοργανισμό Y54 (βλέπε Y-54) και Passion Fruit (βλέπε PF).

## ΠΡΟΚΥΠΤΟΥΣΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΕ2

### 1) Συνέδρια με σύστημα κριτών

Antonatou D., Dimopoulou M., Kallithraka S., Nychas G-J., Papanikolaou S. Studies of ethanol production during growth of wild-type yeast strains from wine on glucose-based media under aerobic conditions. 42nd World Congress of Vine and Wine, OIV, 15-19 July 2019, Geneva, Switzerland.

Antonatou D., Terpou A., Kallithraka S., Nychas G-J., Papanikolaou S. Ethanol and Biomass Production by Newly Isolated Wild-Type Yeast Strains Cultivated on Glucose in Shake-Flask Experiments. 35th International Specialized Symposium on Yeasts. 21-25 October 2019, Antalya, Turkey,

Terpou A., Kallithraka S., Papanikolaou S. Effect of Myclobutanil Pesticide on the Biochemical Behaviour of a Novel *Saccharomyces cerevisiae* Strain During Non-Aseptic Alcoholic Fermentation. 35th International Specialized Symposium on Yeasts. 21-25 October 2019, Antalya, Turkey.

Anagnostopoulou E., Kalantzi O., Tsouko E., Kallithraka S., Papanikolaou, S. Effect of culture conditions on the physiological behavior of *Saccharomyces cerevisiae* FMCC Y-54 growing on glucose in batch experiments. 9th Greek lipid Forum, 21 October 2021, on-line meeting.

### 2) Διεθνή επιστημονικά περιοδικά με σύστημα κριτών

Terpou A, Dimopoulou M, Belka A, Kallithraka S, Nychas G-J, Papanikolaou S (2019) Effect of Myclobutanil pesticide on the physiological behavior of two newly isolated *Saccharomyces cerevisiae* strains during very-high-gravity alcoholic fermentation. *Microorganisms*, 7, 666.



**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Dimopoulou M., Kefalloniti V., Tsakanikas P., Papanikolaou S., Nychas G.J.-E (2021) Assessing the biofilm formation capacity of the wine spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis* through FTIR spectroscopy. *Microorganisms*, 9, 587.

Basa K, Papanikolaou S, Dimopoulou M, Terpou A, Kallithraka S, Nychas G-J (2022) Trials of commercial- and wild-type *Saccharomyces cerevisiae* strains under aerobic and microaerophilic/anaerobic conditions: ethanol production and must fermentation from grapes of Santorini (Greece) native varieties. *Fermentation*, 8, 249.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Compagno C, Dashko S & Piškur J (2014) Introduction to carbon metabolism in yeast. In: *Molecular Mechanisms in Yeast Carbon Metabolism* (Compagno C & Piskur J, eds), pp. 1–21. Springer, Heidelberg.

Hagman A, Torbjorn ST, Compagno C & Piskur J (2013) Yeast “Make-Accumulate-Consume” life strategy evolved as a multi-step process that predates the whole genome duplication. *PLoS ONE* 8, e68734.

Hagman A & Piškur J (2015). A study on the fundamental mechanism and the evolutionary driving forces behind aerobic fermentation in yeast. *PLoS ONE*, 10, 1–24.

Kopsahelis N, Bosnea L, Bekatorou A, Tzia C & Kanellaki M (2012) Alcohol production from sterilized and non-sterilized molasses by *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on brewer's spent grains in two types of continuous bioreactor systems. *Biomass and Bioenergy*, 45, 87–94.

Lin Y & Tanaka S (2006) Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69, 627–642.

Makri A, Fakas S & Aggelis G (2010) Metabolic activities of biotechnological interest in *Yarrowia lipolytica* grown on glycerol in repeated batch cultures. *Bioresource Technology*, 101, 2351–2358.

Papanikolaou S & Aggelis G (2010) *Yarrowia lipolytica*: A model microorganism used for the production of tailor-made lipids. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112, 639–654.

Papanikolaou S & Aggelis G (2019) Sources of microbial oils with emphasis to *Mortierella (Umbelopsis) isabellina* fungus. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35, 63.

Papanikolaou S, Muniglia L, Chevalot I, Aggelis G & Marc I (2002) *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 737–744.

Papanikolaou S, Rontou M, Belka A, Athenaki M, Gardeli C et al (2017) Conversion of biodiesel-derived glycerol into biotechnological products of industrial significance by yeast and fungal strains. *Engineering in Life Sciences*, 17, 262–281.

Piškur J, Rozpedowska E, Polakova S, Merico A & Compagno C (2006) How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? *Trends in Genetics*, 22, 183–186.

Ratledge C (1991) Yeast physiology-a micro-synopsis. *Bioprocess Engineering*, 6, 195–203.

Ribéreau-Gayon P, Glories Y, Maujean A & Dubourdieu D (2006) *Handbook of Enology: The Microbiology of Wine and Vinifications*. *Handbook of Enology* (Vol. 1).

Sarris D, Kotseridis Y, Linga M, Galiotou-Panayotou M & Papanikolaou S (2009) Enhanced ethanol production, volatile compound biosynthesis and fungicide removal during growth of a newly isolated *Saccharomyces cerevisiae* strain on enriched pasteurized grape musts. *Engineering in Life Sciences*, 9, 29–37.





**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Sarris D, Giannakis M, Philippoussis A, Komaitis M, Koutinas AA et al (2013) Conversions of olive mill wastewater-based media by *Saccharomyces cerevisiae* through sterile and non-sterile bioprocesses. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 88, 958–969.

Sarris D, Matsakas L, Aggelis G, Koutinas AA & Papanikolaou S (2014). Aerated vs non-aerated conversions of molasses and olive mill wastewaters blends into bioethanol by *Saccharomyces cerevisiae* under non-aseptic conditions. *Industrial Crops and Products*, 56, 83–93.

Sarris D & Papanikolaou S (2016) Biotechnological production of ethanol: Biochemistry, processes and technologies. *Engineering in Life Sciences*, 16, 307–329.

Terpou A, Dimopoulou M, Belka A, Kallithraka S, Nychas G-JE et al (2019) Effect of myclobutanil pesticide on the bio-kinetic behavior of two novel *Saccharomyces cerevisiae* strains during non-aseptic very high gravity alcoholic fermentations. *Microorganisms*, 7, 666.



**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

### **Ενότητα Εργασίας 3:**

**Μελέτη στελεχών ζυμών σε σχέση με τις φυτοπροστατευτικές τους δράσεις έναντι παθογόνων της αμπέλου**

**Φορέας υλοποίησης: Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών**

***Δράση 3.1: Αξιολόγηση συλλογής ζυμών σε πειράματα ανταγωνισμού κατά των *B. cinerea* και *A. carbonarius* στο εργαστήριο. Δράση 3.2: Αξιολόγηση επιλεγμένων ανταγωνιστικών ζυμών σε πειράματα αντιμετώπισης της τεφράς και όξινης σήψης σε πειράματα αγρού. Δράση 3.3: Αξιολόγηση ανταγωνιστικών ζυμών ως προς την ανθεκτικότητα τους σε μυκητοκτόνες ουσίες***



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



ανάπτυξη - εργασία - αλληλεγγύη

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Η βιολογική αντιμετώπιση με τη χρήση μικροοργανισμών που δρουν ως ανταγωνιστές αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς παράγοντες για την αντιμετώπιση των παθογόνων των φυτών στο πλαίσιο της ολοκληρωμένης αντιμετώπισης και της Πράσινης Συμφωνίας (Green Deal/Farm to Farm Strategy). Οι ζύμες αποτελούν ιδανικούς βιολογικούς παράγοντες καταπολέμησης ασθενειών της αμπέλου, καθώς παρουσιάζουν προσαρμοστικότητα σε μεγάλο εύρος καιρικών συνθηκών, αναπτύσσονται σε σύντομο χρονικό διάστημα και αποικίζουν την επιφάνεια των ραγών εύκολα (Pimenta et al., 2009). Οι ζύμες συνήθως ανταγωνίζονται τους φυτοπαθογόνους μύκητες ως προς τα θρεπτικά συστατικά και το χώρο, με αποτέλεσμα να επιφέρουν αρνητικές επιπτώσεις στην ανάπτυξη και στο δευτερογενή μεταβολισμό των μυκήτων. Έχει επίσης, παρατηρηθεί το φαινόμενο του παρασιτισμού και η παραγωγή ενώσεων από τις ζύμες, με αποτέλεσμα την αναστολή της ανάπτυξης των φυτοπαθογόνων μυκήτων.

Οι ζύμες έχουν την ικανότητα να αποικίζουν υπό ξηροφυτικές συνθήκες και για μακρό χρονικό διάστημα τη φυτική επιφάνεια και να πολλαπλασιάζονται γρήγορα λόγω ταχείας εκμετάλλευσης των θρεπτικών στοιχείων. Παράγουν εξωκυτταρικούς πολυσακχαρίτες οι οποίοι επιμηκύνουν την επιβίωσή τους και μειώνουν τα σημεία αποικισμού του φυτού καθώς παρεμποδίζεται ο αποικισμός φυτοπαθογόνων μυκήτων. Οι ζύμες έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στην βιολογική καταπολέμηση μετασυσπλεκτικών κυρίως παθογόνων με επεμβάσεις σε προσυλλεκτικό και μετασυσπλεκτικό στάδιο. Η ανακάλυψη ελληνικών-ενδημικών απομονώσεων έχει το πλεονέκτημα ότι τα στελέχη αυτά είναι ήδη εγκλιματισμένα στο τοπικό περιβάλλον και στην τοπική χλωρίδα και πανίδα και θα μπορούσαν να πάρουν πιο εύκολα μελλοντικές άδειες χρήσης τους ως βιολογικά σκευάσματα στη χώρα μας. Οι ζύμες έχουν την ικανότητα να αποικίζουν υπό ξηροφυτικές συνθήκες και για μακρό χρονικό διάστημα τη φυτική επιφάνεια και να πολλαπλασιάζονται γρήγορα λόγω ταχείας εκμετάλλευσης των θρεπτικών στοιχείων. Παράγουν εξωκυτταρικούς πολυσακχαρίτες οι οποίοι επιμηκύνουν την επιβίωσή τους και μειώνουν τα σημεία αποικισμού του φυτού καθώς παρεμποδίζεται ο αποικισμός φυτοπαθογόνων



**ΕΠΑνΕΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

μυκήτων. Οι ζύμες έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στην βιολογική καταπολέμηση μετασυλλεκτικών κυρίως παθογόνων με επεμβάσεις σε προσυλλεκτικό και μετασυλλεκτικό στάδιο. Η ανακάλυψη ελληνικών-ενδημικών απομονώσεων έχει το πλεονέκτημα ότι τα στελέχη αυτά είναι ήδη εγκλιματισμένα στο τοπικό περιβάλλον και στην τοπική χλωρίδα και πανίδα και θα μπορούσαν να πάρουν πιο εύκολα μελλοντικές άδειες χρήσης τους ως βιολογικά σκευάσματα στη χώρα μας. Στόχοι της ενότητας ΕΕ 3 ήταν: α) η εύρεση αποτελεσματικών ζυμών ως βιολογικών παραγόντων αντιμετώπισης ασθενειών που επηρεάζουν αρνητικά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του κρασιού όπως της τεφράς και όξινης σήψης των βοτρυών που προκαλούνται από τους μύκητες *Botrytis cinerea* και *Aspergillus carbonarius* (και των καρκινογόνων ωχρατοξινών που παράγουν), β) η αξιολόγηση επιλεγμένων αποτελεσματικών ανταγωνιστικών ζυμών ως προς την ανθεκτικότητα τους σε φυτοπροστατευτικά σκευάσματα που χρησιμοποιούνται στο αμπέλι, ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά σε ένα ολοκληρωμένο πρόγραμμα διαχείρισης ασθενειών της αμπέλου.

### **Δράση 3.1: Αξιολόγηση συλλογής ζυμών σε πειράματα ανταγωνισμού κατά του *B. cinerea* και του *A. carbonarius* στο εργαστήριο.**

Στο πλαίσιο της υλοποίησης της Δράσης 3.1 της ΕΕ3, 126 ζύμες από τη συλλογή του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας που έχουν απομονωθεί από ελληνικούς αμπελώνες εξετάστηκαν ως προς την ανταγωνιστική τους ικανότητα κατά του μύκητα *A. carbonarius*. Επίσης, κατά τα έτη 2018-2021 πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες σταφυλιών από περιοχές της Ελλάδας με διαφορετικές κλιματολογικές συνθήκες με στόχο τον εμπλουτισμό της υπάρχουσας συλλογής με 304 νέα ενδημικά στελέχη ζυμών, που θα μπορούσαν να αποτελέσουν βιολογικούς παράγοντες αντιμετώπισης της όξινης και τεφράς σήψης. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν σε διάφορα



**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

στάδια της ανάπτυξης του σταφυλιού (στάδιο του μούρου, “veraison”, στάδιο ωρίμανσης) από τους αμπελώνες χρησιμοποιώντας τυποποιημένα πρωτόκολλα.

Αρχικά 125 ζύμες από τη συλλογή του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας που έχουν απομονωθεί από ελληνικούς αμπελώνες, εξετάστηκαν ως προς την ανταγωνιστική τους ικανότητα κατά του μύκητα *A. carbonarius*. Στα *in situ* πειράματα στις ράγες, αξιολογήθηκε η παρεμπόδιση της κονιδιογένεσης του στελέχους Ac29 του *A. carbonarius* με σκοπό να βρεθούν αποτελεσματικές ζύμες που να μειώνουν την εξέλιξη της ανάπτυξης του μύκητα επάνω σε ράγες. Τα πειράματα αυτά έδειξαν ότι σε σύνολο 125 ελληνικών ζυμών: **α)** 28 ζύμες (22,4%) παρεμπόδισαν την *in vitro* κονιδιογένεση σε τρυβλία σε ποσοστό >50% με πιο αποτελεσματική τη ζύμη Z55 (93,9%), **β)** 84 ζύμες (67,2%) παρεμπόδισαν την κονιδιογένεση σε ράγες σε ποσοστό >50% ενώ 4 ζύμες (3,2%; YN22, YN37, Z85, Z9) οδήγησαν σε ποσοστά παρεμπόδισης παραγωγής κονιδίων >80% σε ράγες. Στη συνέχεια όλες οι ζύμες σε συνδυασμό με ωχρατοξικογόνους μύκητες *A. carbonarius* εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να παρεμποδίζουν την παραγωγή ωχρατοξίνης A σε ράγες σταφυλιού (ποικιλία Φράουλα) με τη χρήση του AgraQuant ELISA kit και της χρήση της ανοσοενζυμικής μεθόδου ELISA. Από τις 125 ζύμες που αξιολογήθηκαν, οι 52 (41,6%) μείωσαν σημαντικά τα επίπεδα ωχρατοξινών συγκριτικά με το μάρτυρα σε ποσοστό >30% ενώ 26 ζύμες (20,8%) παρεμπόδισαν σχεδόν 100% τη βιοσύνθεση της ωχρατοξίνης (οι τιμές ωχρατοξίνης A που ανιχνεύθηκαν ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου <2 ppb). Πέραν της συλλογής ζυμών του Εργ. Φυτοπαθολογίας αξιολογήθηκε μια επιπλέον συλλογή 178 ζυμών που απομονώθηκαν από διάφορους αμπελώνες της Ελλάδας (Μονόσπιτα – Ν. Ημαθίας, Αγκιάλος – Ν. Μαγνησίας, Τύρναβος – Ν. Λάρισας, Σπάτα – Ν. Αττικής, Νεμέα – Ν. Κορινθίας, Αμπελώνας – ΓΠΑ). Οι ζύμες εξετάστηκαν ως προς την ανταγωνιστική τους ικανότητα κατά του μύκητα *A. carbonarius* με το σύστημα της διπλής καλλιέργειας σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης Potato Dextrose Agar (PDA). 1 μόνο ζύμη παρεμπόδισε την ανάπτυξη του μύκητα *A. carbonarius* σε ποσοστό >40% (40,8%; Z172), 28 ζύμες παρουσίασαν ποσοστά παρεμπόδισης 30-40% και οι υπόλοιπες <30%. Μετά την ολοκλήρωση των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο (αξιολόγηση *in vitro* και *in situ* παρεμπόδισης παραγωγής κονιδίων και ΟΤΑ σε θρεπτικά υποστρώματα και ράγες), έγινε συσχετισμός όλων των δεδομένων και επιλέχθηκαν 8 ζύμες (Z31, Z8, Y1, VOL3, ΣΡ8, Z12, Z55, Y43), για



**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

πραιτέρω διερεύνησή τους σε πειραματικούς αμπελώνες στα Σπάτα Αττικής και στη Σαντορίνη με εφαρμογή στο φύλλωμα και στους βότρες με σκοπό τη βιολογική καταπολέμηση σήψεων της αμπέλου και των ωχρατοξινών.

Επιπλέον, 173 ζύμες από τη συλλογή του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας εξετάστηκαν ως προς την ανταγωνιστική τους ικανότητα κατά του μύκητα *B. cinerea* με το σύστημα της διπλής καλλιέργειας σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης Potato Dextrose Agar (PDA). Από αυτή τη συλλογή, 10 ζύμες παρεμπόδισαν >50% την ανάπτυξη του μύκητα *B. cinerea* σε θρεπτικό υπόστρωμα και οι αποτελεσματικότερες ήταν 2 ζύμες με ποσοστά παρεμπόδισης 87% και 73,5 % (ΥΝ3, Υ14). Από τις υπόλοιπες ζύμες 19 παρουσίασαν ποσοστά παρεμπόδισης 40-50%, και 17 ποσοστά 30-40%. Πέραν της συλλογής ζυμών του Εργ. Φυτοπαθολογίας δημιουργήθηκε μια επιπλέον συλλογή 304 ζυμών που απομονώθηκαν από διάφορους αμπελώνες της Ελλάδας (Μονόσπιτα – Ν. Ημαθίας, Αγχίαλος – Ν. Μαγνησίας, Τύρναβος – Ν. Λάρισας, Σπάτα – Ν. Αττικής, Νεμέα – Ν. Κορινθίας, Αμπελώνας – ΓΠΑ). Οι ζύμες εξετάστηκαν ως προς την ανταγωνιστική τους ικανότητα κατά του μύκητα *B. cinerea* με το σύστημα της διπλής καλλιέργειας σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης Potato Dextrose Agar (PDA). 18 από αυτές τις ζύμες παρεμπόδισαν την ανάπτυξη του μύκητα *B. cinerea* σε ποσοστό >40% (1>50%), 99 ζύμες παρουσίασαν ποσοστά παρεμπόδισης 30-40% και οι υπόλοιπες <30%. Με βάση όλα τα παραπάνω αποτελέσματα επιλέχθηκαν 3 αποτελεσματικές ζύμες (Ζ90, Υ14, Υ52) για περαιτέρω αξιολόγηση τους σε πειραματικούς αμπελώνες στα Σπάτα Αττικής και στη Σαντορίνη με εφαρμογή στο φύλλωμα και στους βότρες με σκοπό τη βιολογική καταπολέμηση της τεφράς σήψης της αμπέλου.

Για την ταυτοποίηση των 8 επιλεγμένων ζυμών (Ζ31, Ζ8, Υ1, VOL3, ΣΡ8, Ζ12, Ζ55, Υ43) για την αντιμετώπιση του *A. carbonarius* και των 3 ζυμών (Ζ90, Υ14, Υ52) για την αντιμετώπιση του *B. cinerea* που επιλέχθηκαν, έγινε αλληλούχηση συγκεκριμένης περιοχής του γενωμικού τους DNA (ITS). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι 3 από τις 8 ζύμες για την αντιμετώπιση του *A. carbonarius* ανήκουν στο είδος *Aureobasidium pullulans*, 2 από τις 8 ανήκουν στο είδος *Candida railenensis*, ενώ οι υπόλοιπες στα είδη *Tolulasporea delbrueckii*, *Rhodotorula mucilaginosa* και *Debaryomyces hansenii* ενώ και οι 3 ζύμες για την αντιμετώπιση του *B. cinerea* ανήκουν στο είδος *Aureobasidium pullulans*.



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

### **Δράση 3.2: Αξιολόγηση επιλεγμένων ανταγωνιστικών ζυμών σε πειράματα αντιμετώπισης της τεφράς και όξινης σήψης σε πειράματα αγρού.**

Με βάση τα αποτελέσματα της Δράσης 3.1, επιλέχθηκαν 8 στελέχη ζυμών και έγινε περαιτέρω αξιολόγηση τους, σε αμπελώνες του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών στα Σπάτα Αττικής, τα έτη 2019, 2020 και 2021, στις ποικιλίες Σαββατιανό, Μαλαγουζιά και Ασύρτικο και σε αμπελώνες της Santo Wines στη Σαντορίνη το 2021.

Κατά το έτος 2019, μείγμα των ζυμών Z31, Z8, Y1, VOL3, ΣΡ8 (Mix Yeasts) ψεκάστηκε σε δύο ποικιλίες, Μαλαγουζιά και Σαββατιανό, στον πειραματικό αμπελώνα του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, στα Σπάτα. Πραγματοποιήθηκαν δύο ψεκασμοί με τις ζύμες αυτές (η πρώτη κατά την περίοδο του γυαλίσματος των ραγών και η 2<sup>η</sup>, τρεις εβδομάδες αργότερα). Πριν τον τρύγο αξιολογήθηκε η σοβαρότητα της ασθένειας στον αμπελώνα και μετά τον τρύγο οι βότρες συλλέχθηκαν και μεταφέρθηκαν στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας, όπου μετρήθηκε και η παραγόμενη ΟΤΑ. Η εφαρμογή του μίγματος Mix Yeasts, μείωσε τη σοβαρότητα της ασθένειας το 2019 κατά 34,5% στην ποικιλία Μαλαγουζιά και 4,7% στην ποικιλία Σαββατιανό. Όσον αφορά τα αποτελέσματα μείωσης της ΟΤΑ, η εφαρμογή του μίγματος Mix Yeasts δε μείωσε τα επίπεδα της ΟΤΑ, τα οποία κυμάνθηκαν στα ίδια επίπεδα με τον μάρτυρα.

Τα έτη 2020 και 2021 έγινε εφαρμογή με ψεκασμό μεμονωμένων ζυμών που επιλέχθηκαν: Z8 (Κωδικός ζύμης πειραμάτων αγρού: A1), Z55 (Κωδ. πειραμάτων αγρού: A2) και Y43 (Κωδ. πειραμάτων αγρού: A3) στην ποικιλία Σαββατιανό, στον πειραματικό αμπελώνα του ΓΠΑ, στα Σπάτα. Το έτος 2020, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η εφαρμογή των τριών ζυμών A1, A2 και A3 μείωσε στατιστικά σημαντικά τη σοβαρότητα της ασθένειας της όξινης σήψης που κυμάνθηκε περίπου στα ίδια επίπεδα με τα αποτελέσματα της εφαρμογής του μυκητοκτόνου Switch®. Τα αποτελέσματα της παραγωγής ΟΤΑ έδειξαν ότι η εφαρμογή των ζυμών A1 (Z8) και A2 (Z55) μείωσαν στατιστικά σημαντικά την ΟΤΑ (67% και 83.5% αντίστοιχα), όπως και η εφαρμογή του μυκητοκτόνου Switch®. Σχετικά με την αξιολόγηση των ζυμών ως προς την τεφρά σήψη, και οι 3 ζύμες (B1, B2 και B3) μείωσαν στατιστικά σημαντικά τη σοβαρότητα της ασθένειας στην ποικιλία Σαββατιανό. Το έτος 2021,



**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

έγινε εφαρμογή του μείγματος των ζυμών Z31, Z8, Y1, VOL3, ΣΡ8 (Mix Yeasts), των ζυμών A1 (Z8) και A2 (Z55) και ενός μείγματος 3 ζυμών *Saccharomyces cerevisiae* (Mix *Saccharomyces*) από το Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του ΓΠΑ. Οι εφαρμογές των ζυμών έγιναν με ψεκασμό (όπως τα προηγούμενα έτη) σε δύο ποικιλίες (Σαββατιανό και Ασύρτικο), στον πειραματικό αμπελώνα του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, στα Σπάτα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλες οι εφαρμογές των ζυμών μείωσαν στατιστικά σημαντικά τη σοβαρότητα της όξινης σήψης στο Σαββατιανό και στο Ασύρτικο. Οι εφαρμογές του μείγματος των ζυμών Z31, Z8, Y1, VOL3, ΣΡ8 (Mix Yeasts) και των ζυμών A1 (Z8) και A2 (Z55) μείωσαν την OTA σε επίπεδα χαμηλότερα από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου συγκριτικά με τον μάρτυρα στην ποικιλία Σαββατιανό. Στην ποικιλία Ασύρτικο, η ζύμη A1 (Z8) και το Mix *Saccharomyces* μείωσαν στατιστικά σημαντικά την ποσότητα της OTA ενώ η ζύμη A2 δεν είχε καμία επίδραση στην OTA, γεγονός που υποδεικνύει ότι η φυτοπροστατευτική δράση των ζυμών είναι εξαρτώμενη από την ποικιλία. Σχετικά με την αξιολόγηση των ζυμών ως προς την τεφρά σήψη, οι 3 ζύμες (B1, B2 και B3) εφαρμόστηκαν το έτος 2021 σε μείγμα στις ποικιλίες Σαββατιανό και Ασύρτικο και μείωσαν στατιστικά σημαντικά τη σοβαρότητα της ασθένειας.

Στο αμπελώνα της Santo Wines στην Σαντορίνη, εφαρμόστηκαν με ψεκασμό οι ζύμες A1, A2 και MIX *Saccharomyces cerevisiae* το έτος 2021 και αξιολογήθηκαν οι σήψεις των βότρεων κατά την περίοδο του τρύγου (φυσικές μολύνσεις). Όλες οι εφαρμογές ήταν ιδιαίτερα αποτελεσματικές στην αντιμετώπιση των σήψεων των ραγών. Ανάλυση των βότρεων για επιμόλυνση με ωχρατοξίνες έδειξε ότι δεν υπήρχε ωχρατοξίνη στο συγκεκριμένο αμπελώνα και έτος στη Σαντορίνη σε τιμές πάνω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε (ELISA).

### **Δράση 3.3: Αξιολόγηση ανταγωνιστικών ζυμών ως προς την ανθεκτικότητα τους σε μυκητοκτόνες ουσίες.**

Οι πιο αποτελεσματικές ζύμες εξετάστηκαν ως προς την ευαισθησία τους σε σειρά μυκητοκτόνων ουσιών με ευρεία χρήση στην καλλιέργεια της αμπέλου. Στόχος της μελέτης είναι η δημιουργία ενός ολοκληρωμένου συστήματος διαχείρισης των μυκήτων *A. carbonarius* και *B. cinerea*, στην καλλιέργεια της αμπέλου που θα συνδυάζει την εφαρμογή βιολογικών παραγόντων –





**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

ανταγωνιστικών ζυμών και τη χρήση χημικών φυτοπροστατευτικών προϊόντων. Ο προσδιορισμός της ευαισθησίας των στελεχών στα μυκητοκτόνα έγινε με βάση την επίδρασή τους στην παρεμπόδιση της ανάπτυξης των ζυμών σε κατάλληλα θρεπτικά υποστρώματα. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν καμπύλες συσχέτισης του τοξικού αποτελέσματος και των συγκεντρώσεων του μυκητοκτόνου. Από τις καμπύλες αυτές εκτιμήθηκαν οι τιμές  $EC_{50}$  (η συγκέντρωση που προκαλεί 50% παρεμπόδιση της αύξησης) και προσδιορίστηκε η ευαισθησία των ζυμών στα διάφορα μυκητοκτόνα. Για το πείραμα αυτό επιλέχθηκαν οι 6 ζύμες: Z12, Z55, Y43 (αντιμετώπιση όξινης σήψης) και τα στελέχη Z90, Y14, Y52 (αντιμετώπιση τεφράς σήψης) που εφαρμόστηκαν στον αγρό κατά τα έτη 2020-2021.

Για τις 6 απομονώσεις ζυμών που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα αγρού πραγματοποιήθηκαν πειράματα ευαισθησίας ως προς τις δραστικές ουσίες fludioxonil, cyprodinil, fenhexamid, boscalid και fluopyram που χρησιμοποιούνται ευρέως στην καλλιέργεια της αμπέλου για την καταπολέμηση διαφόρων ασθενειών. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με βάση την ανάπτυξη των ζυμών σε διαφορετικές συγκεντρώσεις των δ.ο., σε υγρή θρεπτική καλλιέργεια ΥΜ. Αναλυτικότερα, ως προς τη ζύμη Z12 (A1) οι τιμές  $EC_{50}$  κυμάνθηκαν κάτω από τα 0,3 g/mL. Στις δραστικές ουσίες boscalid και cyprodinil η απομόνωση Z12 παρουσίασε τις πιο ψηλές τιμές  $EC_{50}$ . Γενικά, σε όλες τις δραστικές ουσίες, η Z12 χαρακτηρίστηκε ως ευαίσθητη. Ως προς τη ζύμη Z55 (A2) οι τιμές  $EC_{50}$  για όλες τις δραστικές ουσίες ήταν κάτω από τα 0,3 gr/mL, πλην της δραστικής fludioxonil, όπου η τιμή η τιμή  $EC_{50}$  είναι ίση με 3,9 gr/mL, γεγονός που την χαρακτηρίζει μέτρια ανθεκτική στη συγκεκριμένη δ.ο. αυτή. Η ζύμη Y43 (A3) παρουσίασε τιμές  $EC_{50}$  κάτω των 0,03 gr/mL και χαρακτηρίζεται ως ευαίσθητη ως προς όλες τις δ.ο., με πιο χαμηλή τιμή  $EC_{50}$  στη δ.ο. fenhexamid. Η ζύμη Y52 ήταν επίσης ευαίσθητη σε όλες τις δ.ο. που εξετάστηκαν με τιμές  $EC_{50} < 0.7$  gr/ml. Η ζύμη Y14 παρουσίασε πιο υψηλές τιμές  $EC_{50}$  συγκριτικά με τις υπόλοιπες ζύμες χωρίς όμως να μπορεί να θεωρηθεί ανθεκτική στις συγκεκριμένες δ.ο. Τέλος η ζύμη Z90 παρουσίασε μια ιδιαίτερη αυξημένη  $EC_{50}$  (>10 gr/ml.) για την δ.ο. fludioxonil γεγονός που μπορεί να τη χαρακτηρίσει ως ανθεκτική στη συγκεκριμένη δ.ο. ενώ για τις υπόλοιπες δ.ο. οι τιμές  $EC_{50}$  είναι ιδιαίτερα χαμηλές.



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

**ΕΠΑνΕΚ** 2014-2020  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



ανάπτυξη - εργασία - αλληλεγγύη

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

## Ενότητα Εργασίας 4: Μικροοινοποιήσεις και αξιολόγηση οίνων

**Φορέας υλοποίησης: Εργαστήριο Οινολογίας και Αλκοολούχων Ποτών  
Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών**

**Δράση 4.1: Μικροοινοποιήσεις με χρήση επιλεγμένων ζυμών λευκού και ερυθρού οίνου.**

**Δράση 4.2: Οργανοληπτικός έλεγχος, γευσιγνωσία.**



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



ανάπτυξη - εργασία - αλληλεγγύη

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

#### **Δράση 4.1: Μικροοινοποιήσεις με χρήση επιλεγμένων ζυμών λευκού και ερυθρού οίνου.**

Στα πλαίσια αυτής της δράσης, 3 στελέχη του μικροοργανισμού *Saccharomyces cerevisiae* (εφεξής στελέχη Sc9, Sc13 και Sc24) και ένα στέλεχος non-*Saccharomyces*, το στέλεχος *Nakazawaea ishiwadae* M21 (εφεξής N.i.), που απομονώθηκαν από αυθόρμητες ζυμώσεις που εγένοντο στο οινοποιείο «Santo Wines» από Ασύρτικο γλεύκος Σαντορίνης (για περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τα στελέχη, βλέπετε Ενότητα Εργασίας 1) χρησιμοποιήθηκαν σε ζυμώσεις γλεύκους από σταφύλια Ασύρτικου και Μαυροτράγανου, όγκου 8,0L στους 18°C και 25°C αντίστοιχα. Τα σταφύλια προήλθαν από την Σαντορίνη και η ημερομηνία τρυγητού καθορίστηκε με βάση την τεχνολογική ωριμότητα.

Ο εμβολιασμός του γλεύκους για τις ζυμώσεις αυτές, πραγματοποιήθηκε με μονοκαλλιέργειες των στελεχών αυτών που προετοιμάστηκαν από το EMBT (Δρ. Μαρία Δημοπούλου) και ο πληθυσμός του εμβολίου ήταν  $10^6$ . Ακολουθήθηκαν δύο πρωτόκολλα ζύμωσης (2018 και 2019). Αρχικά, τα 4 στελέχη (Sc9, Sc13, Sc24 και N.i.) εμβολιάστηκαν σε καθαρές καλλιέργειες με 2 βιολογικές επαναλήψεις για το καθένα. Κατά το δεύτερο πρωτόκολλο ζύμωσης, προηγήθηκε ο εμβολιασμός με το N.i.. Μετά από 72 ώρες, έγινε δεύτερος εμβολιασμός με τα στελέχη *Saccharomyces* (Sc9, Sc13, και Sc24). Στόχος ήταν η μελέτη της ζυμωτικής δράσης των 4 στελεχών και η ανάπτυξη των βέλτιστων πρωτοκόλλων ζύμωσης με τα απομονωθέντα στελέχη. Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα των συγκεκριμένων δοκιμών, δύο από τα παραπάνω στελέχη (Sc9, Sc13) επελέγησαν για περαιτέρω διερεύνηση σε σύγκριση με ένα εμπορικό στέλεχος και σε διαφορετικές συνθήκες θρέψης (Παραδοτέα 5.1). Πραγματοποιήθηκε εμπλουτισμός του γλεύκους σε άζωτο με προσθήκη 1:1 Yeast extract (για εμπλουτισμό σε οργανικό άζωτο) και DAP (diammonium phosphate) (για εμπλουτισμό σε ανόργανο άζωτο) μέχρι τελικών συγκεντρώσεων YAN 150,0 mg/L και 250,0 mg/L.

Κατά την πειραματική πορεία εφαρμόστηκαν διάφορες χημικές αναλύσεις τόσο στο γλεύκος, όσο και στους παραγόμενους οίνους. Κλασικές αναλυτικές παράμετροι (ελεύθερος και ολικός θειώδης ανυδρίτης, % αιθανόλης, pH, ογκομετρούμενη και πτητική οξύτητα, προσδιορίστηκαν με βάση OIV (2020). Προσδιορισμός των υπολειπόμενων ζαχάρων (γλυκόζη, φρουκτόζη), της γλυκερόλης και του οξικού οξέος πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC), όπως περιγράφεται σε προηγούμενα εδάφια (βλέπετε Ενότητα Εργασίας 2 και Terrou *et al* 2019). Η ανάλυση των αμινοξέων όπως επίσης και το προφίλ των πτητικών ενώσεων που καθορίζουν το άρωμα των οίνων που παρήχθησαν, προσδιορί-



**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

στηκε με τη βοήθεια αέριας χρωματογραφίας (GC) με ανιχνευτή μάζας (MS) για ταυτοποίηση και ανιχνευτή FID για ποσοτικοποίηση, όπως περιγράφεται από Christofi *et al* (2021). Η ανάλυση του χαμηλού μοριακού βάρους φαινολικών, πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC), όπως περιγράφεται από Vlahou *et al* (2022). Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του λογισμικού προγράμματος Statistica V.7 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA). Το Tukey's HSD χρησιμοποιήθηκε ως τεστ σύγκρισης όταν τα δείγματα παρουσίαζαν σημαντικές διαφορές μετά από ανάλυση ANOVA ( $p < 0,05$ ).

Η οργανοληπτική αξιολόγηση των οίνων πραγματοποιήθηκε για όλα τα δείγματα, από μία ομάδα δώδεκα εκπαιδευμένων ατόμων με προηγούμενη εμπειρία στην ανάλυση οίνων, χρησιμοποιώντας συγκεκριμένους περιγραφικούς όρους και μια κλίμακα 5 σημείων. 25,0 mL των δειγμάτων παρουσιάστηκαν στους δοκιμαστές με εντελώς τυχαιοποιημένη σειρά, με τριψήφιους αριθμούς στους 16°C για τα δείγματα Ασύρτικου και στους 20°C για τα δείγματα Μαυροτράγανου. Τα δείγματα Ασύρτικου αξιολογήθηκαν ως προς οσφρητικούς παράγοντες (white flowers, tropical fruits, citrus fruits, stone fruits, και oxidation) και γευστικά ερεθίσματα (sourness and mouthfeel as the perception of the body of wine). Οι δοκιμαστές πραγματοποίησαν επίσης αξιολόγηση ως προς την ολική οσφρητική και γενική ποιότητα των οίνων. Όλα τα δείγματα αξιολογήθηκαν εις διπλούν. Τα δείγματα Μαυροτράγανου αξιολογήθηκαν ως προς την ένταση χρώματος, οσφρητικούς παράγοντες (floral, sour cherry, red fruits, black fruits, και oxidation) και γευστικά ερεθίσματα (sourness and mouthfeel as the perception of the body of wine). Οι δοκιμαστές πραγματοποίησαν επίσης αξιολόγηση ως προς την ολική οσφρητική και γενική ποιότητα των οίνων. Όλα τα δείγματα αξιολογήθηκαν εις διπλούν.

Στις δοκιμές σε γλεύκος Ασύρτικου με καθαρές καλλιέργειες με τα στελέχη *Saccharomyces cerevisiae*, παρατηρήθηκε άμεση έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης, εν αντιθέσει με τις δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν με το N.i. στέλεχος, όπου παρατηρήθηκε τριήμερη καθυστέρηση της αλκοολικής ζύμωσης. Ανεξαρτήτως της αρχικής καθυστέρησης, το N.i στέλεχος χαρακτηρίστηκε από υψηλότερο ρυθμό ζύμωσης των υπολειπόμενων σακχάρων, σε σύγκριση με τα στελέχη Sc13 και Sc24 (Παρ. 4.1). Το μεγαλύτερο ρυθμό ζύμωσης ανάγοντων σακχάρων με στατιστικά σημαντική διαφορά, παρουσίασε το στέλεχος Sc9, με το ρυθμό αυτό να πλησιάζει αυτόν των εμπορικών στελεχών (~25,0 g/L/ημέρα). Στατιστικές διαφορές ως προς τη



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



ανάπτυξη - εργασία - αλληλεγγύη

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

συγκέντρωση υπολειπόμενων ζαχάρων παρατηρήθηκαν μόνο για τις δοκιμές με το Sc13 στέλεχος, ενώ δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στη τελική συγκέντρωση αιθανόλης. Το γεγονός αυτό οδήγησε σε διαφορετικούς συντελεστές απόδοσης αιθανόλης ανά μονάδα σακχάρων. Διακυμάνσεις σημειώθηκαν και στο ρυθμό κατανάλωσης γλυκόζης και φρουκτόζης μεταξύ των δοκιμών με τα διαφορετικά στελέχη. Όλα τα στελέχη παρουσίασαν γλυκόφιλο χαρακτήρα.

Κατά το δεύτερο πρωτόκολλο ζύμωσης στο οποίο εφαρμόστηκαν διαδοχικοί εμβολιασμοί των στελεχών παρατηρήθηκε γενική καθυστέρηση τόσο στην έναρξη όσο και στην ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης. Ωστόσο, παρά την αρχική καθυστέρηση, ολοκληρώθηκαν όλες οι ζυμώσεις καταλήγοντας σε ξηρούς οίνους. Ο αρχικός εμβολιασμός με το «άγριο» στέλεχος (N.i.) φαίνεται να καθόρισε και το ρυθμό κατανάλωσης γλυκόζης και φρουκτόζης. Ο συντελεστής απόδοσης αιθανόλης ανά γραμμάριο καταναλωθέντων ζαχάρων γενικά μειώθηκε σε σχέση πάντα με τις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν με μονοκαλλιέργειες στελεχών. Και πάλι όμως, δεν παρουσιάστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην παραγωγή αιθανόλης.

Στατιστικές διαφορές σημειώθηκαν στην παραγωγή γλυκερόλης και ηλεκτρικού οξέος, με το Sc13 στέλεχος να είναι ο ισχυρότερος παραγωγός, και άρα το πιο ανθεκτικό σε ισχυρά όξινες συνθήκες και στην οσμωτική πίεση (ενώ τα Sc24 και Nι τα λιγότερο ανθεκτικά). Διαδοχικοί εμβολιασμοί κατά το δεύτερο πρωτόκολλο ζύμωσης, οδήγησαν σε ομογενοποίηση των αποτελεσμάτων για γλυκερόλη και ηλεκτρικό οξύ. Ισχυρότερος παραγωγός πτητικής οξύτητας ΠΟ ήταν το στέλεχος Sc24 τόσο κατά το πρώτο όσο και κατά το δεύτερο πρωτόκολλο ζύμωσης. Τα στελέχη Sc9 και Sc13, φαίνεται πως ήταν οι ισχυρότεροι παραγωγοί οξικών εστέρων, ενώ το Sc24 ήταν μάλλον ο ασθενέστερος παραγωγός της συγκεκριμένης ομάδας πτητικών ενώσεων.

Στην περίπτωση του Μαυροτράγανου με τις καθαρές καλλιέργειες ζυμών, δεν παρατηρήθηκε σε καμία περίπτωση καθυστέρηση στην έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης. Όπως ήταν αναμενόμενο, ο ρυθμός κατανάλωσης σακχάρων για το Μαυροτράγανο ήταν υψηλότερος (μέσος όρος 29,1 g/L/ημέρα) σε σχέση με το Ασύρτικο, και δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δοκιμών με τα διαφορετικά στελέχη. Στην περίπτωση των στελεχών *S. cerevisiae*, ολοκληρώθηκε η αλκοολική ζύμωση μέχρι την 10<sup>η</sup> ημέρα, με τους παραχθέντες οίνους να εμπίπτουν στην κατηγορία των ξηρών οίνων με βάση τα υπολειπόμενα ζάχαρα. Οι δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν με το Nι στέλεχος κατέληξαν με υψηλότερες συγκεντρώσεις υπολειπόμενων ζαχάρων σε σχέση με τα υπόλοιπα στελέχη, ωστόσο, δεν σημειώθηκαν στατιστικές διαφορές. Ομογενοποίηση των δειγμάτων Μαυροτράγανου,



**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

παρατηρήθηκε και ως προς τους συντελεστές απόδοσης αιθανόλης ανά μονάδα σακχάρου. Ο μέσος όρος για το συντελεστή απόδοσης ήταν 0,58 g/g.

Κατά το δεύτερο κύκλο πειραματικών ζυμώσεων σε πραγματικό μέσο διαπιστώθηκε ότι οι κινητικές των ΑΖ εξαρτιόνταν πρώτιστος από τα στελέχη των ζυμών και δευτερευόντως από τη συγκέντρωση ΥΑΝ. Το Sc9 στέλεχος έφτασε στο μέσο της ΑΖ μετά από 4 ημέρες. Αντιθέτως, το εμπορικό και το Sc13 στέλεχος παρουσίασαν μια 48ωρη καθυστέρηση, φτάνοντας στο μέσο της ΑΖ μετά από 6 ημέρες. Η παραγωγή αιθανόλης ακολούθησε το ίδιο μοτίβο. Το Sc9 οδήγησε σε οίνους με την υψηλότερη συγκέντρωση αιθανόλης, ακολουθούμενο από το Sc13 και το εμπορικό, χωρίς ωστόσο να σημειώνονται στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Κατά την κατανάλωση αναγόντων σακχάρων, διαφορές στις ανάγκες αζώτου παρατηρήθηκαν μεταξύ των στελεχών. Το Sc9 στέλεχος φαίνεται να ξεπερνά τα υπόλοιπα στελέχη σε ανάγκες αζώτου, ενώ το εμπορικό και το Sc13 στέλεχος παρουσίασαν συγκρίσιμες ανάγκες σε άζωτο. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικές διαφορές στην συγκέντρωση τρυγικού, μηλικού και γαλακτικού οξέος μετά το τέλος της ΑΖ μεταξύ δοκιμών με διαφορετικά στελέχη. Ωστόσο παρατηρήθηκε μείωση τρυγικού οξέος που μάλλον οφείλεται κατά βάση σε φυσικοχημικά φαινόμενα, εν αντιθέσει με την παρατηρούμενη μείωση του κιτρικού οξέος που μάλλον οφείλεται σε διαφορές στην γονιδιακή έκφραση των 3 στελεχών. Η περιορισμένη μείωση στο κιτρικό οξύ στις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν με το Sc13 στέλεχος, οδήγησε σε υψηλότερη ολική οξύτητα και χαμηλότερο pH, σε σύγκριση με τις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν με τα άλλα δύο στελέχη. Οίνοι που παράχθηκαν με το Sc13 στέλεχος χαρακτηρίστηκαν και από χαμηλότερη ΠΟ σε σχέση με οίνους που παράχθηκαν με το εμπορικό και Sc9 στέλεχος. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η αύξηση της πτητικής οξύτητας ήταν μεγαλύτερη στις ζυμώσεις με 250,0 mg N/L έναντι των ζυμώσεων με 150,0 mg N/L ΥΑΝ, στις περιπτώσεις του εμπορικού και του Sc13 στελεχούς, αντίθετα με το Sc9 στέλεχος.

Η υψηλότερη συγκέντρωση γλυκερόλης παρατηρήθηκε στις ζυμώσεις με αρχικό ΥΑΝ στα 150 mg N/L, για όλα τα στελέχη. Ωστόσο, η υψηλότερη τιμή σημειώθηκε για το Sc13 στέλεχος, σε παραλληλισμό με τη γενικότερη άποψη ότι υψηλότερες αποδόσεις γλυκερόλης, οδηγούν σε μειωμένη παραγωγή αιθανόλης.

Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων ως προς τα φαινολικά αυτά συστατικά.

Σε συμφωνία με την περιορισμένη αύξηση στην πτητική οξύτητα, ζυμώσεις με το Sc13 στέλεχος χαρακτηρίστηκαν από μεγαλύτερη παραγωγή ανώτερων αλκοολών και κετονών σε σχέση με ζυμώσεις με το εμπορικό και το Sc9 στέλεχος. Δεν παρατηρή-



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



ανάπτυξη - εργασία - αλληλεγγύη

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

θηκαν στατιστικές διαφορές μεταξύ του εμπορικού και του Sc9 στελέχους ως προς τις συγκεκριμένες ομάδες πτητικών ενώσεων. Επίσης το Sc13 στέλεχος, χαρακτηρίστηκε από μικρότερες συγκεντρώσεις λιπαρών οξέων και εστέρων σε σύγκριση με τα υπόλοιπα. Τα τρία στελέχη παρήγαγαν διαφορετικά προφίλ πτητικών ενώσεων, σε σχέση με το αρχικό YAN. Στις ζυμώσεις με 150,0 mg N/L, το εμπορικό και το Sc9 στέλεχος παρήγαγαν χαμηλότερες συγκεντρώσεις λιπαρών οξέων και υψηλότερες συγκεντρώσεις εστέρων σε σύγκριση με τις ζυμώσεις με 250,0 mg N/L. Για το Sc13 στέλεχος, η παραγωγή λιπαρών οξέων και εστέρων ήταν ανάλογη της αρχικής συγκέντρωσης YAN.

Στα πλαίσια της αυτής της δράσης επιλέχθηκε αρχικά ο μικροοργανισμός *Saccharomyces cerevisiae* Y16 (Δράση 2.1) ο οποίος αναπτύχθηκε σε υπόστρωμα χυμού σταφυλής εμπλουτισμένου με εμπορική γλυκόζη και φρουκτόζη μέχρι συγκέντρωση 250,0 g/L ώστε να προσομοιάζει με τη συνήθη συγκέντρωση στα γλεύκη που προορίζονται για οινοποίηση. Συγκεκριμένα, κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε μη αποστειρωμένος χυμός κόκκινου σταφυλιού του εμπορίου ως μέσο ανάπτυξης του στελέχους με αρχική συγκέντρωση σακχάρων στα 250,0 g/L η οποία, όπως προαναφέρθηκε, επετεύχθη κατόπιν εμπλουτισμού του χυμού με εμπορική γλυκόζη και φρουκτόζη. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα το νεοαπομονωμένο στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae* παρουσίασε υψηλή ζυμωτική ικανότητα δεδομένου ότι καταναλώθηκε το σύνολο της διαθέσιμης πηγής άνθρακα παράγοντας ποσότητες βιομάζας σε συγκέντρωση ~10,5 g/L. Η αιθανόλη παράχθηκε σε σημαντικά υψηλές ποσότητες σε τιμές που πλησιάζουν τα μέγιστα θεωρητικά δεδομένα. Τα ελπιδοφόρα αυτά αποτελέσματα δίνουν το έναυσμα ώστε το στέλεχος αυτό να δοκιμαστεί σε δεύτερο στάδιο και σε πραγματικές συνθήκες οινοποίησης προς παραγωγή λευκού ή/ και ερυθρού οίνου. Στη συνέχεια επιλέχθηκαν νέα στελέχη του *Saccharomyces cerevisiae* (9 και 13), τα οποία είχα προηγουμένως απομονωθεί από Ασύρτικο γλεύκος Σαντορίνης στα πλαίσια της Δράσης 1.2 από το EMBT (Δρ. Μαρία Δημοπούλου). Για λόγους σύγκρισης χρησιμοποιήθηκε επίσης προς μικροοινοποίηση τα εμπορικό στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae* Passion Fruit. Τα στελέχη αυτά χρησιμοποιήθηκαν σε ζυμώσεις γλεύκους από σταφύλια της ποικιλίας Ασύρτικο, όγκου 4,0 L. Ο εμβολιασμός του γλεύκους για τις ζυμώσεις αυτές, πραγματοποιήθηκε με μονοκαλλιέργειες των στελεχών αυτών που προετοιμάστηκαν και ο αρχικός πληθυσμός του εμβολίου ήταν  $10^6$  cfu/L. Η αρχική συγκέντρωση



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



ανάπτυξη - εργασία - αλληλεγγύη

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

σακχάρων του γλεύκους ήταν 240,0 g/L και το αρχικό αφομοιώσιμο άζωτο (Yeast Assumable Nitrogen YAN) 80,0 mg/L. Πραγματοποιήθηκε εμπλουτισμός του γλεύκους σε θρεπτικά, με προσθήκη Yeast extract και DAP (diammonium phosphate), μέχρι τελικών συγκεντρώσεων (YAN) 150,0 mg/L και 250,0 mg/L. Οι τιμές αυτές θεωρούνται η κατώτερη και η μέση αντίστοιχα, για πραγματοποίηση αλκοολικών ζυμώσεων στη βιομηχανία, με μειωμένο ρίσκο κατάληξης σε «κολλημένες» ή «αναγωγικές» ζυμώσεις. Στόχος ήταν η εξέταση της ζυμωτικής συμπεριφοράς των συγκεκριμένων στελεχών σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αζώτου, ώστε να αποσαφηνιστούν οι βέλτιστες συνθήκες οινοποίησης όσων αφορά την θρέψη. Τόσο το εμπορικό, όσο και τα απομονωμένα στελέχη, κατανάλωσαν κατά τη 2η μέρα ζύμωσης, περίπου το 75,0% των αμινοξέων, της οργανικής θρέψης δηλαδή, που συνεργεί στην αύξηση του πληθυσμού και στην παραγωγή πτητικών ενώσεων που συνεισφέρουν στο αρωματικό προφίλ των παραγόμενων οίνων. Διαφοροποιήσεις μεταξύ των στελεχών προέκυψαν στις ανάγκες για ανόργανο άζωτο, αφού ανεξαρτήτου επιπέδου θρέψης το στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae* 9, κατανάλωσε ταχύτερα το αμμωνιακό άζωτο σε σχέση με τα άλλα δύο στελέχη. Ταχύτερη ήταν και η ζυμωτική του δράση. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση του μεγαλύτερου αρχικού εμπλουτισμού σε YAN (250,0 mg/L), ολοκλήρωσε τη ζύμωση σε 18 ημέρες φτάνοντας τα επίπεδα υπολειπόμενων ζαχάρων που αντιστοιχούν σε ξηρό οίνο (<4,0 g/L με βάση τη νομοθεσία) και 12,9% αιθανόλη. Χαμηλότερα αρχικά επίπεδα YAN, είχαν μικρή επίδραση στην ταχύτητα της ζύμωσης, καταλήγοντας ωστόσο σε ένα τελικό προϊόν χωρίς στατιστικά σημαντικές διαφορές σε υπολειπόμενα σάκχαρα και αιθανόλη. Αντιθέτως, το εμπορικό στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae* Passion Fruit και το νέο επιλεγμένο στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae* 13 χαρακτηρίζονται από πιο αργές κινητικές ζυμώσεων, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στην αρχική συγκέντρωση ελεύθερου θειώδους στο γλεύκος (15 ppm). Από τα δεδομένα αυτά θα μπορούσε να προταθεί το στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae* 9 ως κατάλληλο για βιομηχανικής κλίμακας οινοποιήσεις στις οποίες υπάρχει ανάγκη για μεγαλύτερη θείωση του γλεύκους (π.χ. όταν υπάρχει ανάγκη για παρατεταμένη στατική απολάσπωση, λόγω μειωμένης δράσης των πηκτινολητικών ενζύμων) καθώς μπορεί να χαρακτηριστεί ως πιο ανθεκτικό στον θειώδη ανυδρίτη. Εντούτοις, περαιτέρω πειράματα απαιτούνται για τον ακριβή προσδιορισμό της ανθεκτικότητας του κάθε στελέχους σε θειώδη ανυδρίτη. Το πλεονέκτημα από την πιο αργή πορεία ζύμωσης για τα 2 στελέχη *Saccharomyces cerevisiae* 13 και *Saccharomyces cerevisiae* Passion Fruit αλλά και της χαμηλότερης θρέψης (150,0 mg/L), αποτελεί η αυξημένη παραγωγή γλυκερόλης που αυξάνει το «σώμα» και βελτιώνει την αίσθηση στόματος





**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

των οίνων. Αξιοσημείωτο αποτελεί το γεγονός ότι το εμπορικό στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae* Passion Fruit, προκάλεσε την μεγαλύτερη αύξηση στην πτητική οξύτητα (~ 0,35 g/L) σε σύγκριση με τα επιλεγμένα νέα στελέχη *Saccharomyces cerevisiae* 9 (~0,1 g/L) και *Saccharomyces cerevisiae* 13. Μάλιστα, το *Saccharomyces cerevisiae* 13 παρά την μικρή αύξηση της πτητικής οξύτητας στο μέσο της ζύμωσης, τελικά η διαφορά ήταν μηδενική. Η παρατηρούμενη αύξηση στην πτητική οξύτητα από τα δύο άλλα στελέχη πιθανότατα να οφείλεται στο μεταβολισμό του κιτρικού οξέος και όχι του μηλικού, αφού η συγκέντρωση του τελευταίου παρέμεινε σταθερή κατά την πορεία των ζυμώσεων χωρίς αύξηση του γαλακτικού οξέος. Η μεγαλύτερη τάση για παραγωγή πτητικής οξύτητας από το εμπορικό στέλεχος επιβεβαιώνεται και από αναλύσεις των πτητικών ενώσεων με την βοήθεια του SPME-GC-MS. Κατά την ανάλυση αυτή των δειγμάτων το εμπορικό στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae* Passion fruit παρουσίασε την μεγαλύτερη συγκέντρωση οξικού οξέος, ενώ το νέο επιλεγμένο στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae* 9 τη μικρότερη. Εντούτοις, τα δύο αυτά στελέχη χαρακτηρίζονται από συγκρίσιμο προφίλ ανώτερων αλκοολών. Μεγάλες διαφοροποιήσεις σε αυτή την κατηγορία πτητικών ενώσεων, σημειώθηκαν για το απομονωμένο στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae* 13, το οποίο κατάφερε να παράξει σχεδόν διπλάσιες ποσότητες σε σχέση με τα άλλα δυο στελέχη. Η μεγαλύτερη παραγωγή ανώτερων αλκοολών από το *Saccharomyces cerevisiae* 13, φαίνεται να έγινε «σε βάρος» των λιπαρών οξέων μέσης ανθρακικής αλυσίδας (MCFA) σε πρώτο επίπεδο και των εστέρων σε δεύτερο επίπεδο. Αυτό θα μπορούσε να έχει αρνητική επίδραση στο οργανοληπτικό προφίλ αφού τα MCFA μπορούν να δώσουν εστέρες κατά την παλαίωση μέσω όξινης εστεροποίησης που ευνοείται στο pH του οίνου. Παρ' όλα αυτά, το *Saccharomyces cerevisiae* 13, χαρακτηρίστηκε από υψηλότερες συγκεντρώσεις κετονών που δύνανται να προσδώσουν πιο ανθικό αρωματικό χαρακτήρα στο τελικό προϊόν. Επανεξετάζοντας τους εστέρες σαν ομάδα πτητικών ενώσεων που προσδίδουν πιο φρουτώδη χαρακτήρα στους οίνους, η παραγωγή τους φαίνεται να ευνοείται από την χαμηλότερη θρέψη (YAN). Επίσης, το εμπορικό στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae* Passion fruit και το επιλεγμένο στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae* 9, παρουσίασαν ξανά παρόμοιο προφίλ εστέρων. Όμως, μεγαλύτερες συγκεντρώσεις MCFA επιτεύχθηκαν μέσω του *Saccharomyces cerevisiae* 9, γεγονός που συγκλίνει στο συμπέρασμα ότι το συγκεκριμένο στέλεχος θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για ενίσχυση του φρουτώδη χαρακτήρα στους οίνους. Επιπροσθέτως, μελετήθηκε η ζυμωτική δράση 3 νέων στελεχών που απομονώθηκαν από αυθόρμητες ζυμώσεις. Μία αυθόρμητη ζύμωση χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας και αξιολογήθηκαν ως προς



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



ανάπτυξη - εργασία - αλληλεγγύη

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

τα ποιοτικά τους χαρακτηριστικά στην ποικιλία Ασύρτικο. Σε όλες τις περιπτώσεις εφαρμόστηκε το ίδιο πρωτόκολλο οινοποίησης. Διεξήχθησαν οκτώ μικροοινοποιήσεις, οι 3 με τα 3 απομονωμένα στελέχη ζυμομυκήτων σε δοχεία των 100,0 λίτρων και η αυθόρμητη σε δοχεία 700,0 λίτρων. Όλες οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν. Συγκεκριμένα τα στελέχη Sc9 και Sc13 έχουν απομονωθεί από την ποικιλία ασύρτικο στη Σαντορίνη ενώ το Y54 από την περιοχή της Νεμέας στην Πελοπόννησο και ανήκουν στην ιδιωτική συλλογή του εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των σακχάρων (γλυκόζη και φρουκτόζη) έγινε με υγρή χρωματογραφία. Η ζύμωση διήρκησε από 14-37 ημέρες με αύξουσα σειρά αποζύμωσης τα στελέχη Sc9, Y54, Sc13 και τελευταία η αυθόρμητη. Όλοι οι παραγόμενοι οίνοι περιείχαν λιγότερα από 4,0 g/L σακχάρων.

Η ζυμωτική ικανότητα τόσο των επιλεγμένων στελεχών όσο και εκείνων που παρευρίσκονταν στην αυθόρμητη ζύμωση ήταν ικανοποιητική καθώς παρότι η συγκέντρωση σακχάρων στο γλεύκος ήταν αρχικά 224,0 g/L, η τελική αλκοόλη έφτασε τα 13,1% vol. αποδεικνύοντας ότι η αλκοολική ζύμωση ολοκληρώθηκε σε ικανοποιητικό βαθμό. Όσον αφορά την κατανάλωση σακχάρων παρατηρήθηκαν διαφοροποιήσεις. Ο μεγαλύτερος ρυθμός κατανάλωσης των αναγόντων σακχάρων ήταν 23,21 g/L σακχάρων/ημέρα και προήλθε από το στέλεχος Sc9. Ακολούθησε το Y54 με 16,27 g/L σακχάρων/ημέρα, το στέλεχος Sc13 με 14,3 g/L σακχάρων/ημέρα. και τέλος η αυθόρμητη με 12,54 g/L σακχάρων/ημέρα. Διαφορές μεταξύ των ζυμώσεων υπήρξαν και στην προτίμηση κατανάλωσης σακχάρων. Όλα τα απομονωμένα στελέχη παρουσίασαν μεγαλύτερο συντελεστή κατανάλωσης της γλυκόζης σε σχέση με τη φρουκτόζη έστω και με μικρή διαφορά. Αυτό όμως δεν ίσχυσε στην περίπτωση της αυθόρμητης ζύμωσης όπου ο συντελεστής κατανάλωσης της γλυκόζης ήταν 4,92 g/L/ημέρα και αντίστοιχα της φρουκτόζης ήταν 7,52 g/L/ημέρα. Σημαντικό είναι επίσης να αναφερθεί ότι ο μεγαλύτερος συντελεστής κατανάλωσης της γλυκόζης προήλθε από το στέλεχος Sc9 με 15,96 g/L/ημέρα και ήταν τριπλάσιος από εκείνον της αυθόρμητης ζύμωσης. Ο συντελεστής κατανάλωσης της φρουκτόζης ήταν παρόμοιος σε όλες τις ζυμώσεις με μεγαλύτερο εκείνον του στελέχους Sc9. Ο συντελεστής μετατροπής αιθανόλης ανά μονάδα σακχάρου του στελέχους Sc13 ήταν 0,46 g/g, ακολούθησε η αυθόρμητη ζύμωση με 0,42 g/g, έπειτα το Y54 με 0,40 g/g και τέλος το στέλεχος Sc9 με 0,31 g/g. Η τελική συγκέντρωση αλκοόλης δεν παρουσίασε σημαντικές διαφορές. Αναλυτικότερα, το στέλεχος Sc13 είχε 95,84 g/L αιθανόλη (13,1% vol) ακολούθησε το Y54 με 89,38 g/L (12,8 % vol), έπειτα το στέλεχος Sc9 με 87,47 g/L (13,0% vol) και τέλος η αυθόρμητη ζύμωση με

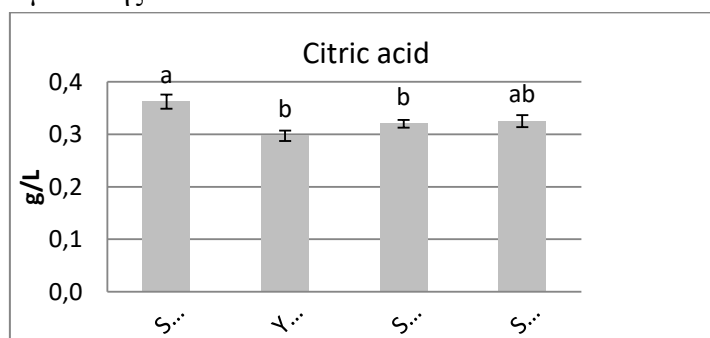


**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

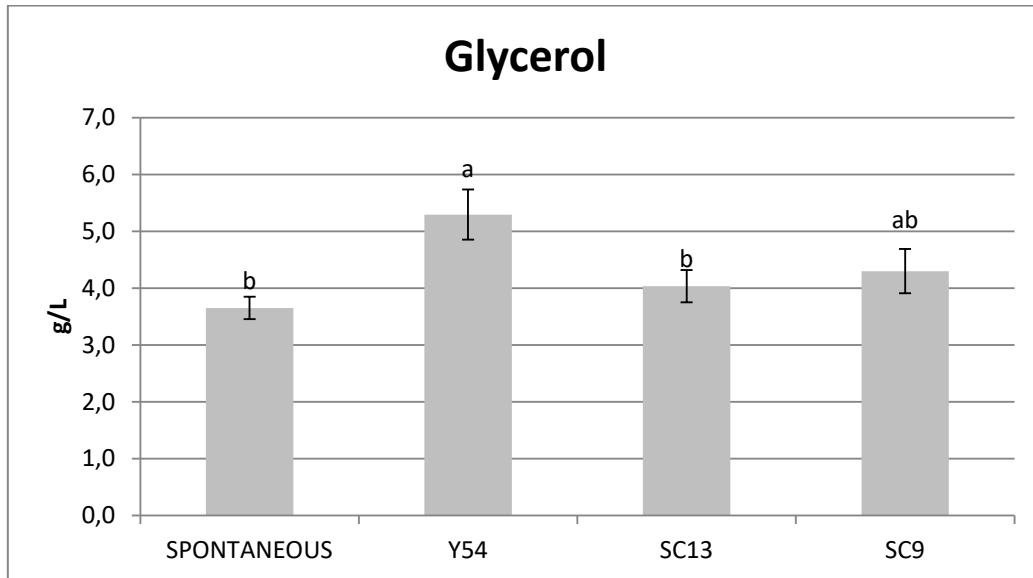
86,14 g/L (13,1 % vol). Αξίζει ωστόσο να σημειωθεί ότι παρότι οι ζυμώσεις όλων των στελεχών σημείωσαν παρόμοιο ποσοστό αλκοόλης υπήρξε μεγάλη διακύμανση στον ρυθμό παραγωγής. Πραγματοποιήθηκαν δύο οργανοληπτικοί έλεγχοι σε διαφορετικές χρονικές στιγμές, από εξειδικευμένο και μη πάνελ δοκιμαστών και με διαφορετικό τύπο ερωτήσεων, για την ποιοτική αξιολόγηση των παραγόμενων οίνων. Στην πρώτη δοκιμή ξεχώρισε το δείγμα από τη ζύμωση με το στέλεχος Sc13 ωστόσο στην επόμενη δοκιμή αν και στα περισσότερα κριτήρια όλα τα στελέχη που συμμετείχαν είχαν μικρές αποκλίσεις στις ποιοτικές παραμέτρους, ο παράγοντας της οξείδωσης επιδρά αρνητικά στην τελική αξιολόγηση του οίνου. Συνεπώς από όλα τα παραπάνω φαίνεται πως αν και το δείγμα με το στέλεχος Sc13 είχε αρχικά ποιοτικότερα χαρακτηριστικά, η εξέλιξή του στο χρόνο δεν ήταν ικανοποιητική σε αντίθεση με το στέλεχος Sc9 που ήταν εξίσου καλό ποιοτικά και με καλύτερη αντοχή στο χρόνο. Στη συνέχεια έγινε σύγκριση με στατιστική ανάλυση μεταξύ των διαφορετικών ζυμώσεων ως προς τις συγκεντρώσεις των ουσιών που μελετήθηκαν από τα αποτελέσματα της HPLC.



**Ραβδόγραμμα 1.** Τελικές συγκεντρώσεις κιτρικού οξέος ανά στέλεχος.

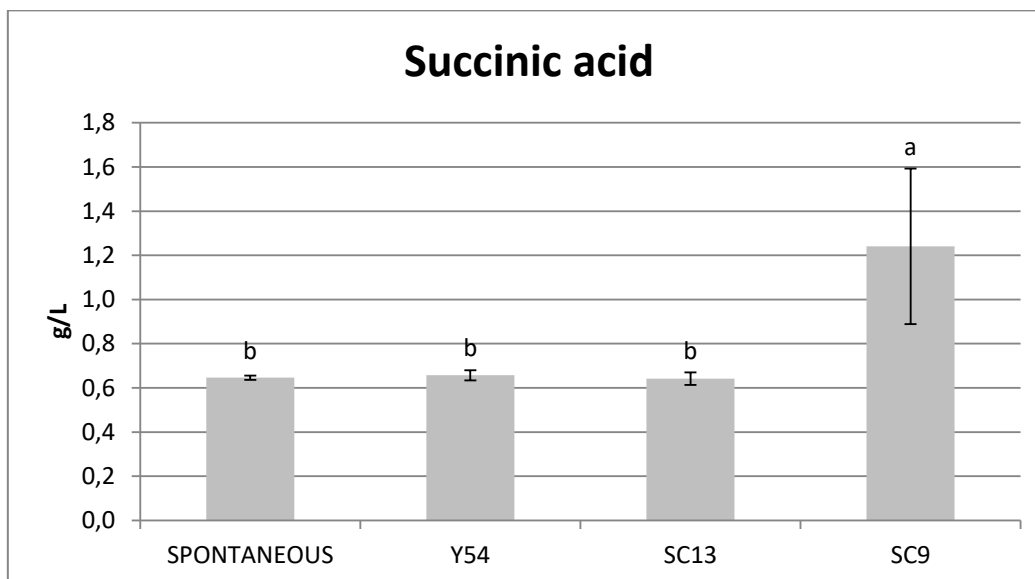
Σύμφωνα με το ραβδόγραμμα 1, στην αυθόρμητη ζύμωση η συγκέντρωση κιτρικού οξέος ήταν η μεγαλύτερη, ωστόσο η διαφορά ήταν στατιστικά σημαντική μόνο για τα στελέχη Y54 και Sc13.

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



Ραβδόγραμμα 2. Η τελική συγκέντρωση γλυκερόλης ανά στέλεχος.

Το στέλεχος με τη μεγαλύτερη παραγωγή γλυκερόλης (ραβδόγραμμα 2) ήταν το Y54 και ήταν το μόνο στέλεχος που διέφερε στατιστικά σημαντικά από την αυθόρμητη ζύμωση. Ωστόσο αυτή η τιμή δεν επαληθεύεται από την οργανοληπτική δοκιμή στη Σαντορίνη όπου και συμμετείχε καθώς το δείγμα ήταν αρκετά οξειδωμένο έτσι ώστε να αξιολογηθεί ορθά.



Ραβδόγραμμα 3. Η τελική συγκέντρωση ηλεκτρικού οξέος ανά στέλεχος.

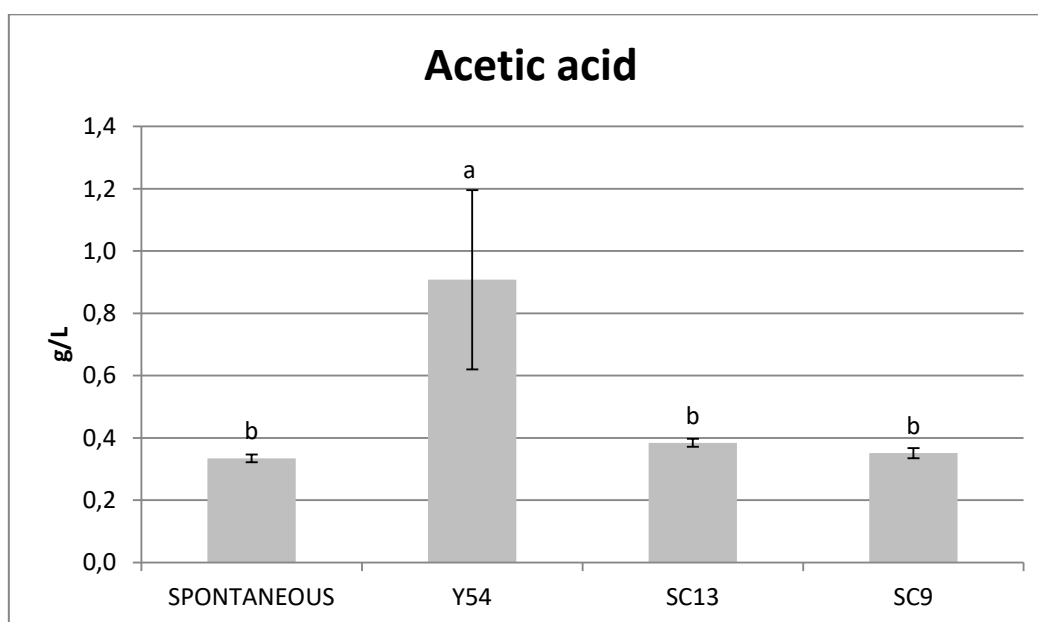


**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Η μεγαλύτερη παραγωγή ηλεκτρικού οξέος έγινε από το Sc9 και ήταν στατιστικά σημαντική από όλα τα υπόλοιπα στελέχη (ραβδόγραμμα 3).



**Ραβδόγραμμα 4.** Η τελική συγκέντρωση οξικού οξέος ανά στέλεχος.

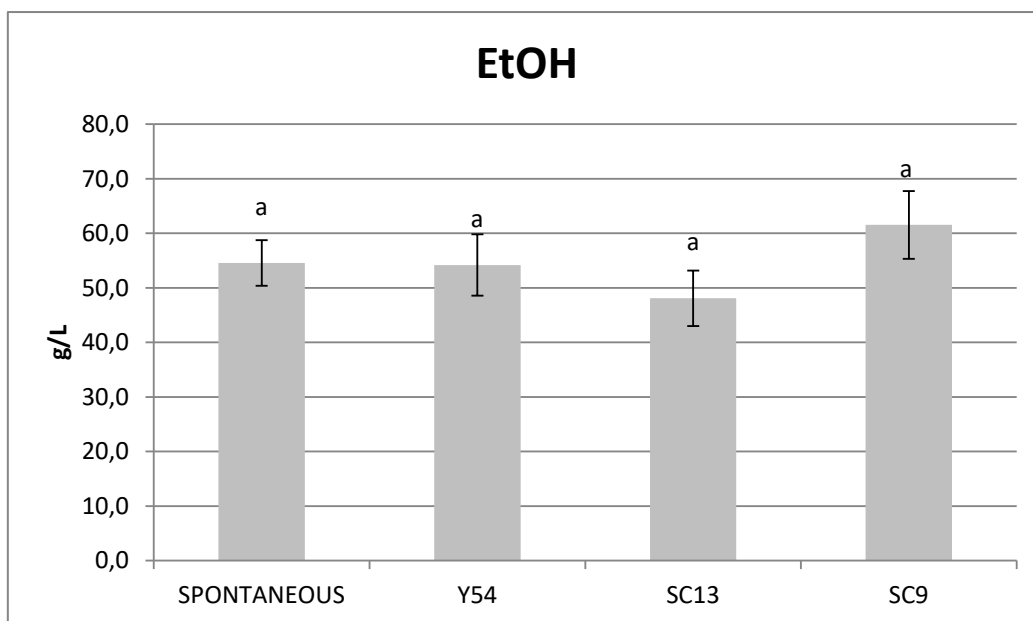
Στο ραβδόγραμμα 4 παρατηρούμε ότι το Y54 παράγαγε τη μεγαλύτερη ποσότητα οξικού οξέος με στατιστικά σημαντική διαφορά, σε σχεδόν μη αποδεκτά όρια ενώ τα υπόλοιπα στελέχη έμειναν εντός επιτρεπτών ορίων. Μέσω της οργανοληπτικής δοκιμής στη Σαντορίνη ενισχύεται η τιμή μέτρησης του οξικού οξέος καθώς το δείγμα συγκέντρωσε τη χαμηλότερη βαθμολογία στην παράμετρο καθαρότητα αρώματος, ωστόσο στην ένταση αρώματος συγκέντρωσε παρόμοια βαθμολογία με τα υπόλοιπα στελέχη. Αυτό αποτέλεσε και την αιτία αποκλεισμού του από την επόμενη οργανοληπτική δοκιμή που διεξήχθη στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.



**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



Ραβδόγραμμα 5. Η συγκέντρωση αιθανόλης ανά στέλεχος.

Όλοι οι παραγόμενοι οίνοι είχαν ολικό αλκοολικό τίτλο ανώτερο του 13,0% (ραβδόγραμμα 5), χωρίς κανένα στέλεχος να διαφέρει στατιστικά σημαντικά ως προς την τελική παραγωγή αιθανόλης.

#### Δράση 4.2: Οργανοληπτικός έλεγχος, γευσιγνωσία.

Μετά το τέλος των ζυμώσεων της Δράσης 4.1 και τις διεργασίες τρυγικής και πρωτεϊνικής σταθεροποίησης ακολούθησε οργανοληπτικός έλεγχος των παραγόμενων οίνων. Για τη συγκεκριμένη εξέταση χρησιμοποιήθηκε η τεχνική Pinot, όπου τα δείγματα αξιολογούνται με βάση το μάρτυρα. Ένα πάνελ αποτελούμενο από 12 εκπαιδευμένους γευσιγνώστες, κλήθηκε να αξιολογήσει τα κρασιά που παράχθηκαν χρησιμοποιώντας τα επιλεγμένα στελέχη *Saccharomyces cerevisiae* 9 και *Saccharomyces cerevisiae* 13 σε σύγκριση με τα κρασιά που παράχθηκαν με τη βοήθεια του εμπορικού στελέχους *Saccharomyces cerevisiae* Passion fruit. Η σύγκριση έγινε ως προς το χρώμα, την γενική αίσθηση αρώματος αλλά και πιο συγκεκριμένα τα άνθη, τα φρούτα, την αναγωγική, την οξειδωμένη και την οσμή ξυδιού, και τέλος την οξύτητα και τη λιπαρότητα (σώμα). Τα αποτελέσματα της οργανοληπτικής εξέτασης δεν έδειξαν ιδιαίτερες διαφορές όσο αφορά την ένταση χρώματος. Ωστόσο διαφορές παρουσιάστηκαν στα αρωματικά χαρακτηριστικά. Τα



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



ανάπτυξη - εργασία - αλληλεγγύη

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

επιλεγμένα στελέχη *Saccharomyces cerevisiae* 9 και *Saccharomyces cerevisiae* 13, παρουσίασαν όχι μόνο καλύτερη γενική αίσθηση αρώματος αλλά βαθμολογήθηκαν καλύτερα ως προς τον ανθικό και φρουτώδη χαρακτήρα τους σε σχέση με το μάρτυρα. Αυτά τα αποτελέσματα βρίσκονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα από την ανάλυση των πτητικών ενώσεων μέσω SPME-GC-MS, κατά την οποία σημειώθηκαν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ανώτερων αλκοολών και κετονών που συνεισφέρουν στον ανθικό χαρακτήρα και λιπαρών οξέων μέσης ανθρακικής αλυσίδας (MCFA) που εν δυνάμει συνεισφέρουν στο φρουτώδη χαρακτήρα. Το πάνελ, έκρινε επίσης χειρότερα τα κρασιά που παράχθηκαν με τη βοήθεια του εμπορικού στελέχους *Saccharomyces cerevisiae* PF ως προς τα οσφρητικά χαρακτηριστικά, και συγκεκριμένα ως προς το βαθμό οξείδωσης τους και την οσμή ξυδιού. Αυτό μπορεί να παραλληλιστεί τόσο με τα αποτελέσματα της πτητικής οξύτητας, η αύξηση της οποίας ήταν μεγαλύτερη για τα δείγματα που παράχθηκαν με το εμπορικό στέλεχος, όσο και με τα αποτελέσματα του GC-MS/SPME για το οξικό οξύ που παρουσίασε παρόμοια τάση. Εν τούτοις, αυτά τα κρασιά χαρακτηρίστηκαν από καλύτερη “λιπαρότητα-σώμα”. Αυτό θα μπορούσε ίσως να δικαιολογηθεί μέσω της μεγαλύτερης συγκέντρωσης υπολειπόμενων ζαχάρων σε αυτά τα δείγματα, που συνεισφέρουν θετικά στην αίσθηση στόματος και στο σώμα. Τέλος, οι οίνοι που παράχθηκαν με τη βοήθεια των επιλεγμένων στελεχών, κρίθηκαν καλύτερα ως προς την οξύτητα η οποία προσδίδει φρεσκάδα στους οίνους και αποτελεί ένα από τα βασικότερα χαρακτηριστικά των οίνων που παράγονται από τη ποικιλία Ασύρτικο. Τα αποτελέσματα από την οργανοληπτική αξιολόγηση, βρίσκονται σε αρκετά σημεία σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των φυσικοχημικών αναλύσεων των δειγμάτων. Όπως και στα αποτελέσματα της πτητικής οξύτητας, αλλά και των εστέρων οξείδωσης, τα δείγματα που προέκυψαν από το στέλεχος Sc24, βαθμολογήθηκαν υψηλότερα ως προς τον παράγοντα οξείδωσης (oxidation) και τις χαμηλότερες βαθμολογίες και για το άρωμα λευκών λουλουδιών, τροπικών και πυρηνόκαρπων φρούτων, και εσπεριδοειδών. τα δείγματα που προέκυψαν από το *non-Saccharomyces* (N.i.) στέλεχος, χαρακτηρίστηκαν από τις υψηλότερες τιμές πυρηνόκαρπων φρούτων, και τις δεύτερες υψηλότερες τιμές τροπικών φρούτων. Αν και το στέλεχος Sc13 αξιολογήθηκε χαμηλότερα ως προς αυτούς τους περιγραφικούς όρους, χαρακτηρίστηκε ως το πιο «λουλουδάτο». Παραδόξως, αν και τα δείγματα που



**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

πρόεκυψαν από το στέλεχος Sc9, σημείωσαν γενικά τις χαμηλότερες τιμές πτητικών ενώσεων, μάλλον οι μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις και ισορροπία, οδήγησε τους δοκιμαστές να το αξιολογήσουν υψηλότερα ως προς τη γενική ποιότητα του αρώματος, με πιο έντονο το «φρουτώδη» χαρακτήρα. Επίσης, σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της γλυκερόλης που επηρεάζει άμεσα την αίσθηση στόματος (mouthfeel) και το σώμα των οίνων, τα δείγματα που προέκυψαν μετά από εμβολιασμό με το στέλεχος Sc13, κατατάχθηκαν πρώτα ως προς αυτό το χαρακτηριστικό.

Τα δείγματα Μαυροτράγανου αξιολογήθηκαν ίσα ως προς την ένταση χρώματος. Διαφοροποιήσεις προέκυψαν κατά την οσφρητική τους αξιολόγηση κατά την οποία τα δείγματα με το στέλεχος Sc9, κυριάρχησαν στην ένταση του βύσσινου (sour cheery), των κόκκινων φρούτων και στην γενική εκτίμηση του αρώματος, ανεξάρτητα από τη χαμηλότερη βαθμολογία μαύρων φρούτων. Τα δείγματα Sc24, παρά την υψηλή βαθμολογία στην ένταση λουλουδιών, και τα N.i δείγματα ανεξάρτητα από την μεγάλη ένταση μαύρων φρούτων, αξιολογήθηκαν χαμηλότερα στη γενική εκτίμηση του αρώματος, μάλλον λόγω της μεγάλης έντασης της οξείδωσης. Το στέλεχος Ni, αξιολογήθηκε ως το καλύτερο ως προς το σώμα των οίνων, ακολουθούμενο όπως ήταν φυσικό από το Sc9, Sc13 και τέλος το Sc24. Παρά την θετική εντύπωση ως προς το σώμα των οίνων όμως, το στέλεχος Ni, αξιολογήθηκε ως το λιγότερο προτιμητέο, εν αντιθέσει με τα Sc9 και Sc13, που βαθμολογήθηκαν υψηλότερα ως προς την γενική εκτίμηση.

Η Οργανοληπτική αξιολόγηση έγινε για όλους τους οίνους με περιγραφικά τεστ αξιολόγησης. Η πρώτη αξιολόγηση για όλα τα δείγματα έγινε από πάνελ 27 ατόμων που αποτελούνταν κυρίως από μεταπτυχιακούς φοιτητές Οινολογίας καθώς και καθηγητές και εργαζόμενους στη βιομηχανία του οίνου στη Σαντορίνη.

Ο στόχος του του 1ου οργανοληπτικού ελέγχου ήταν να διερευνηθούν διαφορές ανάμεσα στους οίνους Ασύρτικου των τεσσάρων γηγενών στελεχών *Saccharomyces cerevisiae*.



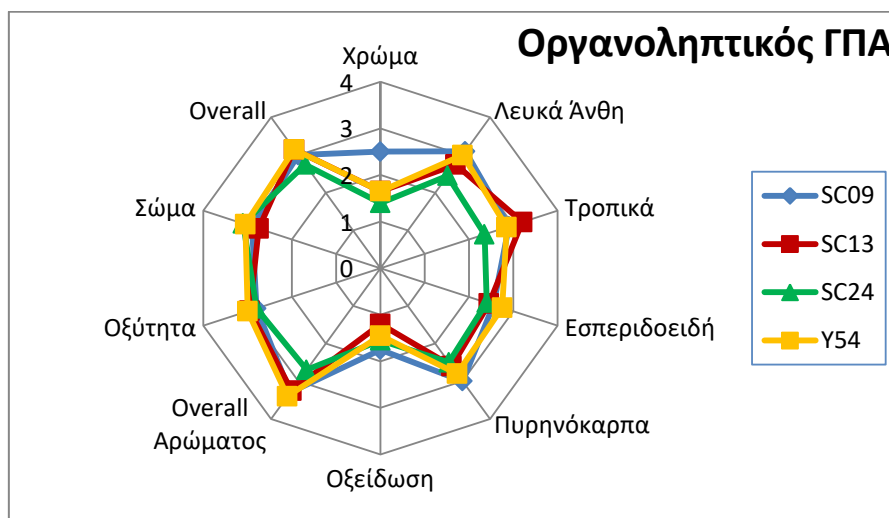


Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

ΕΠΑνΕΚ 2014-2020  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



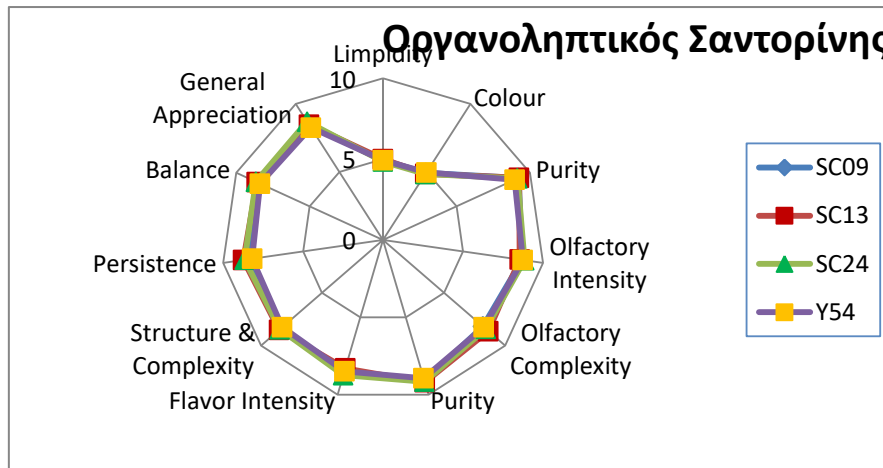
Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



Αραχνόγραμμα 1. Αποτελέσματα οργανοληπτικού ελέγχου ΓΠΑ.

Όπως φαίνεται στο αραχνόγραμμα 1, οι δοκιμαστές αξιολόγησαν τις διαφορές των οίνων σε 10 διαφορετικές παραμέτρους. Η μοναδική στατιστικά σημαντική διαφορά που παρατηρήθηκε ήταν στο χρώμα του Sc9 το οποίο κρίθηκε πιο κίτρινο, παράμετρος που συνδέεται με το γεγονός ότι ο οίνος από το συγκεκριμένο στέλεχος έδειξε κάπως μεγαλύτερο οξειδωτικό χαρακτήρα σε σύγκριση με τα υπόλοιπα στελέχη. Παρόλο που δεν βρέθηκαν λοιπές στατιστικά σημαντικές διαφορές, παρατηρήθηκε χαμηλότερη έκφραση οξύτητας στον οίνο του Sc24, η οποία παρότι δεν επιβεβαιώνεται από τις μετρήσεις της ολικής οξύτητας, εν τούτοις, μπορεί να αποδοθεί στην υψηλότερη συγκέντρωση σακχάρων του συγκεκριμένου οίνου η παρουσία των οποίων επηρεάζει την αντίληψη της οξύτητας. Σχετικά με το αρωματικό προφίλ των οίνων, παρατηρήθηκε για το στέλεχος Sc13 μεγαλύτερη έκφραση τροπικού χαρακτήρα, ενώ για το Y54 αντίστοιχα, εσπεριδοειδών αρωμάτων. Συνολικά το Y54 σκόραρε ελαφρώς καλύτερα από τα άλλα στελέχη τόσο στις επιμέρους κατηγορίες αλλά και συνολικά, εκφράζοντας καλύτερα και την αρωματική τυπικότητα του Ασύρτικου ως ποικιλία, με τα αρώματα εσπεριδοειδών (ΥΠΑΑΤ, 2007). Σκοπός της διενέργειας του συγκεκριμένου οργανοληπτικού ελέγχου ήταν να αξιολογηθούν εμπορικά οι οίνοι ασύρτικου των τεσσάρων γηγενών στελεχών *Saccharomyces cerevisiae*.

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



Αραχνόγραμμα 2. Αποτελέσματα οργανοληπτικού ελέγχου Σαντορίνης.

Αρχικά, όπως φαίνεται στο αραχνόγραμμα 2 όλοι οι οίνοι αξιολογήθηκαν πολύ κοντά στις 11 διαφορετικές παραμέτρους, χωρίς να παρατηρηθούν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Εντούτοις, οι τέσσερις οίνοι βρέθηκαν να καταγράφουν πολύ ικανοποιητική βαθμολογία, σε επίπεδα άνω του 85%, που σύμφωνα με την κλίμακα απονομής βραβείων του IOV (2021) αντιστοιχεί σε μετάλλιο. Το γεγονός αυτό αναδεικνύει τη δυναμική και των τεσσάρων γηγενών στελεχών στην παραγωγή οίνων υψηλής ποιότητας. Ακολουθεί πίνακας με τις μέσες τιμές βαθμολογίας των οίνων.

Πίνακας 1. Μέσες τιμές βαθμολογίας των οίνων, με την τυπική τους απόκλιση.

Στέλεχος	Μέσος όρος βαθμολογίας
Sc9	87,59 ± 0,82
Sc13	88,11 ± 0,60
Sc24	88,22 ± 1,03
Y54	86,33 ± 0,89

Έγινε επιπλέον αξιολόγηση στο εργαστήριο Οινολογίας και αλκοολούχων ποτών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Οι οίνοι είναι διαυγείς ωστόσο υπάρχουν διαφορές κυρίως στο αρωματικό προφίλ από την πρώτη δοκιμή. Παρακάτω αναφέρονται τα αποτελέσματα των ερωτηματολογίων που προέκυψαν μέσω του Tuckey's test αντίστοιχα από κάθε δοκιμή. Από τον οργανοληπτικό στη Σαντορίνη. 1η Ερώτηση: Διαύγεια Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA, τα δείγματα μεταξύ τους, δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική διαφορά. Οι μέσοι όροι κυμαίνονταν περίπου στο ίδιο επίπεδο. Αποτελέσματα πρώτης ερώτησης που αφορούσε στη διαύγεια.



**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

A/A	Δείγμα	M.T ± T.A	
1	Αυθόρμητη ζύμωση	4,7 ± 0,14	a
2	<i>S. cerevisiae</i> Y54	2 4,85 ± 0,10	a
3	<i>S. cerevisiae</i> Sc9	3 5,0 ± 0,00	a
4	<i>S. cerevisiae</i> Sc13	4,93 ± 0,07	a

Όπου, Μ.Τ: μέση τιμή, Τ.Α: τυπική απόκλιση, a, b: υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's p value <0,05).

2η Ερώτηση: Απόχρωση- χρώμα Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA, τα δείγματα μεταξύ τους, δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική διαφορά. Οι μέσοι όροι κυμαίνονταν περίπου στο ίδιο επίπεδο.

Αποτελέσματα δεύτερης ερώτησης που αφορούσε στην απόχρωση - χρώμα.

A/A	Δείγμα	M.T ± T.A	
1	Αυθόρμητη ζύμωση	4,59 ± 0,17	a
2	<i>S. cerevisiae</i> Y54	4,78 ± 0,15	a
3	<i>S. cerevisiae</i> Sc9	4,67 ± 0,14	a
4	<i>S. cerevisiae</i> Sc13	4,96 ± 0,04	a

Όπου, Μ.Τ: μέση τιμή, Τ.Α: τυπική απόκλιση, a, b: υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's p value <0,05).

3η Ερώτηση: Καθαρότητα αρώματος

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA, τα δείγματα μεταξύ τους, παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά. Οι μέσοι όροι του Sc9 και του Sc13 κυμαίνονταν περίπου στο ίδιο επίπεδο, ενώ η αυθόρμητη ζύμωση και το Y54 διέφεραν στατιστικά σημαντικά από τα παραπάνω. Πιο συγκεκριμένα το Y54 αλλά και σε μικρότερο βαθμό η αυθόρμητη ζύμωση είχαν εμφανίσει τριτογενή και οξειδωτικά αρώματα σε τέτοιο βαθμό που κάλυπτε τον ποικιλιακό τους χαρακτήρα



**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Αποτελέσματα τρίτης ερώτησης που αφορούσε στην καθαρότητα αρώματος.

A/A	Δείγμα	M.T ± T.A	
1	Αυθόρμητη ζύμωση	7,93 ± 0,21	b
2	<i>S. cerevisiae</i> Y54	6,52 ± 0,17	c
3	<i>S. cerevisiae</i> Sc9	8,81 ± 0,19	a
4	<i>S. cerevisiae</i> Sc13	8,74 ± 0,19	a

Όπου, Μ.Τ: μέση τιμή, Τ.Α: τυπική απόκλιση, a, b,c : υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's p value <0,05).

4η Ερώτηση: Ένταση αρώματος

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA, τα δείγματα Sc9 και Sc13 καθώς και τα Y54 με την αυθόρμητη ζύμωση μεταξύ τους, δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική διαφορά. Ωστόσο οι μέσοι όροι των Sc9 και Sc13 διέφεραν από αυτούς του Y54 και της αυθόρμητης. Συνεπώς στην ένταση του αρώματος φαίνεται να υπερτερεί το Sc13.

Αποτελέσματα τέταρτης ερώτησης που αφορούσε στην ένταση αρώματος.

A/A	Δείγμα	M.T ± T.A	
1	Αυθόρμητη ζύμωση	7,74 ± 0,15	b
2	<i>S. cerevisiae</i> Y54	7,59 ± 0,23	b
3	<i>S. cerevisiae</i> Sc9	8,41 ± 0,14	a
4	<i>S. cerevisiae</i> Sc13	8,78 ± 0,11	a

Όπου, Μ.Τ: μέση τιμή, Τ.Α: τυπική απόκλιση, a, b: υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's p value <0,05).



**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

5η Ερώτηση: Πολυπλοκότητα αρώματος

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA, τα δείγματα Sc9 και Sc13 μεταξύ τους, δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική διαφορά αλλά διέφεραν ως προς την αυθόρμητη ζύμωση και το Y54.

Αποτελέσματα πέμπτης ερώτησης που αφορούσε στην πολυπλοκότητα του αρώματος.

A/A	Δείγμα	M.T ± T.A	
1	Αυθόρμητη ζύμωση	7,59 ± 0,15	c
2	<i>S. cerevisiae</i> Y54	6,56 ± 0,12	b
3	<i>S. cerevisiae</i> Sc9	8,11 ± 0,11	a
4	<i>S. cerevisiae</i> Sc13	8,33 ± 0,15	a

Όπου, M.T: μέση τιμή, T.A: τυπική απόκλιση, a, b, c: υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's p value <0,05).

6η Ερώτηση: Καθαρότητα γεύσης

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA, τα δείγματα Sc9, Sc13 και η αυθόρμητη μεταξύ τους, δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική διαφορά αλλά διέφεραν από το Y54 το οποίο είχε υποστεί οξείδωση υπερκαλύπτοντας οποιοδήποτε άλλο άρωμα.

Αποτελέσματα έκτης ερώτησης που αφορούσε στην καθαρότητα γεύσης.

A/A	Δείγμα	M.T ± T.A	
1	Αυθόρμητη ζύμωση	8,19 ± 0,23	a
2	<i>S. cerevisiae</i> Y54	6,52 ± 0,17	b
3	<i>S. cerevisiae</i> Sc9	8,74 ± 0,2	a
4	<i>S. cerevisiae</i> Sc13	8,82 ± 0,17	a

Όπου, M.T: μέση τιμή, T.A: τυπική απόκλιση, a, b: υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's p value <0,05).



**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

#### 7η Ερώτηση: Ένταση γεύσης

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA, τα δείγματα της αυθόρμητης ζύμωσης με του Sc9 και του Sc9 με το Sc13 μεταξύ τους, δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική διαφορά. Ωστόσο όλα τα παραπάνω διαφέρουν από το Y54.

Αποτελέσματα έβδομης ερώτησης που αφορούσε στην ένταση της γεύσης.

A/A	Δείγμα	M.T ± T.A	
1	Αυθόρμητη ζύμωση	7,89 ± 0,22	b
2	<i>S. cerevisiae</i> Y54	6,82 ± 0,2	c
3	<i>S. cerevisiae</i> Sc9	8,22 ± 0,16	ab
4	<i>S. cerevisiae</i> Sc13	8,7 ± 0,18	a

Όπου, M.T: μέση τιμή, T.A: τυπική απόκλιση, a, b, c: υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's p value <0,05).

#### 8η Ερώτηση: Δομή- πολυπλοκότητα

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA, τα δείγματα της αυθόρμητης ζύμωσης, του Sc9 και του Sc13 μεταξύ τους, δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική διαφορά, ενώ όλα διαφέρουν ως προς το Y54.

Αποτελέσματα όγδοης ερώτησης που αφορούσε στην δομή και πολυπλοκότητα.

A/A	Δείγμα	M.T ± T.A	
1	Αυθόρμητη ζύμωση	7,67 ± 0,19	a
2	<i>S. cerevisiae</i> Y54	6,44 ± 0,13	b
3	<i>S. cerevisiae</i> Sc9	8,19 ± 0,18	a
4	<i>S. cerevisiae</i> Sc13	8,22 ± 0,18	a

Όπου, M.T: μέση τιμή, T.A: τυπική απόκλιση, a, b: υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's p value <0,05).



**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

#### 9η Ερώτηση: Επίγευση

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA, τα δείγματα Sc9 και Sc13 καθώς και η αυθόρμητη με το Sc9 μεταξύ τους, δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική διαφορά αλλά διαφέρουν από το Y54.

Αποτελέσματα ένατης ερώτησης που αφορούσε στην επίγευση.

A/A	Δείγμα	M.T ± T.A	
1	Αυθόρμητη ζύμωση	7,7 ± 0,19	b
2	<i>S. cerevisiae</i> Y54	6,7 ± 0,18	c
3	<i>S. cerevisiae</i> Sc9	8,07 ± 0,16	ab
4	<i>S. cerevisiae</i> Sc13	8,33 ± 0,14	a

Όπου, M.T: μέση τιμή, T.A: τυπική απόκλιση, a, b, c: υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's p value <0,05).

#### 10η Ερώτηση: Ισορροπία

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA, τα δείγματα Sc9 και Sc13 καθώς και η αυθόρμητη με το Sc9 μεταξύ τους, δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική διαφορά αλλά διαφέρουν από το Y54.

Αποτελέσματα δέκατης ερώτησης που αφορούσε στην ισορροπία.

A/A	Δείγμα	M.T ± T.A	
1	Αυθόρμητη ζύμωση	7,67 ± 0,18	b
	<i>S. cerevisiae</i> Y54		
2		6,33 ± 0,11	c
3	<i>S. cerevisiae</i> Sc9	8,11 ± 0,17	ab
4	<i>S. cerevisiae</i> Sc13	8,33 ± 0,13	a

Όπου, M.T: μέση τιμή, T.A: τυπική απόκλιση, a, b, c: υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's p value <0,05).



**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

11η Ερώτηση: Συνολική εκτίμηση ποιότητας

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA, τα δείγματα Sc9 και Sc13 καθώς και η αυθόρμητη με το Sc9 μεταξύ τους, δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική διαφορά αλλά διαφέρουν από το Y54.

Αποτελέσματα ενδέκατης ερώτησης που αφορούσε στη συνολική εκτίμηση ποιότητας.

A/A	Δείγμα	M.T ± T.A	
1	Αυθόρμητη ζύμωση	7,63 ± 0,17	b
2	<i>S. cerevisiae</i> Y54	6,33 ± 0,09	c
3	<i>S. cerevisiae</i> Sc9	8,15 ± 0,15	ab
4	<i>S. cerevisiae</i> Sc13	8,33 ± 0,14	a

Όπου, M.T: μέση τιμή, T.A: τυπική απόκλιση, a, b, c: υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's p value <0,05).

12η Ερώτηση: Συνολική βαθμολογία

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA, τα δείγματα Sc9 και Sc13 μεταξύ τους, δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική διαφορά και οι μέσοι όροι κυμαίνονταν περίπου στο ίδιο επίπεδο, αλλά διέφεραν ως προς την αυθόρμητη ζύμωση και το Y54.

Αποτελέσματα δωδέκατης ερώτησης που αφορούσε στη συνολική βαθμολογία.

A/A	Δείγμα	M.T ± T.A	
1	Αυθόρμητη ζύμωση	79.3 ± 1,57	b
2	<i>S. cerevisiae</i> Y54	69.44 ± 1.15	c
3	<i>S. cerevisiae</i> Sc9	84.41 ± 1.22	a
4	<i>S. cerevisiae</i> Sc13	86.56 ± 0,93	a

Όπου, M.T: μέση τιμή, T.A: τυπική απόκλιση, a, b, c: υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's p value <0,05).





**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Συμπερασματικά οι διαφορές που διαπιστώθηκαν είχαν να κάνουν με την καθαρότητα, την ένταση και την πολυπλοκότητα του αρώματος, όπως και με την καθαρότητα και την ένταση γεύσης, την δομή και πολυπλοκότητα, την ισορροπία, την επίγευση και τη συνολική εκτίμηση. Το στέλεχος *S. cerevisiae* Y54 συγκέντρωσε τις χαμηλότερες βαθμολογίες σε όλα τα παραπάνω με στατιστικά σημαντική διαφορά και χαρακτηρίστηκε οξειδωμένο τόσο στα αρώματα όσο και στη γεύση. Αντιθέτως, το στέλεχος Sc13, τόσο ως προς τη συνολική εκτίμηση ποιότητας αλλά και την τελική βαθμολογία που συγκέντρωσε, όσο και από όλα τα παραπάνω, φαίνεται να υπερτερεί έναντι της αυθόρμητης και του *S. cerevisiae* Y54. Ωστόσο αν και είχε τη μεγαλύτερη βαθμολογία η οποία αντιστοιχούσε και σε μέταλλιο (>85,0%) δεν διέφερε στατιστικά σημαντικά από το Sc9.

#### **Οργανοληπτικός στο εργαστήριο Οινολογίας και αλκοολούχων ποτών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.**

Εν συνεχεία, παρουσιάζεται ο μέσος όρος της βαθμολογίας του συνόλου των χαρακτηριστικών των οίνων, από το σύνολο των δοκιμαστών. Αρχικά το κάθε δείγμα βαθμολογήθηκε για κάθε ένα από τα χαρακτηριστικά του από 8 αξιολογητές αντίστοιχα. Η δοκιμασία των δειγμάτων έγινε εις τριπλούν από κάθε δοκιμαστή.

Στα αποτελέσματα των αναλύσεων, αναγράφεται η τυπική απόκλιση των τριών επαναλήψεων ως  $\pm$  του μέσου όρου αυτών. Με τα γράμματα a, b χαρακτηρίζεται η στατιστική διαφορά των δειγμάτων (σε επίπεδο 0,05%), ενώ δείγματα με ίδιο γράμμα δεν παρουσιάζουν σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ τους.

#### **1η Ερώτηση: Απόχρωση**

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA, τα δείγματα Sc9 και η αυθόρμητη όπως και η αυθόρμητη με το Sc13 μεταξύ τους, δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική διαφορά και οι μέσοι όροι κυμαίνονταν περίπου στο ίδιο επίπεδο, ενώ το Sc9 με το Sc13 διαφέρουν στατιστικά σημαντικά.



**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Αποτελέσματα πρώτης ερώτησης που αφορούσε στην απόχρωση.

A/A	Δείγμα	M.T ± T.A	
1	Αυθόρμητη ζύμωση	2.31 ± 0.20	ab
2	<i>S. cerevisiae</i> Sc9	1.94 ± 0.06	b
3	<i>S. cerevisiae</i> Sc13	2.69 ± 0,15	a

Όπου, M.T: μέση τιμή, T.A: τυπική απόκλιση, a, b: υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's p value <0,05).

2η Ερώτηση: Ένταση αρώματος

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA, τα δείγματα μεταξύ τους, δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική διαφορά. Οι μέσοι όροι κυμαίνονταν περίπου στο ίδιο επίπεδο.

Αποτελέσματα δεύτερης ερώτησης που αφορούσε στην ένταση αρώματος.

A/A	Δείγμα	M.T ± T.A	
1	Αυθόρμητη ζύμωση	3.44 ± 0.18	a
2	<i>S. cerevisiae</i> Sc9	3.00 ± 0.18	a
3	<i>S. cerevisiae</i> Sc13	3.19 ± 0,16	a

Όπου, M.T: μέση τιμή, T.A: τυπική απόκλιση, a, b: υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's p value <0,05).

3η Ερώτηση: Λευκά άνθη

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA, τα δείγματα μεταξύ τους, δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική διαφορά. Οι μέσοι όροι κυμαίνονταν περίπου στο ίδιο επίπεδο.



**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Αποτελέσματα τρίτης ερώτησης που αφορούσε στα αρώματα λευκών άνθεων.

A/A	Δείγμα	M.T ± T.A	
1	Αυθόρμητη ζύμωση	2.81 ± 0.34	a
2	<i>S. cerevisiae</i> Sc9	2.69 ± 0.27	a
3	<i>S. cerevisiae</i> Sc13	2.31 ± 0,24	a

Όπου, Μ.Τ: μέση τιμή, Τ.Α: τυπική απόκλιση, a, b: υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's p value <0,05).

4η Ερώτηση: Τροπικά φρούτα

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA, τα δείγματα μεταξύ τους, δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική διαφορά. Οι μέσοι όροι κυμαίνονταν περίπου στο ίδιο επίπεδο.

Αποτελέσματα τέταρτης ερώτησης που αφορούσε στα αρώματα τροπικών φρούτων.

A/A	Δείγμα	M.T ± T.A	
1	Αυθόρμητη ζύμωση	2.06 ± 0.21	a
2	<i>S. cerevisiae</i> Sc9	2.38 ± 0.27	a
3	<i>S. cerevisiae</i> Sc13	2.56 ± 0,26	a

Όπου, Μ.Τ: μέση τιμή, Τ.Α: τυπική απόκλιση, a, b: υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's p value <0,05).

5η Ερώτηση: Εσπεριδοειδή

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA, τα δείγματα μεταξύ τους, δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική διαφορά. Οι μέσοι όροι κυμαίνονταν περίπου στο ίδιο επίπεδο.



**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Αποτελέσματα πέμπτης ερώτησης που αφορούσε στα αρώματα εσπεριδοειδών.

A/A	Δείγμα	M.T ± T.A	
1	Αυθόρμητη ζύμωση	2.38 ± 0.22	a
3	<i>S. cerevisiae</i> Sc9	2.44 ± 0.18	a
4	<i>S. cerevisiae</i> Sc13	2.31 ± 0,15	a

Όπου, M.T: μέση τιμή, T.A: τυπική απόκλιση, a, b: υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's p value <0,05).

6η Ερώτηση: Πυρηνόκαρπα

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA, τα δείγματα μεταξύ τους, δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική διαφορά. Οι μέσοι όροι κυμαίνονταν περίπου στο ίδιο επίπεδο.

Αποτελέσματα έκτης ερώτησης που αφορούσε στα αρώματα πυρηνόκαρπων.

A/A	Δείγμα	M.T ± T.A	
1	Αυθόρμητη ζύμωση	2.19 ± 0.23	a
2	<i>S. cerevisiae</i> Sc9	2.56 ± 0.35	a
3	<i>S. cerevisiae</i> Sc13	2.25 ± 0,25	a

Όπου, M.T: μέση τιμή, T.A: τυπική απόκλιση, a, b: υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's p value <0,05).

7η Ερώτηση: Βοτανικά αρώματα

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA, τα δείγματα μεταξύ τους, δεν παρουσίαζαν



**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

στατιστικά σημαντική διαφορά. Οι μέσοι όροι κυμαίνονταν περίπου στο ίδιο επίπεδο.

Αποτελέσματα έβδομης ερώτησης που αφορούσε στα βοτανικά αρώματα.

A/A	Δείγμα	M.T ± T.A	
1	Αυθόρμητη ζύμωση	1.94 ± 0.19	a
2	<i>S. cerevisiae</i> Sc9	2.13 ± 0.22	a
3	<i>S. cerevisiae</i> Sc13	1.63 ± 0,20	a

Όπου, Μ.Τ: μέση τιμή, Τ.Α: τυπική απόκλιση, a, b: υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's p value <0,05).

8η Ερώτηση: Οξείδωση

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA, τα δείγματα της αυθόρμητης ζύμωσης με το Sc9 μεταξύ τους, παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική διαφορά. Αντιθέτως, η αυθόρμητη με το Sc13 και το Sc9 με το Sc13 δεν παρουσίασαν διαφορές και οι μέσοι όροι κυμαίνονταν περίπου στο ίδιο επίπεδο.

Αποτελέσματα όγδοης ερώτησης που αφορούσε σε αρώματα οξείδωσης.

A/A	Δείγμα	M.T ± T.A	
1	Αυθόρμητη ζύμωση	2.19 ± 0.21	a
2	<i>S. cerevisiae</i> Sc9	1.25 ± 0.14	b
3	<i>S. cerevisiae</i> Sc13	1.69 ± 0,22	ab

Όπου, Μ.Τ: μέση τιμή, Τ.Α: τυπική απόκλιση, a, b: υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's p value <0,05).



**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

9η Ερώτηση: Οξύτητα

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA, τα δείγματα μεταξύ τους, δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική διαφορά. Οι μέσοι όροι κυμαίνονταν περίπου στο ίδιο επίπεδο.

Αποτελέσματα ένατης ερώτησης που αφορούσε στην οξύτητα.

A/A	Δείγμα	M.T ± T.A	
1	Αυθόρμητη ζύμωση	3.5 ± 0.20	a
2	<i>S. cerevisiae</i> Sc9	3.31 ± 0.24	a
3	<i>S. cerevisiae</i> Sc13	3.56 ± 0,18	a

Όπου, Μ.Τ: μέση τιμή, Τ.Α: τυπική απόκλιση, a, b: υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's p value <0,05).

10η Ερώτηση: Λιπαρότητα- σώμα

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA, τα δείγματα μεταξύ τους, δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική διαφορά. Οι μέσοι όροι κυμαίνονταν περίπου στο ίδιο επίπεδο.

Αποτελέσματα δέκατης ερώτησης που αφορούσε στην λιπαρότητα και το σώμα.

A/A	Δείγμα	M.T ± T.A	
1	Αυθόρμητη ζύμωση	2.88 ± 0.22	a
2	<i>S. cerevisiae</i> Sc9	2.81 ± 0.26	a
3	<i>S. cerevisiae</i> Sc13	3.13 ± 0,24	a

Όπου, Μ.Τ: μέση τιμή, Τ.Α: τυπική απόκλιση, a, b: υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's p value <0,05).



**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

11η Ερώτηση: Συνολική εκτίμηση ποιότητας

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ANOVA, τα δείγματα μεταξύ τους, δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική διαφορά. Οι μέσοι όροι κυμαίνονταν περίπου στο ίδιο επίπεδο.

Αποτελέσματα ενδέκατης ερώτησης που αφορούσε στην συνολική εκτίμηση ποιότητας.

A/A	Δείγμα	M.T ± T.A	
1	Αυθόρμητη ζύμωση	2.88 ± 0.18	a
2	<i>S. cerevisiae</i> Sc9	3.06 ± 0.21	a
3	<i>S. cerevisiae</i> Sc13	3.00 ± 0,18	a

Όπου, M.T: μέση τιμή, T.A: τυπική απόκλιση, a, b: υποδηλώνουν τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά (Tukey's p value <0,05).

Τα 3 στελέχη δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές με εξαίρεση την απόχρωση και τα αρώματα οξείδωσης με την αυθόρμητη ζύμωση να παρουσιάζει το μεγαλύτερο βαθμό οξείδωσης και να έπεται το Sc13. Αντιθέτως το στέλεχος Sc9 δεν εμφάνισε οξειδωτικά αρώματα.



**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

#### ΠΡΟΚΥΠΤΟΥΣΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΕ4

1) Προκύπτουσες δημοσιεύσεις σε συνέδρια με σύστημα κριτών:

Dimopoulou M., Kallithraka S., Papanikolaou S., Nychas G.-J. Species interaction of grape berries, must and wine microorganisms. 42nd World Congress of Vine and Wine, OIV, 15-19 July 2019, Geneva, Switzerland.

Christofi, S., Dimopoulou, M., Terpou, A., Papanikolaou, S., Nychas, G., Cotea, V., Kallithraka, S. Effect of nitrogen content on fermentation kinetics and aroma profile of Assyrtiko wine. Macrowine 2021, Online platform.

Christofi, S., Dimopoulou, M., Tsapou, E.A., Papanikolaou, S., Kallithraka, S. Assyrtiko wines of Santorini produced by different autochthonous yeasts: Differences in aromatic and organoleptic profiles. In Vivo Analytical Scientia (IVAS) conference, Neustadt, Germany, June 2022 (<https://ives-openscience.eu/14538/>).

Christofi, S., Dimopoulou, M., Papanikolaou, S., Kallithraka, S. Indigenous Ethanol resistant yeast strains for production of Assyrtiko wines. 43rd World Congress of Vine and Wine, OIV, 31/10-4/11, Ensenada, Mexico, 2023.

2) Δημοσιεύσεις σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά αναγνωρισμένου κύρους με σύστημα κριτών:

Christofi, S., Papanikolaou, S., Dimopoulou, M., Terpou, A., Cioroiu, B., Cotea, V., Kallithraka, S. (2022) Effect of nitrogen content on fermentation kinetics and aroma profile of Assyrtiko wine. Applied Sciences, 12, 1405.





**ΕΠΑνΕΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

## **Ενότητα Εργασίας 5: Μεγάλης κλίμακας οινοποίηση και έρευνα τάσεων αγοράς**

**Φορείς υλοποίησης:**

**Εργαστήριο Οινολογίας και Αλκοολούχων Ποτών Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών**

**Ένωση Συνεταιρισμών Θηραϊκών Προϊόντων**

**Εταιρεία Αξιοποίησης και Διαχείρισης της Περιουσίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών**

**Δράση 5.1: Μεγάλης κλίμακας οινοποίηση.**

**Δράση 5.2: Έρευνα τάσεων αγοράς**



**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

### Δράση 5.1: Μεγάλης κλίμακας οινοποίηση

Στα πλαίσια αυτής της δράσης πραγματοποιήθηκε μεγάλης κλίμακας οινοποίηση (δεξαμενή 10 τόνων) με αυθόρμητη ζύμωση από μικροοργανισμούς της γηγενούς μικροχλωρίδας των σταφυλιών και του οινοποιείου ενώ ο υπόλοιπος μούστος μοιράστηκε σε 5 δεξαμενές των 20 τόνων και κάθε δεξαμενή εμβολιάστηκε με διαφορετικό εμπορικό στέλεχος *S. cerevisiae*. Η πορεία της ζύμωσης συγκρίθηκε για όλες τις δεξαμενές ενώ δείγματα από την αυθόρμητη ζύμωση συλλέχθηκαν για τη Δράση 1.1 και 1.2.

Σταφύλια από την ποικιλία Ασύρτικο συλλέχθηκαν στο νησί της Σαντορίνης την περίοδο του τρύγου τον Αύγουστο του 2019. Τα σταφύλια τρυγήθηκαν όταν είχαν φτάσει την κατάλληλη τεχνολογική ωρίμανση και προέρχονταν από 3 αντιπροσωπευτικές αμπελουργικές ζώνες; Θηρασιά (6.19022, 4.32396), Βουρβούλος-Πλατιά (6.28872, 4.034319) και Πύργος-Τρίστατο (6.29916, 4.026444) (Εικόνα 1). Τα σταφύλια οινοποιήθηκαν στους χώρους της συμμετέχουσας εταιρείας «Santo Wines» (Ένωση Συνεταιρισμών Θηραϊκών Προϊόντων Σαντορίνης) σύμφωνα με το καθιερωμένο πρωτόκολλο παραγωγής του οινοποιείου. Πιο συγκεκριμένα ο τρύγος έγινε στις 25 Αυγούστου του 2019. Τα σταφύλια οδηγήθηκαν σε ψυγείο, πάγωσαν στους 4°C μέχρι την επόμενη μέρα που έγινε διαλογή και αποραγισμός. Ο σταφυλοπολτός παρέμεινε στο πιεστήριο για προζυμωτική εκχύλιση 10 ώρες. Προστέθηκαν θειώδης ανυδρίτης (8,0 g/hl) και ασκορβικό οξύ (10,0 gr/hl). Στη συνέχεια έγινε γλευκοποίηση. Ο μούστος παρέμεινε για στατική απολάσπωση. Προστέθηκαν πυκτινολυτικά ένζυμα 2,0 ml/hl και μπεντονίτης 25,0 g/hl. Την επόμενη μέρα το καθαρό γλεύκος οδηγήθηκε στην δεξαμενή ζύμωσης.





**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε σταθερή θερμοκρασία (18°C) με την προσθήκη της απαραίτητης ποσότητας αζώτου (200, mg/L) ενώ η κάθε πορεία της ζύμωσης παρακολούθηθηκε σε καθημερινή βάση με τη μέτρηση των βαθμών Beaume, σακχάρων και αλκοόλης για όλες τις δεξαμενές. Στη δεξαμενή με την αυθόρμητη ζύμωση συλλέχθηκε δείγμα από την αρχή και το τέλος της ζύμωσης. Τα δείγματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση και ταυτοποίηση των γηγενών ζυμών όπως περιγράφεται αναλυτικά στη Δράση 1.1 και 1.2 από το εργαστήριο του EMBT. Με βάσει τα αποτελέσματα οι ζυμώσεις διήρκεσαν από 11 έως και 17 μέρες ανάλογα με τις εναρκτήριες καλλιέργειες που χρησιμοποιήθηκαν. Τα στελέχη των ζυμομυκήτων με το καλύτερο δυναμικό ζύμωσης υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες ήταν τα στελέχη *Saccharomyces cerevisiae* Cru 33 και VL3. Αντίστοιχα η αυθόρμητη ζύμωση διήρκεσε 17 μέρες και παρέμεινε χαμηλή συγκέντρωση από εναπομείναντα σάκχαρα (5,0 g/L).

Επιπρόσθετα στα πλαίσια της Δράσης περί τα τέλη Αυγούστου του 2019, η ΕΣΘΠ πραγματοποίησε συλλογή σταφυλιών ποικιλίας Ασύρτικου. Οι θέσεις των αμπελώνων που τρυγήθηκαν προέρχονταν από τις τρεις αντιπροσωπευτικότερες αμπελουργικές ζώνες. Σε αυτές ανήκουν οι περιοχές της Θηρασιάς, του Βουρβούλου-Πλατιάς και του Πύργου-Τρίστατου. Κατόπιν, στις εγκαταστάσεις της ΕΣΘΠ, πραγματοποιήθηκε μεγάλης κλίμακας οινοποίηση με αυθόρμητη ζύμωση από μικροοργανισμούς της γηγενούς μικροχλωρίδας των σταφυλιών και του οινοποιείου. Παράλληλα με την αυθόρμητη ζύμωση, μέρος του μούστου από το συγκεκριμένο τρύγο μοιράστηκε σε ανοξειδωτες δεξαμενές 20 τόνων, οινοποιήθηκε σύμφωνα με το καθιερωμένο πρωτόκολλο παραγωγής του οινοποιείου της Santo Wines, με την προσθήκη 5 διαφορετικών εμπορικών στελεχών ζυμομυκήτων *Saccharomyces cerevisiae*. Η πορεία της ζύμωσης με τα εμπορικά στελέχη χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση με την αντίστοιχη πορεία της αυθόρμητης ζύμωσης από τους αρμόδιους ερευνητικούς φορείς του έργου.

Στο έργο μας στη συνέχεια μελετήσαμε ζυμώσεις σε μεγάλη κλίμακα για την παραγωγή οίνου από «νέα γηγενή στελέχη» που απομονώθηκαν από διάφορες πηγές, τα οποία είχαν δείξει καλά αποτελέσματα αιθανόλης σε μικρής κλίμακας ζυμώσεις. Επιπλέον έγινε η μελέτη τεσσάρων γηγενών στελεχών ζυμών *Saccharomyces cerevisiae*, τριών απομονωμένων από γλεύκος και οίνο Σαντορίνης (στελέχη *Saccharomyces cerevisiae* Sc9, Sc13, Sc24 – βλέπε απομόνωση και μοριακό χαρακτηρισμό στην EE1, μελέτη της φυσιολογίας και της βιοχημείας τους στην EE2 και μελέτες μικρο-οινοποιήσεων στην EE4) και ενός απομονωμένου από οίνο Νεμέας (Y54), καθώς και άλλων τριών στελεχών που είχαν τα προηγούμενα χρόνια



**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

απομονωθεί από την επιστημονική ομάδα του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Πρόκειται για τα στελέχη *Saccharomyces cerevisiae* Merlot, Rhone και MAK 2 συγκεκριμένα, τα οποία προέρχονται από την ιδιωτική συλλογή του εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και στην παρούσα ΕΕ, εγένετο και γι' αυτούς τους μικροοργανισμούς η διερεύνηση σχετικά με το εάν και κατά πόσο οι συγκεκριμένοι αυτοί μικροοργανισμοί μπορούν να συμμετάσχουν στη διαδικασία παραγωγής οίνων ποιότητας από Ασύρτικο Σαντορίνης, καθώς και στη διεργασία παραγωγής αλκοόλης μέσω της αλκοολικής ζύμωσης σε πιλοτικής κλίμακας διεργασίες.

Σε ένα πρώτο επίπεδο, πραγματοποιήθηκαν βιομηχανικής κλίμακας οινοποιήσεις με τα τέσσερα στελέχη ζυμομυκήτων (Sc9, Sc13, Sc24 και Y54) στις εγκαταστάσεις του οινοποιείου της Santo Wines για παραγωγή λευκών οίνων από Ασύρτικο γλεύκος. Όλες οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν με το ίδιο πρωτόκολλο οινοποίησης. Φυσικοχημικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν τόσο με κλασικές (αλκοολικός τίτλος κατ' όγκο, υπολειμματικά σάκχαρα, τρυγικό οξύ, ενεργός οξύτητα - pH, πτητική οξύτητα), όσο και με σύγχρονες αναλυτικές μεθόδους (υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης - HPLC). Τέλος, γευσιγνωστικά πάνελ έλαβαν χώρα, προκειμένου να υπάρξει μια πλήρης και σφαιρική άποψη σε ότι αφορά στους οργανοληπτικούς χαρακτήρες αυτών των οίνων. Η συγκεκριμένη μελέτη διεξάγεται για πρώτη φορά στην Ελλάδα στην ποικιλία Ασύρτικο και σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα διαφορετικά γηγενή στελέχη επηρέασαν τόσο τη σύνθεση του παραγόμενου οίνου, όσο και το οργανοληπτικό του προφίλ, αναδεικνύοντας τη δυναμική κάποιων από αυτών στην παραγωγή οίνων υψηλής ποιότητας. Οινοποίηση βιομηχανικής κλίμακας έλαβε χώρα υπό αναερόβιες συνθήκες με εμβολιασμό των τεσσάρων στελεχών σε αζύμωτο γλεύκος Ασύρτικου, σε τέσσερις ανοξείδωτες μεταλλικές δεξαμενές (2 χωρητικότητας 500,0 L και 2 χωρητικότητας 800,0 L) στις εγκαταστάσεις του οινοποιείου της Santo Wines στη Σαντορίνη. Η εξαγωγή του γλεύκους έγινε με το πάτημα των σταφυλιών σε πνευματικά πιεστήρια στους 8°C. Το γλεύκος διαύγασε φυσικά, σε θερμοκρασία 4°C για ένα διάστημα 12 ωρών, χωρίς την προσθήκη ενζύμων. Μετά τη διαύγαση, προστέθηκε μικρή ποσότητα διοξειδίου του θείου (SO<sub>2</sub>) με τη μορφή μεταδιθειώδους καλίου (Winy, Enartis) σε τελική περιεκτικότητα ολικού θειώδους περίπου 60,0mg/L και πραγματοποιήθηκε μικροφιλτράρισμα (με φίλτρο 0,45 μm) ώστε να απομακρυνθούν κύτταρα γηγενών ζυμών. Τα αρχικά χαρακτηριστικά του γλεύκους ήταν 12,85 Be ή 231,3 g/L σε υπολειμματικά σάκχαρα, δυναμικό αλκοολικό τίτλο 13,5, ολική οξύτητα 5.23 g/L (εκπεφρασμένη ως τρυγικό

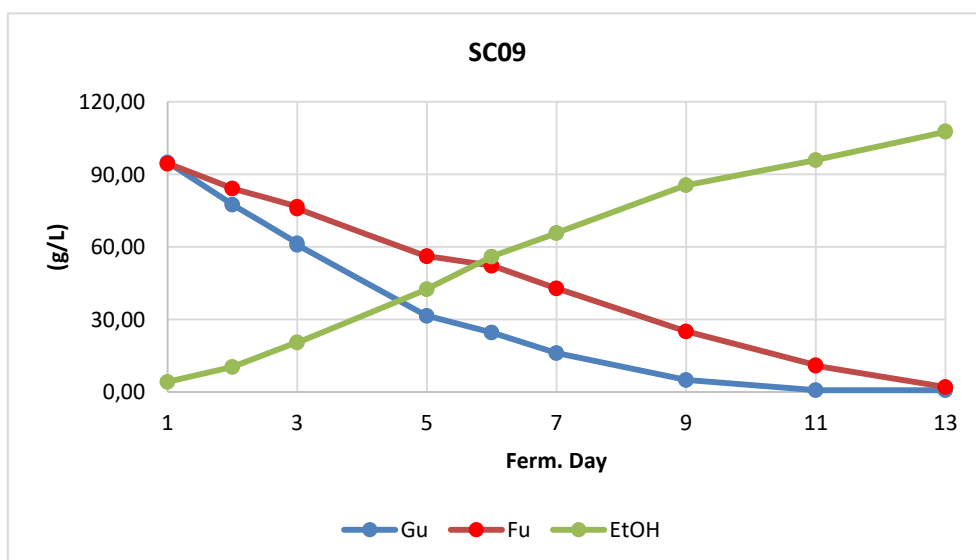


**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

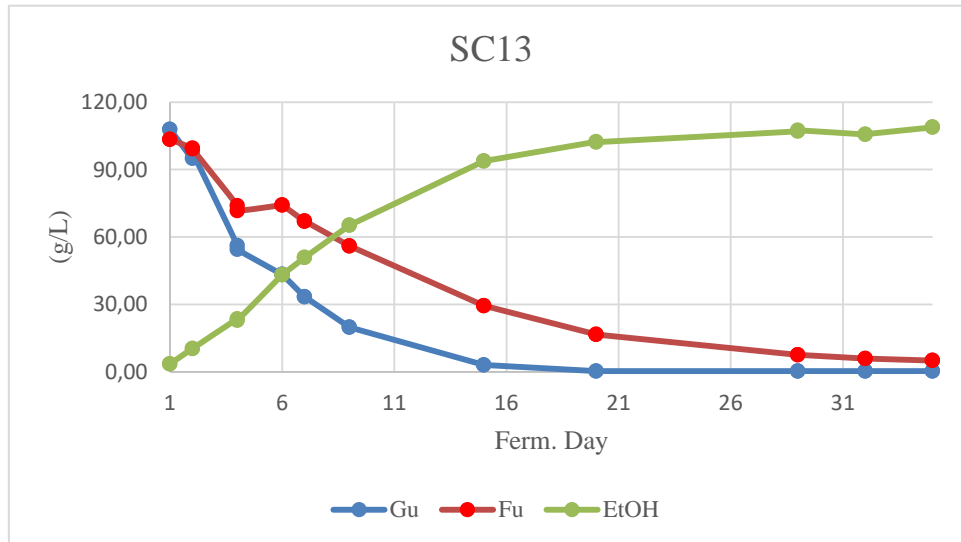
οξύ) και  $\text{pH}=3,26$ . Με την έναρξη της ζύμωσης έγινε εμπλουτισμός του γλεύκους και στις 4 δεξαμενές με Εκχύλισμα Ζυμών και DAP (φωσφορικό διαμμώνιο), ώστε να επιτευχθούν συγκεντρώσεις των 150,0 και 250,0 mg N/L αντίστοιχα, με σκοπό την ομαλή εξέλιξη της ζύμωσης, σύμφωνα με το πιο διαδεδομένο πρωτόκολλο βιομηχανικής οινοποίησης. Τα τέσσερα στελέχη αφού αφέθηκαν να λάβουν τη θερμοκρασία δωματίου και έγινε η προετοιμασία και η εκκίνηση τους με σταδιακή μεταφορά σε περιέκτες έως και 40,0 L, εμβολιάστηκαν στις αντίστοιχες δεξαμενές σε συγκέντρωση  $10^6$  cfu/mL στους  $18^\circ\text{C}$ . Το στέλεχος Sc9 ήταν αυτό που ξεχώρισε από άποψη ταχύτητας ζύμωσης, ολοκληρώνοντας τη ζύμωση του γλεύκους σε 13 ημέρες όπως παρατίθεται στο διάγραμμα 1.



**Διάγραμμα 1.** Κατανάλωση σακχάρων (γλυκόζης και φρουκτόζης) και παραγωγή αιθανόλης σε γλεύκος Ασύρτικου από τον μικροοργανισμό Sc9.

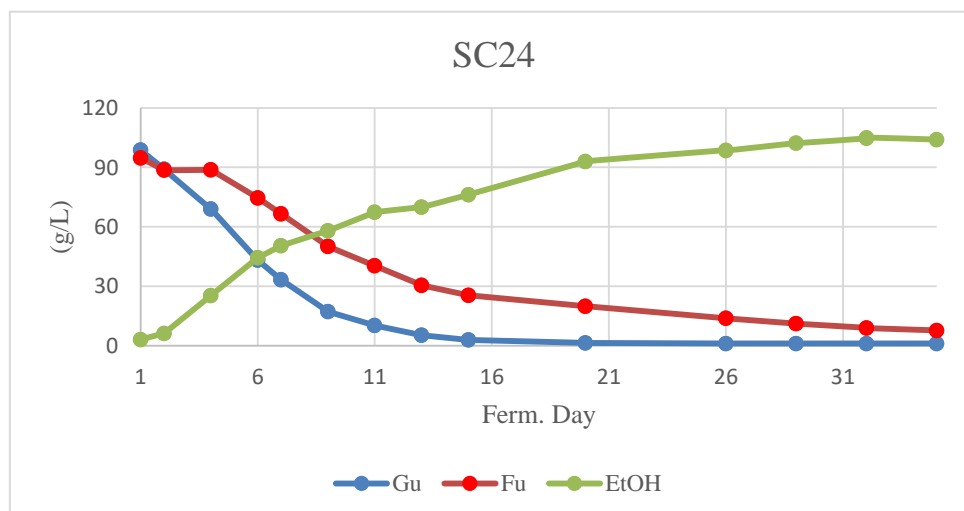
Το στέλεχος Sc9 ήταν αυτό που ξεχώρισε από άποψη ταχύτητας ζύμωσης, ολοκληρώνοντας τη ζύμωση του γλεύκους σε 13 ημέρες. Τόσο στη συγκεκριμένη ζύμωση (διάγραμμα 6), όσο και σε εκείνες των άλλων στελεχών που παρουσιάζονται παρακάτω, η γλυκόζη λόγω της γνωστής προτίμησης του *S. cerevisiae* σε αυτή, καταναλώθηκε πιο γρήγορα από τη φρουκτόζη (Berthels *et. al* 2004). Η τελική του περιεκτικότητα σε υπολειπόμενα σάκχαρα σύμφωνα με την τελική μέτρηση στον οίνο με τη μέθοδο του OIV ήταν 2,06 (g/L).

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



**Διάγραμμα 2.** Κατανάλωση σακχάρων (γλυκόζης και φρουκτόζης) και παραγωγή αιθανόλης σε γλεύκος Ασύρτικου από τον μικροοργανισμό Sc13.

Το στέλεχος Sc13 όπως και τα Sc24 και Y54, δυσκολεύτηκαν να ολοκληρώσουν τη ζύμωση, επιδεικνύοντας ένα πολύ αργό ρυθμό κατανάλωσης της φρουκτόζης μετά την 20 ημέρα, όπου και είχε καταναλωθεί η γλυκόζη. Η ζύμωση τερματίστηκε την 40<sup>η</sup> ημέρα με θείωση, προσθέτοντας μεταδιθειώδες κάλιο σε τελική περιεκτικότητα ελεύθερου θειώδους 35,0 mg/L. Η τελική περιεκτικότητα του οίνου σε υπολειπόμενα σάκχαρα σύμφωνα με την τελική μέτρηση με τη μέθοδο του OIV ήταν 4,00 (g/L).



**Διάγραμμα 3.** Κατανάλωση σακχάρων (γλυκόζης και φρουκτόζης) και παραγωγή αιθανόλης σε γλεύκος Ασύρτικου από τον μικροοργανισμό Sc24.

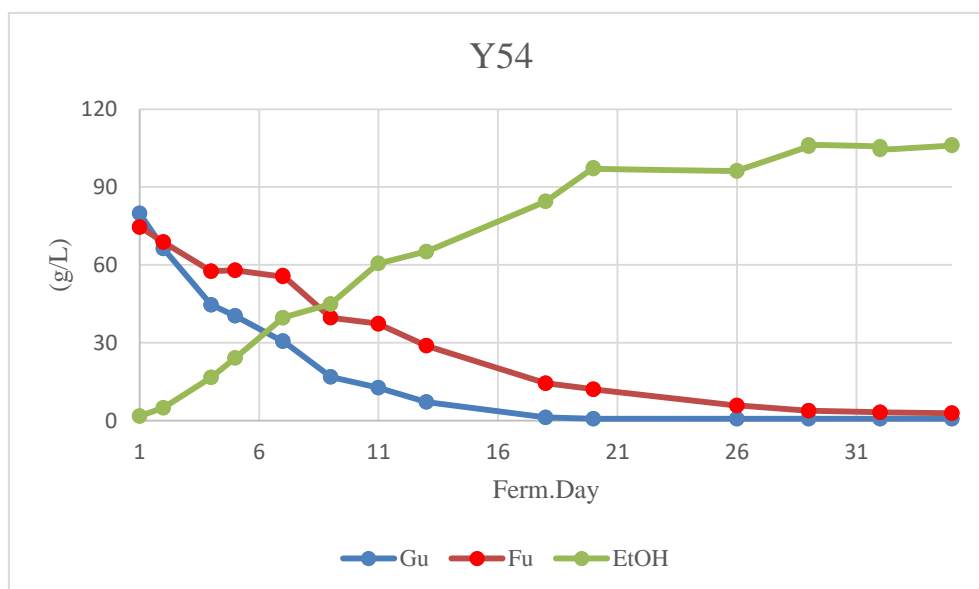


**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Το στέλεχος Sc24, όπως φαίνεται στο παραπάνω σχήμα (Διάγραμμα 3), ενώ στην κατανάλωση της γλυκόζης επέδειξε αντίστοιχη ρυθμό με άλλα στελέχη (Sc13, Y54), δυσκολεύτηκε περισσότερο από όλα στην κατανάλωση της φρουκτόζης, επιδεικνύοντας πολύ μικρό ρυθμό κατανάλωσης μετά την 26<sup>η</sup> ημέρα και σταματώντας ουσιαστικά τη δραστηριότητα του μετά την 35<sup>η</sup> ημέρα. Η τελική περιεκτικότητα του οίνου σε υπολειπόμενα σάκχαρα σύμφωνα με την τελική μέτρηση με τη μέθοδο του ΟΙV ήταν 6,87 (g/L). Πιθανές αιτίες του φαινομένου, αποτελούν η δυναμική κατανάλωσης του στελέχους, η ανεπάρκεια θρεπτικών στοιχείων όπως το αφομοιώσιμο άζωτο κατά τη ζύμωση, λοιπές πηγές στρεσαρίσματος και πιθανότατα περιβαλλοντικοί παράγοντες (Berthels *et al* 2004). Στη συγκεκριμένη περίπτωση, λαμβάνοντας υπόψη ότι όλες οι παράμετροι ήταν ίδιες (μούστος, συνθήκες, πρωτόκολλο οινοποίησης), η αδυναμία ζύμωσης σε επίπεδα ξηρού οίνου, θα μπορούσε να αποδοθεί στη δυναμική του στελέχους.



**Διάγραμμα 4.** Κατανάλωση σακχάρων (γλυκόζης και φρουκτόζης) και παραγωγή αιθανόλης σε γλεύκος Ασύρτικου από τον μικροοργανισμό Y54.

Το Y54 ήταν το στέλεχος το οποίο μετά το Sc9 μπόρεσε και ολοκλήρωσε τη ζύμωση στα χαμηλότερα επίπεδα υπολειπόμενων σακχάρων, στα 3,20 (g/L) (Διάγραμμα 4). Όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις, έτσι κι εδώ, η γλυκόζη καταναλώθηκε πιο



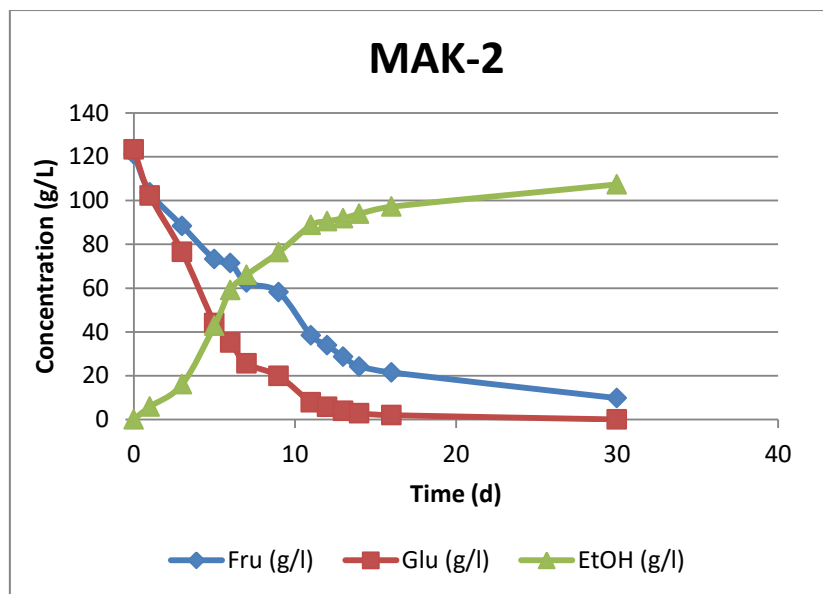
**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

γρήγορα από τη φρουκτόζη. Όπως τα Sc13, Sc24, παρομοίως και το Y54 δυσκολεύτηκε στην κατανάλωση της υπολειπόμενης γλυκόζης, χαμηλώνοντας πολύ τη ζυμωτική του δραστηριότητα μετά τη 18<sup>η</sup> ημέρα και ολοκληρώνοντας ουσιαστικά την 35<sup>η</sup>. Αυτό ήταν αντίθετο με τα ευρήματα της Μπασά (2020) και Basa *et al* (2022) η οποία μελετώντας το συγκεκριμένο στέλεχος σε περιβάλλον μικροοινοποίησης Ασύρτικου, κατέγραψε ολοκλήρωση της ζύμωσης σε διάστημα 15 ημερών.

Ακολουθούν ομοίως τα σχετικά Διαγράμματα και για τα άλλα τρία στελέχη που μελετήθηκαν σε βιομηχανικής κλίμακας ζυμώσεις, σε δοχεία ενεργού όγκου χωρητικότητας 500,0 L, χρησιμοποιώντας Ασύρτικο γλέυκος, με τις διεργασίες να πραγματοποιούνται στους χώρους του οινοποιείου της «Santo Wines» (Διαγράμματα 5-7).



**Διάγραμμα 5.** Κατανάλωση σακχάρων (γλυκόζης και φρουκτόζης) και παραγωγή αιθανόλης σε γλέυκος Ασύρτικο από το μικροοργανισμό MAK-2.





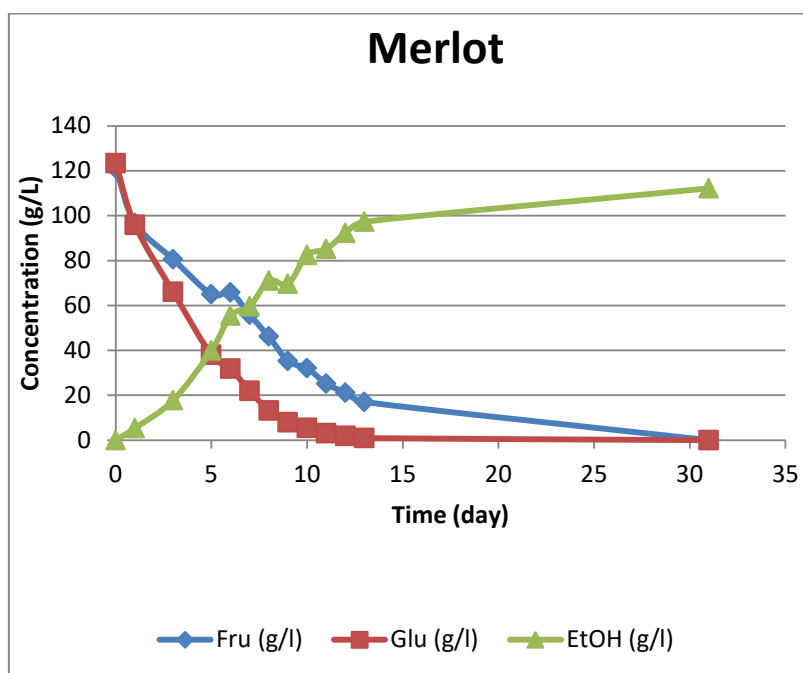
Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

ΕΠΑνΕΚ 2014-2020  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ

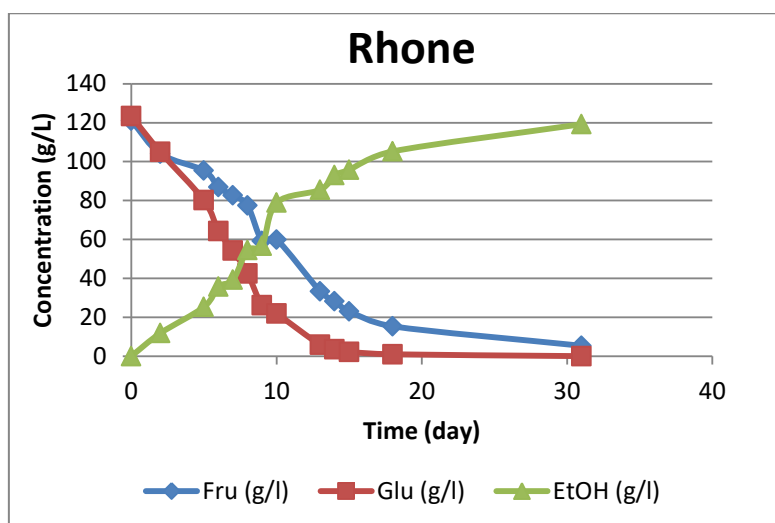


ανάπτυξη - εργασία - αλληλεγγύη

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



**Διάγραμμα 6.** Κατανάλωση σακχάρων (γλυκόζης και φρουκτόζης) και παραγωγή αιθανόλης σε γλεύκος Ασύρτικο από το μικροοργανισμό Merlot.



**Διάγραμμα 7.** Κατανάλωση σακχάρων (γλυκόζης και φρουκτόζης) και παραγωγή αιθανόλης σε γλεύκος Ασύρτικο από το μικροοργανισμό Rhone.



**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Μετρήθηκαν τα «οινολογικά» χαρακτηριστικά των παραγόμενων οίνων. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των μετρήσεων στους τελικούς οίνους, με την τυπική τους απόκλιση, ενδεικτικά για τους 4 από τους παραχθέντες οίνους.

**Πίνακας 1.** Τελικές μέσες τιμές των βασικών αναλύσεων των οίνων, με την τυπική τους απόκλιση.

Στέλεχος	Αιθυλική αλκοόλη (%v/v)	Πτητική οξύτητα (g/L)	Υπολειμματικά σάκχαρα (g/L)	Οξύτητα εκφρασμένη ως g/L τρυγικού οξέος	pH
Sc9	13,80±0,03	0,49±0,01	2,06±0,01	5,20±0,02	3,19±0,01
Sc13	13,60±0,03	0,65±0,01	4,00±0,05	5,30±0,01	3,25±0,01
Sc24	13,50±0,02	0,70±0,01	6,87±0,01	5,30±0,02	3,22±0,01
Y54	13,60±0,02	0,70±0,01	3,20±0,01	5,35±0,02	3,22±0,01

Όλοι οι οίνοι που παρήχθησαν είχαν αλκοολικό τίτλο από 13,5% vol και πάνω, με στατιστικώς σημαντική διαφορά μόνο στην περίπτωση του Sc9 σε σύγκριση με τα υπόλοιπα τρία στελέχη, λόγω της ταχύτερης και πιο απρόσκοπτης κατανάλωσης των σακχάρων από το συγκεκριμένο στέλεχος που του επέτρεψαν να φθάσει σε υψηλότερα επίπεδα συγκέντρωσης αιθανόλης.

Καθώς η γλυκόζη καταναλώνεται πρώτη και ταχύτερα από τη φρουκτόζη, όπως είδαμε στις κινητικές των ζυμώσεων παραπάνω, ουσιαστικά η ποσότητα των υπολειπόμενων σακχάρων αντιστοιχεί στη φρουκτόζη. Όλα τα στελέχη διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους, με το Sc9 να επιδεικνύει τη μικρότερη συγκέντρωση στα 2,06 g/L και το Sc24 τη μεγαλύτερη στα 6,87 g/L. Πάντως, τρία από τα τέσσερα στελέχη (Sc9, Sc13, Y54) κατάφεραν να ολοκληρώσουν τη ζύμωση τους όντας ουσιαστικά μέσα στο εύρος ενός ξηρού οίνου (< 4,0 g/L), κάτι που αποτέλεσε βασική παράμετρος προς διερεύνηση της παρούσας μελέτης.

Παραπάνω παρουσιάζεται η ολική οξύτητα των οίνων που παρήχθησαν από τα τέσσερα στελέχη *S. cerevisiae*. Το στέλεχος Y54 έδωσε τη μεγαλύτερη ολική οξύτητα, η οποία όμως από τη στιγμή που δεν συνοδεύεται με αντίστοιχα το χαμηλότερο pH, συμπεραίνουμε ότι προέρχεται από την παραγωγή κάποιων ασθενών οξέων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Τα υπόλοιπα τρία στελέχη δεν είχαν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ τους.



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



ανάπτυξη - εργασία - αλληλεγγύη

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Οι σχετικά υψηλές τιμές ολικής οξύτητας (και χαμηλού pH) των τελικών οίνων είναι μέσα στο συνηθισμένο εύρος που συναντάται σε οίνους Ασύρτικου (Kechagia *et al* 2008). Στην περίπτωση του Ασύρτικου Σαντορίνης οι σχετικές τιμές συνήθως είναι ακόμα υψηλότερες, αλλά στη συγκεκριμένη περίπτωση το αποτέλεσμα μπορεί να εξηγηθεί με τους συγκεκριμένους οίνους να προέρχονται από μια χρονιά (εσοδεία 2021) ιδιαίτερη, με παρατεταμένους καύσωνες οι οποίοι οδήγησαν σε υπερωρίμανση των σταφυλιών, φαινόμενο το οποίο είχε αρνητικό αντίκτυπο στις μετρούμενες τιμές ολικής οξύτητας και pH, μέσω κυρίως της αποδόμησης του μηλικού οξέος (Drappier *et al* 2019).

Όλες οι τιμές pH των παραγόμενων οίνων κυμάνθηκαν σε πολύ κοντινό εύρος 3,19–3,25, με στατιστικώς σημαντική διαφορά να παρουσιάζεται μόνο μεταξύ των Sc9 και Sc13, η οποία όμως λόγω των παραπλήσιων τιμών, δεν κρίνεται σημαντική για διαφοροποίηση στην ποιότητα του κρασιού.

Η μέτρηση της πτητικής οξύτητας εκπεφρασμένη σε συγκέντρωση (g/L) οξικού οξέος στους τελικούς οίνους, έδειξε τη μικρότερη τιμή 0,49 g/L στο στέλεχος Sc9, σημαντικά χαμηλότερη από τα υπόλοιπα τρία στελέχη, το οποίο μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι το συγκεκριμένο στέλεχος είχε την πιο ταχεία και απρόσκοπτη ζύμωση.

Η μέθοδος της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC) εφαρμόστηκε προς μελέτη της παραγωγής των ακόλουθων δευτερογενών μεταβολιτών.

Στο παραπάνω σχήμα παρατηρούμε ότι τα αποτελέσματα της μέτρησης του οξικού οξέος, έχοντας άμεση συσχέτιση με το συνολικό ύψος της πτητικής οξύτητας (Buick & Holdstock, 2003), συμφωνούν με τη μέτρηση της πτητικής οξύτητας, με το στέλεχος Sc9 να έχει σημαντικά χαμηλότερη παραγωγή οξικού οξέος από το Y54. Οι αποκλίσεις μεταξύ των δυο μετρήσεων στα άλλα δυο στελέχη οφείλεται σε παρουσία άλλων πτητικών οξέων όπως τα μυρμηκικό, βουτυρικό, φορμικό και προπανικό (Zoecklein *et al* 1995) τα οποία δεν μετρήσαμε. Η διακύμανση της συγκέντρωσης οξικού οξέος μεταξύ των τεσσάρων στελεχών, παρουσιάζει θετική συσχέτιση με την παραγωγή γλυκερόλης, κάτι το οποίο συμφωνεί με τα αποτελέσματα προηγούμενης μελέτης (Remize *et al* 1999).

Το στέλεχος με τη μεγαλύτερη παραγωγή γλυκερόλης μετρήθηκε να είναι το Y54, έχοντας στατιστικώς σημαντική διαφορά από τα άλλα τρία στελέχη. Το αποτέλεσμα αυτό είναι σύμφωνο με εκείνα του οργανοληπτικού ελέγχου από το πάνελ του ΓΠΑ, όπου ο οίνος που παράχθηκε από το Y54 κρίθηκε ως αυτός με τη μεγαλύτερη αίσθηση όγκου σώματος, οφειλόμενο κατά πάσα πιθανότητα στην υψηλότερη παραγωγή γλυκερόλης (Ribereau-Gayon *et al* 1972, Gawel *et al* 2007).



**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ

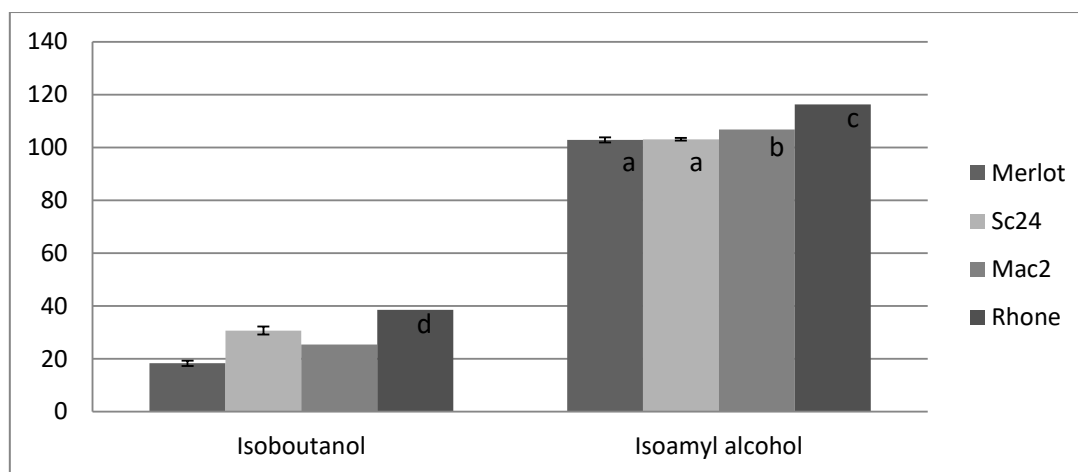


Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Αναφορικά με την παραγωγή ηλεκτρικού οξέος, το στέλεχος Y54 έδωσε στατιστικώς σημαντική διαφορά από τα υπόλοιπα στελέχη, η παρουσία του οποίου προσδίδει στον οίνο εστερικά αρώματα ανθών και τροπικών φρούτων (De Klerk, 2010), αρώματα τα οποία όπως διαπιστώθηκε και στον οργανοληπτικό έλεγχο, αναγνωρίστηκαν στον οίνο σε πολύ καλό ποσοστό.

Το στέλεχος Sc13 όπως και τα Sc24, Y54, δυσκολεύτηκαν να ολοκληρώσουν τη ζύμωση, επιδεικνύοντας ένα πολύ αργό ρυθμό κατανάλωσης της φρουκτόζης μετά την 20 ημέρα, όπου και είχε καταναλωθεί η γλυκόζη. Το στέλεχος Sc24, ενώ στην κατανάλωση της γλυκόζης επέδειξε αντίστοιχο ρυθμό με άλλα στελέχη (Sc13, Y54), δυσκολεύτηκε περισσότερο από όλα στην κατανάλωση της φρουκτόζης, επιδεικνύοντας πολύ μικρό ρυθμό κατανάλωσης μετά την 26η ημέρα και σταματώντας ουσιαστικά τη δραστηριότητα του μετά την 35η ημέρα. Η τελική περιεκτικότητα του οίνου σε υπολειπόμενα σάκχαρα σύμφωνα με την τελική μέτρηση με τη μέθοδο του ΟΙV ήταν 6,87 (g/L).

Εν συνέχεια παρατίθενται ενδεικτικά διαγράμματα (Διαγράμματα 8-12) των αρωματικών συστατικών καθώς και το αρωματικό προφίλ των στελεχών Sc24, Merlot, Rhones και MAK-2.



Διάγραμμα 8. Συγκέντρωση αλκοολών (mg/L) για τα στελέχη Merlot, Sc24, MAK-2 και Rhone.



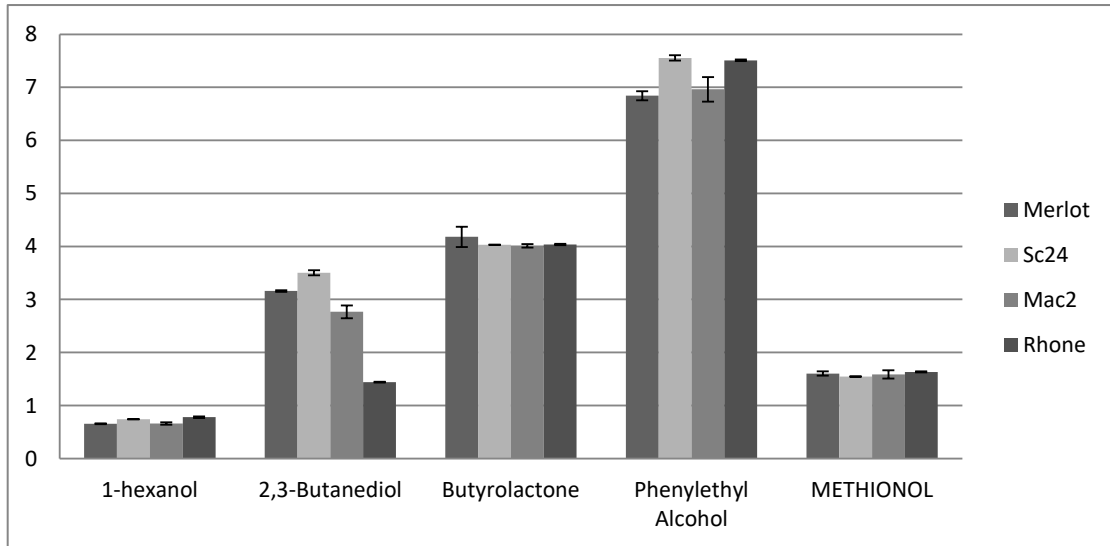
Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ

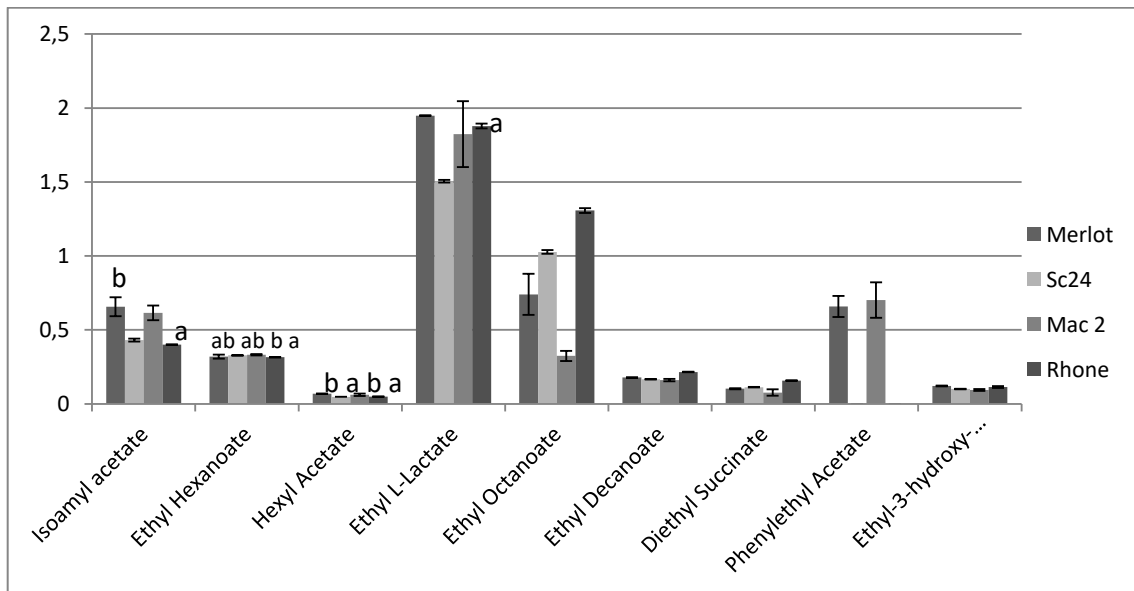


ανάπτυξη - εργασία - αλληλεγγύη

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

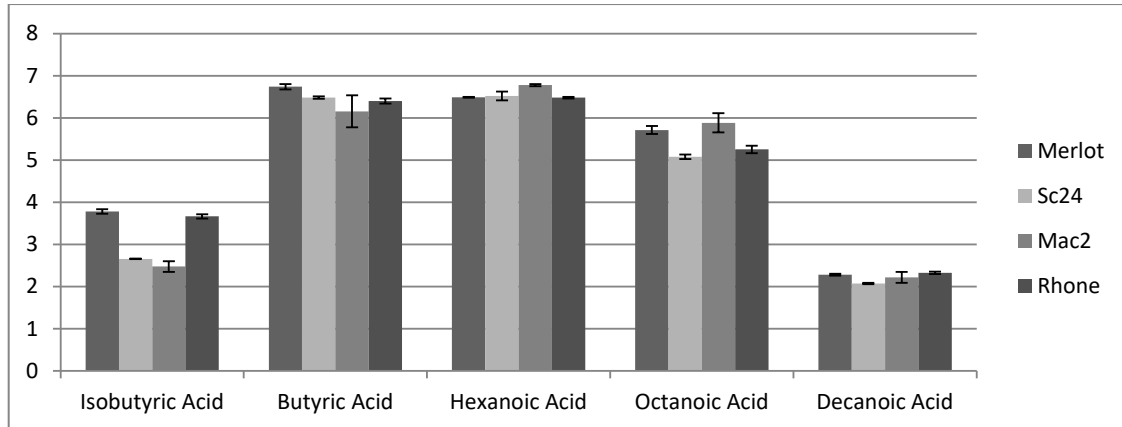


Διάγραμμα 9. Συγκέντρωση αλκοολών (mg/L) για τα στελέχη Merlot, Sc24, MAK-2 και Rhone.

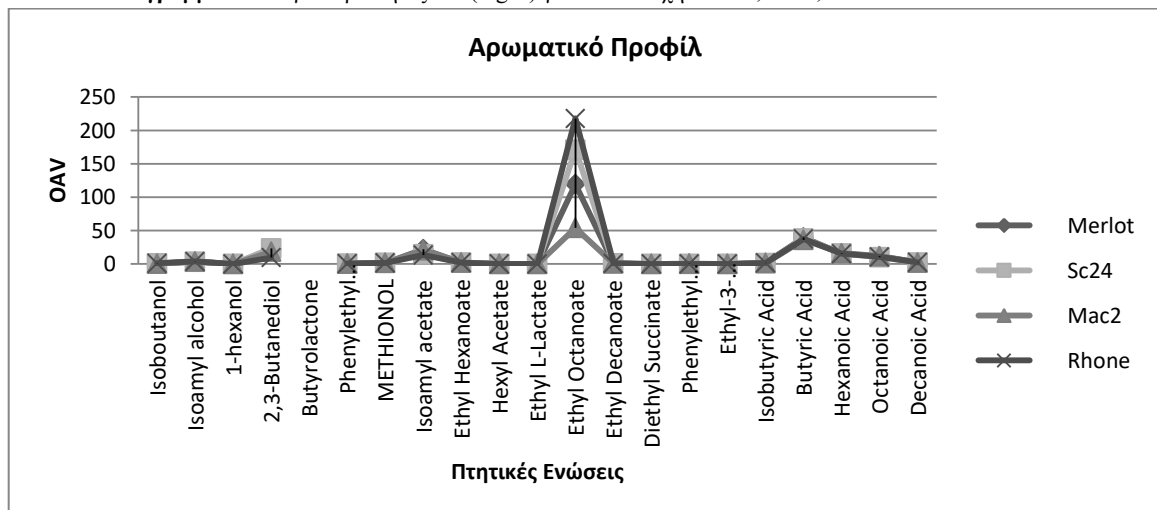


Διάγραμμα 10. Συγκέντρωση εστέρων (mg/L) για τα στελέχη Merlot, Sc24, MAK-2 και Rhone.

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



Διάγραμμα 11. Συγκέντρωση οξέων (mg/L) για τα στελέχη Merlot, Sc24, MAK-2 και Rhone.



Διάγραμμα 12. Αρωματικό προφίλ για τα στελέχη Merlot, Sc24, MAK-2 και Rhone.

Εν κατακλείδι, εντοπίστηκαν διαφορές τόσο στις κλασικές αναλύσεις οίνου, όσο και στις συγκεντρώσεις των δευτερογενών μεταβολιτών. Όσον αφορά το γεγονός ότι τρία από τα τέσσερα στελέχη καθυστέρησαν τόσο πολύ να ζυμώσουν σε επίπεδα ξηρού οίνου, με το Sc24 μάλιστα να μην το καταφέρνει, καταδεικνύει την ανάγκη επανάληψης των δοκιμών σε γλεύκος Ασύρτικου με σκοπό την εξαγωγή πιο ασφαλών συμπερασμάτων. Σαν πρώτη μελέτη πάντως, τα αποτελέσματα είναι ενθαρρυντικά, αφού τα τρία από τα τέσσερα στελέχη μπόρεσαν να δώσουν το δυναμικό τους, με κάποιες βέβαια αποκλίσεις. Στον τεχνικό οργανοληπτικό έλεγχο διαπιστώθηκε ο πολύ καλός από άποψη έντασης, και πολύπλοκος αρωματικός χαρακτήρας και των τεσσάρων οίνων, ενώ στον εμπορικό οργανοληπτικό έλεγχο αναδείχθηκε η υψηλή ποιοτική τους στάθμη. Σαν συμπέρασμα της παρούσας μελέτης, μπορούμε να πούμε ότι και τα τέσσερα γηγενή στελέχη δείχνουν την ικανότητα να δώσουν οίνους υψηλής



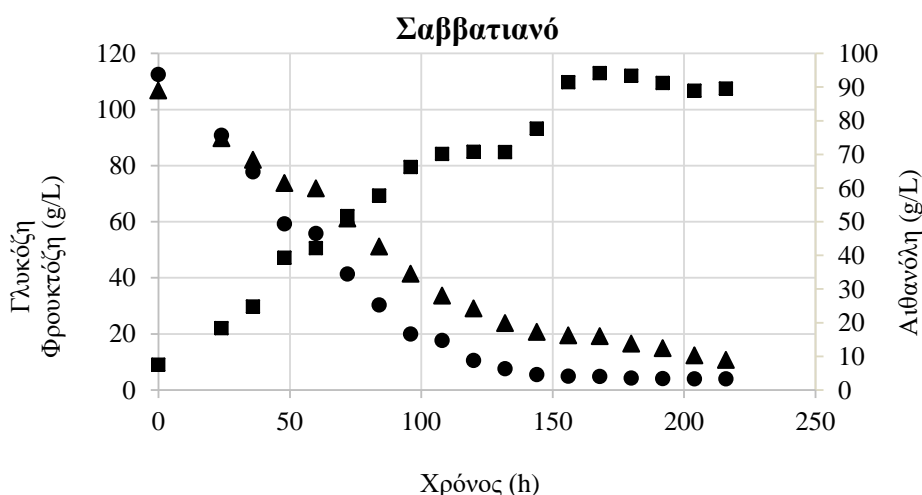
**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

ποιότητας. Επανάληψη της πειραματικής διαδικασίας και περαιτέρω μελέτη των συγκεκριμένων στελεχών φυσικά συνίσταται, στο πλαίσιο της γενικής παραδοχής εκ μέρους πολλών ερευνητών, της υφιστάμενης ανάγκης εμπλουτισμού της γνώσης για την περαιτέρω αξιοποίηση των γηγενών μικροοργανισμών.

Πέρα από τις μεγάλης κλίμακας οινοποιήσεις που έλαβαν χώρα στο οινοποιείο της εταιρείας «Santo Wines», έλαβαν χώρα στο συνεργαζόμενο οινοποιείο της ΕΑΔΠ-ΓΠΑ επίσης μεγάλης κλίμακας οινοποιήσεις σε μεγάλου όγκου ανοξειδωτες μεταλλικές δεξαμενές. Χρησιμοποιήθηκε και εδώ το «νέο» και μελετημένο στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae* Y54, το οποίο σε προηγούμενα πειράματα (βλέπετε ΕΕ 2) είχε δείξει καταπληκτικά αποτελέσματα σε υπόστρωμα γλυκόζης, τόσο σε αναδεδυόμενες φιάλες όσο και σε εργαστηριακής κλίμακας βιοαντιδραστήρες. Το στέλεχος αυτό συνεπώς, δοκιμάστηκε σε μεγαλύτερη κλίμακα ως προς την παραγωγή βιοαιθανόλης και οίνου σε υπόστρωμα σακχάρων (γλυκόζη και φρουκτόζη) σταφυλιού διαφόρων οινοποιητικών ποικιλιών. Τω όντι, ο μικροοργανισμός δοκιμάστηκε ως προς την κατανάλωση των σακχάρων του σταφυλιού της ποικιλίας Σαββατιανό με αρχική συγκέντρωση σακχάρων  $\approx 240$  g/L, και με ενεργό όγκο ζύμωσης τα 200 L. Το στέλεχος κατανάλωσε ικανοποιητικά τη γλυκόζη και τη φρουκτόζη στις 200 h και η μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης έφτασε τα 94,12 g/L (Διάγραμμα 13).



**Διάγραμμα 13.** Κατανάλωση σακχάρων (γλυκόζης - ● και φρουκτόζης - ▲) και παραγωγή αιθανόλης (■) σε γλεύκος Σαββατιανό από το μικροοργανισμό Y54.

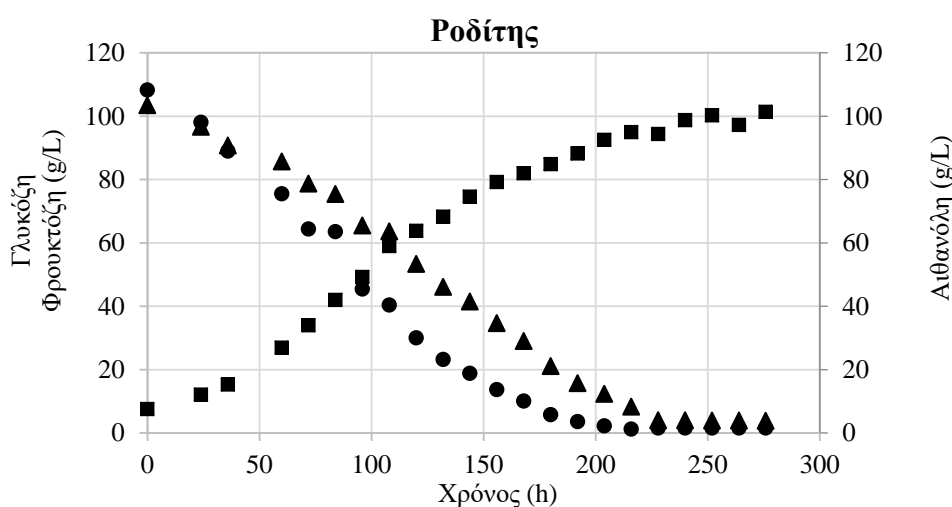


**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Ο μικροοργανισμός δοκιμάστηκε επίσης ως προς την κατανάλωση των σακχάρων του σταφυλιού της ποικιλίας Ροδίτης με αρχική συγκέντρωση σακχάρων  $\approx 240$  g/L, με ενεργό όγκο ζύμωσης τα 200 L. Το στέλεχος κατανάλωσε ικανοποιητικά τη γλυκόζη και τη φρουκτόζη περίπου στις 200 h και η μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης έφτασε τα 101,34 g/L (Διάγραμμα 14).



**Διάγραμμα 14.** Κατανάλωση σακχάρων (γλυκόζης - ● και φρουκτόζης - ▲) και παραγωγή αιθανόλης (■) σε γλεύκος Ροδίτη από το μικροοργανισμό Y54.

Τέλος, το στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae* Y54 δοκιμάστηκε ως προς την κατανάλωση των σακχάρων του σταφυλιού της ποικιλίας Ασύρτικο με αρχική συγκέντρωση σακχάρων ίση με 240 g/L, σε ακόμη μεγαλύτερη κλίμακα, με ενεργό όγκο 1.300 L. Το στέλεχος κατανάλωσε ικανοποιητικά τη γλυκόζη και τη φρουκτόζη περίπου στις 400 h και η μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης έφτασε τα 107,85 g/L (Διάγραμμα 15). Αντίστοιχη δοκιμή έγινε και το επόμενο έτος πάλι με την ποικιλία Ασύρτικο με παρόμοια αποτελέσματα.

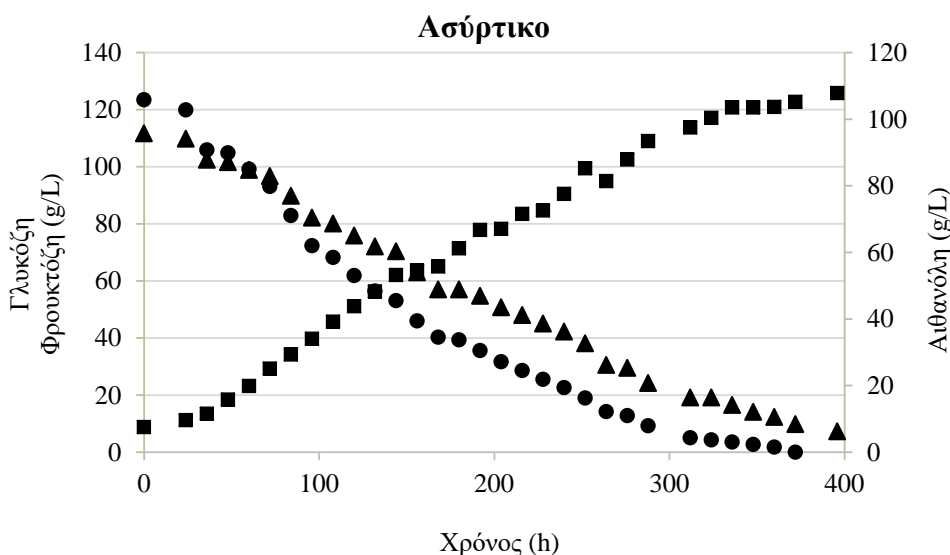




**ΕΠΑνΕΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



**Διάγραμμα 15.** Κατανάλωση σακχάρων (γλυκόζης - ● και φρουκτόζης - ▲) και παραγωγή αιθανόλης (■) σε γλεύκος Ασύρτικο από το μικροοργανισμό Y54.

## Δράση 5.2: Έρευνα τάσεων αγοράς.

Αποτελέσματα και ανάλυση των ερωτηματολογίων

Δημιουργήσαμε ένα ερωτηματολόγιο με τη βοήθεια του εργαλείου Google Forms, το οποίο στάλθηκε σε περίπου 600 οινοποιεία σε όλη την Ελλάδα, με σκοπό την συλλογή δεδομένων που αφορούν τη χρήση των ζυμών στα ελληνικά οινοποιεία. Το ερωτηματολόγιο απαντήθηκε από μόλις 80 οινοποιεία και από τα αποτελέσματα καταλαβαίνουμε πως τα χαρακτηριστικά των ζυμών που θεωρούνται πολύ σημαντικά από τους οινοπαραγωγούς είναι η ιδιότητα να διατηρούν χαμηλή πτητική οξύτητα, η απουσία αναγωγικών οσμών και η παραγωγή πολύπλοκων αρωμάτων. Επίσης πάνω από το 80% των ερωτηθέντων θα χρησιμοποιούσαν ιθαγενείς ζύμες ενώ περίπου το 60% θα διέθετε πόρους για έρευνα με κατεύθυνση τη χρήση ιθαγενών ζυμών και την υιοθέτηση ειδικής ένδειξης στην ετικέτα των προϊόντων τους. Η παρούσα Δράση καθώς και το παραδοτέο της έχουν ολοκληρωθεί σύμφωνα και με το χρονοδιάγραμμα του προγράμματος.

Με βάση τη παρατήρηση των κριτών, ότι πρέπει να συμπληρωθούν περισσότερα ερωτηματολόγια έγινε μια νέα προσπάθεια αποστολής ερωτηματολογίων σε 184

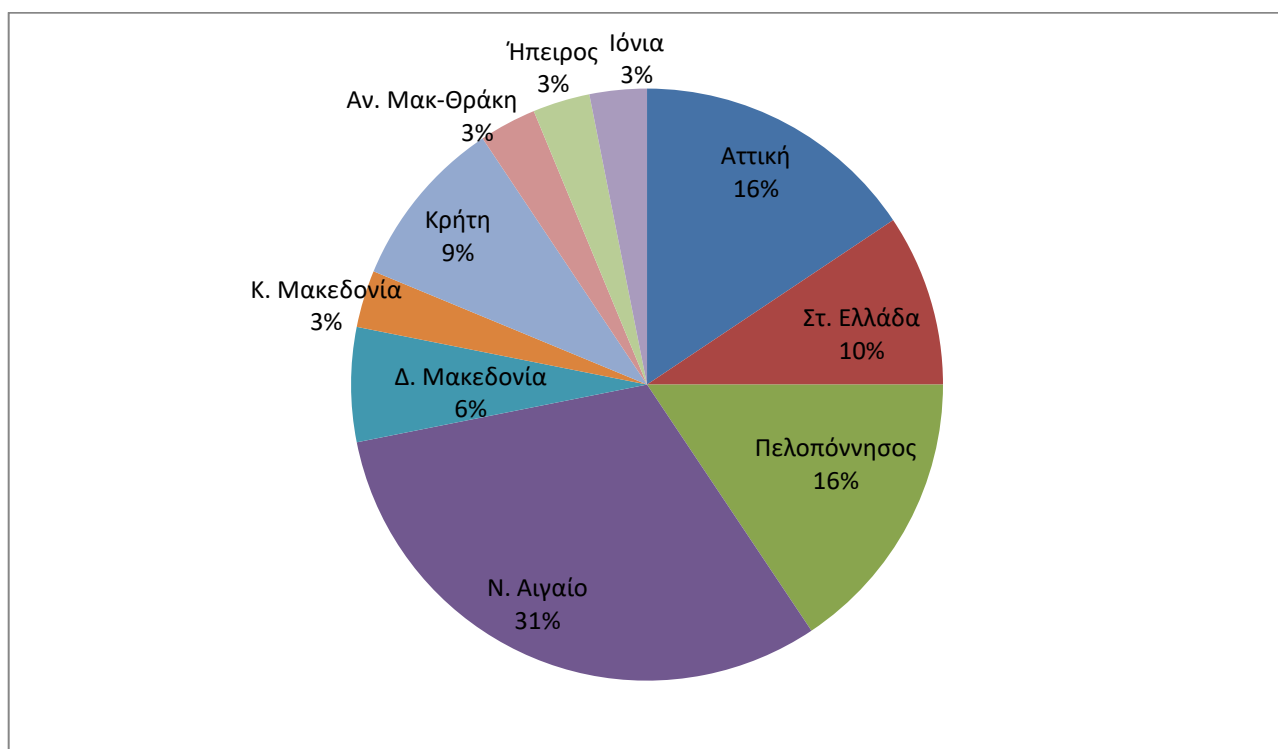


**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Επιχειρήσεις οινοποίησης (συνημμ. αρχείο 1, 2 φύλλο) και απάντησαν 32 από αυτές. Η κατανομή των απαντήσεων ανά περιφέρεια φαίνεται στο Σχήμα 1. Το ένα τρίτο (31%) σχεδόν των απαντήσεων προέρχεται από το Νότιο Αιγαίο και ακολουθούν η Αττική και Πελοπόννησος με τα ίδια ποσοστά (16%).



Σχήμα 1. Απαντήσεις επιχειρήσεων οινοποίησης κατά περιφέρεια

Όλες οι επιχειρήσεις που απάντησαν καλλιεργούσαν και ελληνικές ποικιλίες αμπέλου και το δυναμικό παραγωγής σε λίτρα φαίνεται στο Σχήμα 2. Η έρευνα κάλυψε από πολλής μικρής δυναμικότητας οινοποιεία (1.250 L) μέχρι πολλής μεγάλης σε μια αρκετά αντιπροσωπευτική κατανομή.

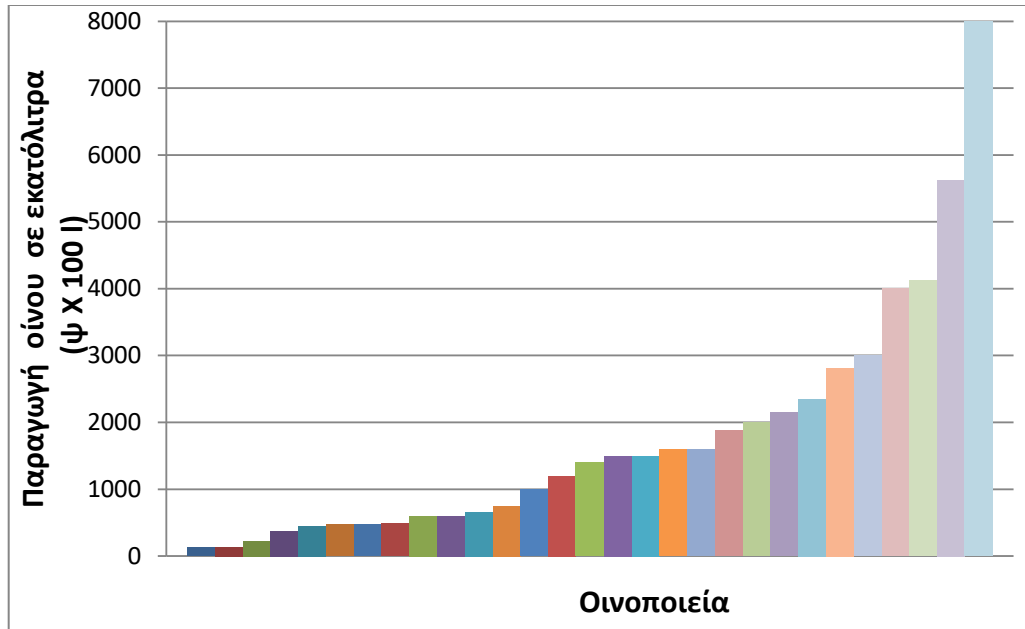
Η πρώτη ομάδα απαντήσεων αφορούσε στην προέλευση των ζυμών (Σχήμα 3). Όπως αναμενόταν η πλειοψηφία των οινοποιείων (27) χρησιμοποιεί εμπορικές ζύμες, τα 14 οινοποιούν με ιθαγενείς ζύμες χωρίς εμβολιασμό και 3 εμβολιάζουν με ιθαγενείς ζύμες. Αρκετά οινοποιεία κάνουν οινοποιήσεις τόσο με εμπορικές ζύμες όσο και με ιθαγενείς ζύμες χωρίς εμβολιασμό.



**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
**ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ**  
**ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ**  
**ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ**  
**ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ**

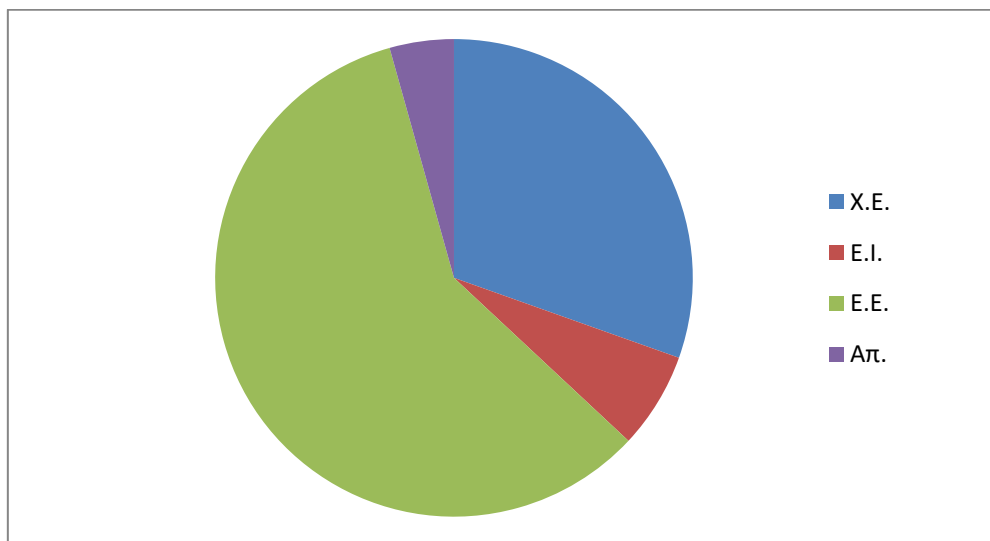


Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



Σχήμα 2. Παραγωγικό δυναμικό οινοποιείων που έλαβαν μέρος στην έρευνα

Μόνο 5 από τα 14 οινοποιεία χρησιμοποιούν ιθαγενείς ζύμες χωρίς εμβολιασμό αποκλειστικά. Σημειώνεται ότι ο αριθμός των επιλογών υπερβαίνει το σύνολο των οινοποιείων (32) γιατί πολλά οινοποιεία χρησιμοποιούν περισσότερες από μια επιλογές.



Σχήμα 3. Προέλευση ζυμών (X.E.: Με ιθαγενείς ζύμες χωρίς εμβολιασμό, E.I.: Με εμβολιασμό ιθαγενών ζυμών, E.E.: Εμβολιασμός με εμπορικό σκεύασμα, Απ.: Ζύμη από απομόνωση του οινοποιείου).

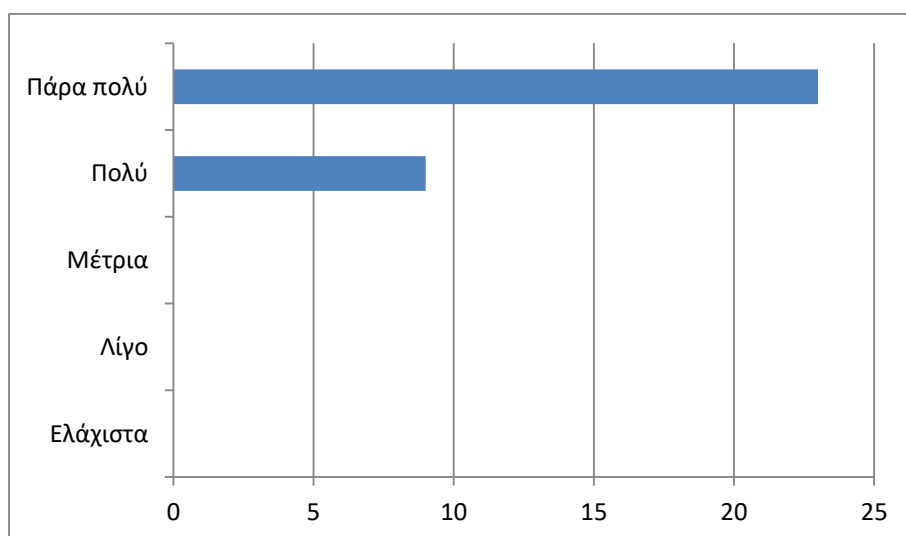


**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

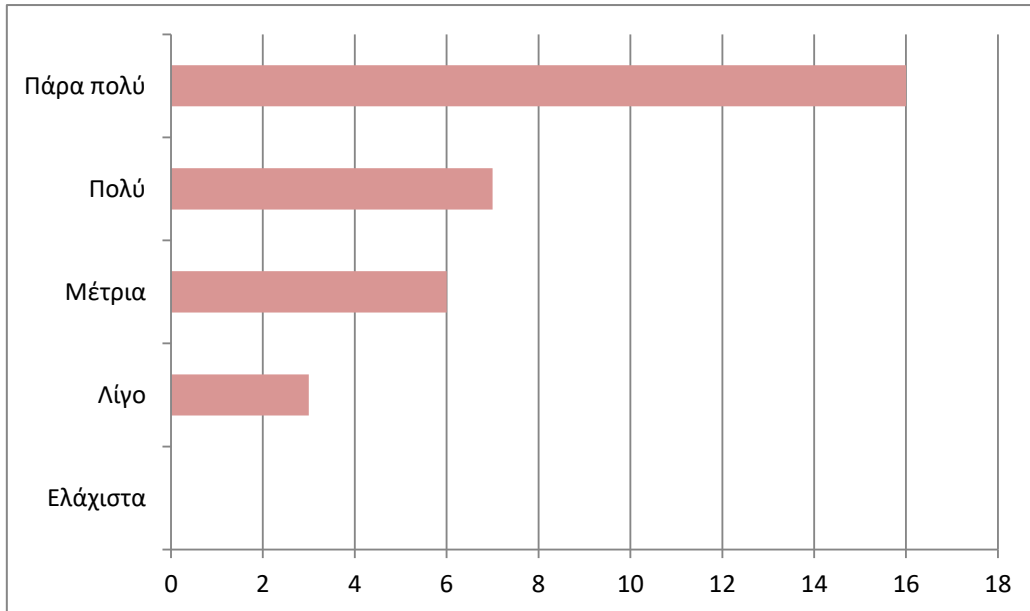
Οι οινοποιητικές επιχειρήσεις αξιολογούν ως πάρα πολύ και πολύ σημαντική τη συμβολή του αμπελότοπου (terroir) στη παραγωγή ποιοτικού οίνου (Σχήμα 4).



**Σχήμα 4.** Αξιολόγηση της σημαντικότητας στη συμβολή του αμπελότοπου (terroir) στη παραγωγή ποιοτικού οίνου σύμφωνα με την άποψη με των οινοποιητικών επιχειρήσεων.

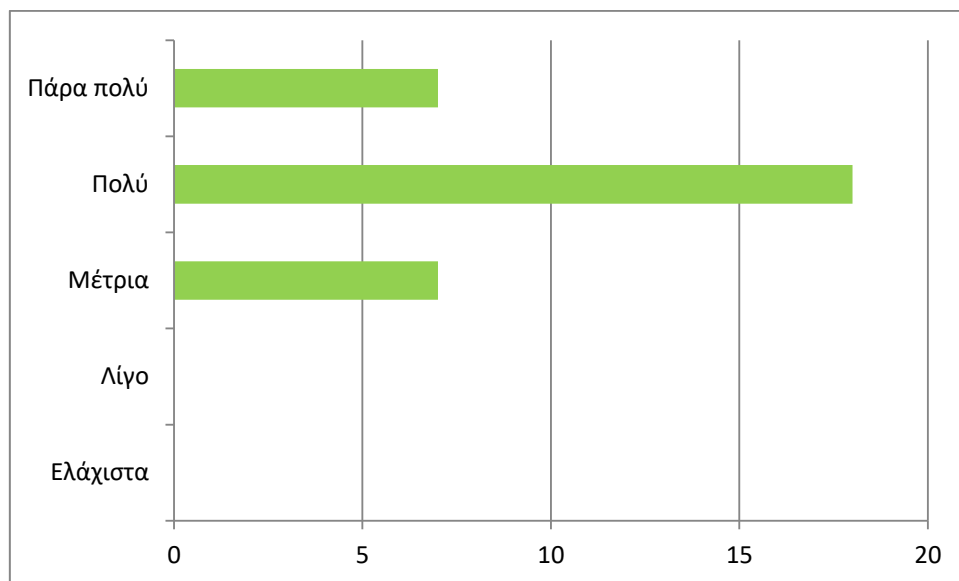
Η σημαντικότητα του ρόλου της ποικιλίας σύμφωνα με τις οινοποιητικές επιχειρήσεις αξιολογείται από τις μισές απαντήσεις ως πάρα πολύ σημαντική για τη παραγωγή ποιοτικού οίνου. Σε αυτές εάν προστεθούν και οι γνώμες για «πολύ» τότε οι θετικές γνώμες ανέρχονται σε 23, δηλ. το 72,0% του συνόλου, ενώ υπάρχουν και απόψεις (n=3) που θεωρούν ότι αυτή είναι λίγη (Σχήμα 5).

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



Σχήμα 5. Αξιολόγηση της σημαντικότητας στη συμβολή της ποικιλίας στη παραγωγή ποιοτικού οίνου σύμφωνα με την άποψη των οινοποιητικών επιχειρήσεων

Οι καλλιεργητικές και αμπελοκομικές τεχνικές (Σχήμα 6) επίσης θεωρούνται ότι είναι πολύ και πάρα πολύ σημαντικές για την παραγωγή ποιοτικού οίνου.



Σχήμα 6. Αξιολόγηση της σημαντικότητας στη συμβολή των καλλιεργητικών και αμπελοκομικών τεχνικών στη παραγωγή ποιοτικού οίνου σύμφωνα με την άποψη των οινοποιητικών επιχειρήσεων.

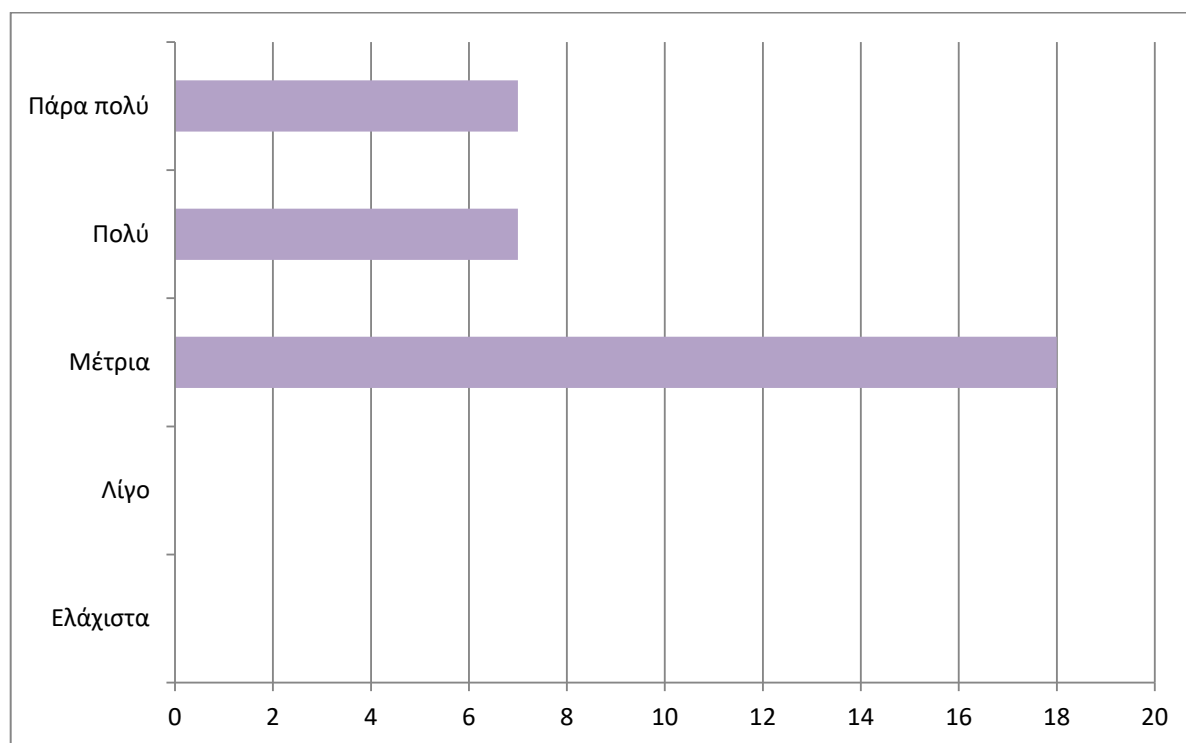


**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

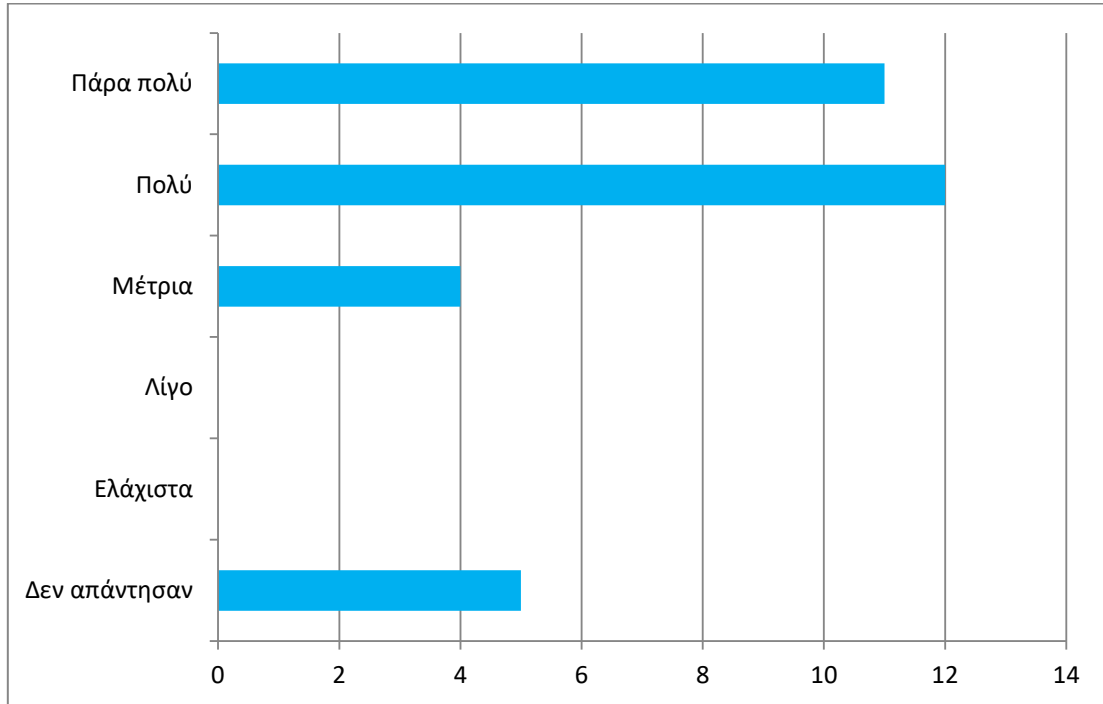
Η σημαντικότητα της συμβολής των ασθενειών και των εντόμων παραγωγή ποιοτικού οίνου αξιολογείται κατά κύριο λόγο ως μέτρια (Σχήμα 6).



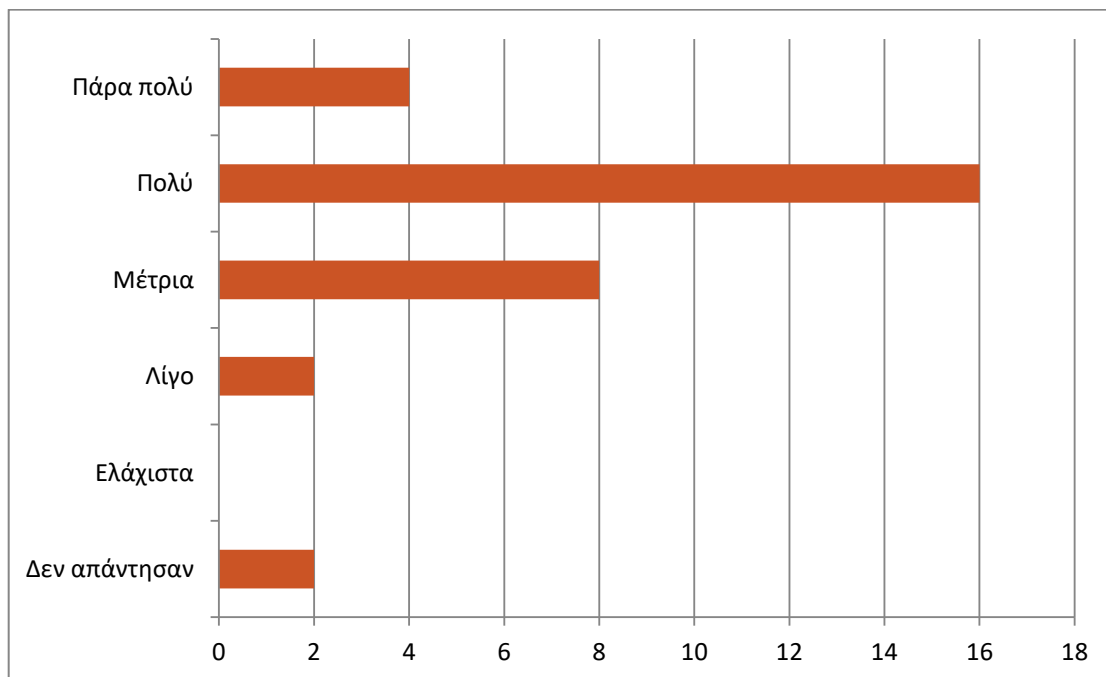
**Σχήμα 6.** Αξιολόγηση της σημαντικότητας στη συμβολή των ασθενειών και των εντόμων στη παραγωγή ποιοτικού οίνου σύμφωνα με την άποψη με των οινοποιητικών επιχειρήσεων.

Η συμβολή των οινοποιητικών τεχνικών στη παραγωγή ποιοτικού οίνου αντιμετωπίζεται ως πολύ και πάρα πολύ σημαντική από τη μεγάλη πλειοψηφία των επιχειρήσεων (Σχήμα 7) και η επιλογή ζυμών να αξιολογείται από το 50,0% των επιχειρήσεων ως πολύ σημαντική ενώ μέτρια τη θεωρούν το 25,0% των επιχειρήσεων (Σχήμα 8).

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



**Σχήμα 7.** Αξιολόγηση της σημαντικότητας στη συμβολή των οινοποιητικών τεχνικών στη παραγωγή ποιοτικού οίνου σύμφωνα με την άποψη με των οινοποιητικών επιχειρήσεων.



**Σχήμα 8.** Αξιολόγηση της σημαντικότητας στη συμβολή της επιλογής ζυμών στη παραγωγή ποιοτικού οίνου σύμφωνα με την άποψη με των οινοποιητικών επιχειρήσεων.

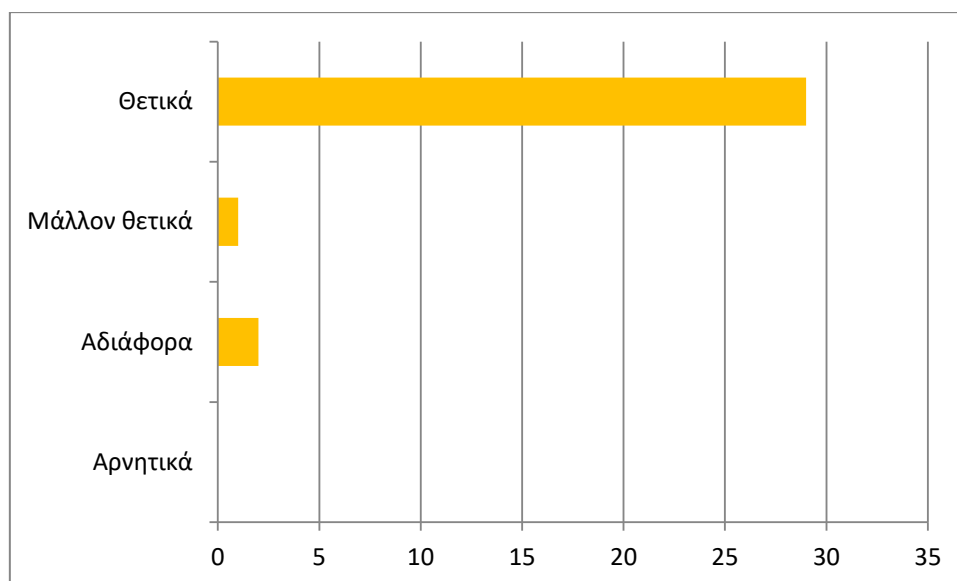


**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Στο ερώτημα για το πώς αξιολογείται η χρήση ιθαγενών ζυμών στην οινοποίηση οι θετικές γνώμες υπερτερούν κατά πολύ, λίγες την αξιολογούν ως αδιάφορη, ενώ ενδιαφέρον είναι ότι δεν υπάρχουν αρνητικές γνώμες (Σχήμα 9).



Σχήμα 9. Αξιολόγηση της χρήσης ιθαγενών ζυμών σύμφωνα με την άποψη με των οινοποιητικών επιχειρήσεων.

Η αξιολόγηση της επίδρασης των ζυμών σε 11 διαφορετικά χαρακτηριστικά για την παραγωγή ποιοτικού οίνου αποτυπώθηκαν ως εξής:

Σχεδόν το 50,0% των ερωτώμενων θεώρησαν την αντοχή στις χαμηλές θερμοκρασίες ως πολύ και πάρα πολύ σημαντική αλλά και ένα σχεδόν 10,0% ως μέτριας σημαντικότητας (Σχήμα 10). Η αντοχή σε υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης αξιολογήθηκε ως πολύ και πάρα πολύ σημαντική από τις περισσότερες επιχειρήσεις (Σχήμα 11). Για την επίδραση στη παραγωγή και αντοχή στο διοξειδίου του θείου (SO<sub>2</sub>) οι γνώμες κινήθηκαν κατά κύριο λόγο σε μέτρια και πολύ σημαντική (Σχήμα 12 και 13). Στη διατήρηση της χαμηλής πτητικής οξύτητας ο ρόλος των ζυμών θεωρήθηκε πάρα πολύ (σχεδόν 50,0%) και πολύ σημαντικός (30,0%) (Σχήμα 14). Οι σχεδόν ίδιες τάσεις υπήρξαν και για την απουσία αναγωγικών οσμών (Σχήμα 15). Στην αξιολόγηση της σημαντικότητας χαρακτηριστικών των ζυμών στην ενίσχυση φρουτώδους και ανθικού αρώματος οι γνώμες μοιράστηκαν εξ ίσου (28,0%) στην μέτρια, πολύ και πάρα πολύ σημαντική επίδραση με τις δύο τελευταίες να υπερβαίνουν το 50,0% (Σχήμα 16). Αντίστοιχα αξιολογήθηκε η συμβολή των ζυμών



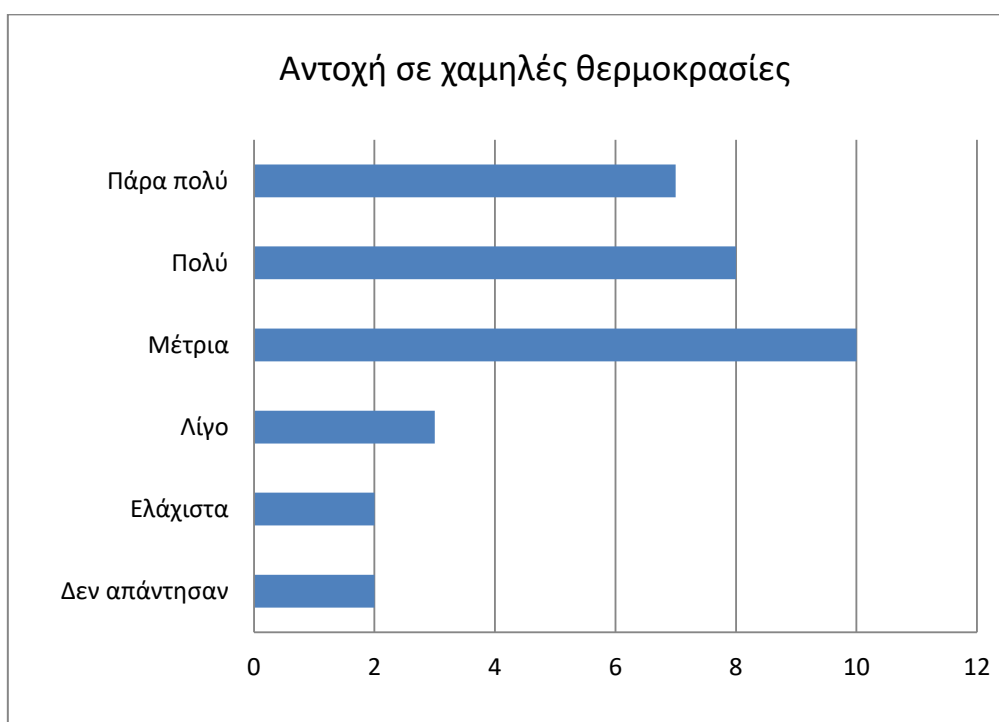


**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

στη παραγωγή πολύπλοκων αρωμάτων αρώματος (Σχήμα 17). Ο ρόλος των ζυμών στο ρυθμό αλκοολικής ζύμωσης ως πολύ και πάρα πολύ σημαντικός απαντήθηκε από το 69,0% των επιχειρήσεων ενώ ως μέτριος από το 25,0% (Σχήμα 18). Η μεταβολή της ογκομετρούμενης οξύτητας υπό την επίδραση των ζυμών αξιολογήθηκε ως πολύ και πάρα πολύ σημαντική από το 62,00% των επιχειρήσεων (Σχήμα 19). Οι γνώμες για τη παραγωγή γλυκερόλης (λιπαρότητα, σώμα οίνου) θεωρήθηκε ως πολύ και πάρα πολύ σημαντική από το 81,0% των επιχειρήσεων (Σχήμα 20). Συνοψίζοντας την αξιολόγηση της επίδρασης των ζυμών σε 11 διαφορετικά χαρακτηριστικά για την παραγωγή ποιοτικού οίνου μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι στα 8 από αυτά οι γνώμες για πολύ και πάρα πολύ σημαντική επίδραση υπερέβαιναν το 50,0% και αντίστοιχα για δύο (αντοχή στις χαμηλές θερμοκρασίες και παραγωγή διοξειδίου του θείου (SO<sub>2</sub>) το 40,0% ενώ σε ένα (αντοχή στο διοξείδιο του θείου (SO<sub>2</sub>) ήταν 28,0%.



Σχήμα 10. Αξιολόγηση της σημαντικότητας χαρακτηριστικών των ζυμών στην αντοχή σε χαμηλές θερμοκρασίες.

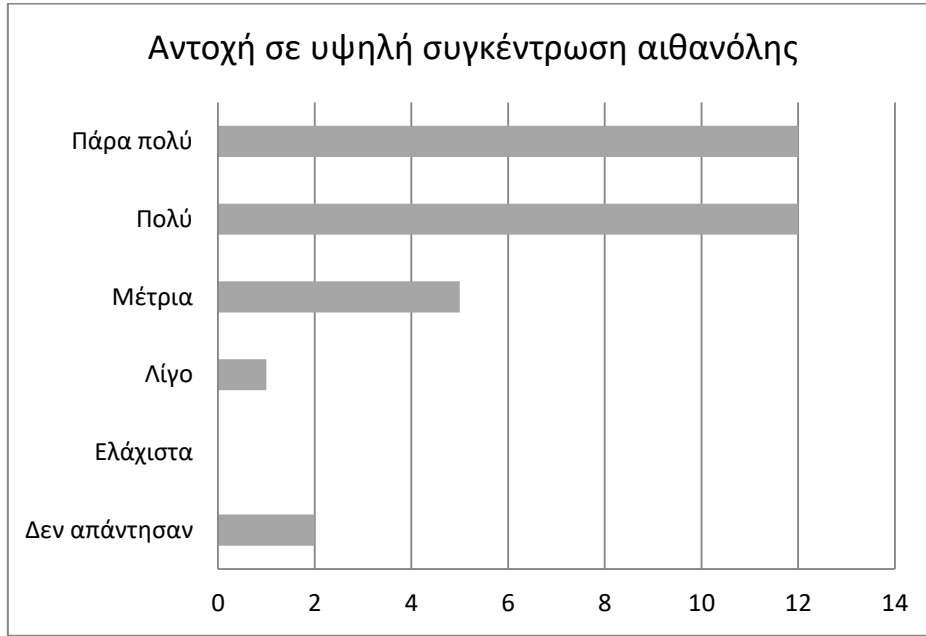


Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

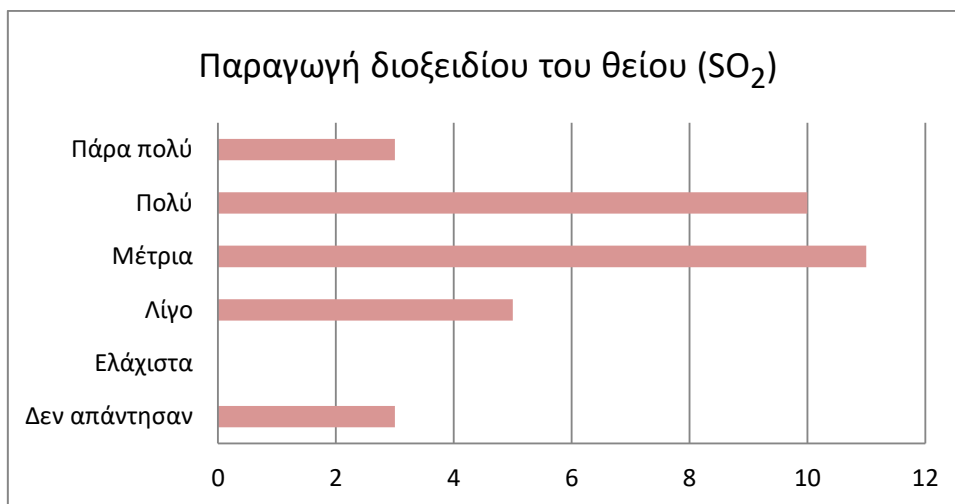
**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

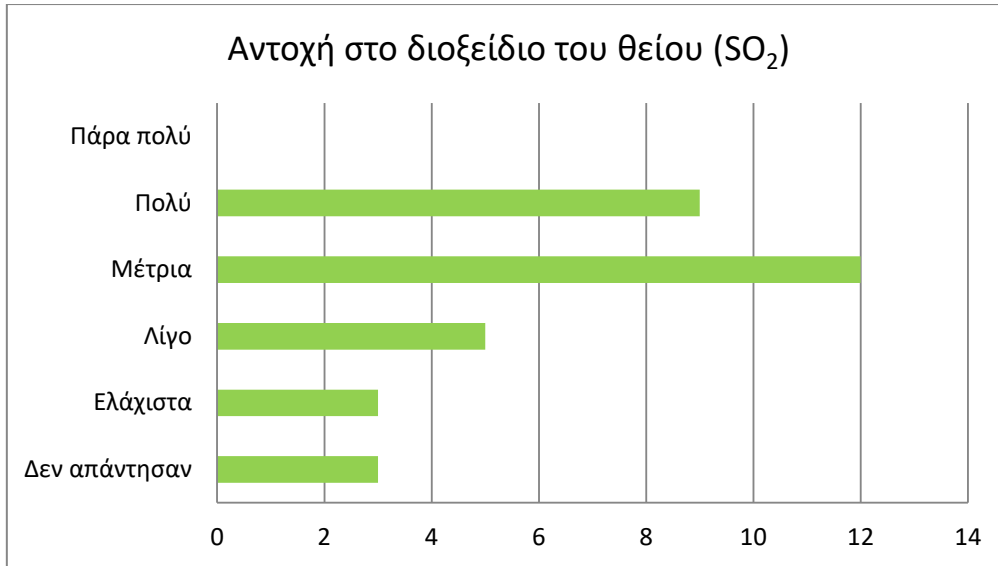


Σχήμα 11. Αξιολόγηση της σημαντικότητας χαρακτηριστικών των ζυμών στην αντοχή σε υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης.

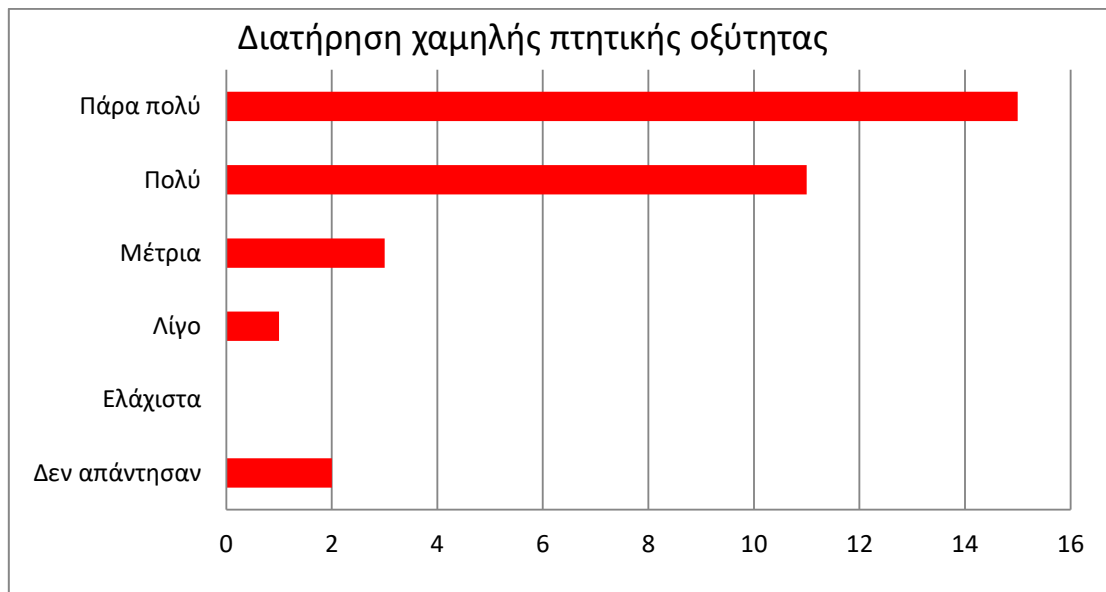


Σχήμα 12. Αξιολόγηση της σημαντικότητας χαρακτηριστικών των ζυμών στη παραγωγή διοξειδίου του θείου.

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



Σχήμα 13. Αξιολόγηση της σημαντικότητας χαρακτηριστικών των ζυμών στην αντοχή στο διοξείδιο του θείου.



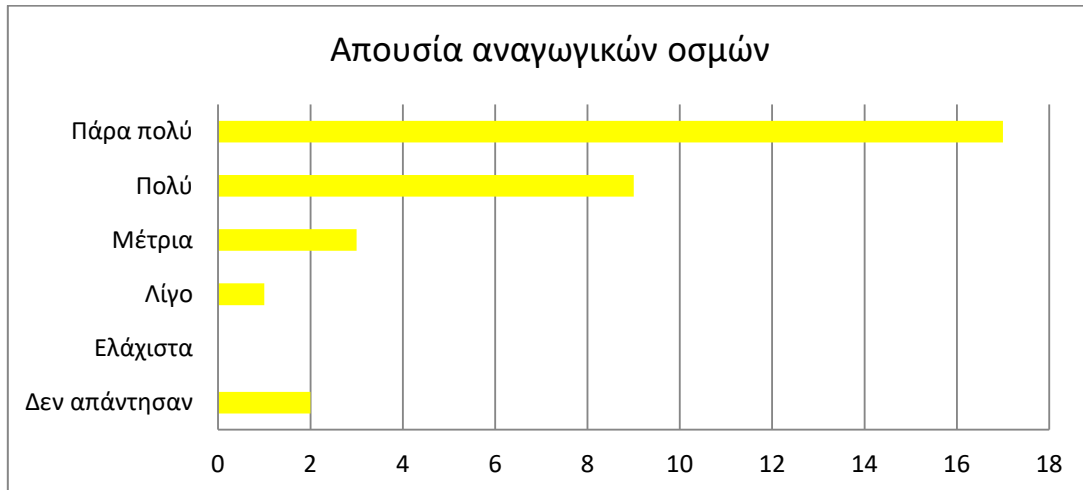
Σχήμα 14. Αξιολόγηση της σημαντικότητας χαρακτηριστικών των ζυμών στη διατήρηση χαμηλής πτητικής οξύτητας.



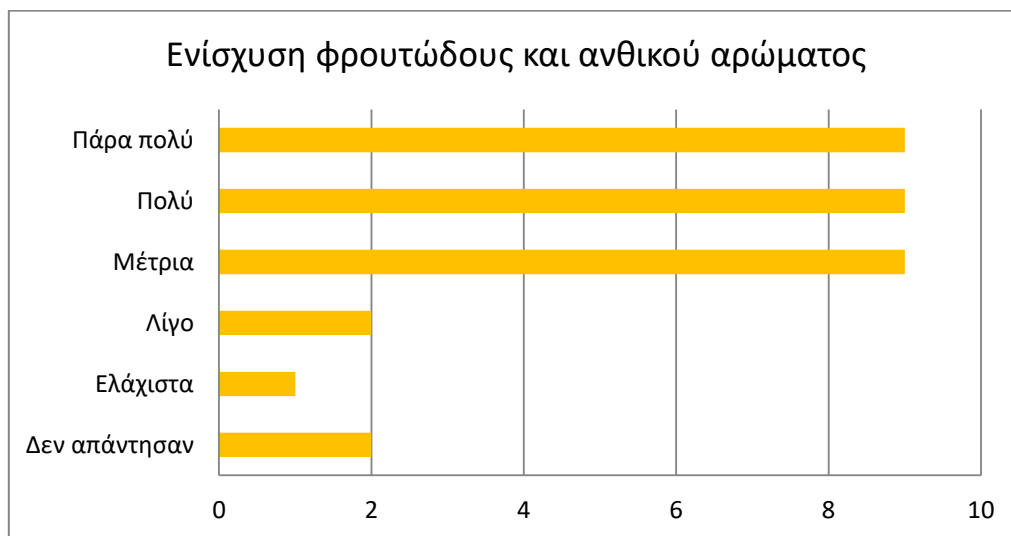
**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

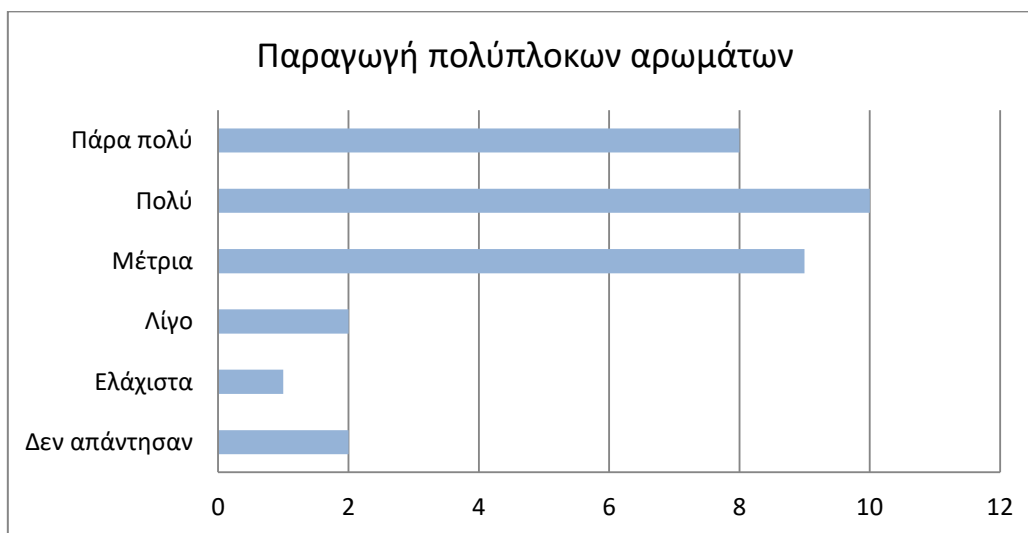


Σχήμα 15. Αξιολόγηση της σημαντικότητας χαρακτηριστικών των ζυμών στην απουσία αναγωγικών οσμών.

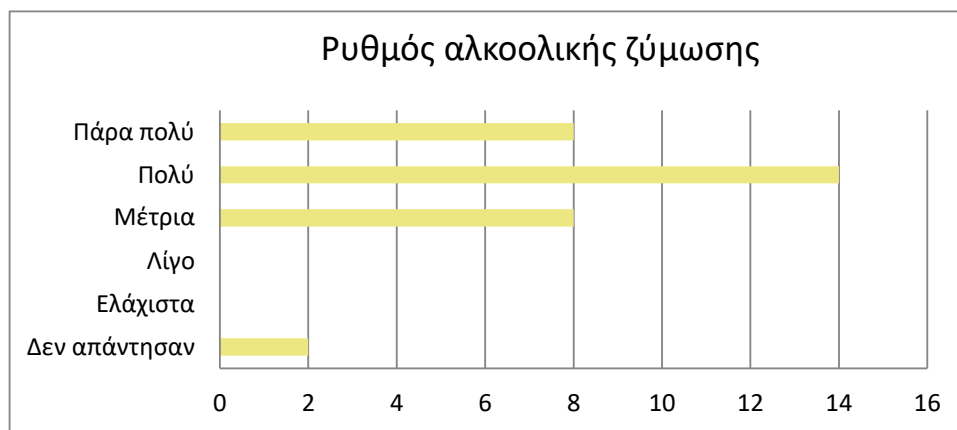


Σχήμα 16. Αξιολόγηση της σημαντικότητας χαρακτηριστικών των ζυμών στην ενίσχυση φρουτώδους και ανθικού αρώματος.

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

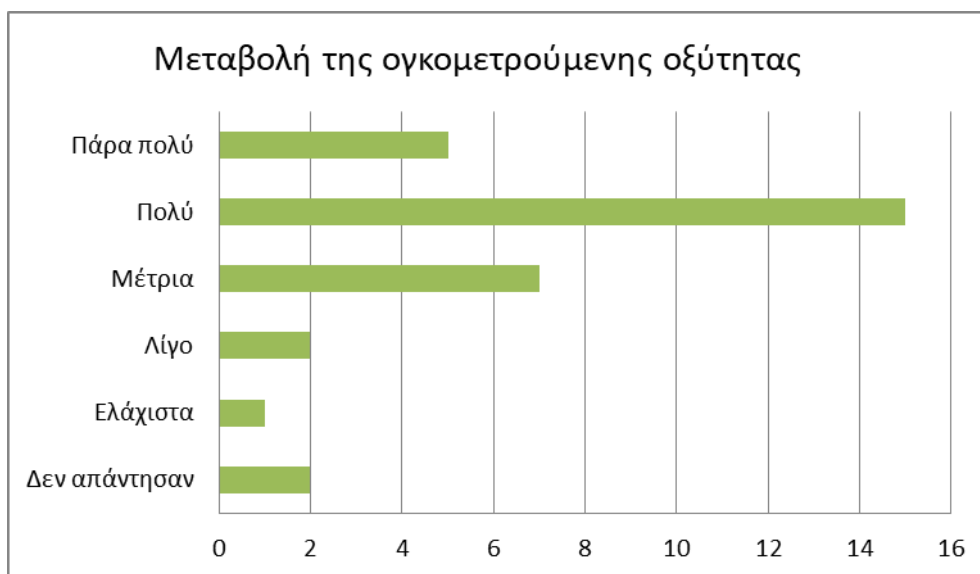


Σχήμα 17. Αξιολόγηση της σημαντικότητας χαρακτηριστικών των ζυμών στην παραγωγή πολύπλοκων αρωμάτων.

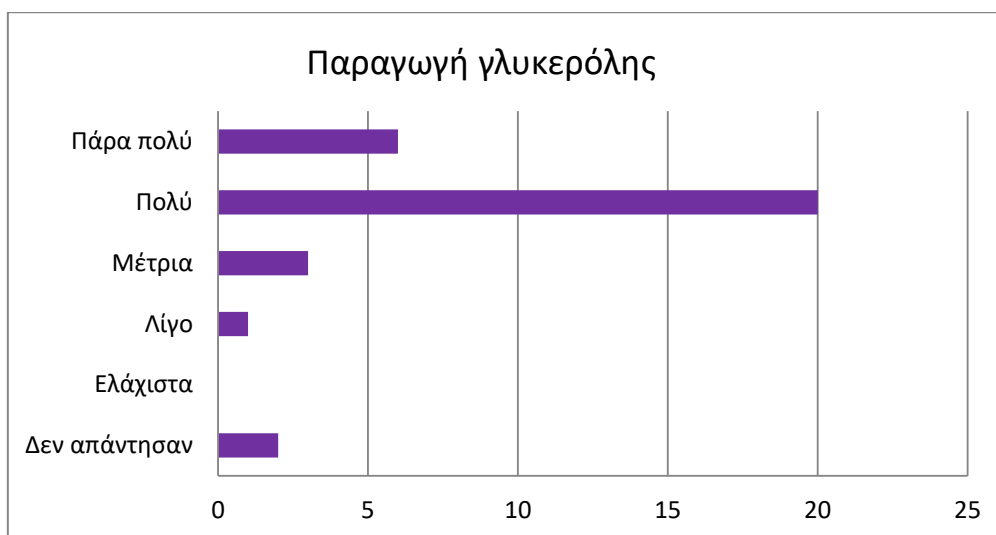


Σχήμα 18. Αξιολόγηση της σημαντικότητας χαρακτηριστικών των ζυμών στο ρυθμό αλκοολικής ζύμωσης.

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



Σχήμα 19. Αξιολόγηση της σημαντικότητας χαρακτηριστικών των ζυμών στη μεταβολή της ογκομετρούμενης οξύτητας.



Σχήμα 20. Αξιολόγηση της σημαντικότητας χαρακτηριστικών των ζυμών στη παραγωγή γλυκερόλης (λιπαρότητα, σώμα οίνου).

Η τελευταία ομάδα ερωτήσεων αφορούσε την αποδοχή της χρήσης ιθαγενών ζυμών από τις οινοποιητικές επιχειρήσεις. Τα ποσοστά ανταπόκρισης είναι πολύ καλά με το 97,0% να δηλώνει ότι θα χρησιμοποιούσε ιθαγενείς ζύμες (Σχήμα 21). Το 84,0% είναι θετικό στη συμμετοχή σε έρευνα για απομόνωση, αξιολόγηση και χρήση ιθαγενών ζυμών (Σχήμα 22) και το 75,0% είναι έτοιμα να διαθέσει και ίδιους πόρους



**ΕΠΑνΕΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ

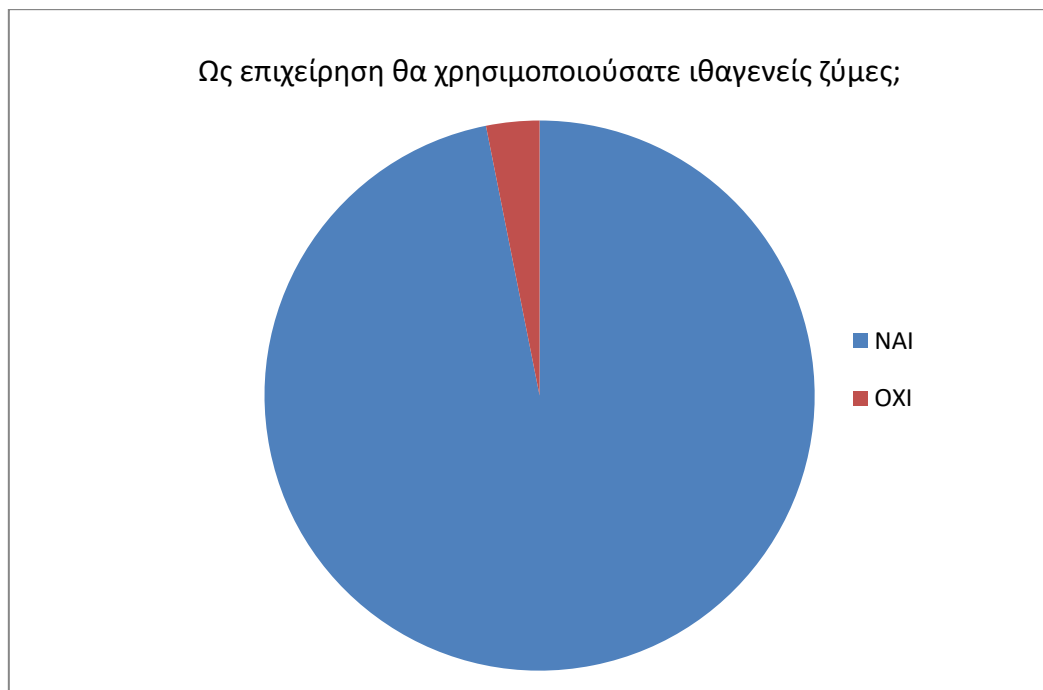


Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

για έρευνα (Σχήμα 23). Το 78,0% συμφωνεί με το να δημιουργηθεί ένα ειδικό σήμα στην ετικέτα ότι έχουν χρησιμοποιηθεί ιθαγενείς ζύμες (Σχήμα 24).

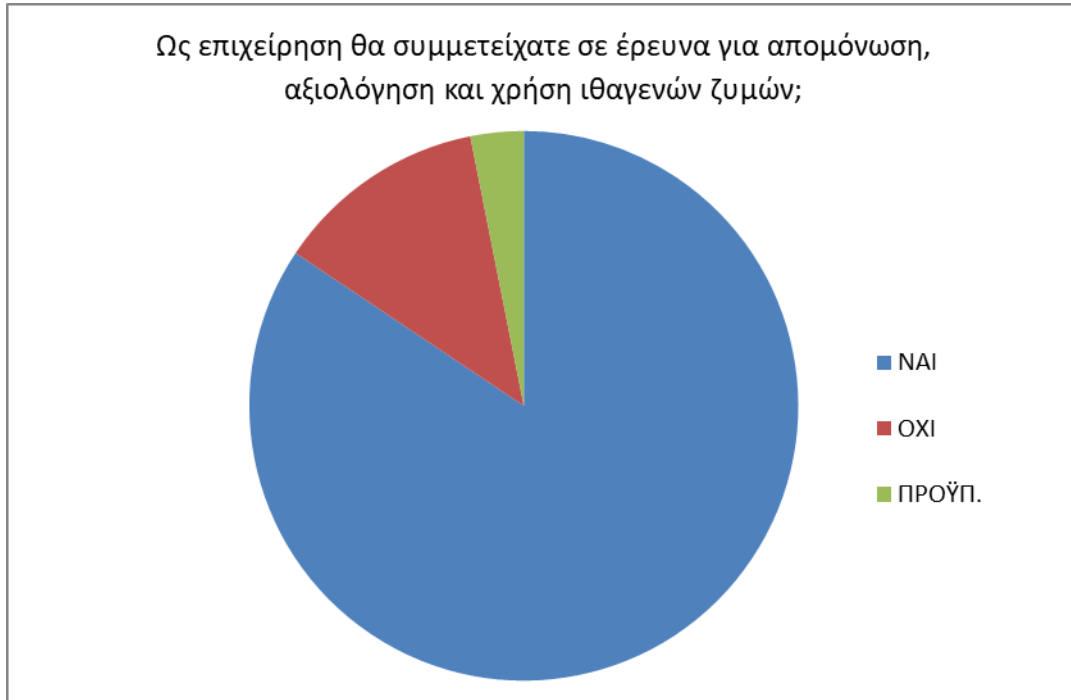
Κοινή θεώρηση των δύο ερευνών:

Είναι σαφές ότι τα εμπορικά σκευάσματα ζυμών υπερέχουν κατά πολύ στις δύο έρευνες αλλά παράλληλα υπάρχει και μια ισχυρή παρουσία χρήσης ιθαγενών ζυμών. Οι γνώμες για την παραγωγή ποιοτικού οίνου λόγω της συμβολής του αμπελότοπου (terroir), της ποικιλίας, των καλλιεργητικών και αμπελοτεχνικών τεχνικών, των ασθενειών και εντομών, των οινοποιητικών τεχνικών και της επιλογής των ζυμών είναι παραπλήσιες στις δύο έρευνες με κάποιες αποκλίσεις.

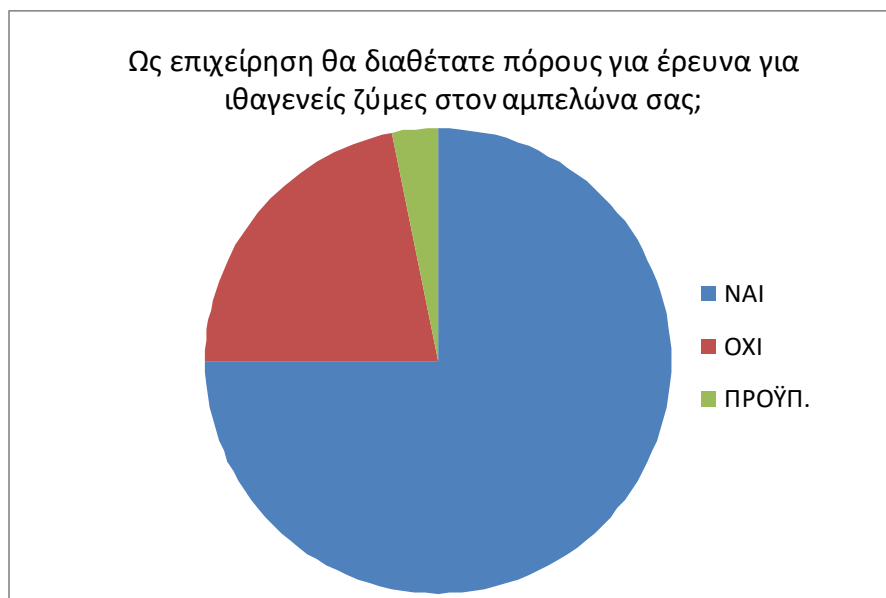


Σχήμα 21. Ανταπόκριση στο ερώτημα για την χρήση ιθαγενών ζυμών από τις επιχειρήσεις.

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



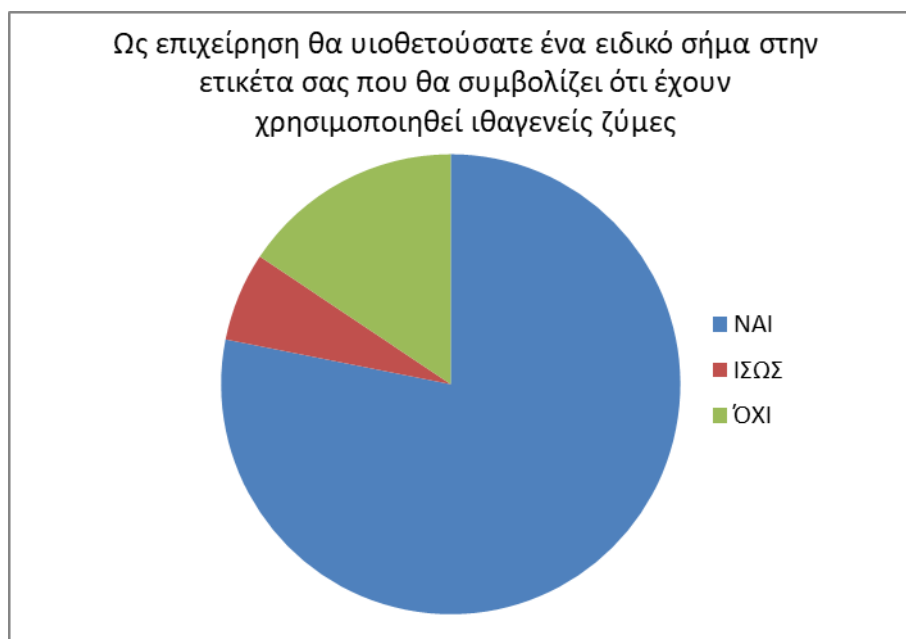
Σχήμα 22. Πρόθεση για συμμετοχή σε έρευνα για απομόνωση, αξιολόγηση και χρήση ιθαγενών ζυμών.



Σχήμα 23. Πρόθεση για διάθεση πόρων για έρευνα.



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



Σχήμα 24. Πρόθεση για χρήση ειδικού σήματος στη ετικέτα ότι έχουν χρησιμοποιηθεί ιθαγενείς ζύμες.

Εκεί που εντοπίζεται διαφορά είναι στο πως αξιολογείται η χρήση ιθαγενών ζυμών στην οινοποίηση όπου στη πρώτη έρευνα υπάρχουν και αρνητικές απόψεις (7,5%) ενώ οι ουδέτερες υπερτερούν, σε αντίθεση με τη δεύτερη έρευνα που οι θετικές γνώμες είναι 90,0%. Σε κάθε περίπτωση οι θετικές γνώμες συγκεντρώνουν ένα σημαντικό ποσοστό.

Η αξιολόγηση των χαρακτηριστικών των ζυμών για την παραγωγή ποιοτικού οίνου που αφορούσε την αντοχή σε χαμηλές θερμοκρασίες ανάμεσα στη πρώτη και δεύτερη έρευνα έδειξε ότι στη πρώτη η πολύ και πάρα πολύ σημαντική επίδραση ανήλθε στο 68,0% ενώ στη δεύτερη στο 47,0% με την μέτρια επίδραση να ανέρχεται στα 31,0%. Στην αντοχή σε υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης οι γνώμες ήταν σχεδόν παρόμοιες (πολύ και πάρα πολύ 42,0% και 27,0% για την πρώτη έρευνα και 37,0% και 37,0% αντίστοιχα για τη δεύτερη). Η σημαντικότητα της παραγωγής του διοξειδίου του θείου (SO<sub>2</sub>) στη πρώτη έρευνα εκτιμήθηκε ως μέτρια από το 41,0% και ως πολύ και πάρα πολύ 47,0% και στη δεύτερη 34,0% και 41,0% αντίστοιχα ενώ υπήρχαν και 15,0% γνώμες για λίγη. Στην αντοχή στο διοξείδιο του θείου (SO<sub>2</sub>) η πρώτη έρευνα δηλώθηκε η επίδραση των ζυμών ως μέτριας σημαντικότητας από το 42,0% και ως πολύ και πάρα πολύ 46,0% και στη δεύτερη η μέτρια 37,0% και 28,0% η πολύ, πάρα πολύ 0,0%, αντίστοιχα ενώ υπήρχαν και 25,0% γνώμες για ελάχιστη και λίγη επίδραση. Στη διατήρηση χαμηλής πτητικής οξύτητας οι δύο έρευνες έδειξαν



**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

παρόμοια αποτελέσματα με την σημαντικότητα να είναι ως πολύ και πάρα πολύ στο 86,0% και 81,0% για κάθε έρευνα ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά για την απουσία αναγωγικών οσμών ήταν 87,0% και 86,0%. Για την ενίσχυση φρουτώδους και ανθικού αρώματος οι γνώμες για μέτρια σημαντικότητα 21,0% και 28,0% για τη πρώτη και δεύτερη έρευνα αντίστοιχα και για το πολύ και πάρα πολύ 67,0% και 56,0% αντίστοιχα δείχνοντας τη σχετικά χαμηλή αναγνώριση της επίδρασης των ζυμών στο συγκεκριμένο χαρακτηριστικό από τους ερωτώμενους. Παρόμοια αποτελέσματα καταγράφηκαν περίπου και για τη παραγωγή πολύπλοκων αρωμάτων και του ρυθμού αλκοολικής ζύμωσης. Για τη μεταβολή της ογκομετρούμενης οξύτητας στο πρώτο κύκλο η σημαντικότητα της ήταν 46,0% μέτρια και πολύ και πάρα πολύ 44,0% ενώ στο δεύτερο κύκλο με διαφορετικά ποσοστά, δηλαδή 22,0% και 62,5% αντίστοιχα. Στη παραγωγή γλυκερόλης στη πρώτη έρευνα θεώρησε μέτρια σημαντικά την επίδραση των ζυμών το 16,0% και πολύ και πάρα πολύ σημαντικά το 77,0% ενώ το αντίστοιχο στην δεύτερη έρευνα ήταν 81,0%.

Στην ομάδα των ερωτημάτων για την χρήση των ιθαγενών ζυμών απάντησαν θετικά στο πρώτο κύκλο το 82,5 ενώ στον δεύτερο κύκλο το 97,0%. Η συμμετοχή της επιχείρησης σε έρευνα για απομόνωση, αξιολόγηση και χρήση ιθαγενών ζυμών στο πρώτο κύκλο συγκέντρωσε το 90,0% και στον δεύτερο κύκλο το 84,0%. Η ετοιμότητα για διάθεση πόρων για έρευνα με σκοπό την απομόνωση, αξιολόγηση και χρήση ιθαγενών ζυμών στον αμπελώνα σας είχε θετικές γνώμες πρώτο κύκλο 64,0% και 75,0% στο δεύτερο κύκλο. Στο ερώτημα αν η επιχείρηση θα υιοθετούσε ένα ειδικό σήμα στην ετικέτα που θα συμβολίζει ότι στον οίνο της έχουν χρησιμοποιηθεί ιθαγενείς ζύμες θετικά απάντησε το 64,0%, πρώτος κύκλος, και 78,0% στον δεύτερο κύκλο.

Από όλα τα παραπάνω μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η πλειοψηφία των ελληνικών οινοποιητικών επιχειρήσεων σε μεγάλο βαθμό αντιλαμβάνεται το ρόλο των ζυμών στην οινοποίηση και είναι ώριμη να χρησιμοποιήσει ιθαγενείς ζύμες, να συμμετέχει σε έρευνα και να τη χρηματοδοτήσει. Η χρήση ειδικού σήματος στην ετικέτα συγκεντρώνει ένα ιδιαίτερα ικανοποιητικό ποσοστό που σημαίνει ότι αξίζει η διερεύνησή του.



**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

## 5.2.2: Κοστολόγηση της συλλογής, αξιολόγησης και χρήσης ιθαγενών ζυμών

Ακολουθεί υπολογισμός κόστους απομόνωσης και αξιολόγησης ζυμών οινοποίησης. Η προσέγγιση του κόστους για τον εντοπισμό αποτελεσματικών ζυμομυκήτων οινοποίησης περιλαμβάνει βασικά στάδια του προγράμματος OENOVATION τα οποία συνοπτικά περιγράφονται:

1. Δειγματοληψία κατά τη διεργασία της αυθόρμητης οινοποίησης
2. Απομόνωση νέων στελεχών ζυμών
3. Μοριακός χαρακτηρισμός/ταυτοποίηση και οινολογικά χαρακτηριστικά των στελεχών ζυμών
4. Μελέτη των φυσιολογικών και βιο-κινητικών χαρακτηριστικών των νέων ζυμών
5. Αξιολόγηση με μικρο-οινοποιήσεις και γευσιγνωσία.

Από την εμπειρία που αποκτήθηκε κατά την υλοποίηση των διαφόρων ΕΕ του προγράμματος, προσεγγιστικά υπολογίζεται ότι θα χρειαστούν 2 δειγματοληψίες στο γλεύκος το οποίο υφίσταται μια αυθόρμητη οινοποίηση μιας ποικιλίας σταφυλής, μια στην αρχή της ζυμωτικής διεργασίας και μια στο τέλος αυτής. Υπολογίζεται, και με βάση τα δεδομένα τα οποία ελήφθησαν στην ΕΕ1 ότι θα μπορούσαν να απομονωθούν περί τις 100 διαφορετικές αποικίες, οι μισές περίπου από την αρχή της ζυμωτικής διεργασίας και οι μισές στο τέλος αυτής. Εάν υποτεθεί ότι τα πειραματικά δεδομένα τα οποία ελήφθησαν στην ΕΕ1 θα ακολουθούσαν και σε αντίστοιχες περιπτώσεις απομόνωσης μικροοργανισμών προερχόμενων από αυθόρμητες ζυμώσεις γλευκών διαφόρων ποικιλιών σταφυλής, θα μπορούσε να είναι αναμενόμενο ότι περί το 60-65% των απομονώσεων θα άνηκε στο είδος *Saccharomyces cerevisiae*, ενώ το 35-40% σε άλλα γένη / είδη μικροοργανισμών non-*Saccharomyces*. (Στη συγκεκριμένη εργασία ευρέθη ότι τα είδη *Pichia membranifaciens* και *Nakazawaea ishiwadae* είναι τα κυρίαρχα είδη μικροοργανισμών non-*Saccharomyces*). Από τα αποτελέσματα επίσης που ελήφθησαν, με ένα χονδρικό υπολογισμό θεωρείται ότι περίπου ένα 30% των απομονωμένων μικροοργανισμών *Saccharomyces cerevisiae* (βλέπε sub-cluster C του Σχήματος 23 στην ΕΕ 1) θα μπορούσε να έχει ικανοποιητική / πολύ ικανοποιητική ζυμωτική ικανότητα. Θα πρέπει να αναφερθεί ότι στα πλαίσια του παρόντος προγράμματος, ευρέθησαν και στελέχη του είδους *Nakazawaea ishiwadae* με εξαιρετική ζυμωτική ικανότητα, πλην όμως δεν θεωρείται σκόπιμο να



**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

πραγματοποιηθεί κοστολόγιο για παραγωγή οίνου χρησιμοποιώντας τον ανωτέρω μικροοργανισμό. Περαιτέρω, στα πλαίσια του προγράμματος πραγματοποιήθηκε εκτενές screening σε >15 άγρια στελέχη του μικροοργανισμού *Saccharomyces cerevisiae* σε υποστρώματα με υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης και >50% των μελετηθέντων στελεχών, έδειξε υψηλή ζυμοτική ικανότητα. Από την άλλη πλευρά όμως, μεταξύ των στελεχών τα οποία υπέστησαν «screening» σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης, υπήρχαν και εμπορικές καλλιέργειες (π.χ. στελέχη Passion Fruit, X5, κλπ). Ως εκ τούτου μια τιμή περίπου που αναφέρθηκε στα προηγούμενα εδάφια, ήτοι του 30% των απομονωμένων μικροοργανισμών του είδους *Saccharomyces cerevisiae*, που να αντιστοιχεί σε περίπου 20% όλων των απομονώσεων που ελήφθησαν από το δείγμα της αυθόρμητης οινοποίησης, η οποία να εμφανίζει υψηλή ζυμοτική ικανότητα, θα μπορούσε να μην αποκλίνει πολύ από την αλήθεια. Συνελόντι ειπείν, περίπου 20 στελέχη από τα αρχικώς περίπου 100 που απομονώθηκαν, όλα ανήκοντα στο είδος *Saccharomyces cerevisiae*, θα μπορούσαν να θεωρηθούν ως εν δυνάμει «ικανά» να φέρουν εις πέρας μια «high gravity fermentation» σε γλεύκος αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων  $\geq 240$  g/L, παράγοντας τελικώς οίνο. Από τα 20 τελικώς στελέχη στα οποία αναφερθήκαμε, θεωρείται ότι τα 6-9 καλύτερα στελέχη θα αξιολογηθούν τελικά με μικρο-οινοποιήσεις σε σύγκριση με μάρτυρες (εμπορικά στελέχη ως το Passion Fruit, το X5, κλπ) και από αυτά θα επιλεγούν 2-4 ως τα πιο ικανά για μια επιτυχημένη εμπορική οινοποίηση.

Το κοστολόγιο κάθε σταδίου υπολογίζεται κατά προσέγγιση ως εξής (θεωρείται ότι η εργασία θα τελεστεί από ένα σχετικά πεπειραμένο Γεωπόνο / Χημικό / Οινολόγο ο οποίος θα αμείβεται με  $\approx 2.000$  € μικτά το μήνα, η κάθε εργατο-ημέρα είναι μια ημέρα πλήρους απασχόλησης, και ο μήνας έχει 23 εργάσιμες ημέρες).

Συμπερασματικά με τη μέχρι τώρα αποκτηθείσα εμπειρία από την έρευνα η απομόνωση ζυμομυκήτων προς εμπορική οινοποίηση εκτιμάται ότι ανέρχεται στα  $\approx 3500$  € (Πίνακας 1).

Σημειώνεται ότι η δημιουργία συλλογών ζυμομυκήτων, που θα έχουν μελετηθεί τα χαρακτηριστικά τους στις φάσεις 2-4, μπορεί να προσφέρει ένα έτοιμο δυναμικό που να αξιολογηθεί απ' ευθείας στη φάση 5 με την αντίστοιχη ποικιλία. Αυτή η προοπτική θα μπορεί να μειώσει κατά πολύ το σχετικό κόστος τη όλης διεργασίας, (περίπου κατά 50%), αφού οι φάσεις 1, 2, 3 και 4 θα μπορούσαν να ελλείπουν.



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

**ΕΠΑνΕΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Πίνακας 1. Αναλυτική κοστολόγηση ανά φάση απομόνωσης ζυμομυκήτων προς εμπορική οινοποίηση

Φάση	Περιγραφή φάσης	Εργατο- ημέρα	Κόστος (€)
1	Δειγματοληψία σε κατά τη διαδικασία της ζύμωσης	≈2	≈175
2	Απομόνωση νέων στελεχών ζυμών	≈4	≈350
3	Μοριακός χαρακτηρισμός/ταυτοποίηση και οινολογικά χαρακτηριστικά των στελεχών ζυμών	≈4	≈350
4	Μελέτη των φυσιολογικών και βιο-κινητικών χαρακτηριστικών των νέων ζυμών	≈10	≈870
5	Αξιολόγηση με μικρο-οινοποιήσεις και γευσιγνωσία	≈20	≈1750
Σύνολο			≈3500



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



ανάπτυξη - εργασία - αλληλεγγύη

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- K. Basa, S. Papanikolaou, M. Dimopoulou, A. Terpou, S. Kallithraka, G. Nychas, Trials of Commercial- and Wild-Type *Saccharomyces cerevisiae* Strains under Aerobic and Microaerophilic/Anaerobic Conditions: Ethanol Production and Must Fermentation from Grapes of Santorini (Greece) Native Varieties, *Fermentation* (2022), Volume 8, Page 249.
- N.J. Berthels, R.R. Cordero Otero, F.F. Bauer, J.M. Thevelein, I.S. Pretorius, Discrepancy in glucose and fructose utilisation during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains, *FEMS Yeast Research* (2004), Volume 4, Pages 683–689.
- D. Buick, M. Holdstock, The relationship between acetic acid and volatile acidity, *Tech. Rev* (2003), Volume 143, Pages 39-43.
- J. de Klerk, Succinic acid production by wine yeasts, Thesis (MScAgric (Viticulture and Oenology))--University of Stellenbosch, 2010.
- J. Drappier, C. Thibon, A. Rabot, L. Geny-Denis, Relationship between wine composition and temperature: Impact on Bordeaux wine typicity in the context of global warming-Review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (2019), Volume 59, Pages 14-30.
- R. Gawel, S. Sluyter, E. Waters, The effects of ethanol and glycerol on the body and other sensory characteristics of Riesling wines, *Australian Journal of Grape and Wine Research* (2007), Volume 13, Pages 38-45.
- D. Kechagia, Y. Paraskevopoulos, E. Symeou, M. Galiotou-Panayotou, Y. Kotseridis, Influence of Prefermentative Treatments to the Major Volatile Compounds of Assyrtiko Wines, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2008), Volume 56, Pages 4555-63.
- F. Remize, J. L. Roustan, J. M. Sablayrolles, P. Barre, S. Dequin, Glycerol Overproduction by Engineered *Saccharomyces cerevisiae* Wine Yeast Strains Leads to Substantial Changes in By-Product Formation and to a Stimulation of Fermentation Rate in Stationary Phase, *Applied and Environmental Microbiology* (1999), Volume 65, Pages 143-9.
- J. Ribereau-Gayon, E. Peynaud, P. Sudraud, P. Ribereau-Gayon (1972) *Trait' e d'Œnologie*, Vol. III: Vinifications, Transformations du Vin. Dunod, Paris.
- B.W. Zoecklein, K.C. Fugelsang, B.H. Gump, F.S. Nury, 1995. *Wine Analysis and Production*. Chapman & Hall, New York.



**Ευρωπαϊκή Ένωση**  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

**ΕΠΑνεΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης