

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

Π.Μ.Σ «Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή του Ανθρώπου»

Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

&

Ελληνικός Οργανισμός «ΔΗΜΗΤΡΑ»

Εργαστήριο Οίνου

Τίτλος Μεταπτυχιακής Εργασίας:

Απομόνωση και ταυτοποίηση της ενδογενούς βακτηριακής
μικροχλωρίδας από αμπελώνες των ζωνών παραγωγής των οίνων ΠΟΠ
«Νεμέα» και ΠΟΠ «Πεζά»

Μεταπτυχιακή φοιτήτρια:

Ιφιγένεια Α. Παλάντζα-Βλαχάκη

Υπεύθυνος Καθηγητής:

Γ.Ι. Νυχάς

Επιβλέπουσα:

Δρ. Ασπασία Νησιώτου

Αθήνα, Ιούνιος 2013

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

Π.Μ.Σ «Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή του Ανθρώπου»

Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

&

Ελληνικός Οργανισμός «ΔΗΜΗΤΡΑ»

Εργαστήριο Οίνου

Τίτλος Μεταπτυχιακής Εργασίας:

Απομόνωση και ταυτοποίηση της ενδογενούς βακτηριακής
μικροχλωρίδας από αμπελώνες των ζωνών παραγωγής των οίνων ΠΟΠ
«Νεμέα» και ΠΟΠ «Πεζά»

Μεταπτυχιακή φοιτήτρια:

Ιφιγένεια Α. Παλάντζα-Βλαχάκη

Υπεύθυνος Καθηγητής:

Γ.Ι. Νυχάς

Επιβλέπουσα:

Δρ. Ασπασία Νησιώτου

Αθήνα, Ιούνιος 2013

Τίτλος Μεταπτυχιακής Εργασίας:

Απομόνωση και ταυτοποίηση της ενδογενούς βακτηριακής
μικροχλωρίδας από αμπελώνες των ζωνών παραγωγής των οίνων ΠΟΠ
«Νεμέα» και ΠΟΠ «Πεζά»

Μεταπτυχιακή φοιτήτρια:

Ιφιγένεια Α. Παλάντζα-Βλαχάκη

Υπεύθυνος Καθηγητής:

Γ.Ι. Νυχάς

Επιβλέπουσα:

Δρ. Ασπασία Νησιώτου

Εξεταστική Επιτροπή:

Καθηγητής Γ.Ι. Νυχάς

Επίκουρος Καθηγητής Ε. Πανάγου

Αναπληρωτής Καθηγητής Ε. Δροσινός

Στους γονείς μου με πολλή αγάπη,

ΠΡΟΛΟΓΟΣ-ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα Μεταπτυχιακή Μελέτη αποτελεί μέρος του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και διατροφή του Ανθρώπου», του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και συγκεκριμένα, του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων. Ο υπεύθυνος καθηγητής για τη Μεταπτυχιακή Μελέτη ήταν ο Κος Γ.Ι. Νυχάς. Η Μελέτη εκπονήθηκε στον Ελληνικό Οργανισμό «ΔΗΜΗΤΡΑ» και συγκεκριμένα στο εργαστήριο οίνου, υπό την καθοδήγηση της Δρ. Ασπασίας Νησιώτου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω και τους δύο για την ευκαιρία που μου δώσανε να επεκτείνω τις γνώσεις μου πάνω σε ένα νέο, για μένα, γνωστικό αντικείμενο και να αποκτήσω σημαντικές εμπειρίες. Επίσης, τους ευχαριστώ για την καθοδήγηση και την υποστήριξη στην πορεία της Μελέτης αυτής. Εκτός από τη Δρ. Ασπασία Νησιώτου, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου οίνου για το συνεργατικό και ευχάριστο περιβάλλον εργασίας.

Ξεχωριστά θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου, στους οποίους αφιερώνω και την Μελέτη αυτή, για την σημαντική καθοδήγηση, υποστήριξη και αγάπη σε όλη την πορεία. Επίσης, την αγαπημένη μου αδερφή Θωμαΐς και τους φίλους μου. Ιδιαίτερα ευχαριστώ την Ιωάννα και τον Αριστοτέλη για τις χαρούμενες εργαστηριακές αναμνήσεις.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τίτλος: Απομόνωση και ταυτοποίηση της ενδογενούς βακτηριακής μικροχλωρίδας από αμπελώνες των ζωνών παραγωγής των οίνων ΠΟΠ «Νεμέα» και ΠΟΠ «Πεζά».

Τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος είναι υπεύθυνα για τη διεξαγωγή της μηλογαλακτικής ζύμωσης στον οίνο. Σαν διαδικασία αφορά στη μετατροπή του μηλικού οξέος σε γαλακτικό, μέσω αποκαρβοξυλίωσης, η οποία καταλήγει σε μικρή αύξηση του pH (Bartowsky *et al.*, 2002; Henick-Kling, 1993; Henschke, 1993; Lonvaud-Funel, 2002). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι προσδίδει στον οίνο θετικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, βελτιώνοντας τη γεύση και την υφή, αλλά και μικροβιολογική σταθερότητα (Agouridis *et al.*, 2005; Costantini *et al.*, 2009; López *et al.*, 2011; Maicas, 2001; Malherbe *et al.*, 2012). Αν και το κύριο βακτήριο της μηλογαλακτικής ζύμωσης ανήκει στο είδος *Oenococcus oeni*, (Costantini *et al.*, 2009; Liu, 2002; Versari *et al.*, 1999), έρευνες έχουν δείξει ότι, είδη των γενών *Lactobacillus* και *Pediococcus* καταφέρνουν να προσαρμοστούν ικανοποιητικά και, σε μερικές περιπτώσεις, να αναπτυχθούν πιο αποτελεσματικά από το *Oenococcus oeni*, πριν ακόμα ολοκληρωθεί η αλκοολική ζύμωση (du Plessis *et al.*, 2004; Izquierdo, Ruiz, Sesepa and Palop, 2009; Ribireau-Gayon, Glories, Maujean and Dubourdieu, 2000).

Τα τελευταία χρόνια, άρχισε να γίνεται όλο και μεγαλύτερο το ενδιαφέρον των οινοποιών, αλλά και της ερευνητικής κοινότητας, για τις αυθόρμητες ζυμώσεις οίνων. Αυτό γιατί, αντίθετα από τις κατευθυνόμενες ζυμώσεις, κατά τις αυθόρμητες ζυμώσεις αναπτύσσονται ενδογενή είδη του αμπελώνα που μπορεί να προσδώσουν ιδιαίτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά στους παραγόμενους οίνους. Όπως και στην περίπτωση της αλκοολικής ζύμωσης όμως, έτσι και στην αυθόρμητη μηλογαλακτική ζύμωση, δεν μπορεί να ελεγχθεί ποια είδη βακτηρίων θα είναι παρόντα στη διαδικασία και ποια τελικά θα καταφέρουν να επιβιώσουν στο πέρας της αλκοολικής ζύμωσης, ώστε αν καταστεί δυνατό να την πραγματοποιήσουν. Όποιο και αν είναι τελικά το αποτέλεσμα, η χρήση εναρκτήριων καλλιεργειών επιλεγμένων ενδογενών ζυμών ή / και βακτηρίων για τη διεξαγωγή των ζυμωτικών διαδικασιών, αποτελεί ένα πολύ ενδιαφέρον εγχείρημα, το οποίο δύναται να καταλήξει σε παραγωγή οίνου με τονισμένα τα χαρακτηριστικά της γεωγραφικής περιοχής προέλευσης, το λεγόμενο μικροβιολογικό terroir (Ruiz, *et al.*, 2010).

Γι' αυτό το λόγο, η ταυτοποίηση και ο χαρακτηρισμός των αυτόχθονων ειδών αποτελεί μία διαδικασία πρωταρχικής σημασίας, για την εύρεση ειδών / στελεχών με οινολογικό δυναμικό. Μεταξύ των διαφόρων μεθόδων ταυτοποίησης που αναπτύχθηκαν τα τελευταία χρόνια, οι πιο ταχείες και αξιόπιστες μέθοδοι στηρίζονται στην αρχή της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR), (*Delley et al., 2002; Roy et al., 2001; Ventura et al., 2001*).

Ο σκοπός της συγκεκριμένης μεταπτυχιακής μελέτης ήταν αρχικά η απομόνωση αυτόχθονων βακτηρίων από δείγματα γλεύκους, τα οποία υποβλήθηκαν σε αυθόρμητη ζύμωση, από δύο ζώνες παραγωγής οίνων ΠΟΠ, στην Κρήτη και στη Νεμέα και στη συνέχεια, η ταυτοποίησή τους σε επίπεδο είδους, με χρήση μοριακών τεχνικών. Ο απώτερος στόχος ήταν η εύρεση αυτόχθονων βακτηριακών ειδών με δυνατότητα επιβίωσης, κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης και δυνατότητα πραγματοποίησης, σε ένα μετέπειτα στάδιο, της μηλογαλακτικής ζύμωσης.

Γι' αυτό το σκοπό, αυτόχθονα βακτήρια απομονώθηκαν από 14 δείγματα γλεύκους, προερχόμενα από τη ζώνη παραγωγής οίνων ΠΟΠ των Πεζών, στην Κρήτη, και από 31 δείγματα γλεύκους, προερχόμενα από τη ζώνη παραγωγής οίνων ΠΟΠ της Νεμέας, στην Πελοπόννησο. Στην περίπτωση της ζώνης των Πεζών, τα δείγματα προέρχονταν από τις ποικιλίες Βηλάνα, Κοτσιφάλι και Μαντηλάρι, ενώ στην περίπτωση της ζώνης της Νεμέας, από την ποικιλία Αγιωργίτικο. Οι απομονώσεις έλαβαν χώρα σε τρία στάδια της αυθόρμητης αλκοολικής ζύμωσης, τα οποία αντιστοιχούσαν στην αρχή (στάδιο BF), στη μέση (στάδιο MF) και στο τέλος (στάδιο EF) αυτής και έπειτα σε ένα ακόμα στάδιο, μετά το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης, για τη μελέτη της μηλογαλακτικής (στάδιο MLF). Για την ταυτοποίηση στελεχών, που απομονώθηκαν, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της ανάλυσης περιορισμού του ενισχυμένου 16S ριβοσωμικού DNA (16S amplified ribosomal DNA restriction analysis - ARDRA)), (*Rodas, Ferrer and Pardo, 2003*). Για το διαχωρισμό των βακτηριακών ειδών *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* και *Lactobacillus paraplantarum*, χρησιμοποιήθηκε επιπλέον μία πολλαπλή (multiplex) PCR, (*Torriani, Felis and Dellaglio, 2001*). Τέλος, για την επιβεβαίωση των προτύπων που ταυτοποιήθηκαν, ένας αντιπρόσωπος από την ομάδα του κάθε βακτηριακού είδους, υποβλήθηκε σε ανάλυση αλληλούχισης.

Από τα 125 συνολικά στελέχη Gram θετικών και αρνητικών στην καταλάση βακτηρίων, που απομονώθηκαν από τη ζώνη των Πεζών και από τα 254 συνολικά, που απομονώθηκαν από τη ζώνη της Νεμέας, προέκυψαν 7 είδη βακτηρίων (*Streptococcus* sp., *Lactococcus lactis*, *Weissella minor*, *Staphylococcus epidermidis*, *Lactobacillus graminis*, *Pediococcus pentosaceus* και *Lactobacillus plantarum*). Από τα 7 αυτά είδη, τα 5 (*Streptococcus* sp., *Lactococcus lactis*, *Weissella minor*, *Staphylococcus epidermidis* και *Lactobacillus graminis*) δεν θεωρήθηκε ότι δύνανται να παίξουν σημαντικό ρόλο στη μηλογαλακτική ζύμωση. Τα είδη *Pediococcus pentosaceus* και *Lactobacillus plantarum*, από την άλλη, δύνανται να θεωρηθούν τα πιο ανθεκτικά στις αφιλόξενες συνθήκες της αλκοολικής ζύμωσης (χαμηλό pH, υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης, κ.α.) από τα 7 που απομονώθηκαν. Το είδος *Pediococcus pentosaceus* απομονώθηκε απ' όλα τα στάδια της ζυμωτικής διαδικασίας, με μεγαλύτερη παρουσία στα πρώτα δύο στάδια της αλκοολικής ζύμωσης (στάδιο BF και στάδιο MF). Τέλος, το είδος *Lactobacillus plantarum*, παρουσιάζεται ως το υπερέχον απομονωμένο βακτηριακό είδος, καθώς απομονώθηκε σε επαρκή πληθυσμό απ' όλα τα στάδια της ζυμωτικής διαδικασίας, εκτός του σταδίου BF, ενώ υπερίσχυσε και στο στάδιο της αποζύμωσης, αλλά και της μηλογαλακτικής ζύμωσης, και στις δύο γεωγραφικές περιοχές. Αν και το πιο ανθεκτικό βακτήριο της κατηγορίας, το είδος *Oenococcus oeni*, δεν απομονώθηκε από κανένα δείγμα της συγκεκριμένης μελέτης.

Συμπερασματικά, τα είδη *Pediococcus pentosaceus* και *Lactobacillus plantarum* παρουσιάζουν μεγάλη ικανότητα επιβίωσης καθ' όλη τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης. Η παρουσία τους και μετά το πέρας αυτής, ίσως υποδηλώνει και την ικανότητα τους να λάβουν ενεργό ρόλο στην μηλογαλακτική ζύμωση, που ακολουθεί. Περαιτέρω έρευνα απαιτείται για την ταυτοποίηση / διάκριση των απομονώσεων σε επίπεδο στελέχους και την αξιολόγηση των τεχνολογικών τους χαρακτηριστικών.

Λέξεις κλειδιά: Μηλογαλακτική ζύμωση, Βακτήρια του Γαλακτικού Οξέος, Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης, Ανάλυση Περιορισμού του Ενισχυμένου 16S Ριβοσωμικού DNA.

ABSTRACT

Title: Isolation and identification of the indigenous bacterial microflora from vineyards of wine-producing zones PDO "Nemea" and PDO "Peza".

Lactic acid bacteria are responsible for conducting the malolactic fermentation in wine. As a process, refers to the conversion of malic acid to lactic acid via decarboxylation, resulting in a slight increase in pH (*Bartowsky et al., 2002; Henick-Kling, 1993; Henschke, 1993; Lonvaud-Funel, 2002*). Furthermore, it has been shown that malolactic fermentation provides the wine with positive organoleptic characteristics, improving the taste and texture, and microbiological stability (*Agouridis, Bekatorou, Nigam and Kanellaki, 2005; Costantini et al., 2009; López et al., 2011; Maicas, 2001; Malherbe et al., 2012*). While the main bacterium for completing malolactic fermentation belongs to the species of *Oenococcus oeni*, (*Costantini et al., 2009; Liu, 2002; Versari et al., 1999*), studies have shown that species of the genera *Lactobacillus* and *Pediococcus* manage to adapt to and in some cases, to develop more effectively than *Oenococcus oeni*, even before completion of the alcoholic fermentation (*du Plessis et al., 2004; Izquierdo, Ruiz, Sesera and Palop, 2009; Ribireau-Gayon, Glories, Maujean and Dubourdiou, 2000*).

In recent years, winemakers, as well as research community, have started to become more and more concerned for the spontaneous fermentation of wines. This is because, unlike the guided fermentations, during spontaneous fermentations the developed indigenous species of the vineyard, can impart the organoleptic characteristics of the wine. As in the case of spontaneous alcoholic fermentations, in spontaneous malolactic fermentations, the types of bacteria that will be present in the process and that they will eventually manage to survive, at the end of alcoholic fermentation, so, if it becomes possible, to perform malolactic, can't be controlled. Whatever the final result, the use of starter cultures of selected indigenous yeasts and / or bacteria in order to carry out fermentative processes, is a very interesting project, which may result in production of wine with accented characteristics of the geographical area of origin, the so called microbiology terroir (*Ruiz, et al., 2010*).

For this reason, the identification and characterization of indigenous species is a vital process for finding species / strains with enological potential. Among the various identification methods developed in recent years, the most rapid and reliable methods

are based on the principle of polymerase chain reaction (PCR), (*Delley et al., 2002; Roy et al., 2001; Ventura et al., 2001*).

The purpose of this Master Thesis was firstly the isolation of the indigenous bacteria from grape samples, which underwent spontaneous fermentation, from two wine-producing areas PDO “Peza” and “Nemea” and then their identification to species level using molecular techniques. The ultimate goal was to find indigenous bacterial species that could survive, during alcoholic fermentation, and that could possibly carry out, in a subsequent step, the malolactic fermentation.

For this purpose, indigenous bacteria were isolated from 14 must samples derived from the wine-producing zone PDO “Peza”, in Crete, and from 31 must samples, derived from the wine-producing zone PDO “Nemea”, in Peloponnese. In the case of Peza zone, the samples came from the varieties Vilana, Kotsifali and Mandilari, whereas in the zone of Nemea, from the variety Aghiorghitiko. Isolation took place in three stages, during spontaneous alcoholic fermentation, which corresponded to the beginning (stage BF), to the middle (stage MF) and to the end (stage EF) of the procedure and then in one more stage, after alcoholic fermentation, in order to study malolactic fermentation (stage MLF). For the identification of the isolated strains, the technique of 16S amplified ribosomal DNA restriction analysis - ARDRA (*Rodas, Ferrer and Pardo, 2003*), was used. For the separation of bacterial species *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus paraplantarum*, an additional multiple PCR, (*Torriani, Felis and Dellaglio, 2001*) was used. Finally, in order to confirm the patterns identified, a representative from the group of each bacterial species was subjected to sequencing analysis.

From the overall 125 strains of Gram positive and catalase-negative bacteria, isolated from the Peza zone and of the overall 254, isolated from the zone of Nemea, 7 species of bacteria (*Streptococcus* sp., *Lactococcus lactis*, *Weissella minor*, *Staphylococcus epidermidis*, *Lactobacillus graminis*, *Pediococcus pentosaceus* and *Lactobacillus plantarum*) were emerged. 5 of these 7 species (*Streptococcus* sp., *Lactococcus lactis*, *Weissella minor*, *Staphylococcus epidermidis* and *Lactobacillus graminis*) weren't considered to play an important role in the malolactic fermentation. The species *Pediococcus pentosaceus* and *Lactobacillus plantarum*, on the other hand, were considered as the most resistant to the harsh conditions of alcoholic fermentation (low

pH, high ethanol concentration, etc.). The species *Pediococcus pentosaceus* was isolated from all stages of the fermentation process, with greater presence in the first two stages of alcoholic fermentation (stage BF and stage MF). Finally, the species *Lactobacillus plantarum*, was presented as the overriding isolated bacterial species, as it was isolated in sufficient population from all stages of the fermentation process, except from the stage BF, while was prevailed in stage EF and stage MLF, in both geographic areas. Although the most resistant species in this category, *Oenococcus oeni*, wasn't isolated from any sample in this study.

In conclusion, the species *Pediococcus pentosaceus* and *Lactobacillus plantarum* showed high survival ability throughout the course of alcoholic fermentation. Their continuous presence after the stage EF, may indicate their ability to take an active role in the malolactic fermentation, which follows. Further research is needed to identify / distinguish isolates at the strain level and to assess their technological characteristics.

Keywords: Malolactic Fermentation, Lactic Acid Bacteria, Polymerase Chain Reaction, 16S Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis – ARDRA.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	16
1.1. Τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος στον οίνο	17
1.1.1. Η ταξινόμηση τους	17
1.1.2. Μεταβολισμός των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος	19
1.1.2.1. Το διακετύλιο και άλλες αρωματικές μεταβολικές ενώσεις	22
1.2. Τα βακτήρια του οξικού οξέος στον οίνο	22
1.3. Οι νηματοειδείς μύκητες στον οίνο	23
1.4. Οι ζύμες στον οίνο	25
1.5. Η ζυμωτική διαδικασία – Αλκοολική και μηλογαλακτική ζύμωση	27
1.5.1. Τα αυτόχθονα είδη και οι μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις	28
1.6. Η ταυτοποίηση των βακτηρίων και η σημασία της	29
1.6.1. Φυσιολογικές και βιοχημικές μέθοδοι ταυτοποίησης	29
1.6.2. Μοριακές μέθοδοι ταυτοποίησης	30
2. ΣΚΟΠΟΣ	33
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	35
3.1. ΥΛΙΚΑ	36
3.1.1. Θρεπτικά υλικά	36
3.1.2. Διαλύματα	36
3.2. ΜΕΘΟΔΟΙ	37
3.2.1. Συλλογή, μεταφορά και αποθήκευση των δειγμάτων σταφυλιών	37
3.2.2. Απαρίθμηση αποικιών βακτηρίων	38
3.2.3. Χρώση κατά Gram και τεστ καταλάσης	39

3.2.4. Απομόνωση των βακτηρίων	40
3.2.5. Ταυτοποίηση των βακτηρίων σε επίπεδο είδους μέσω της ανάλυσης περιορισμού της ενισχυμένης 16S ριβοσωμικής υποπεριοχής (16S amplified ribosomal DNA restriction analysis - ARDRA)	40
3.2.6. Πολλαπλή (Multiplex) PCR για τη διαφοροποίηση των ειδών <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus paraplantarum</i> και <i>Lactobacillus pentosus</i>	41
3.2.7. Ανάλυση αλληλούχισης του DNA	43
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	46
4.1. Τα υπό μελέτη δείγματα μούστου	47
4.2. Απομόνωση βακτηριακής μικροχλωρίδας	48
4.3. Ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους των βακτηρίων γαλακτικού οξέος	50
4.3.1. Ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους μέσω της ανάλυσης περιορισμού της ενισχυμένης 16S ριβοσωμικής υποπεριοχής (16S amplified ribosomal DNA restriction analysis - ARDRA)	50
4.3.2. Ο καθαρισμός του DNA και η προετοιμασία για την αλληλούχιση του	53
4.3.3. Διαφοροποίηση των ειδών <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus paraplantarum</i> και <i>Lactobacillus pentosus</i>	54
4.4. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα	56
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	62
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	69

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1	18
Εικόνα 1.2	19
Εικόνα 1.3	20
Εικόνα 1.4	21
Εικόνα 1.5	23
Εικόνα 1.6	24
Εικόνα 1.7	26
Εικόνα 1.8	31

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 4.1	48
Πίνακας 4.2	49
Πίνακας 4.3	57
Πίνακας 4.4	60

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 4.1	51
Σχήμα 4.2	51
Σχήμα 4.3	52
Σχήμα 4.4	53
Σχήμα 4.5	54
Σχήμα 4.6	55

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

Γράφημα 4.1	58
Γράφημα 4.2	59

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

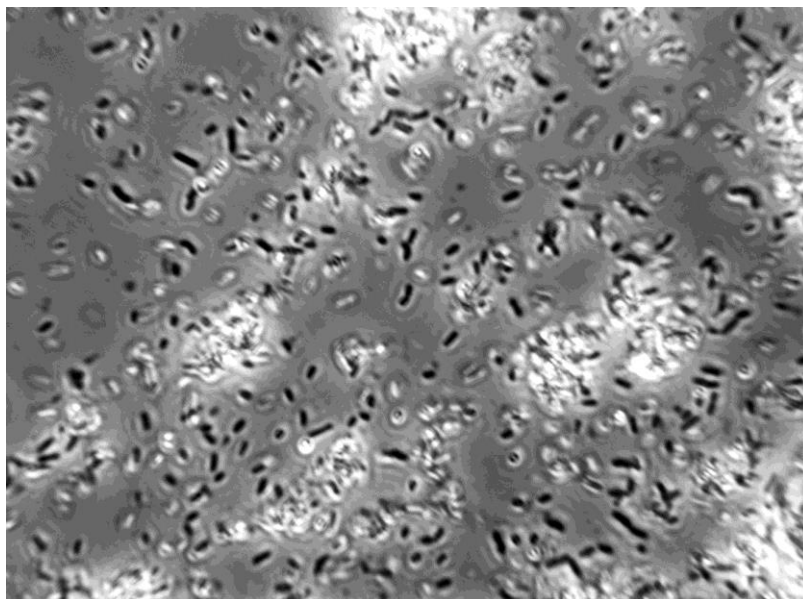
1.1. Τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος στον οίνο

Τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος στον οίνο, αποτελούν μία οικολογικά ποικιλόμορφη ομάδα Gram θετικών, αρνητικών στην καταλάση, μη σποριογόνων μικροοργανισμών, που χαρακτηρίζονται, ανάλογα με το μεταβολικό μονοπάτι που ακολουθούν, ως ομοζυμωτικά ή ως ετεροζυμωτικά είδη. Είναι υπεύθυνα για την αύξηση του pH και τη θετική τροποποίηση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του οίνου, όπως η γεύση, μέσω της αποκαρβοξυλίωσης του μηλικού οξέος σε γαλακτικό, το οποίο αποτελεί το κύριο προϊόν του μεταβολισμού τους, από την κατανάλωση των σακχάρων του μούστου, κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση (*Carr et al., 2002; Fugelsang and Edwards, 2007; Henick-Kling, 1993; Liu, 2002; Lonvaud-Funel, 1999*). Παρ' όλα αυτά, δεν έχουν μόνο θετική επιρροή πάνω στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου, δεδομένου ότι κάποια είδη της κατηγορίας, δύναται να παράγουν μεταβολικά προϊόντα με αρνητική επιρροή στην ποιότητα αυτού. Δύο παραδείγματα αποτελούν οι βιογενείς αμίνες και το καρκινογενές αιθυλο-καρβαμικό (*Lonvaud-Funel, 1999; Mira de Orduña et al., 2000*).

1.1.1. Η ταξινόμηση τους

Τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος αποτελούν μέρος της μικροχλωρίδας των σταφυλιών και του γλεύκους, όπως και του ευρύτερου περιβάλλοντος στον αμπελώνα, αλλά και στο οινοποιείο. Ανήκουν στις οικογένειες *Lactobacillaceae* και *Streptococcaceae*, οι οποίες αντιπροσωπεύονται από τα γένη *Lactobacillus* και *Oenococcus – Pediococcus* αντίστοιχα (*Fugelsang and Edwards, 2007*).

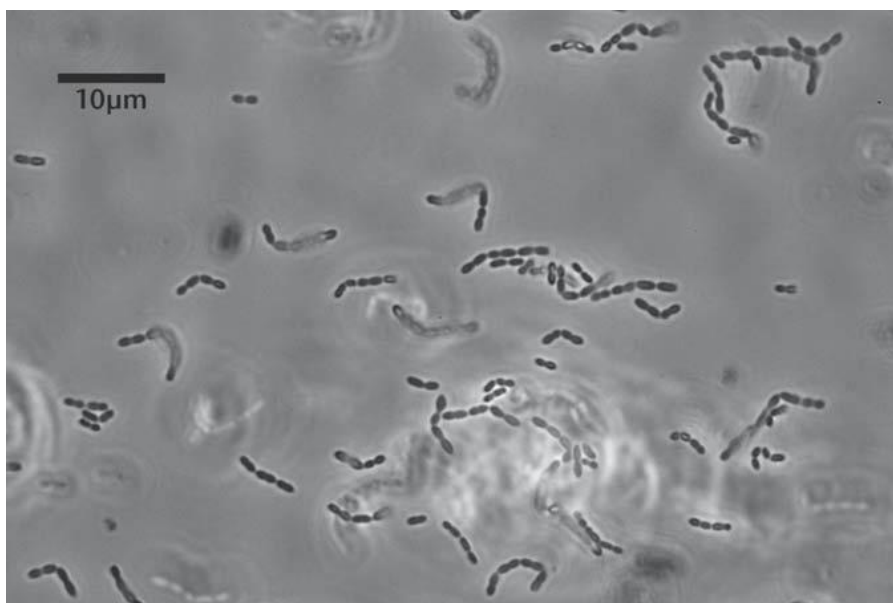
Εικόνα 1.1: Το είδος *Lactobacillus plantarum* όπως εμφανίζεται σε μικροσκόπιο αντίθετης φάσης (Enology Access).



Στο γένος *Lactobacillus* ανήκουν Gram θετικά, αρνητικά στην καταλάση, μικροαερόφιλα βακτήρια τα οποία έχουν ραβδοειδή μορφή ή σχήμα κοκκοβάκιλλου (Εικόνα 1.1) και όσον αφορά στα μεταβολικά τους μονοπάτια, είναι ομοζυμωτικά ή ετεροζυμωτικά. Στο γένος *Oenococcus* ανήκει το βακτηριακό είδος *Oenococcus oeni* (Εικόνα 1.2), τα στελέχη του οποίου είναι Gram θετικά, αρνητικά στην καταλάση, δυνητικά αναερόβια βακτήρια, τα οποία έχουν σφαιρική ή ελλειψοειδή μορφή και συνήθως παρατηρούνται σε ζεύγη ή σε αλυσίδα. Όσον αφορά στα μεταβολικά τους μονοπάτια, ανήκουν στα ετεροζυμωτικά είδη με τον καταβολισμό συγκεκριμένων υδατανθράκων, όπως είναι η φρουκτόζη, η ξυλόζη, η μαλτόζη, η γαλακτόζη και η ριβόζη, να διαφέρει από είδος σε είδος (Edwards et al., 1991). Ένα ευρέως γνωστό και πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό του συγκεκριμένου είδους, είναι η μεγάλη ανθεκτικότητα του στις συνθήκες που δημιουργούνται στο περιβάλλον του γλεύκους, κατά την αλκοολική ζύμωση, γεγονός που το κατατάσσει και στα σημαντικότερα είδη, εάν όχι το σημαντικότερο, για την επαγωγή της μηλογαλακτικής ζύμωσης, η οποία ακολουθεί την αλκοολική (Fugelsang and Edwards, 2007). Τέλος, στο δεύτερο γένος της οικογένειας *Streptococcaceae*, στο γένος *Pediococcus*, ανήκουν Gram θετικά, αρνητικά στην καταλάση, αερόβια ή μικροαερόφιλα βακτήρια, με τα

περισσότερα βακτήρια του γένους αυτού να παρουσιάζονται ομοζυμωτικά (*Pasteris and Strasser de Saad, 2005*).

Εικόνα 1.2: Το είδος *Oenococcus oeni* όπως εμφανίζεται σε μικροσκόπιο αντίθετης φάσης (*Fugelsang and Edwards, 2007*).



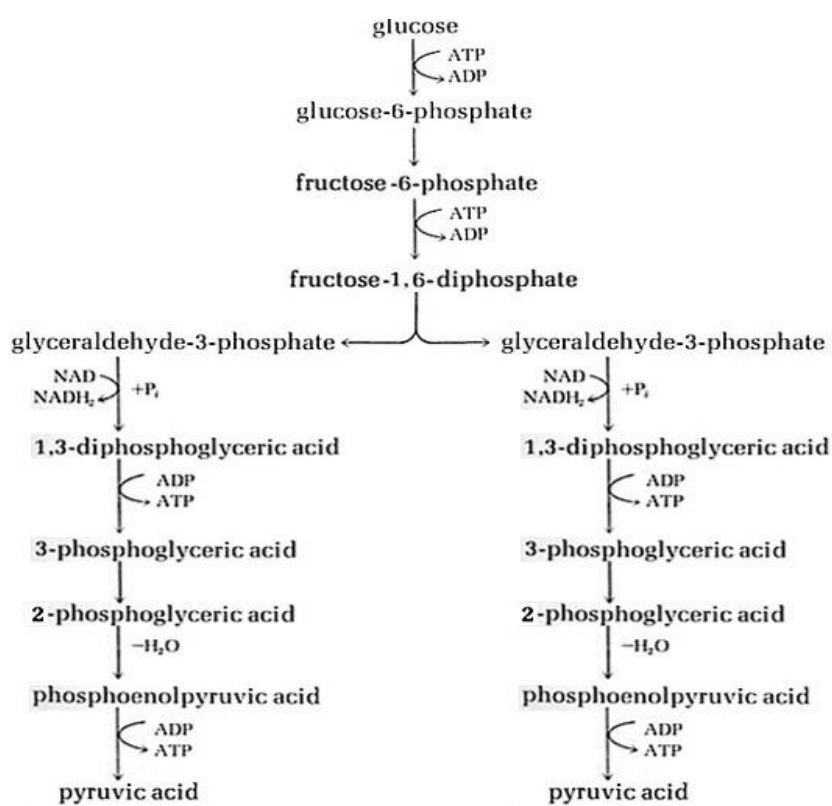
1.1.2. Μεταβολισμός των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος

Τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος παρουσιάζουν ελάχιστες βιοσυνθετικές ικανότητες και τα περισσότερα από τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά, που χρειάζονται, θα πρέπει να τα προμηθευτούν από το περιβάλλον. Βιταμίνες όπως το παντοθενικό οξύ, η θειαμίνη, το νικοτινικό οξύ και η ριβοφλαβίνη αποτελούν λίγα από τα θρεπτικά στοιχεία που απαιτούνται για την επιβίωση, αλλά και την ανάπτυξη τους. Συγκεκριμένα για τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος που παρατηρούνται στον οίνο, ο “χυμός ντομάτας” αποτελεί σημαντική πηγή θρεπτικών και χρησιμοποιείται ακόμα και στα τεχνικά θρεπτικά εργαστηριακά υποστρώματα, για την καλύτερη και πιο γρήγορη *in vitro* ανάπτυξη των βακτηρίων αυτών (*Fugelsang and Edwards, 2007*).

Μετά την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης, έρχεται η σειρά των βακτηρίων να λάβουν δράση και να αρχίσουν τον καταβολισμό των εναπομεινάντων σακχάρων

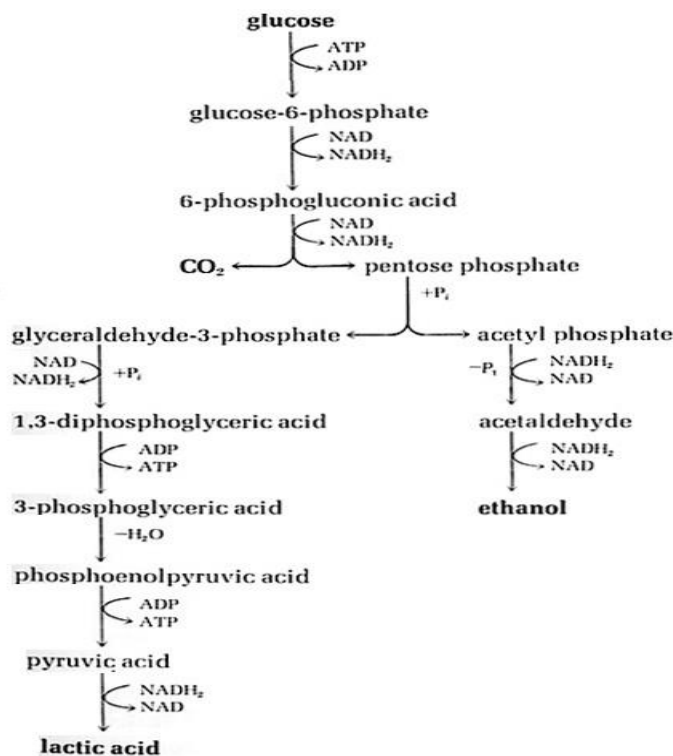
στον οίνο. Οι εξόζες που συνήθως βρίσκονται σε περίσσεια, είναι η γλυκόζη και η φρουκτόζη, ακολουθούμενες από τη μαννόζη και τη γαλακτόζη. Ανάλογα με τον τρόπο καταβολισμού, τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος χαρακτηρίζονται είτε ως ομοζυμωτικά, είτε ως ετεροζυμωτικά. Στην περίπτωση του ομοζυμωτικού καταβολικού μονοπατιού, η γλυκόζη μεταβολίζεται σε πυροσταφυλικό οξύ, μέσω του Embden–Meyerhof–Parnas μονοπατιού (Εικόνα 1.3), αποδίδοντας τελικά γαλακτικό οξύ (*Hofvendahl and Hahn–Hägerdal, 1999*). Αν και 1 mole γλυκόζης θα έπρεπε να αποδίδει 2 moles γαλακτικού οξέος, η πραγματική απόδοση είναι 1,8 moles γαλακτικού οξέος βακτηρίων (*Fugelsang and Edwards, 2007*). Παραδείγματα από υποχρεωτικά ομοζυμωτικά βακτήρια του γαλακτικού οξέος στον οίνο αποτελούν τα είδη *Lactobacillus delbrueckii* και *Lactobacillus jensenii*.

Εικόνα 1.3: Το Embden–Meyerhof–Parnas μονοπάτι ομοζυμωτικού μεταβολισμού των σακχάρων του οίνου, κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση (Online Textbook of Bacteriology).



Στον ετεροζυμωτικό καταβολισμό, ισομοριακές ποσότητες γαλακτικού οξέος, διοξειδίου του άνθρακα (CO₂) και αιθανόλης παράγονται από τον καταβολισμό της γλυκόζης, μέσω του μονοπατιού της φωσφοκετολάσης (Εικόνα 1.4). Αυτό το μονοπάτι χρησιμοποιείται από τα δυνητικά ετεροζυμωτικά βακτήρια, όπως το βακτήριο *Lactobacillus casei*, για τη ζύμωση των πεντοζών και από τα υποχρεωτικά ετεροζυμωτικά βακτήρια, όπως το βακτήριο *Lactobacillus brevis*, για τη ζύμωση των πεντοζών και των εξοζών (Axelsson, 1993). Εν αντιθέση με τα ομοζυμωτικά βακτήρια, τα ετεροζυμωτικά στερούνται το ένζυμο αλδολάση, αλλά παράγουν το ένζυμο φωσφοκετολάση, το οποίο είναι υπεύθυνο για τη διάσπαση της φωσφορικής-5-ξυλουλόξης (πεντόζη) και την παραγωγή φωσφορικής-3-γλυκεραλδεΐδης (πεντόζη) και ακετυλοφωσφορικού άλατος. Λόγω της βιοσύνθεσης πεντοζών, στο συγκεκριμένο μονοπάτι, κάποια βακτηριακά στελέχη δύνανται να καταβολίσουν τις πεντόζες που υπάρχουν στο περιβάλλον, γεγονός που δεν παρατηρείται στην περίπτωση των ομοζυμωτικών βακτηρίων (Fugelsang and Edwards, 2007).

Εικόνα 1.4: Το μονοπάτι της φωσφοκετολάσης ετεροζυμωτικού μεταβολισμού των σακχάρων του οίνου, κατά τη μηλογαλακτική ζύμωση (Online Textbook of Bacteriology).



1.1.2.1. Το διακετύλιο και άλλες αρωματικές μεταβολικές ενώσεις

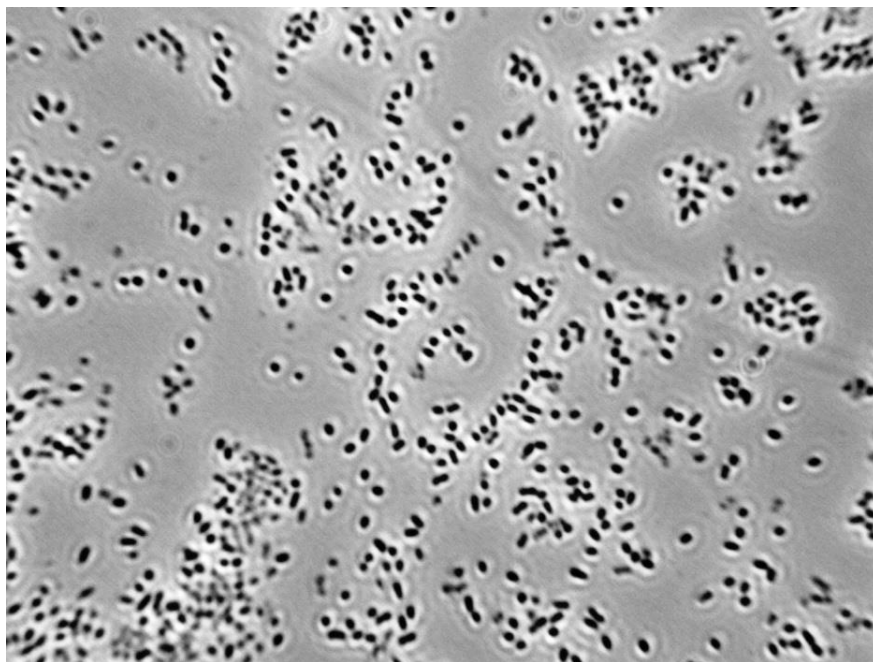
Μία πολύ σημαντική αρωματική ένωση, η οποία αποτελεί συχνά προϊόν μεταβολισμού των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος, είναι το διακετύλιο. Αν και η παρουσία του σε μικρές συγκεντρώσεις προσδίδει στον οίνο ένα θεμιτό άρωμα βουτύρου, η παραγωγή του σε μεγάλες συγκεντρώσεις αποτελεί σημάδι αλλοίωσης (Bartowsky and Henschke, 2004a; 2004b; Martineau and Henick-Kling, 1995a; 1995b; Nielsen and Richelieu, 1999; Rodriguez et al., 1990). Αν και ο *Oenococcus oeni*, ως το κατ' εξοχήν βακτήριο υπεύθυνο για τη διεξαγωγή της μηλογαλακτικής ζύμωσης, έχει αποδειχθεί ότι παράγει πολλές πτητικές ενώσεις, όπως το διακετύλιο, δεν είχε προταθεί, παρά μόνο πρόσφατα, η γενική θετική συμβολή της μηλογαλακτικής ζύμωσης στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου, προσδίδοντας άλλες φορές φρουτώδεις οσμές και γεύσεις και άλλες φορές οσμή και γεύση ζυμωτού ψωμιού ή σοκολάτας (Boido et al., 2002; Delaquis et al., 2000; Gambaro et al., 2001; Henick-Kling, 1995; Laurent et al., 1994; Nielsen and Richelieu, 1999; Pripis-Nicolau et al., 2004; Sauvageot and Vivier, 1997).

1.2. Τα βακτήρια του οξικού οξέος στον οίνο

Τα κύρια χαρακτηριστικά των βακτηρίων του οξικού οξέος, που τα διαχωρίζουν από τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος, είναι ότι χαρακτηρίζονται ως θετικοί στην καταλάση, αερόβιοι, Gram αρνητικοί μικροοργανισμοί. Ανήκουν στην οικογένεια *Acetobacteraceae* και τα δύο γένη στα οποία χωρίζονται είναι το γένος *Acetobacter* και *Gluconobacter* (Εικόνα 1.5). Ακόμα και σε αποδεδειγμένα καθαρές καλλιέργειες οξικών βακτηρίων, μπορεί να παρατηρηθεί μεγάλη ετερογένεια στα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά και να παρατηρηθούν μορφολογίες ελλειψοειδείς, ραβδοειδείς ή νηματοειδείς, που να σχηματίζουν ζεύγη ή αλυσίδες (Du Toit and Pretorius, 2002; Holt et al., 1994; Ruiz et al., 2000). Οι διατροφικές τους συνήθειες είναι παρόμοιες με των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος, αν και κάποια είδη της οικογένειας παρουσιάζονται πιο προσαρμοστικά, αξιοποιώντας το αμμώνιο και την αιθανόλη, ως πηγή αζώτου και άνθρακα αντίστοιχα, απουσία αμινοξέων στο περιβάλλον ανάπτυξης. Αν και αποτελούν αερόβιους μικροοργανισμούς, ακόμα και μικρή επαφή του οίνου με το εξωτερικό περιβάλλον δύναται να παίξει καταλυτικό ρόλο για την γρήγορη ανάπτυξη των βακτηρίων του οξικού οξέος και την αλλοίωση του οίνου. Ο

κύριος λόγος της αλλοίωσης είναι η οξείδωση της αιθανόλης, που έχει παραχθεί κατά τη διαδικασία της αλκοολικής ζύμωσης, σε οξικό οξύ (*Drysdale and Fleet, 1988; Du Toit and Pretorius, 2002*).

Εικόνα 1.5: Το είδος *Acetobacter pasteurianus* όπως εμφανίζεται σε μικροσκόπιο αντίθετης φάσης (Enology Access).

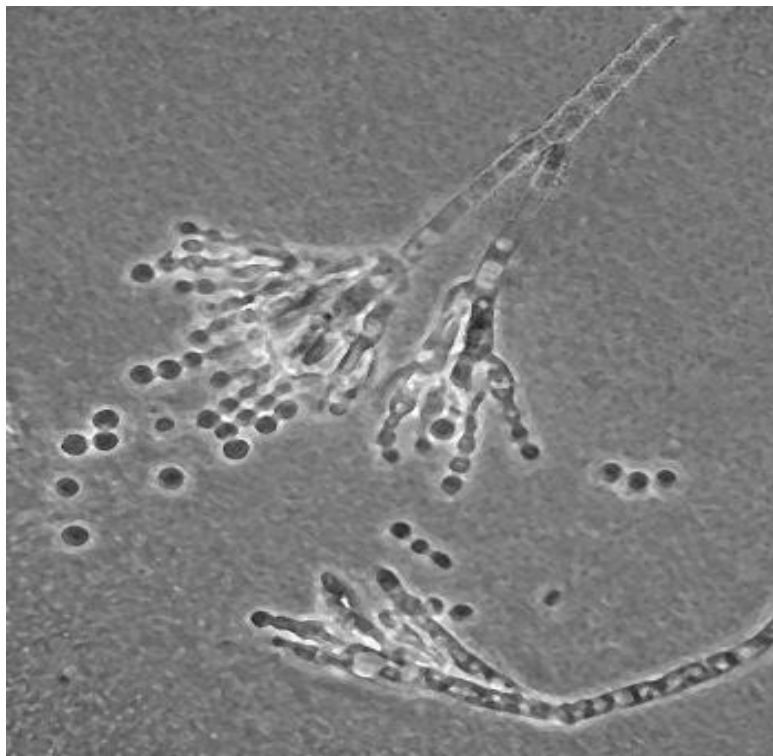


1.3. Οι νηματοειδείς μύκητες στον οίνο

Οι νηματοειδής μύκητες παρουσιάζονται ως αγενείς ή εγγενείς μυκηλιακές δομές, σε συνδυασμό με τα σπόρια τους (Εικόνα 1.6). Έχουν μικρές θρεπτικές απαιτήσεις, έχοντας την ικανότητα να μεταβολίζουν μία ποικιλία ενώσεων, ως πηγή άνθρακα και αζώτου και αν και θεωρούνται υποχρεωτικά αερόβιοι μικροοργανισμοί, έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να αντέξουν τις αναερόβιες συνθήκες αρκετά αποτελεσματικά (*Alur, 2000; Carlile et al., 2001*). Λόγω του ότι έχουν την ικανότητα να δημιουργούν σπόρια, όταν οι εξωτερικές συνθήκες δεν είναι κατάλληλες για την ανάπτυξη τους, μπορούν και μεταφέρονται από το εξωτερικό περιβάλλον, μέσω κυρίως των εντόμων και του αέρα στο εσωτερικό διαρρηγμένων και όχι απόλυτα υγιών ραγών σταφυλιών. Οι διαρρηγμένες ράγες, τις περισσότερες φορές, χάνουν

αρκετή ποσότητα από το νερό που υπάρχει κανονικά στο εσωτερικό τους, γεγονός που καταλήγει ακόμα και στο διπλασιασμό της συγκέντρωσης των σακχάρων. Έτσι, αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί, όπως οι νηματοειδείς μύκητες, μπορούν εύκολα να αναπτυχθούν στο εσωτερικό των ραγών και να επηρεάσουν τη χημική και τη μικροβιολογική σύσταση του γλεύκους. Οι νηματοειδείς μύκητες καταβολίζοντας σάκχαρα, μηλικό και τρυγικό οξύ, μειώνουν την ποσότητα των σακχάρων, που μπορούν να εκμεταλλευτούν οι ζυμωτικοί μικροοργανισμοί, αυξάνοντας ταυτόχρονα και το pH. Επίσης, ενθαρρύνουν την εξάπλωση των βακτηριών του οξικού οξέος και ζυμών που δεν ανήκουν στα ζυμωτικά είδη, επηρεάζοντας έμμεσα την ολοκλήρωση της ζυμωτικής διαδικασίας. (Mills, et al., 2008; Mortimer and Polsinelli, 1999). Έξι γένη που έχει αποδειχθεί ότι εμφανίζονται συχνά στα σταφύλια είναι τα γένη *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Geosmithia*, *Penicillium* και *Verticillium* (David A. Mills, et al., 2008; Fugelsang and Edwards, 2007).

Εικόνα 1.6: Το είδος *Penicillium chrysogenum* όπως εμφανίζεται σε μικροσκόπιο αντίθετης φάσης (Volk, 2003).

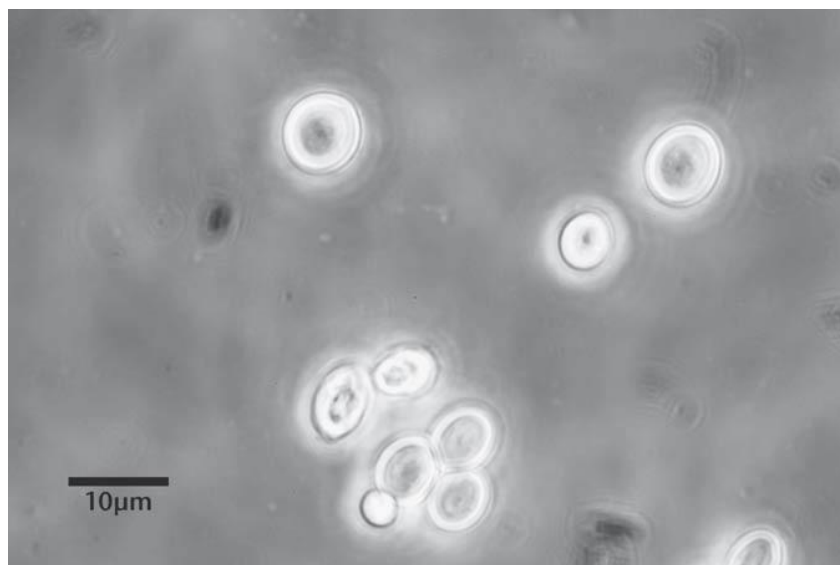


1.4. Οι ζύμες στον οίνο

Οι ζύμες αποτελούν μία από τις σημαντικότερες, αν όχι τη σημαντικότερη, ομάδα μικροοργανισμών στον οίνο. Αν και το γένος *Saccharomyces* παίζει πρωταρχικό ρόλο στην παραγωγή ποιοτικού οίνου, υπάρχουν πολλά ακόμα γένη και είδη, ζυμωτικά και μη με τα δικά τους ιδιαίτερα χαρακτηριστικά (Deak and Beuchat, 1996; Fleet and Heard, 1993; Fugelsang et al., 1993; Loureiro and Malfeito-Ferreira, 2003). Στα πρώτα στάδια της ζυμωτικής διαδικασίας επικρατούν είδη του γένους *Hanseniaspora spp.*, *Pichia spp.*, *Rhodotorula spp.* και *Kluyveromyces spp.*, τα οποία σύντομα αντικαθίστανται από το υπερέχον είδος *Saccharomyces cerevisiae*, το οποίο καταβολίζει τα σάκχαρα του μούστου, με κύριο μεταβολικό προϊόν την αιθανόλη και το διοξείδιο του άνθρακα (Fleet and Heard, 1993; Rib'ereau-Gayon, 1985). Αν και ο ρόλος των μη ζυμωτικών ειδών ζυμών στη ζυμωτική διαδικασία δεν είναι σημαντικός, δεν ισχύει το ίδιο και για τη συμβολή τους στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου, δεδομένου ότι παράγουν δευτερογενείς μεταβολίτες, οι οποίοι συμβάλλουν θετικά στη οσμή και στη γεύση αυτού (Mateo et al., 1991; Soden et al., 2000). Επιπλέον, δεν είναι λίγες οι έρευνες που έχουν αποδείξει ότι μέσω κάποιων εξωκυτταρικών ενζύμων, που παράγουν, δύναται να προσφέρουν στον οίνο χαρακτηριστικά, τα οποία να αφορούν τη γεωγραφική περιοχή παραγωγής του (Charoenchai et al., 1997; Pretorius et al., 1999; Rosi et al., 1994;).

Για τη ταξινόμηση τους, πολλοί οινολόγοι κάνουν χρήση των μορφολογικών ή άλλων χαρακτηριστικών τους και τις χωρίζουν σε ομάδες με άτυπα ονόματα. Ένας πολύ συχνός διαχωρισμός αφορά στη ζυμωτική τους ικανότητα και από εκεί προέρχονται από τη μία οι άγριες ζύμες, οι οποίες παίζουν ρόλο στην αρχή της διαδικασίας, και από την άλλη οι ζύμες του γένους *Saccharomyces* (Εικόνα 1.7), οι οποίες ολοκληρώνουν την αλκοολική ζύμωση. Στην ίδια αρχή στηρίζεται και ο διαχωρισμός των ζυμών σε ζυμωτικά και μη ζυμωτικά είδη.

Εικόνα 1.7: Το γένος *Saccharomyces* όπως εμφανίζεται σε μικροσκόπιο αντίθετης φάσης (*Fugelsang and Edwards, 2007*).



Όπως όλοι οι μικροοργανισμοί, έτσι και οι ζύμες απαιτούν έναν μεγάλο αριθμό θρεπτικών συστατικών για την αποτελεσματική ανάπτυξη τους, συμπεριλαμβανομένου του άνθρακα, του αζώτου και των βιταμινών. Για την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης, το σημαντικότερο ρόλο παίζει το άζωτο, του οποίου η αφομοίωση γίνεται κυρίως μέσω των αμινοξέων και άλλων ανόργανων πηγών όπως είναι το αμμώνιο (*Fugelsang and Edwards, 2007*). Αν και μπορούν κάλλιστα να αναπτυχθούν σε τελείως αναερόβιες συνθήκες, το οξυγόνο τους είναι απαραίτητο για τη σύνθεση συγκεκριμένων μεταβολιτών, όπως είναι η λανοστερόλη και η εργοστερόλη (*Ribireau-Gayon et al., 2000; Walker, 1998*). Μετά το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης, εκτός από την αιθανόλη και το διοξείδιο του άνθρακα (CO_2), παράγονται, μέσω του καταβολισμού των ζυμωτικών ζυμών, και μικρές ποσότητες παραπροϊόντων όπως είναι η γλυκερόλη, η ακεταλδεΐδη και το γαλακτικό οξύ, οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου (*Edwards et al., 1990; Herraizet et al., 1990; Lema et al., 1996; Nykanen, 1986; Rankine, 1967; Zeeman et al., 1982*).

1.5. Η ζυμωτική διαδικασία – Αλκοολική και μηλογαλακτική ζύμωση

Η αλκοολική ζύμωση αποτελεί την αρχή της ζυμωτικής διαδικασίας του γλεύκους. Οι μικροοργανισμοί που υπερέχουν πληθυσμιακά στην αρχή αποτελούν ποικιλία άγριων ζυμών (non-*Saccharomyces*), όπως είναι τα είδη *Kloeckera*, *Candida*, *Issatchenkia*, *Metschnikowia* και *Pichia*. Οι συνθήκες που δημιουργούνται κατά την αλκοολική ζύμωση, με τις δύο κύριες την αύξηση της συγκέντρωσης της αιθανόλης και τη μείωση της συγκέντρωσης του οξυγόνου, παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των μη ζυμωτικών ειδών και συντελούν στην εξάπλωση των ζυμών του γένους *Saccharomyces*, οι οποίες ολοκληρώνουν τη ζυμωτική διαδικασία (Deak and Beuchat, 1996; Hansen et al., 2001; Mauricio et al., 1991). Το επόμενο στάδιο, μετά την αλκοολική ζύμωση, είναι η μηλογαλακτική ζύμωση, η οποία πραγματοποιείται σε όλους τους ερυθρούς οίνους και σε μέρος των λευκών και αφρωδών οίνων. Σαν διαδικασία αφορά στη μετατροπή του μηλικού οξέος σε γαλακτικό, μέσω αποκαρβοξυλίωσης, η οποία καταλήγει σε μικρή αύξηση του pH (Bartowsky et al., 2002; Henick-Kling, 1993; Henschke, 1993; Lonvaud-Funel, 2002). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι προσδίδει στον οίνο θετικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, βελτιώνοντας τη γεύση και την υφή, αλλά και μικροβιολογική σταθερότητα (Agouridis, Bekatorou, Nigam and Kanellaki, 2005; Costantini et al., 2009; López et al., 2011; Maicas, 2001; Malherbe et al., 2012).

Το κύριο βακτήριο της μηλογαλακτικής ζύμωσης ανήκει στο είδος *Oenococcus oeni* (Renouf, Claisse and Lonvaud-Funel, 2007). Το σημαντικότερο από τα χαρακτηριστικά του είναι ότι καταφέρνει να επιβιώνει, αν και σε μειωμένο πληθυσμό, στις αφιλόξενες συνθήκες που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης (π.χ. χαμηλό pH, αυξημένη συγκέντρωση αιθανόλης, μεταβολικά προϊόντα), (Costantini et al., 2009; Liu, 2002; Versari et al., 1999), και μετά το πέρας αυτής να αυξάνεται σε πληθυσμό και να πραγματοποιεί τη μηλογαλακτική ζύμωση (Henick-Kling, 1993; Kunkee, 1991). Βέβαια, δεν αποτελεί το μοναδικό είδος που επιβιώνει κατά την αλκοολική ζύμωση. Έρευνες έχουν δείξει ότι, είδη των γενών *Lactobacillus* και *Pediococcus* καταφέρνουν να προσαρμοστούν ικανοποιητικά και, σε μερικές περιπτώσεις, να αναπτυχθούν και πιο αποτελεσματικά από το *Oenococcus oeni* πριν ακόμα αυτή ολοκληρωθεί (du Plessis et al., 2004; Izquierdo, Ruiz, Sesepa and Palop, 2009; Ribireau-Gayon, Glories, Maujean and Dubourdieu, 2000). Έρευνες έχουν δείξει ότι είδη του γένους *Pediococcus* δύνανται να υποβιβάσουν την ποιότητα του

οίνου παράγοντας μεγάλες ποσότητες διακετυλίου και βιογενών αμινών (Davis et al., 1988; Sponholz, 1993). Παρ' όλα αυτά, κάποια είδη της κατηγορίας, όπως το *Pediococcus pentosaceus*, έχει δειχθεί ότι δεν την υποβιβάζουν, αντιθέτως την αναβαθμίζουν (Edwards and Jensen, 1992; Manca de Nadra and Strasser de Saad, 1995).

1.5.1. Τα αυτόχθονα είδη και οι μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις

Τα τελευταία χρόνια, άρχισε να γίνεται όλο και μεγαλύτερο το ενδιαφέρον των οινοποιών, αλλά και της ερευνητικής κοινότητας για τις αυθόρμητες ζυμώσεις οίνων. Η χρήση των αυτόχθονων ζυμών και βακτηρίων για τη διεξαγωγή των ζυμωτικών διαδικασιών, αποτελεί ένα πολύ ενδιαφέρον εγχείρημα, το οποίο δύναται να καταλήξει σε παραγωγή οίνου με χαρακτηριστικά της γεωγραφικής περιοχής από την οποία προήλθε (Ruiz, et al., 2010). Ωστόσο, τα είδη των αυτόχθονων ζυμών και βακτηρίων μπορεί να ποικίλουν ανάλογα με τη χρονιά. Πολλοί παράγοντες επιδρούν στο γεγονός αυτό, όπως είναι η γεωγραφική περιοχή, οι κλιματολογικές συνθήκες και η ωριμότητα των σταφυλιών (Guerrini et al., 2003).

Κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, δεν υπάρχει καμία εγγύηση ότι η διαδικασία θα ολοκληρωθεί αποτελεσματικά, είτε αυτή πραγματοποιείται με τη χρήση εναρκτήριων καλλιεργειών, είτε μέσω των αυτόχθονων ζυμών του γλεύκους. Ιδιαίτερα στη μηλογαλακτική ζύμωση, οι αλληλεπιδράσεις των βακτηρίων με τις ζύμες, αλλά και των βακτηρίων μεταξύ τους, παίζουν καταλυτικό ρόλο σε αυτό το γεγονός. Για να καταφέρουν τα βακτήρια να επιβιώσουν, κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, και να πραγματοποιήσουν τη μηλογαλακτική ζύμωση, θα πρέπει να αντιμετωπίσουν τη μεγάλη έλλειψη θρεπτικών συστατικών, το χαμηλό pH, την υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης και τα μεταβολικά προϊόντα των ζυμών με αντιβακτηριακή δράση (Capucho and San Romao, 1994; Gilis et al., 1996; Nygaard and Prahl, 1996). Βέβαια, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μικροοργανισμών του γλεύκους δεν είναι μόνο αρνητικές (Dick et al., 1992). Έρευνες έχουν δείξει ότι υπάρχουν στελέχη ζυμών που παίζουν σημαντικό ρόλο στην αλκοολική ζύμωση και στο τέλος αυτής, μέσω της αυτόλυσής τους, προσφέρουν στα βακτήρια τα απαραίτητα αμινοξέα και κυρίως τις απαραίτητες αζωτούχες ενώσεις που χρειάζονται για να αναπτυχθούν (Alexandre et al., 2001; Charpentier and Feuillat, 1993;

Fornairon-Bonnefond et al., 2001; Marti'nez-Rodriguez et al., 2001, 2002). Επίσης, υπάρχουν βακτηριακά στελέχη που εμφανίζονται πιο ανθεκτικά στην υψηλή συγκέντρωση της αιθανόλης και στην έλλειψη θρεπτικών συστατικών και έτσι, επιβιώνουν πιο αποτελεσματικά σε σχέση με άλλα με λιγότερες αντοχές (*Davis et al., 1988; Herve' Alexandre et al., 2003*).

Εκτός από τις αρνητικές επιρροές των ζυμών, τα βακτήρια θα πρέπει να αντιμετωπίσουν και τις μεταξύ τους αρνητικές αλληλεπιδράσεις. Δεν είναι λίγα τα βακτήρια που παράγουν αντιβακτηριακές ουσίες, όπως βακτηριοσίνες, και προκαλούν ισχυρή μείωση της ανάπτυξης των βακτηρίων που καλούνται να τις αντιμετωπίσουν. Πιο συγκεκριμένα, το είδος *Lactobacillus plantarum* έχει δειχθεί ότι παράγει αντιβακτηριακές ουσίες έναντι του είδους *Oenococcus oeni*, κύριου βακτηριακού είδους για τη διεξαγωγή της μηλογαλακτικής ζύμωσης, και το είδος *Pediococcus pentosaceus* έχει δειχθεί ότι παράγει αντιβακτηριακές ουσίες έναντι του είδους *Oenococcus oeni* και *Lactobacillus plantarum* (*Lonvaud-Funel and Joyeux, 1993; Navarro et al., 2000; Strasser de Saad and Manca de Nadra, 1993*).

1.6. Η ταυτοποίηση των βακτηρίων και η σημασία της

1.6.1. Φυσιολογικές και βιοχημικές μέθοδοι ταυτοποίησης

Αδιαμφισβήτητα, ο ρόλος των βακτηρίων στον οίνο είναι πολύ σημαντικός και λόγω και του αυξημένου ενδιαφέροντος, τα τελευταία χρόνια, για την μηλογαλακτική ζύμωση, η ανάγκη για ταυτοποίηση των ειδών και των στελεχών των βακτηρίων, που παίζουν ενεργό ρόλο σε αυτή, είναι πλέον επιτακτική.

Οι φυσιολογικές και οι βιοχημικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται σε ευρεία κλίμακα όντας οικονομικές, εύχρηστες, εύκολες και σχετικά ταχείες. Καλύπτουν ένα φάσμα τεχνικών όπως η μορφολογική και φυσιολογική παρατήρηση, η ανάλυση πρωτεϊνικών προφίλ και η ανάλυση της αφομοίωσης και ζύμωσης των υδατανθράκων. Δεδομένου, όμως, ότι τα βακτήρια παρουσιάζουν πολύ κοινά μεταβολικά και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά (*Corsetti, Lav ermicocca, Morea, Baruzzi, Tosti and Gobetti, 2001;*), είναι πολλές φορές δύσκολο να προκύψει σωστός διαχωρισμός μεταξύ διαφορετικών βακτηριακών ειδών ή στελεχών. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι βακτηριακά είδη με παρόμοιες φυσικοχημικές

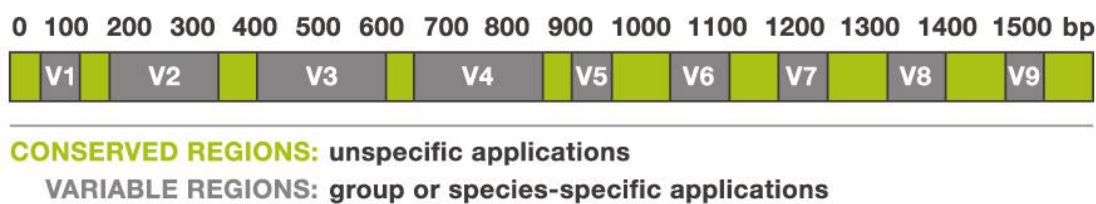
ιδιότητες, αποδεικνύεται ότι ανήκουν σε τελείως διαφορετικά γένη ή είδη, μετά από χρήση μοριακών τεχνικών (*Gonzalez, Encinas Garcia-Lopez and Otero, 2000; Muyanja, Narvhus, Treimo and Langsrud, 2003; Vandamme et al., 1996*).

1.6.2. Μοριακές μέθοδοι ταυτοποίησης

Οι μοριακές τεχνικές, αποτελούν αξιόπιστες μεθόδους ταυτοποίησης των βακτηρίων, και προσφέρουν γρήγορα, σίγουρα και επαναλήψιμα αποτελέσματα. Ανάμεσα στην ποικιλία των μεθόδων που αναπτύχθηκαν τα τελευταία χρόνια, οι μέθοδοι που στηρίζονται στην αρχή της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR), η οποία επιτρέπει την εκλεκτική ενίσχυση στοχευμένων τμημάτων DNA, μέσω της χρήσης ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών, υπό ελεγχόμενες πειραματικές συνθήκες, αποτελούν επικρατέστερες τεχνικές, σε πολλές περιπτώσεις. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τεχνικές όπως η ανάλυση περιορισμού της ενισχυμένης 16S ριβοσωμικής υποπεριοχής (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis - ARDRA), (*Delley et al., 2002; Roy et al., 2001; Ventura et al., 2001*) και τεχνικές όπως πολλαπλές (multiplex) PCR για τη διαφοροποίηση ειδών με παρόμοια γονιδιακά προφίλ.

Η τεχνική ανάλυσης περιορισμού της ενισχυμένης 16S ριβοσωμικής υποπεριοχής, αρχίζει με την ενίσχυση της αντίστοιχης περιοχής του ριβοσωμικού DNA των βακτηρίων. Η συγκεκριμένη περιοχή του ριβοσώματος αποτελεί μέρος της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας (30S) των βακτηρίων και χρησιμοποιείται σε πολλές μοριακές τεχνικές, για τη διαφοροποίηση βακτηριακών ειδών, αλλά και στελεχών (*Temmerman, Huys and Swings, 2004*). Στην τεχνική ARDRA, για την ενίσχυση της 16S ριβοσωμικής υποπεριοχής χρησιμοποιούνται ειδικοί εκκινητές, και ειδικά περιοριστικά ένζυμα, για την μετέπειτα πέψη των ενισχυμένων γονιδιακών περιοχών. Αποτελεί γρήγορη και σχετικά οικονομική τεχνική χαρακτηρισμού, η οποία όμως δεν διαχωρίζει ικανοποιητικά βακτηριακά είδη με πολύ συγγενικά γονιδιακά προφίλ (*Rodas, Ferrer, and Pardo, 2003*), (Εικόνα 1.8).

Εικόνα 1.8: Οι συντηρημένες (με πράσινο – conserved) περιοχές και οι μεταβλητές (με γκρι – variable) περιοχές του 16S rDNA γονιδίου (www.alimetrics.net / Sequence Analysis).



Για την τεχνική της πολλαπλής PCR, χρησιμοποιούνται ειδικοί εκκινητές για κάθε είδος, ώστε να προκύψει τελικά διαφορετικό πρότυπο για την κάθε περίπτωση. Μία περίπτωση πολλαπλής PCR αποτελεί αυτή που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό των ειδών *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paraplantarum* και *Lactobacillus pentosus*. Η μέθοδος στηρίζεται στην ενίσχυση του *recA* γονιδίου, που κωδικοποιεί για μία πρωτεΐνη που συμβάλλει στην επιδιόρθωση του DNA και αποτελεί μία ανερχόμενη τεχνική για την διαφοροποίηση πολύ στενά συνδεδεμένων ειδών (Torriani, Felis and Dellaglio, 2001).

Όλες οι τεχνικές που ομοιάζουν με τις παραπάνω απαιτούν τη σωστή επιλογή εκκινητών για να μπορέσουν να είναι αποτελεσματικές. Αν και υπάρχει μεγάλη ποικιλία ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών, τα αποτελέσματα του χαρακτηρισμού, ανάλογα και με τη φύση του βακτηρίου, δεν είναι πάντα σαφή. Ο καλύτερος τρόπος για τη λύση αυτού του προβλήματος είναι η αλληλούχιση. Σαν διαδικασία, αφορά στην εύρεση της ακριβής νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, ενός εξεταζόμενου τμήματος DNA, και με τη χρήση των βάσεων δεδομένων στην πλήρη ταυτοποίησή του. Εκτός από τις παραπάνω, υπάρχουν και άλλες υποσχόμενες μοριακές μέθοδοι ταυτοποίησης, οι οποίες, ανάλογα με τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά τους, χρησιμοποιούνται και σε διαφορετικές περιπτώσεις. Η τεχνική πολυμορφισμού μήκους θραύσματος εκ περιορισμού (RFLPs), στην οποία ανήκει και η τεχνική ARDRA, περιλαμβάνει την πέψη του γενωμικού DNA με περιοριστικά ένζυμα που κόβουν σε σπάνιες περιοχές, για να δώσει τελικά ως προϊόν μεγάλα θραύσματα DNA. Η τεχνική πολυμορφισμού μήκους ενισχυμένων τμημάτων (AFLP), η οποία

συνδυάζοντας τις τεχνικές PCR με την τεχνική RFLPs, συνδέει αλληλουχίες αναγνώρισης εκκινητών στο DNA, που υπόκειται σε πέψη. Τέλος, η τεχνική τυχαία ενισχυμένου πολυμορφικού DNA (RAPD), η οποία κάνει χρήση εκκινητών που συνδέονται όχι απαραίτητως ειδικά στο γενωμικό DNA (*Kaouther Ben Amor, et al. 2007*).

Οι φυσιολογικές και οι βιοχημικές μέθοδοι χαρακτηρισμού παραμένουν χρήσιμες, άλλα με τις εξελίξεις στον συγκεκριμένο τομέα, το πεδίο εφαρμογής έχει επεκταθεί και προσφέρει καλύτερη κατανόηση ολόκληρου του γονιδιώματος ενός μικροοργανισμού, είτε αυτός είναι ζύμη, είτε είναι βακτήριο. Οι μελλοντικές τάσεις περιλαμβάνουν τη χρήση μοριακών τεχνικών που επικεντρώνονται στο DNA, στο RNA και στα προϊόντα αυτών, τις πρωτεΐνες, για την ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους, όπως και στελέχους. Αποτελούν, με άλλα λόγια, τεχνικές που θα ανοίξουν νέους ορίζοντες και θα θέσουν νέα θεμέλια στην μελέτη των μικροοργανισμών και των μεταξύ τους αλληλεπιδράσεων.

2. ΣΚΟΠΟΣ

Οι αυθόρμητες ζυμώσεις έχουν αποκτήσει μεγάλο ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια. Στην παραγωγή του οίνου, η χρήση των αυτόχθονων ζυμών και βακτηρίων, για τη διεξαγωγή των ζυμωτικών διαδικασιών, έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να προσδώσει στο τελικό προϊόν χαρακτηριστικά της γεωγραφικής περιοχής από την οποία προήλθε (Ruiz, et al., 2010). Η μηλογαλακτική ζύμωση προσδίδει στον οίνο θετικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, προκαλώντας μικρή αύξηση του pH, βελτιώνοντας τη γεύση και την υφή και προσφέροντας μικροβιολογική σταθερότητα (Agouridis, Bekatorou, Nigam and Kanellaki, 2005; Costantini et al., 2009; López et al., 2011; Maicas, 2001; Malherbe et al., 2012). Έτσι, η εύρεση αυτόχθονων βακτηρίων που θα μπορούσαν να αντέξουν τις συνθήκες της αλκοολικής ζύμωσης (χαμηλό pH, υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης) και να ολοκληρώσουν τη μηλογαλακτική ζύμωση, προσδίδοντας στον οίνο οργανοληπτικές ιδιότητες με χαρακτήρα τοπικό (μικροβιολογικό terroir), θεωρείται σημαντική πρόκληση. Γι' αυτό το λόγο, οι μοριακές τεχνικές, όπως αυτές που στηρίζονται στην αρχή της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR), αποτελούν απαραίτητο εργαλείο για την ταυτοποίηση των αυτόχθονων ειδών και την εξέλιξη της συγκεκριμένης προσπάθειας (Delley et al., 2002; Roy et al., 2001; Ventura et al., 2001).

Με γνώμονα τα παραπάνω, ο σκοπός της συγκεκριμένης Μεταπτυχιακής Μελέτης ήταν 1) η απομόνωση αυτόχθονων βακτηριακών ειδών από δείγματα γλεύκους, τα οποία υποβλήθηκαν σε αυθόρμητη ζύμωση, από δύο ζώνες παραγωγής οίνων ΠΟΠ, στην Κρήτη και στη Νεμέα και 2) η ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους των βακτηρίων αυτών με χρήση μοριακών τεχνικών. Ο απώτερος στόχος είναι η εύρεση αυτόχθονων βακτηριακών στελεχών με ικανότητα επιβίωσης, κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης και δυνατότητα πραγματοποίησης, σε ένα μετέπειτα στάδιο, της μηλογαλακτικής ζύμωσης.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. ΥΛΙΚΑ

3.1.1. Θρεπτικά υλικά

Για τη στερεή καλλιέργεια, αλλά και για την υγρή καλλιέργεια των βακτηρίων, της συγκεκριμένης μελέτης, χρησιμοποιήθηκε έτοιμη σκόνη MRS άγαρ (LabM) και MRS υγρό (LabM), αντίστοιχα.

Για την αποθήκευση των βακτηριακών στελεχών, μετά την απομόνωση, στους -80 °C, χρησιμοποιήθηκε MRS υγρό με 30 % γλυκερόλη (Applichem).

Σε όλες τις περιπτώσεις που ήταν αναγκαίο χρησιμοποιήθηκε το αντιβιοτικό κυκλοεξαμίδιο (100 mg/L) και το αντιβιοτικό διφαινύλιο (50 mg/L), για την παρεμπόδιση της ανάπτυξης των ζυμών και των νηματοειδών μυκήτων αντίστοιχα. Να σημειωθεί ότι το αντιβιοτικό κυκλοεξαμίδιο δρα κατά όλων των ζυμών εκτός της *Kloeckera apiculata*.

Για την καλλιέργεια ζυμών, σε κάποιο στάδιο της διαδικασίας, χρησιμοποιήθηκε YPD άγαρ με την εξής σύσταση:

Εκχύλισμα μαγιάς (Yeast Extract – LabM)	10 g/L
Βακτηριακή πεπτόνη (OXOID)	20 g/L
Γλυκόζη (M. ROUMBOULAKIS S.A)	20 g/L
Άγαρ (OXCOID)	20 g/L

Για την παρεμπόδιση της ανάπτυξης των βακτηρίων και των νηματοειδών μυκήτων χρησιμοποιήθηκε το αντιβιοτικό χλωροαμφενικόλη (100 mg/L) και το αντιβιοτικό διφαινύλιο (100 mg/L), αντίστοιχα.

3.1.2. Διαλύματα

- Διάλυμα Lugol για χρήση στη χρώση κατά Gram, 1 L:

3,3 gr κρύσταλλοι ιωδίου

6,6 gr ιωδιούχο κάλιο

dH₂O μέχρι το 1 L

Καλή διάλυση μέσα σε απαγωγό και παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 24 h πριν τη χρήση. Φυλάσσεται σε σκιερό μέρος λόγω της φωτοευαισθησίας του.

- Διάλυμα οριζόντιας ηλεκτροφόρησης DNA, TAE 50X, 1 L:

242 gr Tris Base (Applichem)

57,1 ml οξικό οξύ (Panreac)

100 ml EDTA (0,5 M pH 8.0)

dH₂O μέχρι το 1L

- Διάλυμα EDTA (0,5 M pH 8.0), 1 L:

186,1 gr disodium EDTA·2H₂O (Applichem)

800 ml dH₂O

Η ρύθμιση του pH πραγματοποιείται με προσθήκη NaOH (20 g σφαιρίδια NaOH) και η πλήρης διάλυση του διαλύματος επιτυγχάνεται μόνο σε pH 8.0.

3.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

3.2.1. Συλλογή, μεταφορά και αποθήκευση των δειγμάτων σταφυλιών

Τα δείγματα σταφυλιών που χρησιμοποιήθηκαν για τη συγκεκριμένη πειραματική μελέτη, συλλέχθηκαν, την περίοδο του τρυγητού, από δύο ζώνες προστατευόμενης ονομασίας προέλευσης (ΠΟΠ), των Πεζών, στην Κρήτη και της Νεμέας, στην Πελοπόννησο. Ειδικότερα για τη γεωγραφική ζώνη των Πεζών, πραγματοποιήθηκε συλλογή σε έξι περιοχές/αμπελώνες, στον κάθε έναν από τους οποίους ελέγχθησαν οι

ποικιλίες Βηλάνα, Κοτσιφάλι και Μαντηλάρι. Στον κάθε αμπελώνα επιλέχθηκαν τρία δειγματοληπτικά σημεία και πάρθηκαν τρία αντιπροσωπευτικά δείγματα των δύο κιλών (2 kg) το ένα, για την κάθε ποικιλία ξεχωριστά. Στην περιοχή της Νεμέας, πραγματοποιήθηκε συλλογή σε έντεκα περιοχές/αμπελώνες και ελέγχθηκε η ποικιλία Αγιωργίτικο. Στον κάθε αμπελώνα επιλέχθηκαν τρία δειγματοληπτικά σημεία και πάρθηκαν τρία αντιπροσωπευτικά δείγματα των δύο κιλών (2 kg) το ένα. Η μεταφορά των δειγμάτων στο εργαστήριο πραγματοποιήθηκε μέσα σε αποστειρωμένους πλαστικούς περιέκτες σε ελεγχόμενο κρύο περιβάλλον (4 °C).

Για κάθε δείγμα, περίπου 2 kg ραγών εκθλίφθηκαν σε ομογενοποιητή τύπου Stomacher (400 Circulator, Seward) στα 300 rpm για 1 min. Ο χυμός, ύστερα από φιλτράρισμα, μεταφέρθηκε σε φιάλες χωρητικότητας 1 L και οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 20 °C.

3.2.2. Απαρίθμηση αποικιών βακτηρίων

Καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, ορίστηκαν τρία κύρια δειγματοληπτικά σημεία, αντιπροσωπευτικά για τα τρία κύρια στάδια της ζύμωσης των δειγμάτων γλεύκους. Το πρώτο δειγματοληπτικό σημείο (BF) αντιστοιχούσε στην αρχή της ζυμωτικής διαδικασίας, το μεσαίο δειγματοληπτικό σημείο (MF) αντιστοιχούσε στη μέση της ζυμωτικής διαδικασίας και το τελικό δειγματοληπτικό σημείο (EF) αντιστοιχούσε στο τέλος της ζυμωτικής διαδικασίας. Η αρχή, η μέση και το τέλος της ζύμωσης καθορίστηκαν ανάλογα με την κατανάλωση των σακχάρων του εκάστοτε γλεύκους. Ως αρχή θεωρήθηκε η μηδενική (0 %) κατανάλωση των σακχάρων, ως μέση θεωρήθηκε η μισή (50 %) κατανάλωση των σακχάρων και ως τέλος θεωρήθηκε η συνολική (100 %) κατανάλωση των σακχάρων του εκάστοτε γλεύκους. Για την εκτίμηση των σταδίων αυτών λάμβανε χώρα καθημερινό ζύγισμα (ηλεκτρονικός ζυγός, Gibertini) των φιαλών ζύμωσης και μέσω της μείωσης του βάρους, λόγω της κατανάλωσης των σακχάρων και της έκλυσης CO₂, γινόταν η αντιστοίχιση των σταδίων. Μετά το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης και για την παρακολούθηση της μηλογαλακτικής ζύμωσης, πραγματοποιούνταν κάθε βδομάδα εκ νέου δειγματοληψίες (MLF).

Για την απαρίθμηση των αποικιών των βακτηρίων πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις του γλεύκους (10^{-1} - 10^{-5}) σε διάλυμα Ringer (LabM), και εναιωρήματα όγκου 100 μl επιστρώθηκαν εις τριπλούν σε θρεπτικό υπόστρωμα MRS άγαρ (LabM), που περιείχε τα αντιβιοτικά κυκλοεξαμίδιο (Fluka Analytical) και διφαινύλιο (SIGMA-ALDRICH) σε συγκέντρωση 100 mg/L. Τα τρυβλία επώαστηκαν (επωαστικοί κλίβανοι, Memmert & Heraeus), υπό αναερόβιες συνθήκες στους 28 °C, για 3-5 μέρες. Για τη μείωση του ορίου ανίχνευσης, 50 ml δείγματος γλεύκους φυγοκεντρήθηκαν (φυγόκεντρος, NÜVE) στα 4000 rpm για 10 min και το ίζημα μεταφέρθηκε σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα MRS (LabM), που περιείχε τα αντιβιοτικά κυκλοεξαμίδιο και διφαινύλιο σε συγκέντρωση 100 mg/L. Τα δείγματα επώαστηκαν στους 28 °C, για 3-5 μέρες.

3.2.3. Χρώση κατά Gram και τεστ καταλάσης

Για τη χρώση κατά Gram έλαβε χώρα η προσήλωση του υπό μελέτη δείγματος σε αντικειμενοφόρο πλάκα, ύστερα από διαδοχικά περάσματα πάνω από φλόγα. Ακολούθησε ο αρχικός χρωματισμός του κυτταρικού τοιχώματος του δείγματος με κρυσταλλικό ιώδες για 1 min και ξέπλυμα με άφθονο dH₂O. Στη συνέχεια, προστέθηκε διάλυμα Lugol (§ 3.1.2) για 1 min, για τη δημιουργία συμπλόκου με το κρυσταλλικό ιώδες και τη στερέωση της χρωστικής. Το επόμενο βήμα ήταν ο αποχρωματισμός, ο οποίος πραγματοποιήθηκε με διάλυμα καθαρής αιθανόλης 100 % (Merck KGaA). Μετά την πλύση με άφθονο dH₂O, ακολούθησε ο μεταχρωματισμός με την προσθήκη σαφρανίνης (Serva) για 1 min και τέλος ξανά πλύση με άφθονο dH₂O. Τα δείγματα εξετάστηκαν στο μικροσκόπιο (Olympus) με χρήση κεδρελαίου (Olympus) και ελαικαταδυτικού φακού (x 100).

Για το τεστ καταλάσης μία μεμονωμένη αποικία βακτηρίου προστέθηκε σε μία σταγόνα υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) και παρατηρήθηκε η παρουσία ή η απουσία αφρίσματος, γεγονός που σηματοδοτούσε την παρουσία ή την απουσία του ενζύμου καταλάση, αντίστοιχα.

3.2.4. Απομόνωση των βακτηρίων

Για την απομόνωση των βακτηρίων, 20-25 αποικίες συλλέχθηκαν τυχαία από τα διαφορετικά στάδια των ζυμώσεων (BF, MF, EF), όπως και από το επαναλαμβανόμενο στάδιο μετά το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης (MLF), από τρυβλία με μετρήσιμο αριθμό αποικιών. Οι αποικίες επανακαλλιεργούνταν ξεχωριστά, μέσω γραμμωτής εξάπλωσης, σε MRS άγαρ (LabM) και επωάζονταν ξανά υπό αναερόβιες συνθήκες, στους 28 °C, για 3-5 μέρες. Όταν η ανάπτυξη παρουσιαζόταν ικανοποιητική, γινόταν συλλογή μίας μεμονωμένης αποικίας από το εκάστοτε τρυβλίο και αυτή επανακαλλιεργούνταν μέσω γραμμωτής εξάπλωσης, για δεύτερη φορά, σε MRS άγαρ. Τέλος, λάμβανε χώρα η αποθήκευση του στελέχους στους -80 °C, κατά την οποία, με χρήση μικροβιολογικού κρίκου, συλλέγονταν επαρκή ποσότητα του χαρακτηρισμένου βακτηρίου από το τρυβλίο και τοποθετούνταν σε αποστειρωμένα κρυο-φιαλίδια με MRS υγρό θρεπτικό υπόστρωμα (LabM) – 30 % γλυκερόλη (Applichem), κατευθείαν στους -80 °C.

3.2.5. Ταυτοποίηση των βακτηρίων σε επίπεδο είδους μέσω της ανάλυσης περιορισμού της ενισχυμένης 16S ριβοσωμικής υποπεριοχής (16S amplified ribosomal DNA restriction analysis - ARDRA)

Για την ταυτοποίηση των βακτηρίων πραγματοποιήθηκε, σε πρώτο στάδιο, ενίσχυση, μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR), της 16S ριβοσωμικής τους υποπεριοχής. Γι αυτό το λόγο, βακτηριακά κύτταρα μεταφέρθηκαν από στερεή καλλιέργεια σε 3 μl NaOH (0,02 M - Merck) και επώαστηκαν στους 99 °C για 10 min. Για την ενίσχυση της 16S rDNA περιοχής χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές pA (5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG -3'), (VBC Biotech) και pH (5'- AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA -3'), (VBC Biotech), (Rodas, Ferrer and Pardo, 2003). Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε τελικό όγκο 25 μl με 3 μl εναιωρήματος κυττάρων, 0,25 μM από κάθε εκκινητή, 200 μM από κάθε δεοξυριβονουκλεοτίδιο (dNTP), (BioLabs), 1,5 mM MgCl₂ (Kapa Biosystems) και 1 U DNA πολυμεράσης (Kapa Biosystems), στο ρυθμιστικό διάλυμα που παρέχει ο προμηθευτής του ενζύμου.

Το πρόγραμμα που ακολουθήθηκε στο θερμικό κυκλοποιητή (Bio-Rad) αποτελούνταν από τα εξής στάδια:

1. Θερμοκρασία: 94 °C , Χρόνος: 3 min
2. 35 κύκλους αποτελούμενους από τα εξής βήματα:
 - Θερμοκρασία: 94 °C , Χρόνος: 30 s
 - Θερμοκρασία: 56 °C , Χρόνος: 30 s
 - Θερμοκρασία: 72 °C , Χρόνος: 1:40 min
3. Θερμοκρασία: 72 °C , Χρόνος: 10 min

Τα προϊόντα της PCR αναλύθηκαν με τη διαδικασία της οριζόντιας ηλεκτροφόρησης (Bio-Rad & CONSORT) σε διάλυμα αγαρόζης (Invitrogen) 1,2 % - TAE 1X (§ 3.1.2). Ο χρωματισμός τους πραγματοποιήθηκε με τη προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου (Applichem) και η ποσοτικοποίηση τους έγινε με ένα μάρτυρα μοριακών μεγεθών DNA 100 bp (BioLabs). Τέλος, η ψηφιοποίηση τους έγινε με έκθεση σε UV ακτινοβολία και χρήση του υπολογιστικού προγράμματος Alphamager 2000.

Μετά τη διαδικασία της ενίσχυσης ακολούθησε η πέψη της συγκεκριμένης περιοχής με το περιοριστικό ένζυμο MseI (RO525S BioLabs) και 500 ng DNA. Η διάρκεια της πέψης ήταν 2 h στους 37 °C και τα προϊόντα της πέψης αναλύθηκαν με τη διαδικασία της οριζόντιας ηλεκτροφόρησης σε διάλυμα αγαρόζης 2,5 % - TAE 1X. Ο χρωματισμός τους πραγματοποιήθηκε με τη προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου και η ποσοτικοποίηση τους έγινε με ένα μάρτυρα μοριακών μεγεθών DNA 100 bp. Τέλος, η ψηφιοποίηση τους έγινε με έκθεση σε UV ακτινοβολία και χρήση του υπολογιστικού προγράμματος Alphamager 2000.

3.2.6. Πολλαπλή (Multiplex) PCR για τη διαφοροποίηση των ειδών *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paraplantarum* και *Lactobacillus pentosus*

Για τη διαφοροποίηση των ειδών *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paraplantarum* και *Lactobacillus pentosus*, πραγματοποιήθηκε μία πολλαπλή PCR (Torriani, Felis and Dellaglio, 2001) η οποία στηρίζεται στην ενίσχυση του recA

γονιδίου, στο βακτηριακό γονιδίωμα. Γι αυτό το λόγο, βακτηριακά κύτταρα μεταφέρθηκαν από στερεή καλλιέργεια σε 3 μl NaOH (0,02 M - Merck) και επώαστηκαν στους 99 °C για 10 min. Για την ενίσχυση του *recA* γονιδίου χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές *paraF* (5' - GTC ACA GGC ATT ACG AAA AC - 3)', (VBC Biotech), *planF* (5' - CCG TTT ATG CGG AAC ACC TA - 3)', (VBC Biotech), *pentF* (5' - CAG TGG CGC GGT TGA TAT C - 3)', (VBC Biotech) και ο αντίστροφος εκκινητής *PREV* (5' - TCG GGA TTA CCA AAC ATC AC - 3)', (VBC Biotech). Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε τελικό όγκο 20 μl με 3 μl εναιωρήματος κυττάρων, 0,25 μM από τους εκκινητές *paraF*, *pentF* και *PREV*, 0,12μM από τον εκκινητή *planF*, 12 μM από κάθε δεοξυριβονουκλεοτίδιο (dNTP), (BioLabs), 0,025 U/μl DNA πολυμεράσης (Kapa Biosystems), στο ρυθμιστικό διάλυμα που παρείχε ο προμηθευτής του ενζύμου.

Το πρόγραμμα που ακολουθήθηκε, στη συνέχεια, στο θερμικό κυκλοποιητή (Bio-Rad) αποτελούνταν από τα εξής στάδια:

1. Θερμοκρασία: 94 °C , Χρόνος: 3 min
2. 30 κύκλους αποτελούμενους από τα εξής βήματα:
 - Θερμοκρασία: 94 °C , Χρόνος: 30 s
 - Θερμοκρασία: 56 °C , Χρόνος: 10 s
 - Θερμοκρασία: 72 °C , Χρόνος: 30 s
3. Θερμοκρασία: 72 °C , Χρόνος: 5 min

Τα προϊόντα της πολλαπλής PCR αναλύθηκαν με τη διαδικασία της οριζόντιας ηλεκτροφόρησης (Bio-Rad & CONSORT) σε διάλυμα αγαρόζης (Invitrogen) 1,2 % - TAE 1X (§ 3.1.2). Ο χρωματισμός τους πραγματοποιήθηκε με τη προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου (Appllichem) και η ποσοτικοποίηση τους έγινε με ένα μάρτυρα μοριακών μεγεθών DNA 100 bp (BioLabs). Τέλος, η ψηφιοποίηση τους έγινε με έκθεση σε UV ακτινοβολία και χρήση του υπολογιστικού προγράμματος Alphamager 2000.

3.2.7. Ανάλυση αλληλούχισης του DNA

Για την αλληλούχιση του DNA, πραγματοποιήθηκε ενίσχυση της V1-V3 περιοχής του ριβοσωμικού DNA (Grahm *et al.*, 2003). Γι αυτό το λόγο, βακτηριακά κύτταρα μεταφέρθηκαν από στερεή καλλιέργεια σε 3 μl NaOH (0,02 M - Merck) και επώαστηκαν στους 99 °C για 10 min. Για την ενίσχυση της συγκεκριμένης περιοχής χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές P1 (5' - GCG GCG TGC CTA ATA CAT GC - 3'), (VBC Biotech) και P2 (5' - TTC CCC ACG CGT TAC TCA CC - 3'), (VBC Biotech). Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε τελικό όγκο 50 μl με 3 μl ελαιωρήματος κυττάρων, 0,25 μM από κάθε εκκινητή, 200 μM από κάθε δεοξυριβονουκλεοτίδιο (dNTP), (BioLabs), 1,5 mM MgCl₂ (Kapa Biosystems) και 1 U DNA πολυμεράσης (Kapa Biosystems), στο ρυθμιστικό διάλυμα που παρείχε ο προμηθευτής του ενζύμου.

Το πρόγραμμα που ακολουθήθηκε, στη συνέχεια, στο θερμικό κυκλοποιητή (Bio-Rad) αποτελούνταν από τα εξής στάδια:

1. Θερμοκρασία: 94 °C , Χρόνος: 3 min
2. Θερμοκρασία: 94 °C , Χρόνος: 30 s
3. Θερμοκρασία: 64 °C , Χρόνος: 30 s
4. Θερμοκρασία: 72 °C , Χρόνος: 30 s
5. Θερμοκρασία: 94 °C , Χρόνος: 30 s
6. Θερμοκρασία: 62 °C , Χρόνος: 30 s
7. Θερμοκρασία: 72 °C , Χρόνος: 30 s
8. Θερμοκρασία: 94 °C , Χρόνος: 30 s
9. Θερμοκρασία: 60 °C , Χρόνος: 30 s
10. Θερμοκρασία: 72 °C , Χρόνος: 30 s
11. Θερμοκρασία: 94 °C , Χρόνος: 30 s
12. Θερμοκρασία: 58 °C , Χρόνος: 30 s

13. Θερμοκρασία: 72 °C , Χρόνος: 30 s
14. Θερμοκρασία: 94 °C , Χρόνος: 30 s
15. Θερμοκρασία: 56 °C , Χρόνος: 30 s
16. Θερμοκρασία: 72 °C , Χρόνος: 30 s
17. Θερμοκρασία: 94 °C , Χρόνος: 30 s
18. Θερμοκρασία: 54 °C , Χρόνος: 30 s
19. Θερμοκρασία: 72 °C , Χρόνος: 30 s
20. Θερμοκρασία: 94 °C , Χρόνος: 30 s
21. Θερμοκρασία: 52 °C , Χρόνος: 30 s
22. Θερμοκρασία: 72 °C , Χρόνος: 30 s
23. 20 κύκλους αποτελούμενους από τα εξής βήματα:
 - Θερμοκρασία: 94 °C , Χρόνος: 30 s
 - Θερμοκρασία: 50 °C , Χρόνος: 30 s
 - Θερμοκρασία: 72 °C , Χρόνος: 30 s
24. Θερμοκρασία: 72 °C , Χρόνος: 10 min

Τα προϊόντα της πολλαπλής PCR αναλύθηκαν με τη διαδικασία της οριζόντιας ηλεκτροφόρησης (Bio-Rad & CONSORT) σε διάλυμα αγαρόζης (Invitrogen) 1,2 % - TAE 1X (§ 3.1.2). Ο χρωματισμός τους πραγματοποιήθηκε με τη προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου (Applichem) και η ποσοτικοποίηση τους έγινε με ένα μάρτυρα μοριακών μεγεθών DNA 100 bp (BioLabs) και με τη επιπρόσθετη χρήση λ φάγων (BioLabs). Τέλος, η ψηφιοποίηση τους έγινε με έκθεση σε UV ακτινοβολία και χρήση του υπολογιστικού προγράμματος Alphamager 2000.

Ο καθαρισμός του πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του “QIAquick PCR Purification kit” και την εφαρμογή των εξής σταδίων:

Αρχικά πραγματοποιήθηκε η προσθήκη 5 όγκων του ρυθμιστικού διαλύματος PB σε 1 όγκο του προϊόντος της PCR, το οποίο και μεταφέρθηκε, για την πρόσδεση του DNA, στην ειδική μεμβράνη της στήλης QIAquick. Στη συνέχεια, έλαβε χώρα μία φυγοκέντρηση (60 s, 13.000 rpm), (Eppendorf 5424) και ύστερα από την απομάκρυνση του ιζήματος, προστέθηκαν στη στήλη QIAquick 0,75 ml από το ρυθμιστικό διάλυμα PE. Ακολούθησε μία ακόμη φυγοκέντρηση (60 s, 13.000 rpm) και μετά την απομάκρυνση του ιζήματος, πραγματοποιήθηκε δεύτερη φυγοκέντρηση (60 s, 13.000 rpm), με την επακόλουθη απομάκρυνση του ιζήματος, για μία ακόμη φορά. Για την ανάκτηση του DNA από τη μεμβράνη της στήλης, έλαβε χώρα έκλυση με ποσότητα ddH₂O (BIOCHROM), λαμβάνοντας ως δεδομένο ότι μέσω της διαδικασίας αυτής παρατηρείται μία απώλεια 30 % της ποσότητας του αρχικού DNA και έχοντας υπόψη ότι για την ορθή αλληλούχιση απαιτούνται τουλάχιστον 20 µl τελικού δείγματος, συγκέντρωσης 50 ng/µl.

Τα προϊόντα του καθαρισμού αναλύθηκαν με τη διαδικασία της οριζόντιας ηλεκτροφόρησης σε διάλυμα αгарόζης 1,2 % - TAE 1X. Ο χρωματισμός τους πραγματοποιήθηκε με τη προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου και η ποσοτικοποίηση τους έγινε με ένα μάρτυρα μοριακών μεγεθών DNA 100 bp και με τη επιπρόσθετη χρήση λ φάγων. Τέλος, η ψηφιοποίηση τους έγινε με έκθεση σε UV ακτινοβολία και χρήση του υπολογιστικού προγράμματος Alphamager 2000.

Η αλληλούχιση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια αυτόματης συσκευής αλληλούχισης (ABI 3730 XL, Macrogen, [http:// www.macrogen.com](http://www.macrogen.com)) και τη χρήση του εμπρόσθιου εκκινήτη P1 (5' - GCG GCG TGC CTA ATA CAT GC - 3'). Η αναζήτηση των ακολουθιών (Blast search) έγινε με την επιλογή 'nucleotide-nucleotide' στην βάση δεδομένων NCBI GenBank data library.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. Τα υπό μελέτη δείγματα μούστου

Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία, μελετήθηκαν 14 δείγματα μούστου από την περιοχή των Πεζών, στην Κρήτη και 31 δείγματα μούστου από την περιοχή της Νεμέας, στην Πελοπόννησο. Οι συγκεκριμένες γεωγραφικές περιοχές, αποτελούν ζώνες προστατευόμενης ονομασίας προέλευσης (ΠΟΠ) και οι αμπελώνες τους είναι παλιοί με μεγάλη οινοποιητική ιστορία. Έχοντας αυτά τα χαρακτηριστικά, οι αμπελώνες των δύο αυτών περιοχών, απέκτησαν, μέσα στα χρόνια, τον δικό τους ξεχωριστό χαρακτήρα, στον οποίο χαρακτήρα συνέβαλλε κατά πολύ το σύνολο των μικροοργανισμών, που κατάφεραν να εδραιωθούν και, στην πορεία, να αποτελούν τη φυσική και χαρακτηριστική μικροχλωρίδα του κάθε αμπελώνα ξεχωριστά.

Το κάθε δείγμα γλεύκους αντιστοιχούσε σε δείγμα σταφυλιών, που συλλέχθηκε από έναν συγκεκριμένο αμπελώνα, μίας εκ των δύο υπό μελέτη γεωγραφικών περιοχών. Στον εκάστοτε αμπελώνα είχαν οριστεί τρία σημεία δειγματοληψίας και το κάθε δείγμα αποτελούνταν από 6 kg σταφυλιών. Πιο συγκεκριμένα, στη ζώνη των Πεζών εξετάστηκε ένας αμπελώνας από την περιοχή Πανόραμα (εργαστηριακό δείγμα 18P), ένας αμπελώνας από την περιοχή Χουδέτσι (εργαστηριακό δείγμα 30P), ένας αμπελώνας από την περιοχή Άγιες Παρασκιές (εργαστηριακά δείγματα 42P-45P), ένας αμπελώνας από την περιοχή Πατισίδερος (εργαστηριακά δείγματα 23P, 46P, 47P, 48P) και ένας αμπελώνας από την περιοχή Καλλονή (εργαστηριακά δείγματα (49P, 50P, 51P, 32P). Όσο για τη ζώνη της Νεμέας, εξετάστηκε ένας αμπελώνας από την περιοχή Κούτσι (εργαστηριακά δείγματα 1N-3N, 28N-30N), ένας αμπελώνας από την περιοχή Δάφνη (4N-6N), ένας αμπελώνας από την περιοχή Γυμνό (εργαστηριακά δείγματα 7N-9N), ένας αμπελώνας από την περιοχή Αρχαία Νεμέα (εργαστηριακά δείγματα 10N-12N), ένας αμπελώνας από την περιοχή Έμπατος (εργαστηριακά δείγματα 13N-15N), ένας αμπελώνας από την περιοχή Καλύβια (εργαστηριακά δείγματα 16N-18N), ένας αμπελώνας από την περιοχή Τρίποδι (εργαστηριακά δείγματα 19N-21N), ένας αμπελώνας από την περιοχή Ψάρι (εργαστηριακά δείγματα 22N-24N) και ένας αμπελώνας από την περιοχή Ασπρόκαμπος (25N-31N). Οι ποικίλες που μελετήθηκαν στη ζώνη των Πεζών ήταν τρεις, Βηλάνα, Κοτσιφάλι και Μαντηλάρι και στη ζώνη της Νεμέας ήταν μία, Αγιωργίτικο. Ο συγκεκριμένος τρόπος συλλογής αποσκοπούσε στη δημιουργία μίας αντιπροσωπευτικής εικόνας για τον κάθε αμπελώνα και κατ' επέκταση για την κάθε μία υπό μελέτη γεωγραφική περιοχή ξεχωριστά.

4.2. Απομόνωση βακτηριακής μικροχλωρίδας

Για την παρακολούθηση της βακτηριακής μικροχλωρίδας, πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία πριν από την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης (στάδιο BF), στη μέση (στάδιο MF – κατανάλωση της μισής ποσότητας των σακχάρων του μούστου), στο τέλος (στάδιο EF - αποζύμωση) και κάθε βδομάδα, μετά το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης, (στάδιο MLF). Το στάδιο αυτό, επαναλαμβανόταν κάθε βδομάδα και αποσκοπούσε στην προσπάθεια ανάκτησης των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος, που μπορεί να βρισκόταν σε μικρό πληθυσμό μέσα στο ζυμούμενο μούστο, και / ή στην παρακολούθηση της κινητικής των βακτηρίων αυτών, ύστερα από το πέρας της αλκοολικής, ώστε να μελετηθεί και η περίπτωση αυθόρμητης μηλογαλακτικής ζύμωσης σε αυτόν. Σε όλα τα δειγματοληπτικά στάδια, πριν από οποιαδήποτε διαδικασία απομόνωσης, λάμβανε χώρα ένας αρχικός χαρακτηρισμός του εκάστοτε βακτηριακού στελέχους ως γαλακτικό, μέσω της χρώσης κατά Gram και του τεστ καταλάσης (§ 3.2.3).

Όπως φαίνεται στους Πίνακες 4.1 και 4.2, η απομόνωση των Gram (+) βακτηρίων, για τα υπό μελέτη δείγματα των Πεζών και της Νεμέας, έλαβε χώρα σε διάφορα στάδια, κατά κύριο λόγο σε ένα στάδιο για το κάθε δείγμα, και σε μερικά δείγματα δεν πραγματοποιήθηκε καθόλου.

Πίνακας 4.1: Παρουσίαση του συνολικού αριθμού απομονωμένων βακτηριακών στελεχών, με αναφορά στους αμπελώνες, στις ποικιλίες, στους εργαστηριακούς κωδικούς και στο στάδιο δειγματοληψίας, από το οποίο απομονώθηκαν. Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα αντιστοιχούν στα δείγματα γλεύκους από τη περιοχή των Πεζών.

Περιοχή/Αμπελώνας	Ποικιλία	Κωδικός δείγματος	Στάδιο δειγματοληψίας	Αριθμός απομονωμένων Gram (+) βακτηρίων
Πανόραμα	Μανηλάρι	18P	MLF	23
Πατσίδερος	Κοτσιφάλι	23P	MLF	20
Χουδέτσι	Κοτσιφάλι	30P	MF	22

Καλλονή	Βηλάνα	32P	EF	16
Άγιες Παρασκιές	Κοτσιφάλι	44P	EF	24
Άγιες Παρασκιές	Κοτσιφάλι	45P	EF	22
Καλλονή	Μαντηλάρι	49P	EF	20
Σύνολο				125

Πίνακας 4.2: Παρουσίαση του συνολικού αριθμού απομονωμένων βακτηριακών στελεχών, με αναφορά στους αμπελώνες, στις ποικιλίες, στους εργαστηριακούς κωδικούς και στο στάδιο δειγματοληψίας, από το οποίο απομονώθηκαν. Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα αντιστοιχούν στα δείγματα γλεύκους από τη περιοχή της Νεμέας.

Περιοχή/Αμπελώνας	Ποικιλία	Κωδικός δείγματος	Στάδιο δειγματοληψίας	Αριθμός απομονωμένων Gram (+) βακτηρίων
Γυμνό	Αγιωργίτικο	9N	BF	5
			MF	3
			EF	3
Αρχαία Νεμέα	Αγιωργίτικο	12N	BF	20
			MLF	12
Καλύβια	Αγιωργίτικο	18N	BF	22
Τρίποδι	Αγιωργίτικο	19N	EF	5
Ψάρι	Αγιωργίτικο	22N	BF	7
Ψάρι	Αγιωργίτικο	23N	BF	29
Ψάρι	Αγιωργίτικο	24N	BF	6
Ασπρόκαμπος	Αγιωργίτικο	25N	BF	25
Κούτσι	Αγιωργίτικο	28N	BF	4

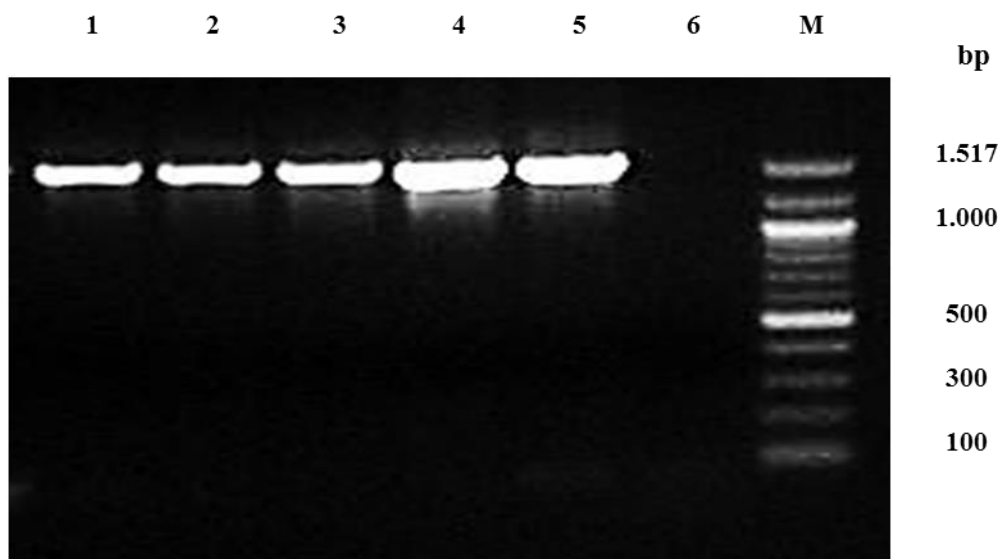
			EF	30
Κούτσι	Αγιοργίτικο	29N	EF	58
Ασπρόκαμπος	Αγιοργίτικο	31N	BF	20
			MF	5
Σύνολο				254

4.3. Ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους των βακτηρίων γαλακτικού οξέος

4.3.1. Ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους μέσω της ανάλυσης περιορισμού της ενισχυμένης 16S ριβοσωμικής υποπεριοχής (16S amplified ribosomal DNA restriction analysis - ARDRA)

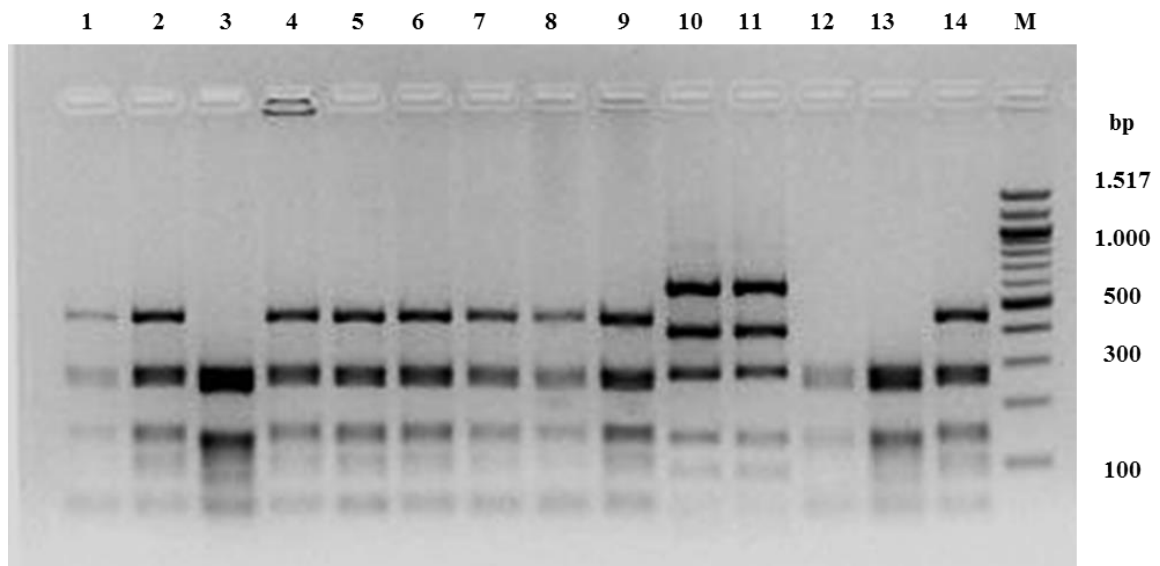
Για την ταυτοποίηση, σε επίπεδο είδους, των απομονωμένων στελεχών βακτηρίων του γαλακτικού οξέος, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική ανάλυσης περιορισμού της ενισχυμένης 16S ριβοσωμικής υποπεριοχής, (§ 3.2.5). Η συγκεκριμένη τεχνική εστιάζει στην ενίσχυση και στην μετέπειτα πέψη του γονιδίου που κωδικοποιεί για τη μικρή υπομονάδα του ριβοσώματος των βακτηρίων, την 16S υποπεριοχή. Η ενίσχυση αυτή πραγματοποιήθηκε μέσω PCR, με τη χρήση εκκινητών, που αναγνωρίζουν τη συγκεκριμένη γονιδιακή περιοχή, και σαν αποτέλεσμα, ύστερα από την ηλεκτροφόρηση και την έκθεση του πηκτώματος σε UV ακτινοβολία, παρατηρήθηκε ένα προϊόν 1.500 ζευγών βάσεων (bp) περίπου, όπως φαίνεται χαρακτηριστικά και στο σχήμα 4.1.

Σχήμα 4.1: Το PCR προϊόν έπειτα από την τεχνική ανάλυσης περιορισμού της ενισχυμένης 16S ριβοσωμικής υποπεριοχής. M: Μάρτυρας μοριακών μεγεθών 100 bp. 1-5: Ενισχυμένες γονιδιακές περιοχές διαφορετικών βακτηριακών στελεχών. 6: Αρνητικός μάρτυρας του πειράματος (διάλυμα PCR χωρίς προσθήκη DNA).

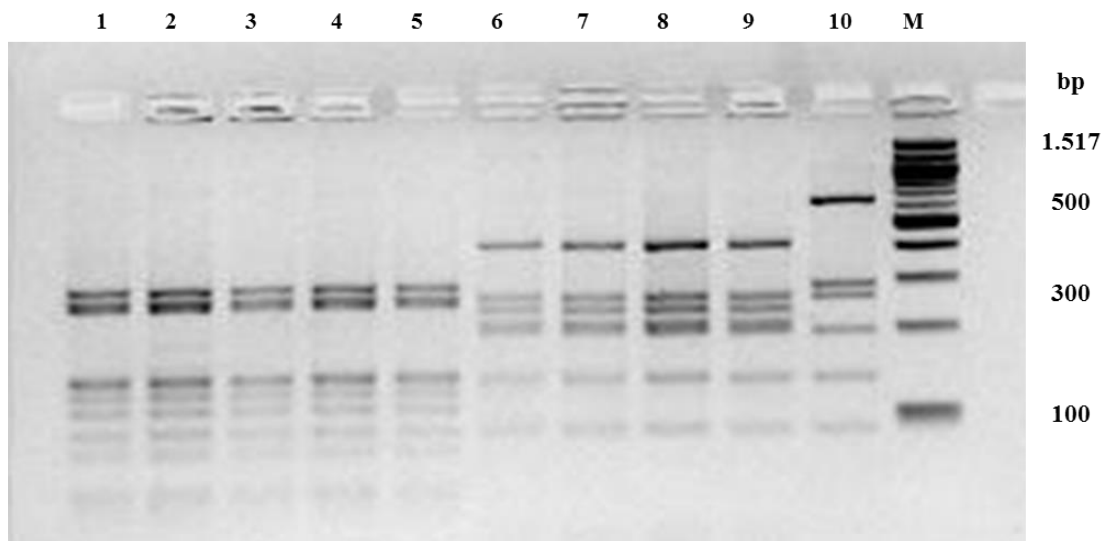


Το συγκεκριμένο PCR προϊόν, στην μετέπειτα πορεία της ταυτοποίησης, υποβλήθηκε σε διαδικασία πέψης με το περιοριστικό ένζυμο MseI. Το ένζυμο αυτό, αναγνωρίζοντας και κόβοντας συγκεκριμένη γονιδιακή περιοχή, δημιουργούσε διαφορετικά γονιδιακά προφίλ, τα οποία αντιστοιχούσαν σ' ένα βακτηριακό είδος (Σχήμα 4.2, 4.3 και 4.4).

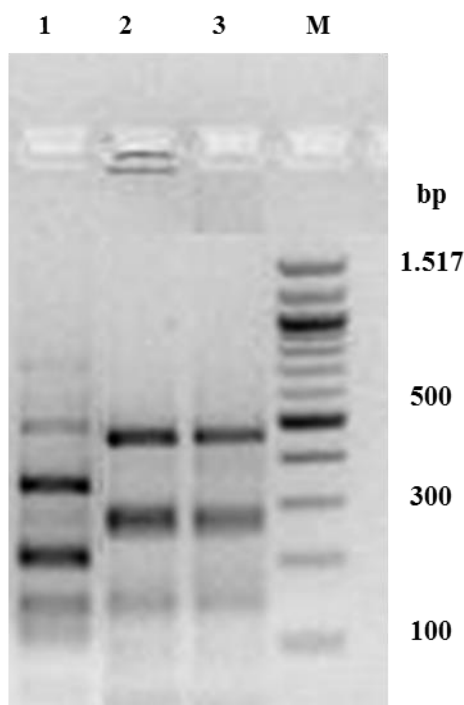
Σχήμα 4.2: Διαφορετικά πρότυπα περιορισμού ύστερα από την πέψη με το περιοριστικό ένζυμο MseI. M: Μάρτυρας μοριακών μεγεθών 100 bp. 1,2, 4-9 και 14: *Lactobacillus plantarum*. 3, 12 και 13: *Pediococcus pentosaceus*. 10 και 11: *Staphylococcus epidermidis*.



Σχήμα 4.3: Διαφορετικά πρότυπα περιορισμού ύστερα από την πέψη με το περιοριστικό ένζυμο MseI. M: Μάρτυρας μοριακών μεγεθών 100bp. 1-5: *Pediococcus pentosaceus*. 6-9: *Weissella minor*. 10: *Lactobacillus graminis*.



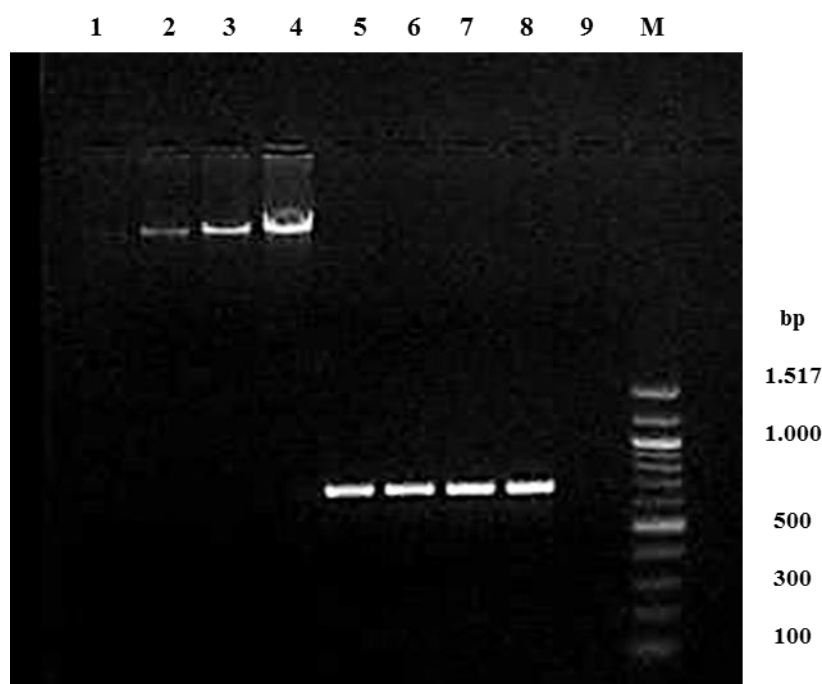
Σχήμα 4.4: Διαφορετικά πρότυπα περιορισμού ύστερα από την πέψη με το περιοριστικό ένζυμο MseI. M: Μάρτυρας μοριακών μεγεθών 100bp. 1: *Streptococcus* sp. 2 και 3: *Lactobacillus plantarum*.



4.3.2. Ο καθαρισμός του DNA και η προετοιμασία για την αλληλούχιση του

Για την επιβεβαίωση του γονιδιακού προφίλ, που προέκυψε από την πέψη (§ 4.3.1) έλαβε χώρα αλληλούχιση της V1-V3 περιοχής του ριβοσωμικού DNA (rDNA). Το προϊόν PCR υποβλήθηκε σε μία διαδικασία καθαρισμού (§ 3.2.7) και μετά από τη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης και της ποσοτικοποίησης, ακολούθησε η αλληλούχιση. Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιούνταν με τη βοήθεια λ φάγων, οι οποίοι προστίθονταν, σε γνωστές συγκεντρώσεις, για ηλεκτροφόρηση μαζί με τα PCR προϊόντα, και η ποσοτικοποίηση των τελευταίων επιτυγχάνονταν μέσω της σύγκρισης της φωτεινότητας τους, με τη φωτεινότητα των λ φάγων (Σχήμα 4.5).

Σχήμα 4.5: Προϊόν PCR της V1-V3 περιοχής του ριβοσωμικού DNA. M: Μάρτυρας μοριακών μεγεθών 100 bp. 1-4: λ φάγοι, που χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση των προϊόντων PCR, με τον αριθμό 1 να αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 20 ng/μl, τον αριθμό 2 σε συγκέντρωση 50 ng/μl, τον αριθμό 3 σε συγκέντρωση 100 ng/μl και τον αριθμό 4 σε συγκέντρωση 200 ng/μl. 5-8: Ενισχυμένες γονιδιακές περιοχές διαφορετικών βακτηριακών στελεχών συγκέντρωσης 200 ng/μl. 9: Αρνητικός μάρτυρας του πειράματος (διάλυμα PCR χωρίς προσθήκη DNA).



Από τα βακτηριακά στελέχη που είχαν το ίδιο γονιδιακό προφίλ, επιλέγονταν ένας αντιπρόσωπος, για να σταλεί για αλληλούχιση, και τα αποτελέσματα που προέκυπταν αφορούσαν όλη την ομάδα των παρόμοιων στελεχών.

4.3.3. Διαφοροποίηση των ειδών *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paraplantarum* και *Lactobacillus pentosus*

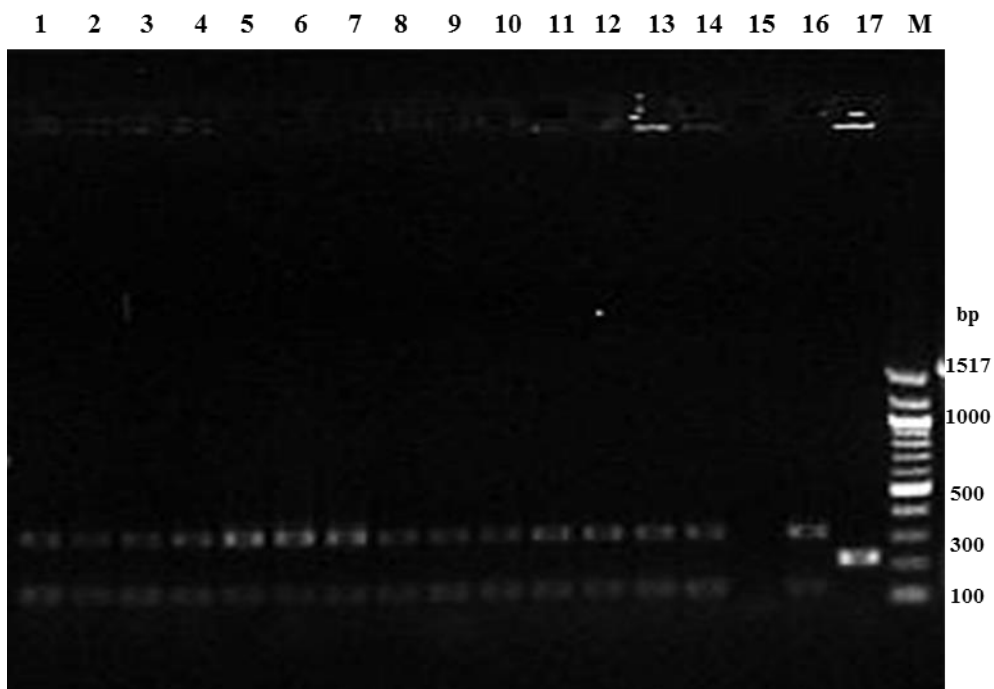
Εκτός από τη διαδικασία της αλληλούχισης (§ 4.3.2), ένας άλλος τρόπος που εξυπηρετεί στη διαφοροποίηση και στην πλήρη ταυτοποίηση, σε επίπεδο είδους, των βακτηριακών στελεχών και χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη μεταπτυχιακή

μελέτη, για τη διαφοροποίηση των ειδών *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paraplantarum* και *Lactobacillus pentosus*, ήταν μία διαδικασία πολλαπλής PCR (§ 3.2.6). Τα συγκεκριμένα βακτηριακά είδη, έχουν παρόμοια γονιδιακά προφίλ, όταν περιοχή του γονιδιώματος τους υπόκειται σε αντίστοιχη πέψη, με αυτή που περιγράφηκε παραπάνω (§ 4.3.1), και έτσι είναι δύσκολο να διαφοροποιηθούν.

Η διαδικασία της συγκεκριμένης πολλαπλής PCR στηρίζεται στην ενίσχυση του γονιδίου *recA*, το οποίο βρίσκεται στο γονιδίωμα των βακτηρίων, και μέσω της χρήσης τριών εκκινητών, ειδικών για τα τρία αναφερόμενα βακτηριακά είδη (*planF* για τον *Lactobacillus plantarum*, *pentF* για τον *Lactobacillus pentosus* και *paraF* για τον *Lactobacillus paraplantarum*) και ενός αντίστροφου εκκινητή (*pREV*), λαμβάνει χώρα η διαφοροποίηση τους. Σαν διαδικασία είναι λιγότερο χρονοβόρα και πολύ πιο οικονομική από τη διαδικασία της αλληλούχισης και για τη διαφοροποίηση των συγκεκριμένων βακτηριακών ειδών, χρησιμοποιήθηκε εξ' ολοκλήρου αυτή.

Μετά τη διαδικασία της ανάλυσης περιορισμού της ενισχυμένης 16S ριβοσωμικής υποπεριοχής (§ 4.3.1), όποια βακτηριακά δείγματα προέκυπταν ένα από τα τρία παραπάνω βακτηριακά είδη, υπόκεινταν στη διαδικασία πολλαπλής PCR και ύστερα από την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων και τη μετέπειτα έκθεση αυτών σε UV ακτινοβολία, λάμβανε χώρα η διαφοροποίηση τους (Σχήμα 4.6).

Σχήμα 4.6: Προϊόντα της πολλαπλής PCR. M: Μάρτυρας μοριακών μεγεθών 100 bp. 1-14: Ενισχυμένες βακτηριακές περιοχές διαφορετικών στελεχών, τα οποία ύστερα από τη διαδικασία της πέψης θεωρήθηκαν *Lactobacillus plantarum* ή *Lactobacillus pentosus*. 16 και 17: Θετικοί μάρτυρες της διαδικασίας, με τον αριθμό 16 να αντιπροσωπεύει το προφίλ του *Lactobacillus plantarum* και τον αριθμό 17 να αντιπροσωπεύει το προφίλ του *Lactobacillus pentosus*. 15: Αρνητικός μάρτυρας του πειράματος (διάλυμα PCR χωρίς προσθήκη DNA).



4.4. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα

Μέσω της εφαρμογής των μεθόδων, που αναφέρθηκαν παραπάνω, προέκυψαν διάφορα συγκεντρωτικά αποτελέσματα για τα είδη των βακτηρίων γαλακτικού οξέος που απομονώθηκαν, σε ποια στάδια παρατηρήθηκαν, κατά το πλείστον, και κατά πόσο οι δύο γεωγραφικές περιοχές, από τις οποίες πάρθηκαν τα δείγματα σταφυλιών, παρουσιάζουν παρόμοια βακτηριακή μικροχλωρίδα.

Όπως παρουσιάζεται και στον πίνακα 4.3, ύστερα από τις διαδικασίες της απομόνωσης, της ταυτοποίησης και της αλληλούχισης, παρατηρήθηκαν επτά διαφορετικά πρότυπα, τα οποία αντιστοιχούν σε επτά διαφορετικά είδη βακτηρίων. Πιο συγκεκριμένα, με την ενίσχυση της 16S ριβοσωμικής περιοχής και την πέψη με το ένζυμο MseI, προέκυψαν τα είδη *Staphylococcus epidermidis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Weissella minor*, *Lactobacillus graminis*, *Lactococcus lactis* και *Streptococcus* sp.. Το είδος *Lactobacillus plantarum*, προέκυψε ύστερα από μία επιπλέον ενίσχυση του recA γονιδίου με την πολλαπλή PCR (§ 4.3.3).

Πίνακας 4.3: Παρουσίαση των επτά διαφορετικών γονιδιακών προφίλ και του είδους στο οποίο το καθένα από αυτά αντιστοιχεί, σε συνδυασμό με τις αντίστοιχες πληροφορίες από την ενίσχυση και την πέψη του.

Πρότυπο	Προϊόν PCR (bp)	Θραύσματα περιορισμού (bp)	Είδος
I	1500	600, 400, 290, 140, 90	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
II	1500	280, 260, 240, 130, 120, 100, 90	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
III	1500	480, 290, 260, 150, 130, 100, 84	<i>Lactobacillus plantarum</i> ^α
IV	1500	400, 250, 240, 210, 130, 90	<i>Weissella minor</i>
V	1500	600, 280, 260, 150, 130, 90	<i>Lactobacillus graminis</i>
VI	1500	430, 380, 260, 180, 150, 130	<i>Lactococcus lactis</i>
VII	1500	420, 260, 170, 130, 120, 60	<i>Streptococcus sp.</i> ^β

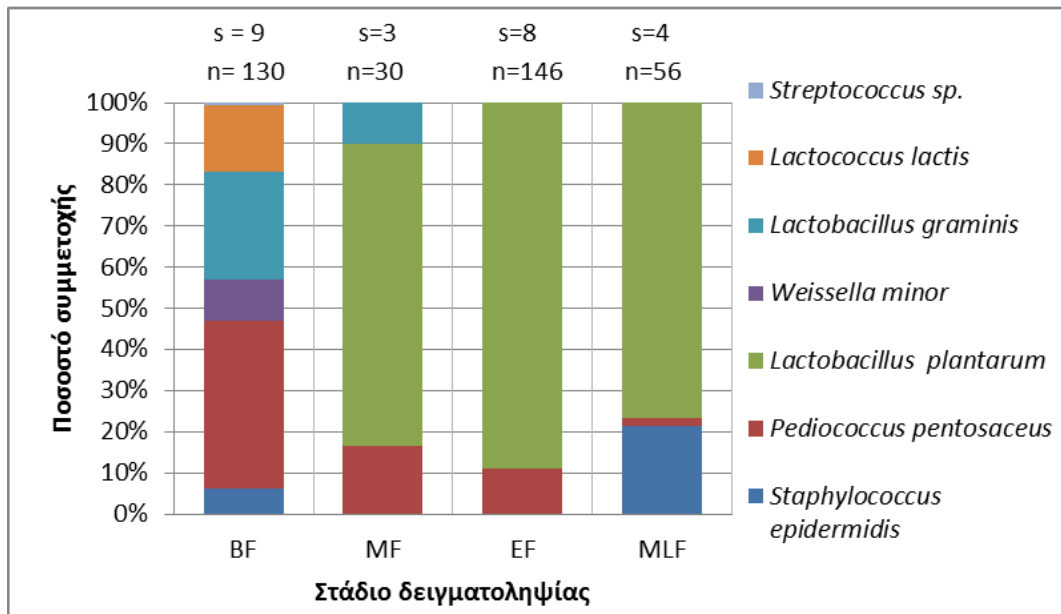
α: Το είδος *Lactobacillus plantarum* προέκυψε ύστερα και από μία επιπλέον διαδικασία πολλαπλής PCR (§ 3.2.8). β: Ύστερα και από τη διαδικασία αλληλούχισης προέκυψαν δύο πιθανά είδη, *Streptococcus lutetiensis* / *infantarium*.

Αν και επτά τα διαφορετικά βακτηριακά είδη που απομονώθηκαν, συγκριτική μελέτη της παρουσίας του καθενός εξ' αυτών στα διάφορα δειγματοληπτικά στάδια (BF, MF, EF) και στο επαναλαμβανόμενο στάδιο MLF, κατέδειξε ότι η βακτηριακή μικροχλωρίδα μεταβαλλόταν αισθητά από δειγματοληπτικό στάδιο, σε δειγματοληπτικό στάδιο.

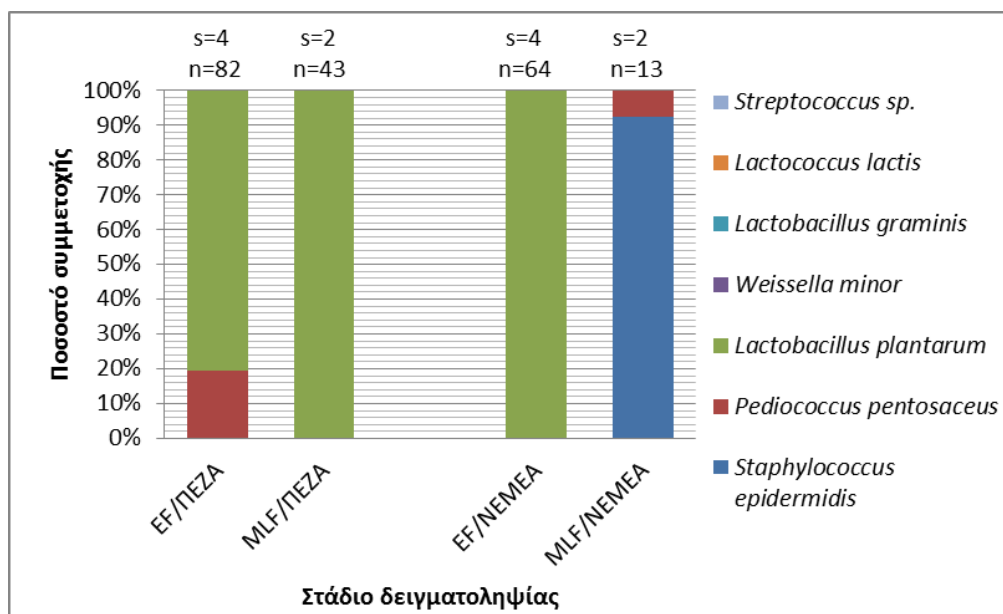
Πιο συγκεκριμένα και παρατηρώντας και το γράφημα 4.1, όπως και τον πίνακα 4.4, τα βακτηριακά είδη *Streptococcus* sp., *Lactococcus lactis* και *Weissella minor* εμφανίζονται μόνο στο στάδιο BF. Από την άλλη, το είδος *Lactobacillus graminis* εμφανίζεται στα στάδια BF και MF, αλλά απουσιάζει από τα επόμενα. Σε δύο στάδια, αλλά διαφορετικά από την προηγούμενη περίπτωση, εμφανίζεται και το είδος *Staphylococcus epidermidis*, το οποίο παρατηρείται στο BF και έπειτα ξανά στο EF στάδιο. Τέλος, το είδος *Lactobacillus plantarum* εμφανίζεται σε τρία στάδια (MF, EF, MLF) αποτελώντας και το υπερέχον βακτηριακό είδος, όπως και το είδος *Pediococcus pentosaceus*, που μπορεί να μην αποτελεί το υπερέχον βακτηριακό είδος, αλλά εμφανίζεται σε όλα τα στάδια.

Εστιάζοντας στο τελικό στάδιο της αλκοολικής ζύμωσης και στα στάδια, μετά το πέρας αυτής, τα οποία αποτελούν και δείκτη για το ποια βακτηριακά είδη δύνανται να ανέχονται τις συνθήκες της αλκοολικής ζύμωσης και να συμβάλλουν, στην πορεία, στη μηλογαλακτική ζύμωση, είναι φανερό (Πίνακας 4.4 και Γράφημα 4.2) ότι και για τις δύο γεωγραφικές περιοχές, στα δείγματα στα οποία έλαβε χώρα δειγματοληψία στα συγκεκριμένα στάδια, παρατηρήθηκε μεγάλη παρουσία του βακτηριακού είδους *Lactobacillus plantarum*, ακολουθούμενο από το βακτηριακό είδος *Pediococcus pentosaceus*. Ως μεμονωμένο γεγονός θεωρείται η παρουσία του βακτηριακού είδους *Staphylococcus epidermidis* σε ένα δείγμα από τη γεωγραφική περιοχή της Νεμέας.

Γράφημα 4.1: Παρουσίαση του επί τοις εκατό ποσοστού συμμετοχής του καθενός εκ των επτά βακτηριακών ειδών, όπως παρουσιάζεται στα τέσσερα στάδια δειγματοληψίας. Τα αποτελέσματα αφορούν το σύνολο των υπό μελέτη δειγμάτων και από τις δύο γεωγραφικές περιοχές. Ο αριθμός των απομονωμένων βακτηρίων (n) και το σύνολο των δειγμάτων (s), από τα οποία απομονώθηκαν, αναγράφεται πάνω από κάθε στήλη.



Γράφημα 4.2: Συγκριτική παρουσίαση του επί τοις εκατό ποσοστού συμμετοχής του καθενός εκ των επτά βακτηριακών ειδών, όπως παρουσιάζεται στα στάδια EF και MLF. Τα αποτελέσματα αφορούν τα δείγματα των Πεζών και της Νεμέας, στα οποία έλαβε χώρα απομόνωση βακτηριακής μικροχλωρίδας στα συγκεκριμένα στάδια. Ο αριθμός των απομονωμένων βακτηρίων (n) και το σύνολο των δειγμάτων (s), από τα οποία απομονώθηκαν, αναγράφεται πάνω από κάθε στήλη.



Πίνακας 4.4: Παρουσίαση του επί τοις εκατό ποσοστού συμμετοχής, του καθενός εκ των επτά βακτηριακών ειδών, όπως παρουσιάζεται στο εκάστοτε δείγμα, των δύο υπό μελέτη γεωγραφικών περιοχών.

Κωδικός Δείγματος	Στάδιο Δειγματοληψίας	Συμμετοχή (%)						
		<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Weissella minor</i>	<i>Lactobacillus graminis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Streptococcus sp.</i>
18P	MLF			100				
23P	MLF			100				
30P	MF			100				
32P	EF		100					
44P	EF			100				
45P	EF			100				
49P	EF			100				
9N	BF	100						
	MF					100		

	EF		100			
12N	BF					100
	MLF	100				
18N	BF			66,67	16,67	5,56
19N	EF		100			
22N	BF	57,14	42,86			
23N	BF					100
24N	BF		100			
25N	BF		96	4		
	MLF		100			
28N	BF					100
	EF		100			
29N	EF		100			
31N	BF		100			
	MF		100			

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι ράγες των σταφυλιών αποτελούν ένα ποικιλόμορφο οικοσύστημα, το οποίο φιλοξενεί πολλά είδη ζυμών και βακτηρίων. Όλα αυτά τα είδη, είτε προέρχονται από το εξωτερικό περιβάλλον, είτε αποτελούν μέρος της ενδογενούς μικροχλωρίδας, αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και συμβάλλουν, με το δικό τους τρόπο, στην αλκοολική και στη μηλογαλακτική ζύμωση (Ruiz *et al.*, 2010). Στην περίπτωση δε των αυθόρμητων ζυμώσεων, η επίδραση τους στη διάρκεια της ζύμωσης είναι μεγαλύτερη, από τη στιγμή που δεν χρησιμοποιούνται εναρκτήριες καλλιέργειες για να καθορίσουν λίγο πολύ το αποτέλεσμα αυτής. Έτσι, δύναται να προσδώσουν στον οίνο τα δικά τους ιδιαίτερα χαρακτηριστικά και στην περίπτωση συσχέτισης τους με τη γεωγραφική περιοχή, από την οποία προέρχονται τα σταφύλια, τα χαρακτηριστικά αυτά να προσδώσουν στον οίνο χαρακτήρα τοπικό (Querol *et al.*, 1992b; SchuÈtz and Gafner, 1993). Γι αυτόν και για πολλούς ακόμα λόγους είναι πολύ σημαντική η συμβολή των μοριακών μεθόδων για την ταυτοποίηση των βακτηριακών ειδών του οίνου. Μοριακές μέθοδοι όπως αυτές που στηρίζονται στη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR), αποτελούν σημαντικό εργαλείο σε έναν τομέα που συνεχώς εξελίσσεται (Delley *et al.*, 2002; Roy *et al.*, 2001; Ventura *et al.*, 2001).

Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία μελετήθηκαν 14 δείγματα γλεύκους από τη ζώνη παραγωγής οίνων ΠΟΠ των Πεζών, στην Κρήτη, και 31 δείγματα γλεύκους από τη ζώνη παραγωγής οίνων ΠΟΠ της Νεμέας, στην Πελοπόννησο. Από τη ζώνη των Πεζών μελετήθηκαν δείγματα των ποικιλιών Βηλάνα, Κοτσιφάλι και Μαντηλάρι, σε πέντε αμπελώνες, και από τη ζώνη της Νεμέας, δείγματα της ποικιλίας Αγιωργίτικο, σε εννέα αμπελώνες. Συνολικά 125 στελέχη Gram θετικών και αρνητικών στην καταλάση βακτηρίων απομονώθηκαν από επτά δείγματα της ζώνης των Πεζών και συνολικά 254 από έντεκα δείγματα της ζώνης της Νεμέας (Πίνακας 4.1 και 4.2). Η απομόνωση των βακτηριακών στελεχών έλαβε χώρα σε ένα μόνο στάδιο της αλκοολικής ζύμωσης ή στο στάδιο της μηλογαλακτικής ζύμωσης, με εξαίρεση στα δείγματα 9N, 12N, 28N και 31N, στα οποία η απομόνωση πραγματοποιήθηκε σε περισσότερα του ενός δειγματοληπτικά στάδια. Για τη ζώνη των Πεζών, τα στελέχη απομονώθηκαν κυρίως από το τελικό στάδιο της ζύμωσης (στάδιο EF), εν αντιθέση με τη ζώνη της Νεμέας, όπου τα στελέχη απομονώθηκαν κυρίως από το αρχικό στάδιο της αλκοολικής ζύμωσης (στάδιο BF). Είναι γεγονός ότι κατά τη διάρκεια της αυθόρμητης αλκοολικής ζύμωσης, η οποία δύναται να ακολουθηθεί από τη μηλογαλακτική, δεν ελέγχεται το είδος και ο αριθμός των μικροοργανισμών που θα

παίξουν ρόλο σε αυτές. Έτσι, διαφορετικά είδη βακτηρίων του γαλακτικού οξέος και όχι μόνο, παρουσιάζονται στο γλεύκος και το καθένα επιδρά διαφορετικά στο περιβάλλον αυτού, με ποικιλία συνεπειών ανάλογα με την περίπτωση.

Καθ' όλη τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, ακόμα και μετά το στάδιο της αποζύμωσης, υπήρξε μεγάλη παρουσία βακτηρίων του οξικού οξέος, γεγονός που δημιούργησε πρόβλημα στην απομόνωση των Gram (+) βακτηρίων, όπως και στη γενικότερη ανάπτυξή τους στα δείγματα των ζυμούμενων γλευκών. Αν και ο πληθυσμός των βακτηρίων του οξικού οξέος μειώνεται αισθητά από τα πρώτα κιάλας στάδια της αλκοολικής ζύμωσης, λόγω έλλειψης οξυγόνου, με την παραμικρή έκθεση του ζυμούμενου γλεύκους στον ατμοσφαιρικό αέρα, η ανάπτυξή τους δύναται να διεγερθεί (*Drysdale and Fleet, 1989b; Millet and Lonvaud-Funel, 2000*). Επίσης, υπάρχουν περιπτώσεις στις οποίες η αλκοολική ζύμωση σταματάει ή δεν εξελίσσεται με κανονικό ρυθμό. Έτσι, η μικρή παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα (CO₂) δεν επαρκεί για τη δημιουργία των αναερόβιων παρεμποδιστικών συνθηκών (*Fugelsang and Edwards, 2007*). Από την άλλη, οι αναερόβιες συνθήκες δεν καθίστανται πάντα απαγορευτικές για την επιβίωση των συγκεκριμένων βακτηρίων και ίσως απλά να επιβραδύνουν το ρυθμό ανάπτυξής τους (*Du Toit and Lambrechts, 2002*). Όπως αποδείχθηκε και σε παλαιότερες έρευνες, βακτήρια του οξικού οξέος κατάφεραν να απομονωθούν από τον πάτο βαρελιών παλαίωσης οίνου, σε περιβάλλον, δηλαδή, αν όχι μηδενικής, ελάχιστης συγκέντρωσης οξυγόνου (*Drysdale and Fleet, 1989b; Joyeux et al., 1984b*). Η γρήγορη ανάπτυξη των βακτηρίων του οξικού οξέος, ίσως να ωφελήθηκε και από την παρουσία των άγριων ζυμών, αρχικά, και του *Saccharomyces cerevisiae* στα μετέπειτα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης, καθώς η κύρια πηγή άνθρακα για τα βακτήρια αυτά είναι η αιθανόλη, που αποτελεί κύριο μεταβολικό προϊόν των ζυμών (*Drysdale and Fleet, 1988; Du Toit and Lambrechts, 2002; Du Toit and Pretorius, 2002; Joyeux et al., 1984a; Poblet et al., 2000b*).

Ένας ακόμα σημαντικός παράγοντας που ίσως να επηρέασε την ανάπτυξη των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος, ήταν η ανάπτυξη των ζυμών. Η αλκοολική ζύμωση έχει ως κύριο αποτέλεσμα τον καταβολισμό του μεγαλύτερου ποσοστού των σακχάρων του γλεύκους, την παραγωγή αιθανόλης και CO₂. Η παραγωγή αιθανόλης είναι μία σημαντική αιτία για την κατακόρυφη μείωση των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος και περισσότερο εκείνων που δεν παρουσιάζουν ανθεκτικότητα και έτσι, καταφέρνουν να επιβιώσουν μόνο στα αρχικά στάδια της διαδικασίας (*Henick-*

Kling, 1993). Βέβαια, όλα είναι θέμα βακτηριακού είδους, δεδομένου ότι κάποια είδη ανέχονται υψηλά επίπεδα αιθανόλης μέχρι και 14 % (v/v), τη στιγμή που οι περισσότεροι οίνοι φτάνουν μέχρι 8-12 % (v/v), (*Capucho and San Romao, 1994*). Εκτός από την υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης, και η έλλειψη θρεπτικών, λόγω του καταβολισμού της μεγαλύτερης ποσότητας σακχάρων από τις ζύμες, παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των βακτηρίων αυτών. Αν και δεν αποτελεί πάντα σημαντικό εμπόδιο, υπάρχουν περιπτώσεις, ανάλογα και με το είδος των σταφυλιών, όπου η συγκέντρωση των σακχάρων, μετά το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης, μειώνεται μέχρι και τα 0,5 gr/L, επιβραδύνοντας την ανάπτυξη των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος που έχουν επιβιώσει (*Maicas et al, 1999a*). Τέλος, υπάρχουν είδη ζυμών που παράγουν μεταβολικά προϊόντα με αντιβακτηριακή δράση. Ένα συχνό παράδειγμα της κατηγορίας είναι τα λιπαρά οξέα όπως το δεκανοειδές και το δωδεκανοειδές. Έρευνες έχουν δείξει ότι παρουσία του δεκανοειδούς λιπαρού οξέος σε συγκέντρωση μεγαλύτερη από 12,5 mg/L και του δωδεκανοειδούς σε συγκέντρωση μεγαλύτερη από 2,5 mg/L, παρουσία 4 % (v/v) αιθανόλης, δρουν παρεμποδιστικά για τη μηλογαλακτική ζύμωση (*Alexandre et al, 2004; Capucho & San Romao, 1994; Edwards et al, 1990*).

Για την αρχική ταυτοποίηση στελεχών, που απομονώθηκαν, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της ανάλυσης περιορισμού της ενισχυμένης 16S ριβοσωμικής υποπεριοχής (16S amplified ribosomal DNA restriction analysis - ARDRA), (*Rodas, Ferrer and Pardo, 2003*), κατά την οποία ύστερα από μία διαδικασία αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR), (Σχήμα 4.1) και μία πέψη, προέκυψαν διαφορετικά πρότυπα περιορισμού, τα οποία αντιστοιχούσαν και σε ένα ξεχωριστό βακτηριακό είδος το καθένα (Σχήμα 4.2, 4.3, 4.4). Λόγω του ότι τα βακτηριακά είδη *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* και *Lactobacillus paraplantarum* εμφανίζουν πολύ κοινό πρότυπο περιορισμού, όταν γίνεται χρήση του παραπάνω τρόπου ταυτοποίησης τους, έλαβε χώρα μία πολλαπλή (multiplex) PCR, (*Torriani, Felis and Dellaglio, 2001*), για τον περαιτέρω διαχωρισμό τους (Σχήμα 4.6). Τέλος, ύστερα από την ταυτοποίηση των δειγμάτων, ένας αντιπρόσωπος από την ομάδα του κάθε βακτηριακού είδους, υποβλήθηκε σε ανάλυση αλληλούχισης για την πλήρη επιβεβαίωση του προτύπου.

Από τα αποτελέσματα και των μοριακών τεχνικών προέκυψαν επτά είδη βακτηρίων, όπως φαίνεται και στον πίνακα 4.3, με διαφορετική παρουσία και συμβολή στη

ζυμωτική διαδικασία. Όπως παρουσιάζεται και στο γράφημα 4.1, στο αρχικό στάδιο της αλκοολικής ζύμωσης (στάδιο BF) εμφανίζονται τα περισσότερα βακτηριακά είδη (*Streptococcus* sp., *Lactococcus lactis*, *Weissella minor*, *Staphylococcus epidermidis*, *Lactobacillus graminis* και *Pediococcus pentosaceus*) εκτός του *Lactobacillus plantarum*. Το ζυμωτικό αυτό στάδιο, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ποικιλία βακτηριακών ειδών, λόγω του ότι η αλκοολική ζύμωση δεν έχει ακόμα ξεκινήσει και σε συνδυασμό με την απουσία ή την παρουσία μικρού πληθυσμού βακτηρίων του οξικού οξέος, τα Gram (+) βακτήρια, και κυρίως τα γαλακτικά, δύναται να αναπτυχθούν αποτελεσματικότερα. Το γεγονός αυτό παρατηρείται και στον πίνακα 4.4, όπου σε δείγματα, από τα οποία έχει πραγματοποιηθεί απομόνωση στο στάδιο BF (18N, 22N), περισσότερα του ενός βακτηριακά είδη συνθέτουν το συνολικό πληθυσμό. Από τα είδη που εμφανίζονται στο αρχικό στάδιο της αλκοολικής ζύμωσης, μόνο τα τρία παρουσιάζονται και σε επόμενα στάδια. Πιο συγκεκριμένα, το είδος *Lactobacillus graminis* παρουσιάζεται και στο μεσαίο στάδιο της αλκοολικής ζύμωσης (στάδιο MF), απουσιάζοντας βέβαια απ' όλα τα υπόλοιπα. Μαζί με τα είδη *Streptococcus* sp., *Lactococcus lactis* και *Weissella minor* αποτελούν βακτήρια του γαλακτικού οξέος, που δεν έχει δειχθεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στη μηλογαλακτική ζύμωση. Αν και έχουν παρατηρηθεί και άλλες φορές σε ζυμούμενο γλεύκος, οι αντοχές τους είναι ελάχιστες στα εμπόδια που δύναται να συναντήσουν στη διαδικασία, όπως είναι η υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης και η μείωση του pH (Lonvaud-Funel, 1999; Fugelsang and Edwards, 2007; Ruiz, et al., 2010). Η παρουσία του είδους *Staphylococcus epidermidis*, από την άλλη, το οποίο απομονώθηκε και από ένα ακόμα δείγμα μετά την αποζύμωση, κατά τη μελέτη της μηλογαλακτικής ζύμωσης (στάδιο MLF), δύναται να θεωρηθεί τυχαία, λόγω εξωτερικής μόλυνσης, καθώς το περιβάλλον ανάπτυξης του είναι το δέρμα των ζώων και των ανθρώπων (Otto, 2009; Queck and Otto, 2008).

Τα είδη *Pediococcus pentosaceus* και *Lactobacillus plantarum*, δύναται να θεωρηθούν τα πιο ανθεκτικά από τα επτά που απομονώθηκαν. Το είδος *Pediococcus pentosaceus* απομονώθηκε απ' όλα τα στάδια της ζυμωτικής διαδικασίας με μεγαλύτερη παρουσία στα πρώτα δύο στάδια της αλκοολικής ζύμωσης (στάδιο BF και στάδιο MF), επιδεικνύοντας, όμως σε κάποια σημεία σημαντική ανθεκτικότητα. Όπως φαίνεται και στον πίνακα 4.4, στο δείγμα 25N παρουσιάζεται στο στάδιο BF και ύστερα απομονώνεται ξανά μετά το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης, στην μελέτη

της μηλογαλακτικής (στάδιο MLF). Το γεγονός αυτό, υποδηλώνει ότι το συγκεκριμένο είδος κατάφερε να επιβιώσει στο αφιλόξενο περιβάλλον που δημιουργείται από τις ζύμες, κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, ώστε να μπορέσει να διεγερθεί η ανάπτυξη του μετά το πέρας αυτής, στη μηλογαλακτική ζύμωση. Το είδος *Lactobacillus plantarum*, παρουσιάζεται ως το υπερέχων απομονωμένο βακτηριακό είδος, καθώς απομονώθηκε σε επαρκή πληθυσμό απ' όλα τα στάδια της ζυμωτικής διαδικασίας, εκτός του σταδίου BF και υπερίσχυσε και στο στάδιο της αποζύμωσης, αλλά και της μηλογαλακτικής ζύμωσης, και στις δύο γεωγραφικές περιοχές, όπως φαίνεται και στο γράφημα 4.2. Σαν βακτηριακά είδη, δεν θεωρούνται ως τα πιο ζυμωτικά της κατηγορίας και το είδος *Oenococcus oeni* αποτελεί πάντα το κατάλληλο για τη πραγματοποίηση της μηλογαλακτικής ζύμωσης (Henick-Kling, 1993; Kunkee, 1991; Renouf, Claisse and Lonvaud-Funel, 2007). Παρ' όλα αυτά, δεν είναι λίγες οι έρευνες στις οποίες έχει αποδειχθεί η αντοχή τους στις αφιλόξενες συνθήκες της αλκοολικής ζύμωσης, αλλά και η παραγωγή χρήσιμων μεταβολικών προϊόντων, γεγονός που μπορεί να καταδεικνύει και τη σημαντική συνεισφορά που μπορούν να έχουν, κατά συνέπεια, στη μηλογαλακτική ζύμωση (du Plessis et al., 2004; Edwards and Jensen, 1992; Izquierdo, Ruiz, Sesepa and Palop, 2009; Manca de Nadra and Strasser de Saad, 1995; Ribireau-Gayon, Glories, Maujean and Dubourdieu, 2000). Βέβαια, αυτός είναι ένας τομέας που πρέπει να μελετηθεί διεξοδικότερα, για να δειχθεί κατά πόσο τα δύο αυτά βακτηριακά είδη, ή ένα τουλάχιστον από αυτά, έχει τη δυνατότητα να ολοκληρώσει την αλκοολική ζύμωση χωρίς την παρουσία του είδους *Oenococcus oeni*. Αν όχι, θα πρέπει να δειχθεί κατά πόσο θα μπορούσε να υπάρξει συνδυασμός ζυμωτικών ειδών, δεδομένου ότι και το είδος *Lactobacillus plantarum*, όπως και το είδος *Pediococcus pentosaceus* έχει αποδειχθεί ότι παράγουν βακτηριοσίνες έναντι κυρίως του είδους *Oenococcus oeni*, άλλα και μεταξύ τους (Biswas et al., 1991; Navarro et al., 2000; Lonvaud-Funel and Joyeux, 1993; Strasser de Saad and Manca de Nadra, 1993). Η παραγωγή βακτηριοσινών ίσως να ήταν και ένας λόγος που δεν απομονώθηκε από κανένα δείγμα, στο οποίο απομονώθηκε το είδος *Lactobacillus plantarum* ή *Pediococcus pentosaceus*, το είδος *Oenococcus oeni*. Επίσης, αυτός δύναται να είναι και ο λόγος για την απουσία συμβίωσης στο ίδιο δείγμα των δύο ειδών, *Lactobacillus plantarum* και *Pediococcus pentosaceus*.

Την ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους θα πρέπει να ακολουθήσει μελλοντικά η ταυτοποίηση σε επίπεδο στελέχους, για τον πλήρη χαρακτηρισμό των απομονωμένων βακτηριακών ειδών, της συγκεκριμένης μελέτης. Με αυτόν τον τρόπο, θα μπορέσει να μελετηθεί σε άλλο επίπεδο η βακτηριακή μικροχλωρίδα στα διαφορετικά στάδια της ζυμωτικής διαδικασίας και να αποδειχθεί ποια στελέχη, πλέον, παίζουν ρόλο σε αυτή, μελετώντας τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά τους. Έτσι, θα μπορούσε να καταστεί δυνατή και η σωστή διαλογή εκείνων των βακτηριακών στελεχών που έχουν την ικανότητα να προσδώσουν έναν ιδιαίτερο χαρακτήρα στον οίνο, ο οποίος να εξαρτάται και από την γεωγραφική ζώνη, στην οποία παράγεται.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Agouridis, N., Bekatorou, A., Nigam, P., & Kanellaki, M. (2005). “Malolactic fermentation in wine with *Lactobacillus casei* cells immobilized on delignified cellulosic material. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2546–2551.

Alexandra, H., Costello, P.J., Remize, R., Guzzo, J. Guilloux-Benatier, M., (2004). “*Saccharomyces cerevisiae*-*Oenococcus oeni* interactions in wine: current knowledge and perspectives”. *Int. J. Food Microbiol.* 93, 141-154.

Alexandre, H., Heintz, D., Chassagne, D., Guilloux-Benatier, M., Charpentier, C., Feuillat, M., (2001). “Protease A activity and nitrogen fractions released during alcoholic fermentation and autolysis in enological conditions”. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 26, 235– 240.

Alur, M.D. (2000). “*Botrytis*”. In: *Encyclopedia of Food Microbiology*. R.K. Robinson, C.A. Batt, and P.D. Patel (Eds.), Volume 1, pp. 279–283. Academic Press, New York, NY.

Axelsson LT. (1993). “Lactic acid bacteria: classification and physiology”. In: Salminen S, von Wright A, editors. *Lactic Acid Bacteria*. New York: Marcel Dekker, Inc.,:1– 63.

Barbe J.-C., de Revel G., Joyeux A., Bertrand A., Lonvaud-Funel A. (2001). “Role of botrytized grape micro-organisms in SO₂ binding phenomena”. *J. Appl. Microbiol.*, 90: 34-42.

Bartowsky, E., Costello, P., Henschke, P., (2002). “Management of malolactic fermentation—wine flavour manipulation”. *Australian and New Zealand Grapegrower and Winemaker* 461a (7–8), 10–12.

Bartowsky, E.J. and P.A. Henschke. (2004a). “The “buttery” attribute of wine diacetyl desirability, spoilage and beyond”. *Int. J. Food Microbiol.* 96: 235–252.

Bartowsky, E.J. and P.A. Henschke. (2004b). “The “buttery” attribute of wine diacetyl desirability, spoilage and beyond. Butter or no butter”. In: *Proceedings*

Biswas, S.R., Ray, P., Johnson, M.C. and Ray, B. (1991). “Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, pediocin AcH, by *Pediococcus acidilactici*”. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 1265-1267.

Boido, E., A. Lloret, K. Medina, F. Carrau, and E. Dellacassa. (2002). “Effect of glycosidase activity of *Oenococcus oeni* on the glycosylated flavor precursors of Tannat wine during malolactic fermentation”. *J. Agric. Food Chem.* 50: 2344–2349. *of the XVies Entretiens Scientifi ques Lallemand.* pp. 11–17. Oporto, Portugal.

Capucho, I., San Romao, M.V. (1994). “Effect of ethanol and fatty acids on malolactic activity of *Leuconostoc oenos*”. *Applied Microbiology and Biotechnology* 42, 391–395.

Carlile, M.J., S.C. Watkinson, and G.W. Gooday. (2001). “*The Fungi*, 2nd edition”. Academic Press, New York, NY.

Carr, F.J., Chill, D. and Maida. N. (2002). “The lactic acid bacteria: a literature survey”. *Crit. Rev. Microbiol.* 28: 281–370.

Charoenchai C, Fleet GH, Henschke PA & Todd BEN (1997). “Screening of non-Saccharomyces wine yeasts for the presence of extracellular hydrolytic enzymes”. *Austr J Grape Wine Res* 3: 2–8.

Charpentier, C., Feuillat, M., (1993). “Yeast autolysis”. In: Fleet, G.H. (Ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland, pp. 225– 242.

Corsetti, A., Lavermicocca, P., Morea, M., Baruzzi, F., Tosti, N., & Gobbetti, M. (2001). “Phenotypic and molecular identification and clustering of lactic acid bacteria and yeasts from wheat (species *Triticum durum* and *Triticum aestivum*) sourdoughs of Southern Italy”. *International Journal of Food Microbiology*, 64, 95–104.

Costantini, A., García-Moruno, E. and Moreno-Arribas, M.V. (2009). “Biochemical transformations produced by malolactic fermentation”. In: *Wine chemistry and biochemistry*. Eds. M.V. Moreno-Arribas and M.C. Polo (Springer Science+Business Media: New York) pp. 27–57.

Costello, P. J., Morrison, G. J., Lee, T. H., Fleet G. H. (1983). “Numbers and species of lactic acid bacteria in wines during vinification”. *Food Techno. Aust.* 35, 14-18.

David A. Mills, Trevor Phister, Ezekial Neeley, and Eric Johannsen L. Cocolin and D. Ercolini (eds.), (2008). “*Molecular Techniques in the Microbial Ecology of Fermented Foods*”.

Davis, C.R., D. Wibowo, G.H. Fleet, and T.H. Lee. (1988). “Properties of wine lactic acid bacteria: their potential enological significance”. *Am. J. Enol. Vitic.* 39: 137–142.

Deak, T. and L.R. Beuchat. (1996). “*Handbook of Food Spoilage Yeasts*”. CRC Press, Inc., New York, NY.

Delaquis, P., M. Cliff, M. King, B. Girard, J. Hall, and A. Reynolds. (2000). “Effect of two commercial malolactic cultures on the chemical and sensory properties of Chancellor wines vinified with different yeasts and fermentation temperatures”. *Am. J. Enol. Vitic.* 51: 42–48.

Delley M, Germond JE. (2002). “Differentiation of *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus*, subsp *lactis*, and subsp *delbrueckii* using physiological and genetic tools and reclassification of some strains from the ATCC collection”. *Syst Appl Microbiol.* 25:228–31.

Dick, K.J., Molan, P.C., Eschenbruch, R., (1992). “The isolation from *Saccharomyces cerevisiae* of two antibacterial cationic proteins that inhibit malolactic bacteria”. *Vitis* 31, 105– 116.

Drysdale, G.S. and G.H. Fleet. (1988). “Acetic acid bacteria in winemaking: a Review”. *Am. J. Enol. Vitic.* 39: 143–154.

du Plessis, H. W., Dicks, L. M. T., Pretorius, I. S., Lambrechts, M. G., & du Toit, M. (2004). “Identification of lactic acid bacteria isolated from South African brandy base wines”. *International Journal of Food Microbiology*, 91, 19–29

Du Toit, W.J. and M.G. Lambrechts. (2002). “The enumeration and identification of acetic acid bacteria from South African red wine fermentations”. *Int. J. Food Microbiol.* 74: 57–64.

Edwards, C.G. and K.A. Jensen. (1992). “Occurrence and characterization of lactic acid bacteria from Washington state wines: *Pediococcus* spp”. *Am. J. Enol. Vitic.* 43: 233–238. *Appl Microbiol Biotechnol* (2001) 56:35–39.

Fleet, G.H. and G.M. Heard. (1993). “Yeasts—Growth during fermentation . In: *Wine Microbiology and Biotechnology*. G.H. Fleet (Ed.), Chapter 2, pp. 27–55. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland.

Fornairon-Bonnefond, C., Camarasa, C., Moutounet, M., Salmon, J.-M., (2001). “Etat des connaissances scientifiques actuelles sur le phe´nome`ne d’autolyse des levures et l’e´levage des vins sur lies”. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 35, 57–78.

Fugelsang, K.C., Edwards, C.G. (2007). “Wine Microbiology”. Practical Applications and Procedures. Springer, New York.

Fugelsang, K.C., M.M. Osborn, and C.J. Muller. (1993). “*Brettanomyces* and *Dekkera*. Implications in winemaking”. In: *Beer and Wine Production*. B.H. Gump (Ed.), 536: 110–129. American Chemical Society, Washington, DC.

Gambaro, A., E. Boido, A. Zlotejablko, K. Medina, A. Lloret, E. Dellacassa, and F. Carrau. (2001). “Effect of malolactic fermentation on the aroma properties of Tannat wine”. *Aust. J. Grape Wine Res.* 7: 27–32.

Gilis, J.-F., Delia-Dupuy, M.-L., Strehaiano, P., (1996). “Etude qualitative et quantitative des interactions entre *Saccharomyces cerevisiae* et *Leuconostoc oenos*”. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 3, 151– 157.

Gonzlez, C. J., Encinas, J. P., Garcia-Lopez, M. L., & Otero, A. (2000). “Characterization and identification of lactic acid bacteria from freshwater fishes”. *Food Microbiology*, 17, 383–391.

Guerrini, S., Bastianini, A., Blaiotta, G., Granchi, L., Moschetti, G., Coppola, S., et al. (2003). “Phenotypic and genotypic characterization of *Oenococcus oeni* strains isolated from typical Italian wines”. *International Journal of Food Microbiology*, 83, 1–14.

Hansen, E.H., P. Nissen, P. Sommer, J.C. Nielsen, and N. Arneborg. (2001). “The effect of oxygen on the survival of non-*Saccharomyces* yeasts during mixed culture fermentations of grape juice with *Saccharomyces cerevisiae*”. *J. Appl. Microbiol.* 91: 541–547.

Henick-Kling, T., (1995). “Control of malolactic fermentations in wine: energetics, flavour modification and methods of starter culture preparation”. *J. Appl. Bacteriol.* 79, 29-37.

Henick-Kling, T., (1993). “Malolactic fermentation”. In: Fleet, G.H. (Ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland, pp. 289–326.

Henschke, P.A., (1993). “An overview of malolactic fermentation research”. *Australian and New Zealand Wine Industry Journal* 8 (1), 69– 79.

Herve´ Alexandra, Peter J. Costello, Fabienne Remizec, Jean Guzzoc, Miche´le Guilloux-Benatiera (2004). “*Saccharomyces cerevisiae*–*Oenococcus oeni* interactions in wine: current knowledge and perspectives”. *Journal of Food Microbiology* 93 141–154.

Hofvendahl Karin, Hahn–Ha¨gerdal Ba¨rbel (2000).”Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources”. *Enzyme and Microbial Technology* 26 87–107.

Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley, and S.T. Williams. (1994). “Genus *Acetobacter* and *Gluconobacter*”. In: *Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology*. J.G. Holt (Ed.), pp. 71–84. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, MD.

Izquierdo, P. M., Ruiz, P., Sesepa, S., & Palop, M. Ll. (2009). “Ecological study of lactic acid microbiota isolated from Tempranillo wines of Castilla-La Mancha”. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. doi:10.1016/j.jbiosc.2009.04.001.

Joyeux A., Lafon-Lafourcade S., Ribereau-Gayon P. (1984a). “Evolution of acetic acid bacteria during fermentation and storage of wine”. *Appl. Environ. Microbiol.*, 48: 153-156.

Joyeux, A., S. Lafon-Lafourcade, and P. Ribureau-Gayon. (1984b). “Evolution of acetic acid bacteria during fermentation and storage of wine”. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 153–156.

Kenneth C. Fugelsang and Charles G. Edwards (2007). “WINE MICROBIOLOGY Practical Applications and Procedures”. Second edition. Science and Business Media, LLC.

Kunkee, R., (1991). “Some roles of malic acid in the malolactic fermentation in winemaking”. *FEMS Microbiology Reviews* 88, 55–72.

Lafon-Lafourcade, S., Carre, E., Ribéreau-Gayon, P. (2003). “Occurrence of lactic acid bacteria during different stages of vinification and conservation of wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 46, 874-880.

Laurent, M.-H., T. Henick-Kling, and T.E Acree. (1994). “Changes in the aroma and odor of Chardonnay wine due to malolactic fermentation”. *Wein-Wiss.* 49: 2–9.

Liu, S.-Q. (2002). “A review. Malolactic fermentation in wine—beyond deacidification”. *J. Appl. Microbiol.* 92: 589–601.

Lonvaud-Funel, A., (2002). “Lactic acid bacteria—a survey”. In: Verlag, T.S. (Ed.), Proceedings of the 13th International Oenology Symposium; 9 –12 June 2002. Montpellier, France, International Association of Oenology, Management and Wine Marketing, 59– 74.

Lonvaud-Funel, A., (1999). “Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine”. *Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 76, 317–331.

Lonvaud-Funel, A. and A. Joyeux. (1993). “Antagonism between lactic acid bacteria of wines: inhibition of *Leuconostoc oenos* by *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus pentosaceus*”. *Food Microbiol.* 10: 411–419

López, R., López-Alfaro, I., Gutiérrez, A.R., Tenorio, C., Garijo, P., González-Arenzana, L. and Santamaría, P. (2011). “Malolactic fermentation of Tempranillo wine: contribution of the lactic acid bacteria inoculation to sensory quality and chemical composition”. *International Journal of Food Science and Technology* 46, 2373–2381.

Loureiro, V. and M. Malfeito-Ferreira. (2003). “Spoilage yeasts in the wine Industry”. *Int. J. Food Microbiol.* 86: 23–50.

Maicas, S. (2001). “The use of alternative technologies to develop malolactic fermentation in wine”. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56, 35–39.

Maicas, S., Gonzalez-Cabo, P., Ferrer, S. & Pardo, I., (1999a). “Production of *Oenococcus oeni* biomass to induce malolactic fermentation in wine by control of pH and substrate addition”. *Biotechnol. Lett.* 21, 349-353.

Malherbe, S., Tredoux, A.G.J., Nieuwoudt, H.H. and du Toit, M. (2012). “Comparative metabolic profiling to investigate the contribution of *O. oeni* MLF starter cultures to red wine composition”. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 39, 477–494.

Manca de Nadra, M.C. and A.M. Strasser de Saad. (1995). Polysaccharide production by *Pediococcus pentosaceus* from wine. *Int. J. Food Microbiol.* 27: 101–106.

Martineau, B. and T. Henick-Kling. (1995a). “Formation and degradation of diacetyl in wine during alcoholic fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* strain EC1118 and malolactic fermentation with *Leuconostoc oenos* strain MCW”. *Am. J. Enol. Vitic.* 46: 442–448.

Martineau, B. and T. Henick-Kling. (1995b). “Performance and diacetyl production of commercial strains of malolactic bacteria in wine”. *J. Appl. Bacteriol.* 78: 526–536.

Martínez-Rodríguez, A.J., Carrascosa, A.V., Martí'n-Alvarez, P.J., Moreno-Arribas, V., Polo, M.C., (2002). “Influence of the yeast strain on the changes of the amino acids, peptides and proteins during sparkling wine production by the traditional method”. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 29, 314– 322.

Martínez-Rodríguez, A.J., Carrascosa, A.V., Polo, M.C., (2001). “Release of nitrogen compounds to the extracellular medium by three strains of *Saccharomyces cerevisiae* during induced autolysis in a model wine system”. *International Journal of Food Microbiology* 68, 155– 160.

Mauricio, J.C., S. Guijo, and J.M. Ortega. (1991). “Relationship between phospholipid and sterol contents in *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii* and their fermentation activity in grape musts”. *Am. J. Enol. Vitic.* 42: 301–308.

Mira de Orduña, R., Liu, S.-Q., Patchett, M.L., Pilone, G.J., (2000). “Ethyl carbamate precursor citrulline formation from arginine degradation by malolactic wine lactic acid bacteria”. *FEMS Microbiology Letters* 183, 31–35.

Mortimer, R., and M. Polsinelli. (1999). “On the origins of wine yeast”. *Res. Microbiol.* 150:199–204.

Muyanja, C., Narvhus, J. A., Treimo, J., & Langsrud, T. (2003). “Isolation, characterisation and identification of lactic acid bacteria from bushera”: a Ugandan traditional fermented beverage. *International Journal of Food Microbiology*, 80, 201–210.

Navarro, L., M. Zarazaga, J. Saenz, F. Ruiz-Larrea, and C. Torres. (2000). “Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from Rioja red wines”. *J. Appl. Microbiol.* 88: 44–51.

Nielsen, J.C. and M. Richelieu. (1999). “Control of flavor development in wine during and after malolactic fermentation by *Oenococcus oeni*”. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 740–745.

Nygaard, M., Prahl, C., (1996). “Compatibility between strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Leuconostoc oenos* as an important factor for successful malolactic fermentation. Proceedings of the Fourth International Symposium on Cool-Climate Viticulture and Oenology, 16– 20 July, Rochester, NY, USA, V1-103–V1-106.

Otto M (2009). "*Staphylococcus epidermidis* — the 'accidental' pathogen", *Nature Reviews Microbiology* 7 (8): 555–567, [doi:10.1038/nrmicro2182](https://doi.org/10.1038/nrmicro2182), [PMID 19609257](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19609257/).

Poblet M., Rozès N., Ruiz A., Reguant C., Beltrán G., Torija M.a J., Guillamón J.M., Bordons A., Mas A. (2000b). “Seguimiento e identificaci_n de los microorganismos presents durante la elaboraci3n de los vinos”. *Aliment. Eq. Tecnol.*, 19: 95-100.

Pretorius I, van der Westhuizen T & Augustyn O (1999). “Yeast biodiversity in vineyard and wineries and its importance to the south African wine industry”. A review. *S Afri J Enol Vitic* 20: 61–74.

- Pripis-Nicolau, L., G. De Revel, A. Bertrand, and A. Lonvaud-Funel. (2004).** “Methionine catabolism and production of volatile sulphur compounds by *Oenococcus oeni*”. *J. Appl. Microbiol.* 96: 1176–1184.
- Queck SY and Otto M (2008).** [*"Staphylococcus epidermidis and other Coagulase-Negative Staphylococci"*](#). *Staphylococcus: Molecular Genetics*. Caister Academic Press. [ISBN 978-1-904455-29-5](#).
- Querol, A., Barrio, E., Huerta, T. and Ramo'n, D. (1992b).** “Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains”. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 2948–2953.
- Renouf, V., Claisse, O., & Lonvaud-Funel, A. (2007).** “Inventory and monitoring of wine microbial consortia”. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75, 149–164.
- Rib´ereau-Gayon P (1985).** “New developments in wine Microbiology”. *Am J Enol Viticult* 36: 1–10.
- Ribureau-Gayon, P., D. Dubourdieu, B. Dontche, and A. Lonvaud. (2000).** *“Handbook of Enology. Volume 1. The Microbiology of Wine and Vinifications”*. John Wiley & Sons, New York, NY.
- Ribureau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2000).** “The Chemistry of wine stabilization and treatments”. In *Handbook of enology* (pp. 140). Chichester, UK: Wiley.
- Rodas Ana María, Ferrer Sergi, and Pardo Isabel (2003).** “16S-ARDRA, a Tool for Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated from Grape Must and Wine”. ENOLAB – Laboratori de Microbiologia Enològica. Departament de Microbiologia i Ecologia, Facultat de Ciències Biològiques, Universitat de València, Burjassot, València, Spain.
- Rodriguez, S.B., E. Amber, R.J. Thornton, and M.R. McLellan. (1990).** “Malolactic fermentation in Chardonnay: growth and sensory effects of commercial strains of *Leuconostoc oenos*”. *J. Appl. Bacteriol.* 68: 139–144.
- Rosi I, Vinella M & Domizio P (1994).** “Characterization of b-glucosidase activity in yeast of oenological origin”. *J Appl Bacteriol* 77: 519–527.

Roy D, Sirois S, Vincent D. (2001). “Molecular discrimination of lactobacilli used as starter and probiotic cultures by amplified ribosomal DNA restriction analysis”. *Curr Microbiol.*;42:282–9.

Ruiz, A., M. Poblet, A. Mas, and J.M. Guillamon. (2000). “Identification of acetic acid bacteria by RFLP of PCR-amplified 16S rDNA and 16S-23S rDNA intergenic spacer”. *Int. J. Syst. Microbiol.* 50: 1981–1987.

Ruiz P., Izquierdo P.M., Sesepa S., Palop M.Ll. (2010). “Analysis of lactic acid bacteria populations during spontaneous malolactic fermentation of Tempranillo wines at five wineries during two consecutive vintages” *Spain Food Control* 21 70–75

Sauvageot, F. and P. Vivier. (1997). “Effects of malolactic fermentation of sensory properties of four Burgundy wines”. *Am. J. Enol. Vitic.* 48: 187–192.

Schultz, M. and Gafner, J. (1993). “Analysis of yeast diversity during spontaneous and induced alcoholic fermentations”. *Journal of Applied Bacteriology* 75, 551–558.

Stander, M.A. and P.S. Steyn. (2002). “Survey of ochratoxin A in South African Wines”. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 23: 9–13. 37.

Strasser de Saad (2005). “Aerobic glycerol catabolism by *Pediococcus pentosaceus* isolated from wine”. *Food Microbiol.* 22: 399–407.

Temmerman Robin, Huys Geert and Swings Jean (2004). “Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture independent methods”. *Trends in Food Science & Technology* 15 348–359.

Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K., Swings, J. (1996). “Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics”. *Microbiol. Rev.* 60, 407-438

Ventura M, Elli M, Reniero R, Zink R. (2001). “Molecular microbial analysis of *Bifidobacterium* isolates from different environments by the species specific amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA)”. *FEMS Microbiol Ecol.*;36:113–21.

Walker, G.M. (1998). “*Yeast. Physiology and Biotechnology*”. John Wiley & Sons, New York, NY.