

# ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

Σχολή Τροφίμων Βιοτεχνολογίας και Ανάπτυξης

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου

Π.Μ.Σ Επίσημη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή του Ανθρώπου

Κατεύθυνση: Συστήματα Διαχείρισης Ποιότητας και Ασφάλειας Τροφίμων



## ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Βιοποικιλότητα ζυμών σε αμπελώνες της Αττικής και της  
Σαντορίνης και γενετική δομή γηγενών πληθυσμών  
*Torulaspota delbrueckii*»

Πασχάλης Α. Θεοφανούδης

Αθήνα 2019

Επιβλέπων Καθηγητής: Γεώργιος-Ιωάννης Νυχάς

Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

# ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

Σχολή Τροφίμων Βιοτεχνολογίας και Ανάπτυξης

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου

Π.Μ.Σ Επίσημη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή του Ανθρώπου

Κατεύθυνση: Συστήματα Διαχείρισης Ποιότητας και Ασφάλειας Τροφίμων



---

## ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Βιοποικιλότητα ζυμών σε αμπελώνες της Αττικής και της  
Σαντορίνης και γενετική δομή γηγενών πληθυσμών

*Torulasporea delbrueckii*»

Πασχάλης Α. Θεοφανούδης

Αθήνα 2019

Επιβλέπων Καθηγητής: Γεώργιος-Ιωάννης Νυχάς

Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Βιοποικιλότητα ζυμών σε αμπελώνες της Αττικής και της  
Σαντορίνης και γενετική δομή γηγενών πληθυσμών  
*Torulaspota delbrueckii*»

Πασχάλης Α. Θεοφανούδης

Αθήνα 2019

Επιβλέπων Καθηγητής: Γεώργιος-Ιωάννης Νυχάς

Τριμέλης Επιτροπή:

Γεώργιος-Ιωάννης Νυχάς, Καθηγητής

Ευστάθιος Πανάγου, Αν. Καθηγητής

Ασπασία Νησιώτου, Ερευνήτρια

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια υποστηρίζεται έντονα η θετική συνεισφορά των μη-*Saccharomyces* ζυμών στην ποιότητα του οίνου. Ένα τέτοιο είδος είναι το *Torulasporea delbrueckii*. Επομένως, η βιογεωγραφική ανάλυση των μικροοργανισμών που συναντώνται στην πορεία της ζύμωσης του γλεύκους σταφυλιών συνεισφέρει σημαντικά στην "ενίσχυση" της έννοιας του μικροβιακού "terroir". Πραγματοποιήθηκαν αυθόρμητες ζυμώσεις από δείγματα σταφυλιών του έτους 2018 δύο περιοχών και τεσσάρων διαφορετικών αμπελώνων (τρεις Σαντορίνη, ένας Αττική), κατά την διάρκεια των οποίων απομονώθηκαν ζύμες. Έγινε ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους, ζυμών απομονωμένων από την αρχή της ζύμωσης μέσω PCR-RFLP της περιοχής 5.8S ITS του rDNA, ενώ για την ταυτοποίηση του *Saccharomyces cerevisiae* σε επίπεδο στελέχους έγινε ενίσχυση των interdelta περιοχών. Για την αντίστοιχη ταυτοποίηση του *T. delbrueckii* ενισχύθηκαν 7 διαφορετικές περιοχές του γενωμικού DNA με μικροδορυφορικές αλληλουχιές. Από την αρχή της ζύμωσης ταυτοποιήθηκαν 6 διαφορετικά είδη, με τα πιο επικρατή να ανήκουν στο γένος *Hanseniaspora*. Η ανάλυση των πληθυσμών του *S. cerevisiae* αποκάλυψε 12 διαφορετικά γονοτυπικά προφίλ και η βιοποικιλότητα ήταν της τάξης 14,29%. Στην συγκεκριμένη ανάλυση δεν προέκυψε κάποιο επικρατές στέλεχος. Η ανάλυση των αλληλουχιών των μικροσυστοιχιών ήταν επιτυχής και αποτέλεσε το πρώτο βήμα για την ανάλυση της γενετικής δομής γηγενών πληθυσμών του *T. delbrueckii*. Οι μη-*Saccharomyces* ζύμες που απομονώθηκαν στο τελικό στάδιο της ζύμωσης μπορούν να αξιολογηθούν για τις τεχνολογικές τους ιδιότητες στην οινοπαραγωγική διαδικασία, ενώ η βιογεωγραφική ανάλυση δεν αποκάλυψε κάποια σημαντική διαφορά στην σύσταση του μικροβιώματος των δύο περιοχών αλλά και των αμπελώνων.

Λέξεις κλειδιά: ζύμωση οίνου, βιοποικιλότητα, ζύμες, "terroir"

# Yeast biodiversity in vineyards of Attica and Santorini and population genetics of indigenous *Torulapsora delbrueckii*

## Abstract

In the recent years it is being supported the positive contribution of non-*Saccharomyces* yeasts on the wine quality. One of such species is *Torulapsora delbrueckii*. So the biogeographical analysis of the microorganisms found throughout the wine grapes fermentation contributes significantly to microbial "terroir" concept. Yeasts were isolated from the spontaneous fermentations from grape cultivar 2018 of two different regions and four vineyards (three Santorini, one Attica). PCR-RFLP of the 5.8S ITS region of rDNA was performed for the identification on a species level of the isolated yeasts from the beginning of fermentation, while for the typing of *Saccharomyces cerevisiae* the interdelta regions were amplified. For the typing of *T. delbrueckii*, 7 different genome loci containing microsatellites were amplified. 6 different species were identified from the beginning of fermentation, with the most dominant belonging to genus *Hanseniaspora*. The analysis of *S. cerevisiae* populations revealed 12 different genotypes and the biodiversity was 14,29%. No dominant strain was found with this method. Microsatellites analysis was successful and was the first step for the genetic structure of *T. delbrueckii* populations. Non-*Saccharomyces* yeasts isolated from the end of fermentation can be tested for their technological applications in winemaking, whereas the biogeographical analysis didn't reveal a significant difference in the microbiome of the two regions but also of the vineyards.

Key words: wine fermentation, biodiversity, yeasts, "terroir"

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.Εισαγωγή.....	8
1.1 Η ζύμωση του μούστου.....	9
1.1.1 Η διαδικασία της ζύμωσης.....	9
1.1.2 Η πορεία ζύμωσης του κρασιού.....	10
1.2 Η μικροχλωρίδα των ώριμων σταφυλιών.....	11
1.3 Οι ζύμες στα στάδια της αυθόρμητης ζύμωσης.....	12
1.4 Το δυναμικό σύστημα της ζύμωσης του γλεύκους.....	12
1.5 Η ζύμη <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	13
1.6 Το “terroir” και οι βασικοί παράγοντες που επηρεάζουν την σύσταση του οίνου.....	14
1.7 Βιογεωγραφία μικροοργανισμών της αμπέλου.....	15
1.8 Μέθοδοι ταυτοποίησης ζυμών σε επίπεδο είδους.....	17
1.8.1 Μέθοδος ταυτοποίησης μέσω ITS αλληλουχιών.....	17
1.9 Ταυτοποίηση <i>Saccharomyces cerevisiae</i> σε επίπεδο στελέχους.....	18
1.10 Το γένος <i>Torulaspota</i> .....	20
1.10.1 Χαρακτηριστικά αντιπροσώπων του γένους.....	20
1.11 Το είδος <i>Torulaspota delbrueckii</i> .....	22
1.11.1 Ενδιαιτήματα του είδους <i>Torulaspota delbrueckii</i> .....	22
1.11.1.1 Βιοδιεργασίες.....	22
1.11.1.2 Φυσικό περιβάλλον.....	22

1.12 Η διττή ανάγνωση της συμβολής του <i>Torulaspota delbrueckii</i> στα ζυμούμενα προϊόντα.....	22
1.13 Η πείρωση του κρασιού.....	23
1.14 Οι μικροσυστοιχίες DNA ως μέσο εκτίμησης της γενετικής ποικιλομορφίας.....	24
1.15 Η γενετική πληθυσμών του <i>Torulaspota delbrueckii</i> .....	27
1.16 Σκοπός της εργασίας.....	27
2. Υλικά-Μέθοδοι.....	28
2.1 Δείγματα σταφυλιών και αυθόρμητες ζυμώσεις.....	29
2.2 Απαρίθμηση μικροοργανισμών.....	29
2.3 Βασικές οινολογικές αναλύσεις.....	30
2.4 Μοριακή ταυτοποίηση των απομονωμένων ζυμών.....	30
2.4.1 Ενίσχυση της 5.8S ITS rDNA περιοχής με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.....	30
2.4.2 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.....	31
2.4.3 Ανάλυση μήκους θραυσμάτων περιορισμού της 5.8S ITS περιοχής..	32
2.5 Ενίσχυση των interdelta αλληλουχιών του <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ..	32
2.6 Ενίσχυση μικροδορυφορικών αλληλουχιών του γενωμικού DNA του είδους <i>Torulaspota delbrueckii</i> .....	33
3. Αποτελέσματα.....	37
3.1 Κινητική αυθόρμητων ζυμώσεων και απαρίθμηση μικροοργανισμών.	38
3.2 Βασικές οινολογικές αναλύσεις.....	45
3.3 Μοριακή ταυτοποίηση των απομονωμένων ζυμών.....	49

3.4 Ανάλυση της ζυμοχλωρίδας.....	50
3.5 Ενίσχυση των interdelta αλληλουχιών του <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	50
3.6 Ανάλυση των πληθυσμών <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	51
3.7 Ενίσχυση των μικροδορυφορικών αλληλουχιών του γενωμικού DNA του είδους <i>Torulaspora delbrueckii</i> .....	55
4. Συζήτηση-Συμπεράσματα.....	56
4.1 Σύσταση ζυμοχλωρίδας των μη- <i>Saccharomyces</i> ζυμών στο αρχικό στάδιο της ζύμωσης από αμπελώνες της Σαντορίνης και της Αττικής.....	57
4.2 Σύνδεση μεταξύ της πορείας αυθόρμητων ζυμώσεων και της μικροχλωρίδας.....	57
4.3 Βιοποικιλότητα των στελεχών <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	59
4.4 Ανάλυση των αποτελεσμάτων της ενίσχυσης των μικροδορυφορικών αλληλουχιών του <i>Torulaspora delbrueckii</i> .....	59
5. Βιβλιογραφία.....	60



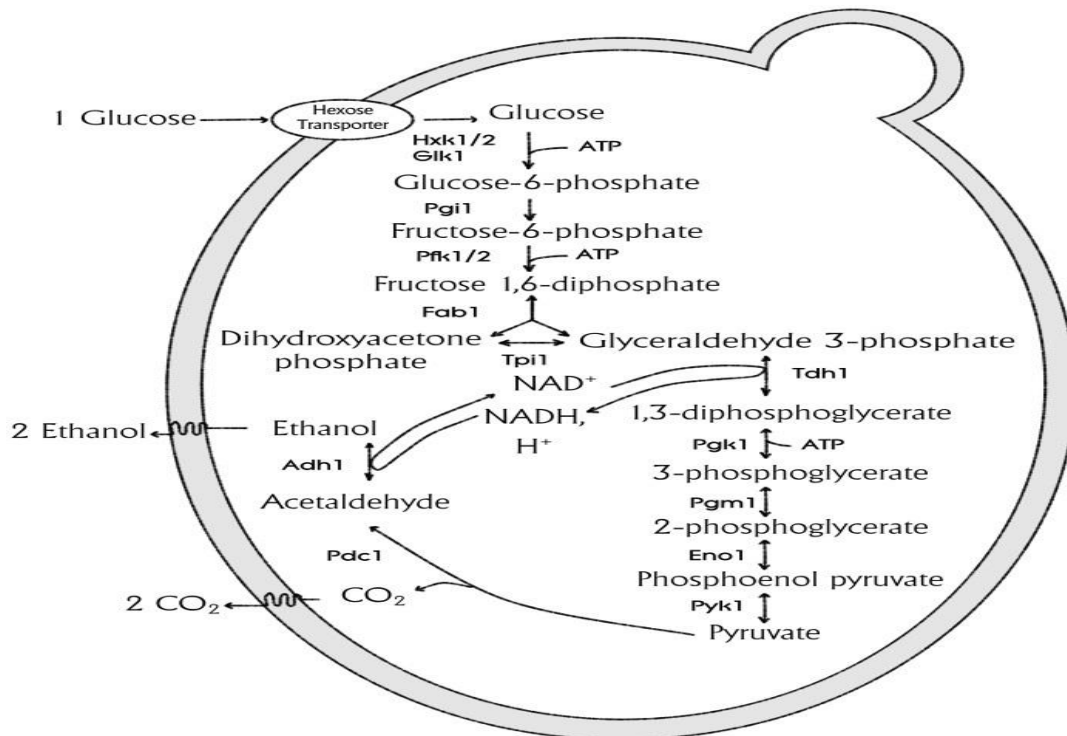
# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## **1.1 Η ζύμωση του μούστου**

Τα κύρια στάδια της διαδικασίας οινοποίησης είναι τα εξής: 1) σπάσιμο των σταφυλιών και παραλαβή του μούστου, 2) ζύμωση του μούστου από ζύμες (αλκοολική) ή και βακτήρια (μηλογαλακτική), 3) ωρίμαση του κρασιού σε βαρέλια και 4) συσκευασία σε φιάλες και αποθήκευση. Οι μικροοργανισμοί που συναντώνται καθόλη την πορεία παραγωγής οίνου, από τις ράγες των σταφυλιών μέχρι και την αποθήκευση, τυγχάνουν ευρείας μελέτης και ενδιαφέροντος από την επιστημονική κοινότητα (Fleet 2008, Pretorius and Hoj 2005), καθώς αποτελούν μια από τις βασικές μεταβλητές που διαμορφώνουν το τελικό προϊόν. Επομένως, η “αποκρυπτογράφηση” του ρόλου τους στο δυναμικό σύστημα της ζύμωσης, αλλά και της καθαυτής τους παρουσίας στην αμπελουργική/οινοποιητική πορεία, είναι μείζονος σημασίας.

### **1.1.1 Η διαδικασία της ζύμωσης**

Εξελικτικά η αναερόβια διαδικασία της ζύμωσης των μικροοργανισμών εικάζεται πως προέκυψε 145 με 65 εκατομμύρια χρόνια πριν, στην Κρητιδική περίοδο, όταν και υπήρξε μια διαθέσιμη αφθονία υποστρωμάτων σε μικροβιακές κοινωνίες (Mora et al. 2013). Ιστορικά αυτή η “ιδιότητα” των μικροοργανισμών θεωρείται πως έγινε ανθρώπινα αξιοποιήσιμη κατά την Νεολιθική περίοδο (Papadimitriou et al. 2015). Αλκοολούχα ποτά θεωρείται πως παράγονταν στην Αρχαία Κίνα από το 7000 Π.Χ. από μίγμα ρυζιού, μελιού και γηγενών φρούτων (McGovern et al. 2004). Ο Louis Pasteur στο βιβλίο του «Studies on fermentation» χαρακτηρίζει την ζύμωση ως μια διαδικασία ζωτικής σημασίας για τους μικροοργανισμούς και την ορίζει ως “αναπνοή χωρίς αέρα” (Pasteur 1876). Ζύμωση είναι η μεταβολική διαδικασία των μικροοργανισμών κατά την οποία γίνεται διάσπαση οργανικών ενώσεων, χωρίς την χρήση οξυγόνου ως δέκτη ηλεκτρονίων, σε απλούστερες ενώσεις με ταυτόχρονη παραγωγή ενέργειας (ATP). Η ζύμωση στα τρόφιμα (άρα και στο κρασί) είναι μια τεχνολογία αξιοποίησης και τελειοποίησης της ανάπτυξης και της μεταβολικής δραστηριότητας των μικροοργανισμών για την συντήρηση και μεταποίηση τους (Terefe 2016). Στο βιοχημικό μονοπάτι της αλκοολικής ζύμωσης τα τελικά προϊόντα είναι η αιθανόλη και το διοξείδιο του άνθρακα. Εκτός από αυτούς τους μεταβολίτες παράγονται και άλλα παραπροϊόντα με βασικότερο την γλυκερόλη, καθώς και άλλα οργανικά οξέα και αλκόολες (Bai et al. 2008).



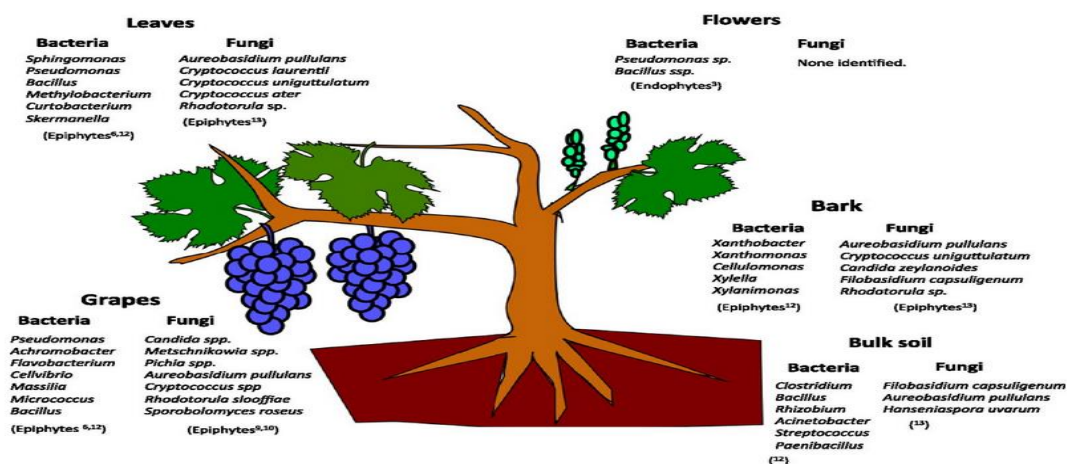
**Εικόνα 1.1.** Βασικό μεταβολικό μονοπάτι κατά την αλκοολική ζύμωση του *Saccharomyces cerevisiae* (Oliveira et al. 2013).

### 1.1.2 Η πορεία ζύμωσης του κρασιού

Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των αλκοολούχων ποτών εξαρτώνται από παραμέτρους όπως οι πρώτες ύλες, οι εκάστωτε πρακτικές που ακολουθούνται στην γραμμή παραγωγής, αλλά και από την ωρίμανση και την αποθήκευση των τελικών προϊόντων (Cole and Noble 1997). Στο κρασί κατά αντιστοιχία, οι παράμετροι αυτές είναι οι γεωγραφικές και κλιματικές συνθήκες των αμπελουργικών ζωνών, η ποικιλία του σταφυλιού, η μικροχλωρίδα στις ράγες των σταφυλιών, και φυσικά η ζύμωση του γλεύκους και οι οινοποιητικές πρακτικές (Fleet 2003). Οι μικροοργανισμοί διαμορφώνουν σε μεγάλο βαθμό (θετικά και αρνητικά) την ποιότητα των σταφυλιών (Freire et al. 2017, Rousseaux et al. 2014, Villa and Longo 1996), αλλά και μέσω της πολύπλοκης διαδικασίας (βιοχημικά και πληθυσμιακά) της ζύμωσης παράγουν πρωτογενείς (αιθανόλη, διοξείδιο του άνθρακα) και εκατοντάδες δευτερογενείς μεταβολίτες, με αποτέλεσμα την μοναδικότητα των διαφόρων κρασιών (Fleet 2003, Lambrechts and Pretorius 2000, Nisiotou et al. 2018).

## 1.2 Η μικροχλωρίδα των ώριμων σταφυλιών

Οι ράγες των άγουρων σταφυλιών έχουν χαμηλούς πληθυσμούς ζυμών, συνήθως  $10-10^3$  CFU/g, (Fleet 2003), και αποικίζονται επίσης από βακτήρια του οξικού και οξυγαλακτικά (Kantor et al. 2015, Maulani et al. 2012). Στα ώριμα σταφύλια οι πληθυσμοί αυτοί, διαφοροποιούνται και αυξάνονται ( $10^4-10^6$  CFU/g), και φαίνεται να παίζουν κρίσιμο ρόλο στην πορεία της ζύμωσης αλλά και στην τελική γεύση και άρωμα του οίνου (Bokulich et al. 2016). Τα συνηθέστερα είδη που συναντώνται στην επιφάνεια των ώριμων σταφυλιών ανήκουν στα γένη *Hanseniaspora*, *Metschnikowia* και σε μικρότερα ποσοστά *Candida* και *Pichia* (Fleet 2003, Kantor et al. 2017, Nisiotou and Nychas 2007). Το πολυπληθέστερο είδος (50-70%) σε ώριμα σταφύλια αλλά και κατά την αρχή της ζύμωσης είναι το *Hanseniaspora uvarum* όπως θα φανεί παρακάτω. Εκτός από τις ζύμες, ενδιαίτημα για πληθώρα βακτηρίων και μυκήτων αποτελούν οι διάφοροι φυτικοί ιστοί του *Vitis vinifera*, τα οποία φαίνεται να έχουν αντίκτυπο στον οίνο (Bokulich et al. 2016, Gilbert et al. 2014).



**Εικόνα 1.2.** Βακτήρια και μύκητες που επηρεάζουν τους ιστούς του *Vitis vinifera* και πιθανώς συσχετίζονται με τον οίνο (Gilbert et al. 2014).

Το κυρίαρχο είδος της ζύμωσης του γλεύκους, *Saccharomyces cerevisiae* (wine yeast) στην περίπτωση της οινοποίησης, σπανίως απομονώνεται από σταφύλια και στις περιπτώσεις που αυτό συμβαίνει, καταμετρώνται πληθυσμοί της τάξης 10-100 CFU/g (Fleet 2003).

### 1.3 Οι ζύμες στα στάδια της αυθόρμητης ζύμωσης

Οι χαρακτηριζόμενες ως “άγριες ζύμες” είναι αυτές που εκκινούν την αυθόρμητη αλκοολική ζύμωση, φτάνοντας κατά τις πρώτες μέρες τα  $10^7$  CFU/ml (Fleet and Heard 1993, Fleet et al. 1984). Τέτοια είδη ανήκουν στα γένη *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Candida* και *Metschnikowia*, καθώς άλλα είδη που μπορεί να αποικίζουν την επιφάνεια των σταφυλιών και με το σπάσιμο μεταφέρονται στον μούστο, ώντας αερόβια, δεν μπορούν να επιβιώσουν (Fleet 2008). Με την πάροδο των ημερών, και στα μέσα και τελικά στάδια, επικρατούν είδη του γένους *Saccharomyces*. Το κυρίαρχο είδος *Saccharomyces cerevisiae*, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, φτάνει πληθυσμούς της τάξης  $10^8$  CFU/ml και είναι αυτό που αποζυμώνει στην πλειοψηφία των περιπτώσεων (Fleet 2003).

### 1.4 Το δυναμικό σύστημα της ζύμωσης του γλεύκους

Όπως φάνηκε στην παραπάνω παράγραφο η ζύμωση του γλεύκους από μικροβιολογικής σκοπιάς είναι ένα σύνθετο φαινόμενο, και οι παράγοντες που διαμορφώνουν την δυναμικότητα αυτού του συστήματος θα αναλυθούν ευθύς αμέσως. Στην αρχή της ζύμωσης οι “άγριες ζύμες” είναι αυτές που μεταβολίζουν τα σάκχαρα προς παραγωγή αιθανόλης και διοξειδίου του άνθρακα και στην συνέχεια πεθαίνουν, καθώς δεν αντέχουν στις υψηλότερες συγκεντρώσεις αιθανόλης που παράγονται με την πάροδο των ημερών (Fleet 2003). Συγκεκριμένα η ανοχή στην αιθανόλη έχει δειχθεί πως εξαρτάται από την συγκέντρωση μονοακόρεστων λιπαρών οξέων, στερολών, καθώς και την ενεργότητα της  $H^+$  ATPάσης της πλασματικής μεμβράνης των ζυμών (Castillo Agudo 1992, Thomas and Rose 1979), χαμηλά επίπεδα των οποίων, στις “άγριες ζύμες”, δεν ευνοούν την ανθεκτικότητα στην αιθανόλη (Aguirrela et al. 2006). Με την αυτόλυση των κυττάρων, οι “άγριες ζύμες” ουσιαστικά “δίνουν πάτημα” σε ανθεκτικότερα στελέχη ζυμών, που συνεχίζουν την παραγωγή αιθανόλης (Fleet 2003), όμως η κυριότερη συνεισφορά των “άγριων ζυμών” κατά την αλκοολική ζύμωση είναι τα προϊόντα του δευτερογενούς τους μεταβολισμού (Romano et al. 1997). Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν είδη του γένους *Hanseniaspora*, τα οποία με τους διάφορους εστέρες, ανώτερες αλκοόλες και άλλες πτητικές ενώσεις, που προκύπτουν μετά από ζύμωση γλευκών, συνεισφέρουν θετικά στα “αρωματικό προφίλ” του οίνου (Medina et al. 2013, Moreira et al. 2011). Βάσει αυτής της πιθανής συμβολής και συσχέτισης των “άγριων ζυμών” στον “χαρακτήρα” του οίνου, η ερευνητική δραστηριότητα πάνω στον διαδοχικό εμβολιασμό γλευκών με “άγριες ζύμες” και *Saccharomyces cerevisiae*, αλλά και μεμονωμένα, γίνεται ολοένα και πιο εκτενής τα τελευταία χρόνια (Comitini et al. 2011, Sadoudi et al. 2012, Varela et al. 2016, Sgouros et al. 2018, Nisiotou et al. 2018). Πάνω σε αυτήν την ιδέα έχουν “πατήσει”

πολλοί ερευνητές, και συγκεκριμένα οι Andorra et al. (2012), απέδειξαν όντως πως μετά από ζύμωση με στέλεχος του είδους *Candida zemplinina*, σε συνθετικό μούστο, υπήρχε παραγωγή ανώτερων αλκοολών, μικρότερη όμως σε σχέση με την αντίστοιχη ζύμωση σε πραγματικό μούστο. Ενώ, τέλος και σε μία αντίστοιχη έρευνα στην Ελλάδα με γηγενή στελέχη του παραπάνω είδους φάνηκε να υπάρχει αξιοσημείωτη διαφοροποίηση στην παραγωγή οργανικών οξέων, τα οποία και διαμορφώνουν ένα πολύπλοκο προφίλ στον οίνο (Nisiotou et al. 2018).

### 1.5 Η ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*

Ο ζυμομήκτας του κρασιού δεν είναι αερομεταφερόμενος, επομένως η μεταφορά του εικάζεται πως γίνεται μέσω εντόμων εντός των αμπελώνων, αλλά επίσης ο μούστος "εμπλουτίζεται" με τέτοια στελέχη από τον εξοπλισμό του κάθε οινοποιείου. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, μετά τις πρώτες ημέρες της ζύμωσης αρχίζουν να επικρατούν στην μικροχλωρίδα του ζυμούμενου γλεύκους, κυρίως, στελέχη του *Saccharomyces cerevisiae*. Ο βασικός περιοριστικός παράγοντας αυτής της εναλλαγής είναι η ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών στην αιθανόλη (Fleet 2003). Το *Saccharomyces cerevisiae* αντέχει με διαφορά σε υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης, σε σχέση με τις "άγριες ζύμες" που μπορούν να επιβιώσουν μέχρι ένα ποσοστό της τάξης 5-7% κατά κανόνα (Fleet 2003). Αυτή είναι μία από τις βασικές παραμέτρους που καθιστούν το συγκεκριμένο είδος, οργανισμό μοντέλο, χωρίς ακόμα να έχουν αποκρυπτογραφηθεί πλήρως οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας και ο "γονιδιακός καμβάς" που τους "πυροδοτεί" (Chambers and Pretorius 2010, Ma and Liu 2010). Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η σύσταση των μονοακόρεστων λιπαρών οξέων της κυτταρικής μεμβράνης παίζει βασικό ρόλο στην απόκριση ενάντια της καταπόνησης της αιθανόλης (You et al. 2002). Τα γονίδια που υπερεκφράζονται κατά την έκθεση του ζυμομύκητα στην αιθανόλη, κωδικοποιούν για διάφορες πρωτεΐνες των οργανιδίων του κυττάρου, αλλά και ένζυμα που συμμετέχουν στις μεταβολικές διεργασίες, όπως είναι οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ (HSP), πρωτεΐνες του κυτταρικού τοιχώματος, και ένζυμα που συμμετέχουν στην γλυκόλυση και τον κύκλο του Krebs (Stanley et al. 2009). Αυτοί οι μηχανισμοί απόκρισης είναι γενικοί και συναντώνται και σε άλλους μικροοργανισμούς, όμως η έκφραση και εντοπισμός στον πυρήνα των πρωτεϊνών Rat8 και Asr1, φαίνεται να είναι εξειδικευμένη για την απόκριση στο σοκ της αιθανόλης (Betz et al. 2004, Takemura et al. 2004), και χρειάζεται περαιτέρω έρευνα πάνω σε αυτά τα φαινόμενα. Ένας άλλος περιοριστικός παράγοντας, που μπορεί να προκαλέσει προβλήματα κατά την αλκοολική ζύμωση, είναι τα μικρού μήκους λιπαρά οξέα (Bisson 1990). Ενώ μεγάλο ενδιαφέρον αποτελούν τα επονομαζόμενα "killer" στελέχη, τα οποία φαίνεται να υπερισχύουν έναντι άλλων στελεχών, λόγω των εκκρινόμενων τοξινών τους (El-Banna et al. 2011). Όλοι αυτοί οι παράγοντες που αναφέρθηκαν, μαζί και με άλλες

παραμέτρους, είναι υπεύθυνοι για την διαδοχική επικράτηση ειδών, από την αρχή μέχρι το τέλος της ζύμωσης, αλλά ακόμα πιο βασικά, για την διαφοροποίηση και υπερίσχυση στελεχών στο είδος *Saccharomyces cerevisiae*. Η έρευνα, επομένως, πάνω στην εξάπλωση και βιοποικιλότητα του ζαχαρομύκητα είναι πολύ σημαντική. Σε γενικές γραμμές τα στελέχη που έχουν απομονωθεί από τους αμπελώνες παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια σε σχέση με τα εργαστηριακά και τα στελέχη των οινοποιείων (Tofalo et al. 2013). Σημαντικό ρόλο σε αυτές τις γενετικές διαφοροποιήσεις φαίνεται να παίζουν οι σφήκες που πραγματοποιούν την διακίνηση των στελεχών (Stefanini et al. 2012).

### **1.6 Το "terroir" και οι βασικοί παράγοντες που επηρεάζουν την σύσταση του οίνου**

Οι μικροοργανισμοί που συναντώνται στα σταφύλια είναι άρρηκτα συνδεδεμένοι με όλη την διαδικασία της ζύμωσης και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου. Ο όρος *terroir* έχει περιγραφεί αρχικά εμπειρικά από Γάλλους οινολόγους, με σκοπό να προσδώσουν στα προϊόντα τους προστιθέμενη αξία καθώς και να τα διαχωρίσουν από κρασιά διαφορετικών περιοχών. Τα τελευταία χρόνια υποστηρίζεται στην επιστημονική κοινότητα η έννοια του "μικροβιακού *terroir*", σύμφωνα με την οποία, η διαφορετική βιοποικιλότητα των μικροοργανισμών ανά περιοχή, φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην διαμόρφωση του εκάστωτε οίνου (Bokulich et al. 2013, Bokulich et al. 2016, Banilas et al. 2016, Nisiotou et al. 2018). Η διαμόρφωση αυτής της συνθήκης είναι ένα πολυπαραγοντικό φαινόμενο και εξαρτάται από παράγοντες οι οποίοι αντίστοιχα αλληλεπιδρούν (Belda et al. 2017). Οι πληθυσμοί των μικροοργανισμών του εδάφους της αμπέλου φαίνεται να διαφοροποιούνται συστηματικά και μη τυχαία ανάλογα με την γεωγραφική περιοχή (Burns et al. 2015), και αυτή η διαφοροποίηση επιδρά επόμενα στην "σύσταση" του μικροβιώματος του αμπέλου (Zarraonaindia et al. 2015). Η βιοποικιλότητα της αμπέλου είναι ιδιαίτερα μεγάλη όσον αφορά τους προκαρυωτικούς οργανισμούς, καθώς διαφορετικά είδη επικρατούν στα φύλλα του φυτού και άλλα στα σταφύλια (Leveau and Tech 2010). Αντίστοιχα και η βιοποικιλότητα των ζυμών που υπάρχουν στα σταφύλια και στον μούστο έχει μελετηθεί διεξοδικά, είναι ιδιαίτερα μεγάλη (Pinto et al. 2015), επηρεάζεται από την γεωγραφική περιοχή (*terroir*) (Banilas et al. 2016), την ποικιλία των σταφυλιών και τις κλιματικές συνθήκες (Bokulich et al. 2014), ενώ διαφοροποιείται αισθητά ανάλογα με την υγιεινή κατάσταση του σταφυλιού (Nisiotou and Nychas 2007). Επακόλουθα η μικροβιακή ποικιλότητα κατά την διάρκεια της ζύμωσης του μούστου εξαρτάται από αυτή των σταφυλιών, σε ένα σύνθετο και δυναμικό φαινόμενο (ζύμωση μούστου) από μικροβιακής, βιοχημικής και χημικής σκοπιάς (Portillo and Mas 2016, Bokulich et al. 2012, Nisiotou et al. 2007). Περισσότερα για αυτό το κομμάτι θα αναφερθούν σε επόμενο κεφάλαιο.

Ένας άλλος παράγοντας που συμβάλει στην μεταβλητότητα του μικροβιώματος τόσο των σταφυλιών, αλλά και του οίνου, είναι η ανθρώπινη παρέμβαση και δράση στις αμπελουργικές ζώνες αλλά και στις πρακτικές οινοποίησης (Grangeteau et al. 2016). Ιδιαίτερως, λόγω της “άνθισης” και συστηματοποίησης των βιολογικών καλλιεργειών, οι ανθρώπινες δραστηριότητες αποκτούν μεγαλύτερη βαρύτητα στην διαμόρφωση του “*terroir*” και του οίνου (Belda et al. 2013). Η ύπαρξη μικροβιακού “*terroir*”, όπως φάνηκε είναι μια μεταβλητή που σε συνδυασμό με άλλους παράγοντες καθορίζουν την πορεία ζύμωσης και την σύσταση του κρασιού από μικροβιολογικής αλλά και οργανοληπτικής άποψης. Συγκεκριμένα, είναι γνωστό πως συμβιωτικά ριζοβακτήρια επηρεάζουν την ανάπτυξη και την φυσιολογία των ριζιδίων των φυτών και κατ’έκταση ολόκληρων των φυτών (Comprant et al. 2010). Αυτό το φαινόμενο συναντάται και στο είδος *Vitis vinifera* όπου βακτήρια που ενισχύουν την ανάπτυξη του φυτού (PGPB), φαίνεται να ενισχύουν την άμυνα του φυτού έναντι παθογόνων (Comprant et al. 2010). Εκτός από την ποικιλία του σταφυλιού, η συγκέντρωση σακχάρων και η υδατοπεριεκτικότητα συμβάλουν στην έννοια του “*terroir*”, εξαρτώμενα και από τις κλιματολογικές συνθήκες (Zsofi et al. 2010). Οι μικροοργανισμοί που επιτελούν συντελούν στην δημιουργία τελικών πτητικών μεταβολιτών του κρασιού (Verginer et al. 2010). Επιπλέον, πολύ πρόσφατα έχει βρεθεί ύπαρξη συσχέτισης του μικροβιακού “*terroir*” με τους μεταβολίτες του οίνου από τους Bokulich et al. 2016 και Banilas et al. 2016, οι οποίοι εισήγαγαν μια νέα παράμετρο στον σχηματισμό των τελικών οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του οίνου πέραν από την κλασική σχέση ποικιλίας σταφυλιού-ζυμωτικοί μικροοργανισμοί-μεταβολίτες. Όπως φαίνεται η έννοια του “*μικροβιακού terroir*” είναι πλέον ευρέως αποδεκτή και παίζει κρίσιμο ρόλο στην παραγωγή του κρασιού. Έπομένως η βιογεωγραφία των μικροοργανισμών που συναντώνται στους αμπελουργικές ζώνες και στους αμπελώνες πρέπει να μελετάται διεξοδικά.

### **1.7 Βιογεωγραφία μικροοργανισμών της αμπέλου**

Όπως αναλύθηκε διεξοδικώς παραπάνω, τα είδη των μικροοργανισμών που συναντώνται στα ώριμα σταφύλια και στον μούστο συνθέτουν ένα “*μικροβιακό terroir*”, η σύσταση τους όμως διαφέρει σημαντικά ανά περιοχές του πλανήτη, χωρίς να έχει βρεθεί ακόμα μια προφανής εξήγηση για τον λόγο που επικρατεί αυτή η συνθήκη (Barata et al. 2011). Συγκεκριμένα, σε σταφύλια καλλιεργημένα στην Αργεντινή έχουν βρεθεί είδη όπως *Hanseniaspora uvarum*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Candida stellata*, *Pichia membranifaciens* κ.α (Combina et al. 2005), τα ποσοστά των οποίων αλλάζουν και ανάλογα με την χρονιά συγκομιδής (*vintage*). Σε μια πιο πρόσφατη έρευνα στην χώρα της Αργεντινής (Eder et al. 2017) ταυτοποιήθηκαν είδη κατά την διάρκεια αυθόρμητης ζύμωσης μούστου και συγκεκριμένα στην αρχή της ζύμωσης, από το φυτό *Vitis labrusca L.*, με επικρατέστερα το *Candida sp.*, *Hanseniaspora uvarum* αλλά και το



*Torulasporea delbruecki*. Στην κοντινή χώρα της Βραζιλίας υπερισχύει το *Hanseniaspora uvarum* και είδη του γένους *Issatchenkia* (Baffi et al. 2011). Σε αμπελώνες από την χώρα της Χιλής, επιπλέον, έχει επισημανθεί το "αποτύπωμα" που αφήνουν οι άγριες ζύμες του αμπέλου (*Hanseniaspora* spp., *Metschnikowia* spp., και άλλες σε μικρότερα ποσοστά), με βάση την ταυτότητα τους, το ποσοστό εμφάνισης τους, αλλά και τα κλιματικά χαρακτηριστικά (Jara et al. 2016). Στο κρύο κλίμα του Καναδά, σε άλλη έρευνα, έχει δειχθεί πως επικρατούν βασιδιομύκητες του γένους *Cryptococcus* και σε μικρότερο ποσοστό το *Hanseniaspora uvarum* (Subden et al. 2003). Προχωρώντας στην περιοχή της Ασίας, και συγκεκριμένα στην Ινδία, έχουν ταυτοποιηθεί είδη όπως το *Hanseniaspora guilliermondii*, *Hanseniaspora uvarum*, *Candida* spp., αλλά και *Saccharomyces cerevisiae* (Chavan et al. 2009). Στην Ιαπωνία έχουν απομονωθεί στελέχη του είδους *Hanseniaspora uvarum* και *Candida* spp. (Yanagida et al. 1992), ενώ στην γειτονική Κίνα παρομοίως επικρατεί το *Hanseniaspora uvarum*, και σε μικρότερα ποσοστά, βασιδιομύκητες και είδη των γενών *Candida* και *Pichia* (Li et al. 2010). Στην Αυστραλία κυρίαρχο είδος ευρισκόμενο σε διάφορες ποικιλίες σταφυλιών είναι το *Aureobasidium pullulans* και σε μικρότερους πληθυσμούς συναντώνται τα παραδοσιακά είδη *Hanseniaspora uvarum*, *Candida* spp., *Metschnikowia pulcherrima* (Prakitichaiwattana et al. 2004). Στην ευρωπαϊκή ήπειρο και κυρίως στις μεσογειακές χώρες έχουν γίνει πολύ περισσότερες μελέτες. Ξεκινώντας από την χώρα της Γαλλίας, και την ευρύτερη περιοχή του Μπορντό, σε ώριμα σταφύλια, ταυτοποιήματα στελέχη του γένους *Cryptococcus* και *Candida* βρίσκονται σε υψηλότερο ποσοστό (περίπου 30%) και σε μικρότερα ποσοστά ευρίσκονται τα *Pichia* spp., *Rhodotorula* spp., *Hanseniaspora* spp. κ.α. (Renouf et al. 2005). Στην Ιταλία, σε διάφορες ποικιλίες σταφυλιών, τα είδη που έχουν ταυτοποιηθεί δεν παρουσιάζουν κάποια ιδιαίτερη διαφορά σε σχέση με αυτά που έχουν αναφερθεί (Guerzoni and Marchetti 1987). Σε σλοβενικές ποικιλίες τα τρία κυρίαρχα είδη είναι το *Rhodotorula glutinis*, *Aureobasidium pullulans* και *Hanseniaspora uvarum* (Raspor et al. 2006). Στην περιοχή της Ταραγόνα στην Ισπανία, σε μούστο σταφυλιών, επικρατεί το *Hanseniaspora uvarum*, σε ποσοστό 60%, έπονται είδη όπως *Aureobasidium pullulans*, *Pichia kluyveri*, *Candida stellata*, *Metschnikowia pulcherrima* και *Rhodotorula mucilaginosa* (Sabate et al. 2002). Νοτιότερα στην Ιβηρική χερσόνησο (Μάλαγα), σε μία πιο πρόσφατη εργασία των Clavijo et al. 2010, έπειτα από αυθόρμητες ζυμώσεις μούστων, έχουν βρεθεί άγριες ζύμες όπως *Hanseniaspora uvarum*, *Hanseniaspora guilliermondii* αλλά και *Lachancea thermotolerans*.

Στον ελλαδικό χώρο η καταγραφή και αποτύπωση γηγενών ζυμών, σε ώριμα σταφύλια και μούστο κατά την αρχή της ζύμωσης έχει γίνει σε πολύ λίγες έρευνες. Συγκεκριμένα, σε μία έρευνα στην περιοχή της Αττικής (Nisiotou and Nychas 2007) και της Μαντινείας (Nisiotou et al. 2007) έχουν καταγραφεί είδη του γένους *Hanseniaspora*, με το πιο ενδιαφέρον να είναι το *Hanseniaspora oruntiae*. Σε ντόπια ποικιλία από αμπελώνες της

Κεφαλλονιάς έχουν ταυτοποιηθεί, φαινοτυπικά, είδη που ανηκούν στο γένος *Candida* και *Cryptococcus* (Koulougliotis and Eriotou 2016). Με μοριακές τεχνικές, σε μια παλαιότερη έρευνα επί ελληνικού εδάφους (Αμύνταιο και Σαντορίνη), έχουν ταυτοποιηθεί επίσης και τα είδη *Torulaspora delbrueckii*, *Candida stellata*, *Metschnikowia pulcherrima* (Pramateftaki et al. 2000). Επομένως η κατανοήση της βιογεωγραφίας αμπέλων του ελλαδικού χώρου, μπορεί να βοηθήσει στην διαλογή γηγενών, μη συμβατικών ειδών, έχοντας ως απότοκο την παραγωγή εναλλακτικών οίνων ντόπιου χαρακτήρα.

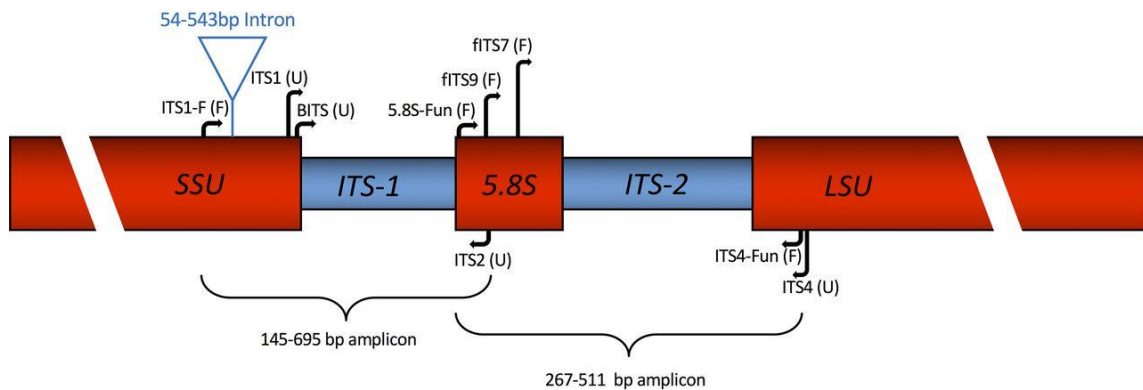
### **1.8 Μέθοδοι ταυτοποίησης ζυμών σε επίπεδο είδους**

Η ταυτοποίηση των ζυμών σε επίπεδο είδους, τα παλαιότερα χρόνια πραγματοποιούνταν με την παρατήρηση διαφόρων φαινοτυπικών χαρακτηριστικών, όπως η ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά καθώς και διάφορα βιοχημικά test (Pincus et al. 2007). Αυτές οι μέθοδοι, όμως, είναι πολύ χρονοβόρες και πλέον ξεπερασμένες. Σχετικά πιο γρήγορες και διαχειρίσιμες στον όγκο δουλειάς είναι οι μέθοδοι ταυτοποίησης μοριακής Βιολογίας. Η ευρέως διαδεδομένη τεχνική είναι η PCR-RFLP, και μελέτες όπως των Esteve-Zarzoso et al. 1999 αλλά και Nisiotou and Nychas 2007, αποτελούν θεμέλια για την μοριακή ταυτοποίηση ζυμών απομονωμένων από σταφύλια, μούστο και κρασί. Επιπλέον, και η μέθοδος της PCR-DGGE έχει δώσει ικανοποιητικά αποτελέσματα σε αυτό το κομμάτι (Renouf et al. 2005, Nisiotou et al. 2007). Η ακριβής περιοχή του γονιδιώματος βάσει της οποίας γίνεται ενίσχυση συγκεκριμένης αλληλουχίας, θα αναλυθεί παρακάτω. Πέραν από αυτές τις μεθόδους, τα τελευταία χρόνια, με την πρόοδο και εξέλιξη της Βιοπληροφορικής, έχει καταστεί δυνατό να εντοπισθούν είδη μυκήτων και βακτηρίων στο κρασί (Bokulich et al. 2016), τα οποία δεν έχουν την ικανότητα να σχηματίσουν μικροβιακές αποικίες στο τρυβλίο αλλά μπορεί να συμμετέχουν στην τελική σύσταση του ποτού.

#### **1.8.1 Μέθοδος ταυτοποίησης μέσω των ITS αλληλουχιών**

Για την ταυτοποίηση των μυκήτων σε επίπεδο είδους έχουν προταθεί πολλοί markers, με μεγαλύτερη αποδοχή και εφαρμογή από την επιστημονική κοινότητα, της περιοχής 18S-5.8S-28S του ριβοσωμικού DNA (Schoch et al. 2012). Παρόλο που υπάρχουν κάποιες αμφιβολίες και ενδοιασμοί για την παγκοσμιοποίηση μεθόδων ταυτοποίησης βασισμένων σε αυτήν την αλληλουχία (Kiss 2012), η επεξεργασία τους δίνει αξιόπιστα αποτελέσματα, με λίγες περιπτώσεις αποτυχίας (Begerow et al. 2010). Πιο αναλυτικά, η αλληλουχία του ριβοσωμικού DNA, εντός του πυρήνα, στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, αποτελείται από εκατοντάδες επαναλήψεις, της μη μεταγραφώμενης περιοχής και της μεταγραφώμενης περιοχής, παραταγμένες η μία πίσω από την άλλη (Hillis and Dixon 1990).

Εντός της αλληλουχίας που κωδικοποιεί για το τμήμα της μικρής (18S) και της μεγάλης (28S) υπομονάδας, παρεμβάλεται το γονίδιο 5.8S έχοντας αριστερά και δεξιά του τις αλληλουχίες ITS1 και ITS2 αντίστοιχα, οι οποίες παρουσιάζουν πολυμορφισμό (Rampersad 2014) και για αυτόν ακριβώς τον λόγο μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βάση για φυλογενετικές αναλύσεις και κατανόηση της εξελικτικής πίεσης. Για να μελετηθεί η παραπάνω διαδεδειγμένη διαφορά έχουν σχεδιαστεί πολλοί εκκινητές, βασισμένοι στις αλληλουχίες των συντηρημένων γονιδίων της μικρής και μεγάλης υπομονάδας των ριβοσωμάτων (White et al. 1990).

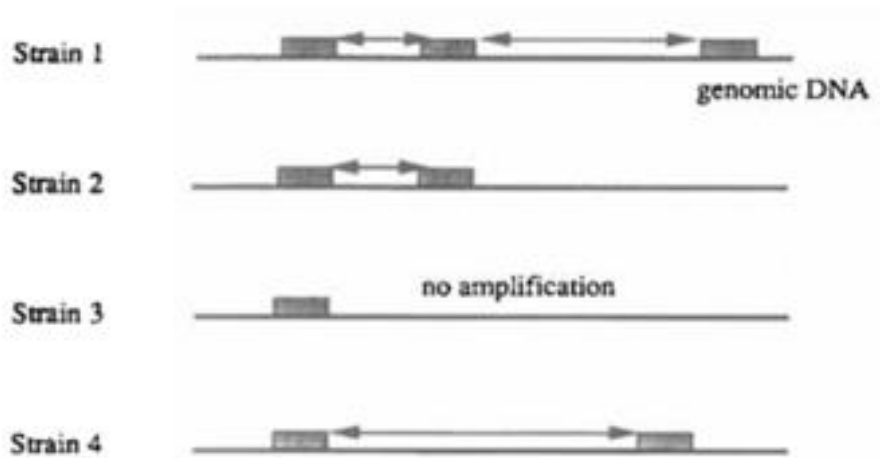


**Εικόνα 1.3.** Κατά σειρά οι περιοχές του ριβοσωμικού DNA στον πυρήνα των μυκήτων, και περιοχές βασισμένες για την σχεδίαση εκκινητών (Lee Taylor et al. 2016).

### 1.9 Ταυτοποίηση *Saccharomyces cerevisiae* σε επίπεδο στελέχους

Όπως περιγράφηκε παραπάνω το είδος *S. cerevisiae* αποτελεί το κρισιμότερο είδος για την ολοκλήρωση της ζύμωσης του οίνου, και επομένως η ταυτοποίηση των στελεχών συμβάλλει στην κατανόηση της βιογεωγραφίας του είδους αλλά και στην βελτιστοποίηση και αριστοποίηση των ζυμώσεων κατά τις διεργασίες παραγωγής οίνου. Έχουν προταθεί αρκετές μοριακές μέθοδοι για την ταυτοποίηση του είδους σε επίπεδο στελέχους (aCGH, αλληλούχιση γονιδιώματος, RAPD-PCR, ανάλυση μικροσυστοιχιών, MLST) (Tofalo et al. 2013). Μια ευρέως διαδεδομένη είναι η ταυτοποίηση που βασίζεται στις δέλτα (δ) αλληλουχίες του γενωμικού DNA του ζυμομύκητα, οι οποίες ανακαλύφθηκαν για πρώτη φορά από τους Cameron et al. 1979 και συναντώνται στην αρχή και στο τέλος του μεταθετού στοιχείου Ty1, χωρίς αυτό να αποτελεί νόρμα (Cameron et al. 1979). Οι Eigel και Feldmann το 1982 απέδειξαν πως αυτές οι αλληλουχίες (μαζί με τα μεταθετά στοιχεία) γειτνιάζουν γονιδια tRNA του *S. cerevisiae*. Εμβαθύνοντας, στο γονιδίωμα του ζυμομύκητα υπάρχουν περίπου 35 κόπιες του μεταθετού στοιχείου και τουλάχιστον 100 επαναλήψεις δ αλληλουχιών, μήκους περίπου 250 βάσεων (Cameron et al. 1979). Βάσει αυτού και με το δεδομένο πως στο γονίδιο SUP4 οι δ αλληλουχίες διαφέρουν σε αριθμό και θέση, από στέλεχος σε

στελέχος (Cameron et al. 1979), σχεδιάστηκαν οι εκκινητές δ1 και δ2 και με την μέθοδο της PCR αναδείχθηκε ο πολυμορφισμός των μοτίβων που προέκυψαν σε διαφορετικά στελέχη, καθιστώντας ικανή την ταχεία και οικονομική ταυτοποίηση του *S. cerevisiae* σε επίπεδο στελέχους (Ness et al. 1993). Οι Legras and Karst σε δημοσίευση τους το 2003, αριστοποίησαν την παραπάνω μέθοδο. Σχεδιάζοντας τους εκκινητές δ.1.2 και δ.2.1, συνέκριναν την διακριτική ικανότητα της μεθόδου εφαρμόζοντας PCR με τρία ζευγάρια εκκινητών (δ1-δ2, δ.1.2-δ2, δ1.2-δ.2.1), και ουσιαστικά ο εκκινητής δ.1.2 ήταν αυτός που προσέδωσε την μεγιστοποίηση στην ευαισθησία της μεθόδου.



**Εικόνα 1.4.** Τα γκρι ορθογώνια αναπαριστούν τις δ αλληλουχίες σε μια περιοχή και η γραμμή με τα βέλη τις interdelta περιοχές. Ανάλογα με την θέση και τον αριθμό των δ αλληλουχιών ενισχύονται μέσω PCR, διαφορετικού μεγέθους και αριθμού περιοχές, ο συνδυασμός των οποίων αποτελεί το "γονιδιακό αποτύπωμα" κάθε στελέχους, το οποίο απεικονίζεται σε πήκτωμα αγαρόζης μέσω ηλεκτροφόρησης (Ness et al. 1993).

## 1.10 Το γένος *Torulaspora*

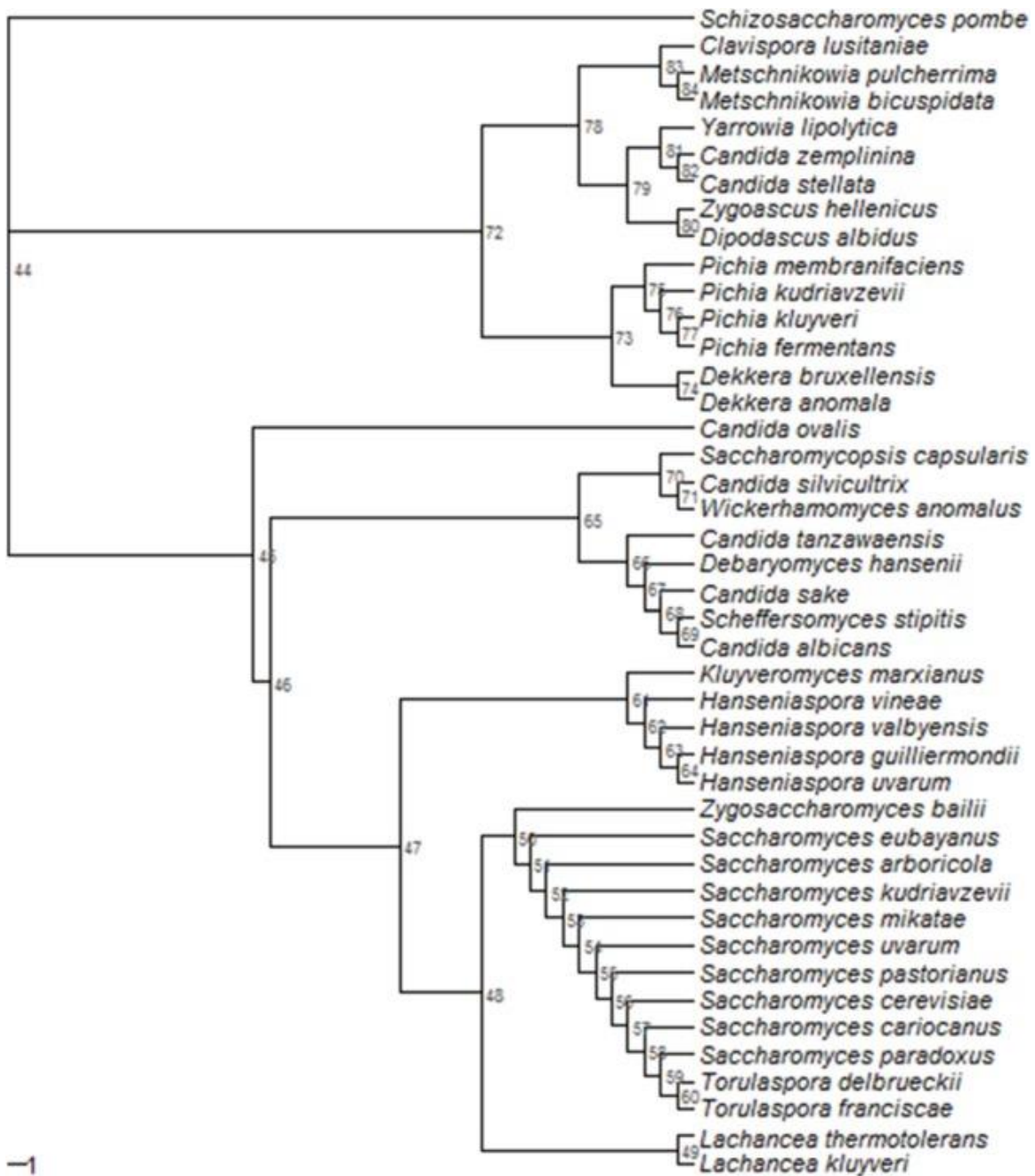
### 1.10.1 Χαρακτηριστικά αντιπροσώπων του γένους

Σύμφωνα με τους Kurtzman et al. 2011 έχουν περιγραφεί τα είδη *T. delbrueckii*, *T. francisce*, *T. globosa*, *T. maleae*, *T. microellipsoides* και το *T. pretoriensis*. Σε αυτά τα είδη ήρθαν να προστεθούν τα είδη *T. quercum* (Wang et al. 2009) και *T. indica* (Saluja et al. 2012), κάνοντας τα αποδεκτά είδη του γένους 8 στο σύνολο. Τα είδη του συγκεκριμένου γένους, έχουν δυνατότητα εγγενούς(ασκοσπόρια) και αγενούς (εκβλαστήματα) αναπαραγωγής. Τα κύτταρα τους έχουν σφαιρική προς ελλειψοειδή μορφή, έχουν ικανότητα ζύμωσης και κάποια από τα είδη του γένους παρουσιάζουν ανθεκτικότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης συγκριτικά με άλλα (Kurtzman 1998). Το περιοχόμενο του ζεύγους GC εκφράζεται σε ποσοστό που κυμαίνεται ανάμεσα στα είδη μεταξύ περίπου 42-47% (Kurtzman et al. 2011).

**Πίνακας 1.1.** Συστηματική κατάταξη του γένους *Torulaspora*

<b>ΕΠΙΚΡΑΤΕΙΑ</b>	<b>Eukarya</b>
<b>ΒΑΣΙΛΕΙΟ</b>	<b>Fungi</b>
<b>ΦΥΛΟ</b>	<b>Ascomycota</b>
<b>ΟΜΟΤΑΞΙΑ</b>	<b>Saccharomycetes</b>
<b>ΤΑΞΗ</b>	<b>Saccharomycetales</b>
<b>ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ</b>	<b>Saccharomycetaceae</b>
<b>ΓΕΝΟΣ</b>	<b><i>Torulaspora</i></b>

Φαινοτυπικά, τα είδη του γένους παρουσιάζουν αρκετές ομοιότητες με ανάλογα των γενών *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces* και *Debaryomyces*, όμως αποτελούν μια μονοφυλετική ομάδα, που ξεχωρίζει από τις υπόλοιπες "αμφιβόλου διαφοροποίησης" ομάδες ειδών των προαναφερθέντων γενών (Kurtzman and Robnett 2003, Kurtzman et al. 2011). Επομένως, γονοτυπικά, ο διαχωρισμός του γένους από άλλα συγγενικά είναι ξεκάθαρος, και δεν φαίνεται να προκαλεί την αμφιθυμία που προκύπτει από την διαφοροποίηση και κατάταξη των άλλων γενών, προερχόμενη από διαφορετικές μελέτες "μοριακής βάσης" για τον ίδιο σκοπό (Kurtzman and Robnett 2003, Kurtzman and Suzuki 2011).



**Εικόνα 1.5.** Δενδρόγραμμα που απεικονίζει την φυλογενετική σχέση 41 ειδών της τάξης Saccharomycetales, με βάση την ανάλυση της αλληλουχίας 18S του ριβοσωμικού DNA. Σύμφωνα με αυτή την μέθοδο τα γένη *Saccharomyces* και *Torulaspora* έχουν μικρή γενετική απόσταση μεταξύ τους (Masneuf-Pomarede et al. 2016).

## **1.11 Το είδος *Torulaspora delbrueckii***

### **1.11.1 Ενδιαιτήματα του είδους *Torulaspora delbrueckii***

#### **1.11.1.1 Βιοδιεργασίες**

Το είδος *T. delbrueckii* είναι μάλλον κοσμοπολίτικο (στελέχη του έχουν απομονωθεί από όλες τις ηπείρους), συναντάται και σε βιοδιεργασίες αλλά και στο φυσικό περιβάλλον (Albertin et al. 2014). Πιο συγκεκριμένα, το είδος έχει απομονωθεί κατά το αρχικό στάδιο αυθόρμητης ζύμωσης γηγενούς εκουαδοριανής ποικιλίας κόκκων καφέ (Papalexandratou et al. 2011), αλλά και από μαύρες ελιές ελληνικού τύπου (Kotzekidou 1997). Επιπλέον, ταυτοποιήσεις έχουν γίνει και από τις παραδοσιακά μεξικάνικα αλκοολούχα ποτά που έχουν ως βάση το φυτό Αγαυγή (Lachance 1995, Valdez et al. 2011). Ενώ, το είδος έχει συσχετιστεί με τουρσιά αγγουριών (Etchells and Bell 1950). Ενδιαφέρον αποτελεί η απομόνωση στελεχών, από φρούτα και χυμούς φρούτων με υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων (Kurtzman 1998), με κάποια παραδείγματα να είναι μηλίτες γαλλικής προέλευσης (Coton et al. 2006), φραουλιές (Santo et al. 2012), αλλά και ζαχαροκάλαμα (Stringini et al. 2008). Ιδιαίτερη κατηγορία που έχουν πραγματοποιηθεί απομονώσεις, αποτελούν τα γαλακτοκομικά προϊόντα όπως το κεφίρ (Loretan et al. 2003), παραδοσιακό αφρικάνικο ζυμούμενο προϊόν με βάση το γάλα (Gadaga et al. 2000), αλλά και κατά την διάρκεια ωρίμανσης τυριών τύπου γκούντα (Welthagen and Vijoen 1998).

#### **1.11.1.2 Φυσικό περιβάλλον**

Το είδος μπορεί να έχει ενδιαιτήματα τα οποία έχουν πολύ χαμηλό ποσοστό ανθρώπινης παρέμβασης. Πιο αναλυτικά, το είδος έχει ταυτοποιηθεί σε απομονώσεις από την επιφάνεια φύλλων διαφορών φυτών της Ταϊλάνδης (Limtong and Koowadjanakul 2012), καθώς και σε έντομα (Nguyen et al. 2006). Τέλος, το είδος έχει βρεθεί και σε εδαφολογικές απομονώσεις στην Σουηδία (Capriotti 1957).

## **1.12 Η διττή ανάγνωση της συμβολής του *Torulaspora delbrueckii* στα ζυμούμενα προϊόντα**

Όπως φάνηκε παραπάνω το είδος, συμμετέχει σε βιοδιεργασίες, απαντώμενο μέσα στην φυσική μικροχλωρίδα των προϊόντων κατά την πορεία της ζύμωσης. Αυτό, ανάλογα με την διεργασία μπορεί να έχει θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα. Το είδος έχει ταυτοποιηθεί σε μαλακά τυριά τα οποία έχουν υποστεί οπτική αλλοίωση (Westfall and Filtenborg 1998), καθώς και επίσης μπορεί να "προσβάλλει" και να υποβαθμίσει

ποιοτικά παστεριωμένους χυμούς πορτοκαλιού (Arias et al. 2002, Ros-Chumillas et al. 2007). Από την άλλη πλευρά, τα τελευταία χρόνια φαίνεται να αποκαλύπτεται η θετική συμβολή του στην παραγωγή ψωμιού, καθώς κάποια στελέχη του παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στο οσμωτικό stress, ικανότητα “φουσκώματος” του προζύμι (Hernandez-Lopez et al. 2003), αλλά και αντοχή σε θερμοκρασίες ψύξης (Almeida and Pais 1996, Alves-Araujo et al. 2004), καθιστώντας τα υποψηφία ως εναλλακτικούς διεξαγωγείς ή συνδιεξαγωγείς της ζύμωσης του ψωμιού (Pacheco et al. 2012), σε σχέση ή μαζί με το *S. cerevisiae* αντίστοιχα.

### **1.13 Η περίπτωση του κρασιού**

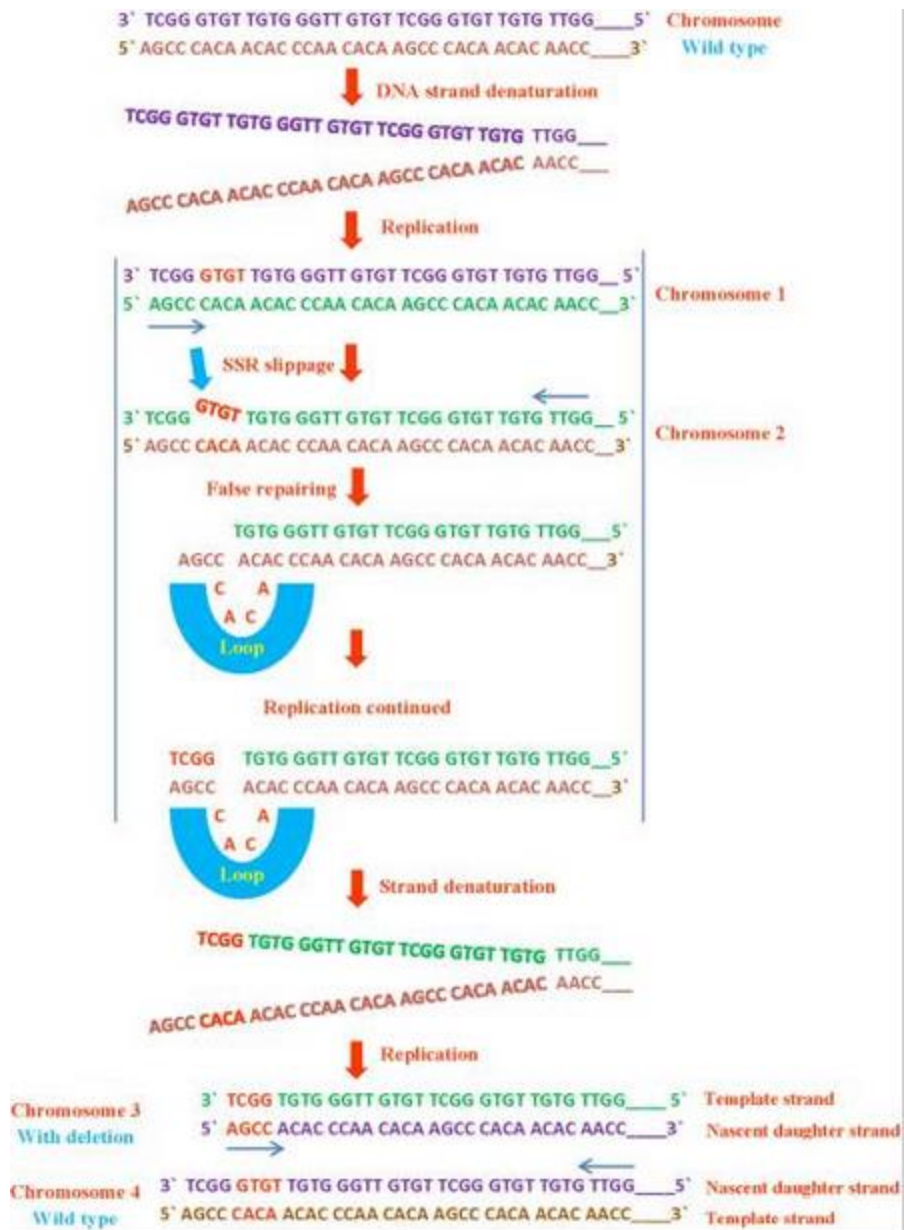
Τα τελευταία χρόνια οι “άγριες” ζύμες χρησιμοποιούνται όλο και πιο συστηματικά στην έρευνα πάνω στις μικροβιολογία του οίνου. Σε πολλές μελέτες έχει δειχθεί πως τέτοιες ζύμες, παίζουν σημαντικό ρόλο στην διαμόρφωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του οίνου (Escribano-Viana et al. 2018, Chen et al. 2018, Velazquez et al. 2019, Sgouros et al. 2018, Nisiotou et al. 2018). Το είδος *T. delbrueckii* ανήκει σε αυτές τις ζύμες και μάλιστα φαίνεται να έχει κάποια από τα πιο ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά. Η παραγωγή αιθανόλης είναι μικρότερη σε σχέση με αυτή από το *S. cerevisiae*, όμως μεγαλύτερη σε σχέση με άλλες άγριες ζύμες (Ciani and Maccarelli 1998, Sgouros et al. 2018). Επιπλέον το είδος χαρακτηρίζεται από την ικανότητα του να παράγει χαμηλές συγκεντρώσεις οξικού οξέος, ακεταλδεϋδης, ακετοϊνης και αιθυλικού οξέος, ιδιότητα επιθυμητή για την οινοποίηση (Ciani and Picciotti 1995, Sgouros et al. 2018). Η χαμηλή παραγωγή οξικού οξέος “οδηγεί” και στην χαμηλή πτητική οξύτητα (Martinez et al. 1990), και για αυτόν ακριβώς τον λόγο έχει ελεγχθεί η ικανότητα του να μειώνει να πτητική οξύτητα οίνων σε μεικτή καλλιέργεια με *S. cerevisiae*, με άκρως ενθαρρυντικά αποτελέσματα (Bely et al. 2008). Ενώ αυτό έχει φανεί να ισχύει και στην περίπτωση που γίνονται διαδοχικές καλλιέργειες, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες (Ciani et al. 2005). Εκτός από αυτήν την ιδιότητα, το συγκεκριμένο είδος έχει προταθεί και για την παραγωγή αφρώδων οινών, μέσω της δευτερογενούς ζύμωσης (Canonico et al. 2018). Τέλος, συγκεκριμένα στελέχη του είδους με killer ιδιότητες, φαίνεται να μπορούν να εξαφανίσουν ή να μειώσουν στο ελάχιστο τους πληθυσμούς άλλων “άγριων ζυμών” (Velazquez et al. 2019). Επομένως το *T. delbrueckii* φαίνεται να διαθέτει ιδιότητες που κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες μπορούν να αξιοποιηθούν κατά την οινοποιητική διαδικασία για να βελτιώσουν τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του οίνου, αλλά και ως “προστατευτικές” καλλιέργειες.



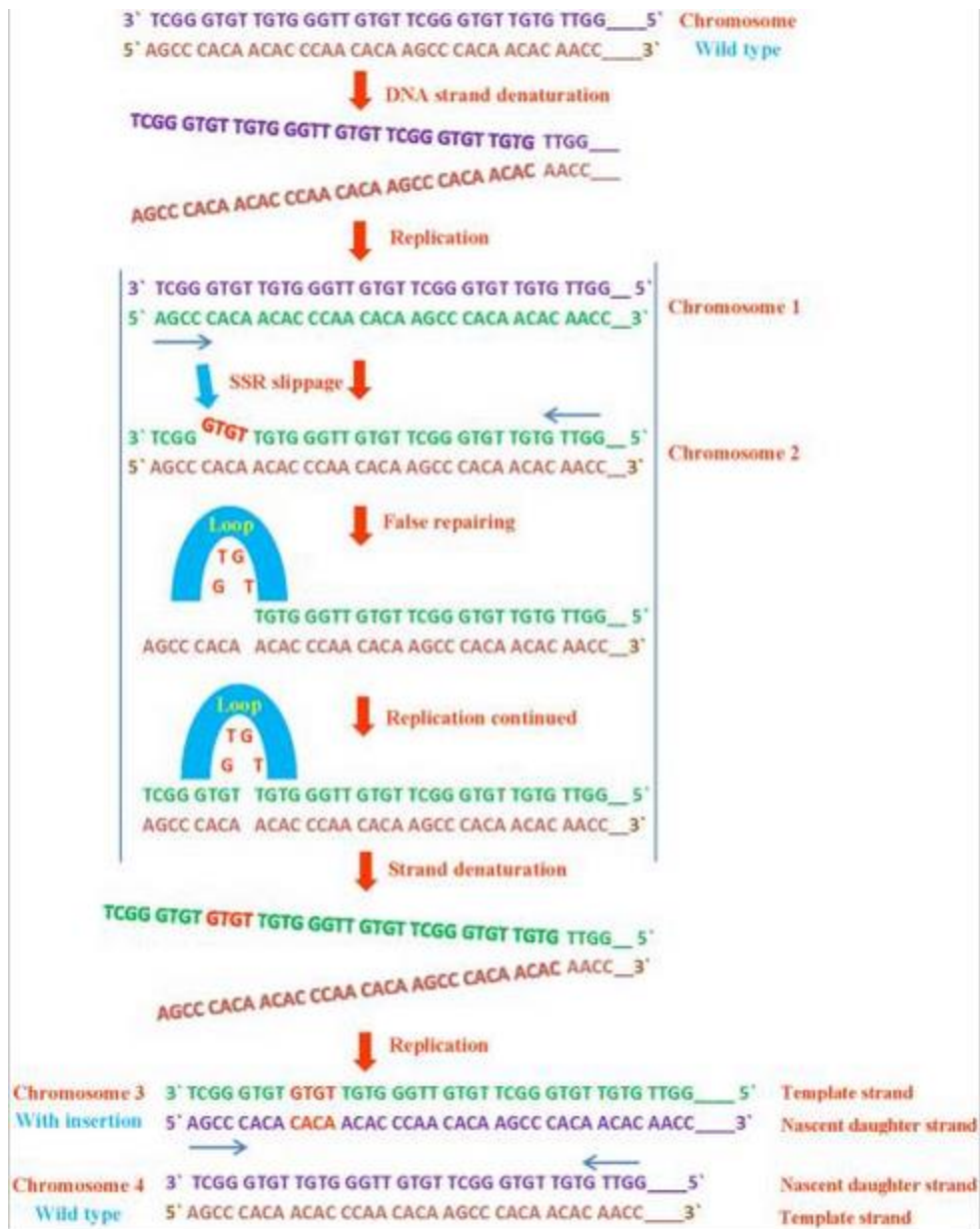
#### 1.14 Οι μικροσυστοιχίες DNA ως μέσο εκτίμησης της γενετικής ποικιλομορφίας

Οι μικροσυστοιχίες ή μικροδορυφορικές αλληλουχίες είναι επαναλήψεις βάσεων με μικρό μήκος, συγκεκριμένου μοτίβου, εξαπλωμένες στο DNA των οργανισμών (Litt and Luty 1989, Han et al. 2015, Saeed et al. 2016). Ο όρος μικροδορυφορικές αλληλουχίες (microsatellites) εισήχθη για πρώτη φορά το 1989 από τους Litt and Luty, οι οποίοι προσδιόρισαν τον πολυμορφισμό της συστηματικής επανάληψης ενός δινουκλεοτιδίου (TG) στο γονίδιο που κωδικοποιεί για την ακτίνη του καρδιακού μυός. Πιο αναλυτικά, αυτές οι συστοιχίες (σε επανάληψη η μία πίσω από την άλλη) αντιστοιχούν σε μοτίβα 1 έως 10 ζευγών βάσεων (Tautz 1993, Saeed et al. 2016) τα οποία ποικίλουν σε αριθμό ανάλογα τον γεντικό τόπο (locus) στον οποίο βρίσκονται, τόσο σε φυτικούς (Varshney et al. 2005, Zulini et al. 2005), σε ζωικούς οργανισμούς (Litt and Luty 1989) και φυσικά σε μικροοργανισμούς (Albertin et al. 2014, Banilas et al. 2016). Η ιδιότητα τους, να διαφοροποιείται ο αριθμός των επαναλήψεων τους από οργανισμό σε οργανισμό, αλλά και το ότι έχουν πολύ υψηλή συχνότητα σημειακών μεταλλαγών, τα καθιστά ως μοριακούς δείκτες, που βοηθάνε σε ζητήματα μοριακής βιολογίας, βιοτεχνολογίας, οικολογίας και πάνω απόλα εξέλιξης (Saeed et al. 2016). Η ανάλυση της διαφοροποίησης του μήκους τους, μπορεί να γίνει μέσω αλληλούχισης ολόκληρου του γονιδιώματος (WGS) (Abdelkrim et al. 2009) ή με την ενίσχυση αλληλουχιών (PCR) που περιέχουν τις μικροσυστοιχίες σε συνδυασμό με τον ακριβή υπολογισμό του μήκους της ενισχυμένης αλληλουχίας (Albertin et al. 2014, Banilas et al. 2016).

Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων γίνονται προσθήκες ή ελλείψεις των μικροδορυφορικών αλληλουχιών, περιλαμβάνουν το "γλίστρημα" του μοτίβου πάνω στην μητρική αλυσίδα, την δημιουργία λούπας και μέσω της ολοκλήρωσης της αντιγραφής θα προψύψει η έλλειψη ή η προσθήκη, όπως φαίνεται και στις εικόνες 1.6 και 1.7.



**Εικόνα 1.6.** Μηχανισμός με τον οποίο μπορεί να προκύψει έλλειψη αλληλουχίας που αποτελεί μέρος μια μικροσυστοιχίας (Saeed et al. 2016)



**Εικόνα 1.7.** Μηχανισμός με τον οποίο μπορεί να προκύψει προσθήκη αλληλουχίας που αποτελεί μέρος μια μικροσυστοιχίας (Saeed et al. 2016)

Τέλος, πρέπει να τονιστεί πως οι μικροδορυφορικές αλληλουχίες έχουν την δυνατότητα μεταφοράς σε γονιδιώματα εντός συντηρημένων περιοχών, διαειδικά και ενδοειδικά, πράγμα που μπορεί να αποκαλύψει εξελικτικές σχέσεις συγκεκριμένων ομάδων (Saeed et al. 2016)

### **1.15 Η γενετική πληθυσμών του *Torulaspota delbrueckii***

Το πυρηνικό DNA του *T. delbrueckii*, προσφάτως αλληλουχημένο, μήκους 9-11 Mb είναι κατανομημένο σε 8 χρωμοσώματα (Gordon et al. 2011, Gomez-Angulo et al. 2015), ενώ το μιτοχονδριακό DNA έχει μήκος 28-45 Kb (Wu et al. 2015). Αυτές οι πληροφορίες αποτελούν το θεμέλιο για την αποκρυπτογράφηση και την σχέση των γονιδίων που προσδίδουν σε στελέχη του είδους “οινοποιητικές ικανότητες” και μπορούν να αξιοποιηθούν και βιοτεχνολογικά (Gomez-Angulo et al. 2015), αλλά και για την κατανόηση της διαμόρφωσης του “γενετικού καμβά” των πληθυσμών του είδους σε σχέση με τις εξελικτικές και οικολογικές πιέσεις που δέχεται (Albertin et al. 2014). Μέχρι στιγμής μόνο μια έρευνα έχει αποκαλύψει τις εξελικτικές σχέσεις στελεχών του είδους, απομονωμένα από ποικίλα περιβάλλοντα. Συγκεκριμένα οι Albertin et al. το 2014 υποστήριξαν πως η ανθρώπινη δραστηριότητα επηρεάζει την γενετική δομή των πληθυσμών του είδους, και τους διαφοροποιεί σε σχέση με στελέχη απομονωμένα από “παρθένα” περιβάλλοντα. Αυτή η πληροφορία είναι πολύ σημαντική, καθώς όπως έχει αναφερθεί το είδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην οινοποιητική διαδικασία, και επομένως εκτενέστερες μελέτες για την κατανόηση της πληθυσμιακής γενετικής, ανάμεσα σε στελέχη που έχουν απομονωθεί από αμπελουργικές και οινοποιητικές περιοχές, μπορούν να βοηθήσουν στην παραγωγή ποιοτικότερων οίνων.

### **1.16 Σκοπός της Εργασίας**

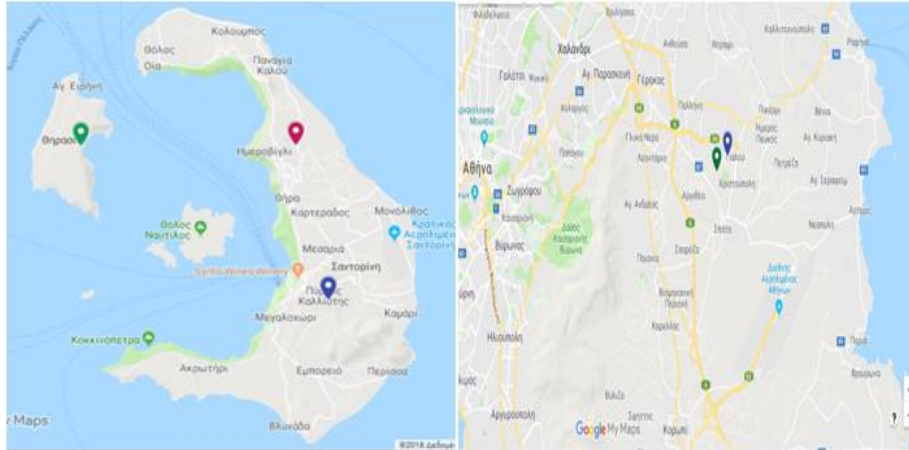
Η παρούσα εργασία χωρίζεται σε δυο ενότητες. Σκοπός της πρώτης ενότητας είναι η απομόνωση και η ταυτοποίηση για πρώτη φορά της γηγενούς μικροχλωρίδας των αμπελώνων του ΓΠΑ στα Μεσόγεια Αττικής και του Συνεταιρισμού Σαντορίνης, για το έτος 2018. Η συγκεκριμένη δράση αποτελεί το πρώτο βήμα στα πλαίσια της αξιοποίησης της γηγενούς μικροχλωρίδας των συγκεκριμένων αμπελώνων για την παραγωγή εναρκτήριων καλλιεργειών οινοποίησης.

Στη δεύτερη ενότητα θα γίνει το πρώτο βήμα για την μετέπειτα μελέτη της βιογεωγραφίας της ζύμης *Torulaspota delbrueckii*, η οποία εξετάζεται τα τελευταία χρόνια ως μια σημαντική εναλλακτική εναρκτήρια καλλιέργεια για την παραγωγή οίνων ποιότητας. Μέσω της εκτίμησης των γενετικών αποστάσεων των πληθυσμών *T. delbrueckii*, με βάση την ανάλυση μικροδορυφορικών αλληλουχιών του γονιδιώματος θα καταστεί δυνατό να εξετασθεί η γενετική δομή πληθυσμών *T. delbrueckii* που έχουν απομονωθεί από διαφορετικούς αμπελώνες ανά την Ελλάδα.

## **2.ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ**

## 2.1 Δείγματα σταφυλιών και αυθόρμητες ζυμώσεις

Τα σταφύλια προέρχονταν από τους αμπελώνες των περιοχών Θηρασία (δείγματα OST1,OST2), Βουρβούλος (δείγματα OSV1,OSV2) και Πύργος (OPS1, OSP2), του νησιού της Σαντορίνης, για το έτος 2018. Επίσης, σταφύλια των ποικιλιών Ασύρτικο(δείγματα OAK1,OAK2 και OAK) και Σαββατιανό προέρχονταν (δείγματα OAM1 και OAM2) από τον αμπελώνα του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, στα Σπάτα Αττικής, από το ίδιο έτος.



**Εικόνα 2.1.** Τα σημεία δειγματοληψίας φαίνονται στους χάρτες όπως περιγράφηκαν παραπάνω.Αριστερά, ποικιλία Ασύρτικο, Θηρασία (πράσινη κουκίδα), Βουρβούλος (κόκκινη κουκίδα), Πύργος (μπλε κουκίδα). Δεξιά, ποικιλία Ασύρτικο (πράσινη κουκίδα), ποικιλία Σαββατιανό (μπλε κουκίδα).

Πραγματοποιήθηκε ασηπτική έκθλιψη των σταφυλιών προς δημιουργία μούστου μέσω του μηχανήματος Stomacher και ο μούστος που συλλέχθηκε, μεταφέρθηκε ανά δείγμα, σε ογκομετρικές φιάλες των 500 ml, και κάτω από αναερόβιες συνθήκες πραγματοποιήθηκαν αυθόρμητες ζυμώσεις. Η πορεία των ζυμώσεων παρακολούθηθηκε μέσω της καταμέτρησης του παραγόμενου CO<sub>2</sub>, έπειτα από καθημερινή ζύγιση των φιαλών. Βάσει των παραπάνω δημιουργήθηκαν καμπύλες κινητικής των ζυμώσεων.

## 2.2 Απαρίθμηση μικροοργανισμών

Πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία σε τρία διαφορετικά στάδια των ζυμώσεων και επώαση έπειτα από διαδοχικές αραιώσεις, στα θρεπτικά υποστρώματα WL, LA, ESA και MRS στους 28°C και YPD στους 37°C αντίστοιχα. Τα στάδια που έγιναν οι δειγματοληψίες ήταν: α)αμέσως μετά την έκθλιψη των σταφυλιών (G),β) κατά την αρχή της ζύμωσης (BF) και γ)κατά το τέλος της ζύμωσης (EF).Τα τρυβλία επώαστηκαν

για 2-5 μέρες και στην συνέχεια έγινε καταμέτρηση των CFU's. Πραγματοποιήθηκε δειγματοληπτική μικροσκοπική παρατήρηση κάποιων αντιπροσωπευτικών αποικιών, και έπειτα έγινε αποθήκευση των απομονώσεων στην τράπεζα μικροοργανισμών του εργαστηρίου του Ινστιτούτου Οίνου, του ΕΛΓΟ ΔΗΜΗΤΡΑ.

### **2.3 Βασικές οινολογικές αναλύσεις**

Πραγματοποιήθηκε μέτρηση του pH, υπολογισμός ολικών σακχάρων και μέτρηση ολικής οξύτητας στο στάδιο G. Στο στάδιο EF μετρήθηκε το pH, η ολική και πτητική οξύτητα. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις μεθόδους που ορίζει η νομοθεσία (ΓΧΚ, Μέθοδοι ανάλυσης οίνων και γλευκών Τόμος 1, έκδοση 2013).

### **2.4 Μοριακή ταυτοποίηση των απομονωμένων ζυμών**

#### **2.4.1 Ενίσχυση της 5.8S ITS rDNA περιοχής με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης**

Σε μικροσωληνάρια PCR 0,2ml προστέθηκαν 3μl καυστικού νατρίου (NaOH) 0,02N και διαλύθηκε μικρή ποσότητα βιομάζας. Ακολούθησε βρασμός στους 99°C για 10 λεπτά.

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 50μl το οποίο περιλάμβανε 10ng μητρικού DNA, 1X Buffer Kara A, 20 pmol από κάθε εκκινητή, 100μM από κάθε dNTP και 1 U από την DNA πολυμεράση (KAPA Taq DNA Polymerase, KAPABiosystems).

Οι αλληλουχίες των μορίων εκκινητών είναι:

**ITS1:** 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG -3'

**ITS4:** 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

(White et al. 1990)

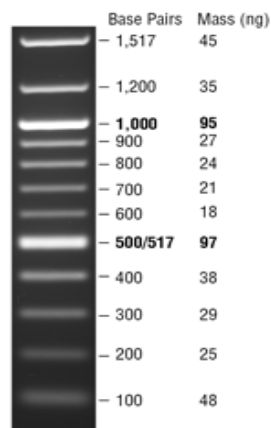
Η ενίσχυση έλαβε χώρα σε θερμοκυκλοποιητή (Biorad T100™ Thermal Cycler) σύμφωνα με το ακόλουθο πρόγραμμα:

Στάδιο της PCR	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος
1. Αρχική Αποδιάταξη	94° C	3min
2. Αποδιάταξη	94° C	30sec
3. Υβριδισμός εκκινητών	52° C	30sec
4. Επιμήκυνση	74° C	1min
<b>Επανάληψη σταδίων 2-4 για 35 φορές</b>		
5. Τελική επιμήκυνση	74° C	10min
<b>Διατήρηση στους 10° C</b>		

#### 2.4.2 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Τα προϊόντα της αντίδρασης διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v (AppliChem) , ανιχνεύτηκαν έπειτα από χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο (AppliChem) 5μl/100ml και φωτογραφήθηκαν κάτω από φως UV ακτινοβολίας με φωτογραφική μηχανή (Biorad, GelDoc XR<sup>+</sup>).

Τα μοριακά μεγέθη προσδιορίστηκαν με την βοήθεια δείκτη μοριακών βαρών (100bp DNA Ladder, New England Biolabs)



**Εικόνα 2.2.** Δείκτης μοριακών βαρών 100bp DNA Ladder, New England Biolabs



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

Για τις αντιδράσεις περιορισμού της 5.8S ITS περιοχής, τα προϊόντα PCR επώαστηκαν με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *HinfI*, *HaeIII* ή *HhaI* (Takara, Japan). Σε ορισμένες περιπτώσεις τα προϊόντα PCR χρειάστηκε να επωαστούν και με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *DdeI* (New England Biolabs) και *DraI* (Takara, Japan). Περίπου 400 ng προϊόντος PCR επώαστηκαν με 1 U ενζύμου σε τελικό όγκο 15μl με ρυθμιστικό διάλυμα που παρείχε ο προμηθευτής του ενζύμου για 16-18h σε θερμοκρασία 37 °C.

Τα θραύσματα περιορισμού διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτης αγαρόζης 2.5% w/v (AppliChem), ανιχνεύτηκαν έπειτα από χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο (AppliChem) 5μl/100ml και φωτογραφήθηκαν κάτω από φως UV ακτινοβολίας με φωτογραφική μηχανή (Biorad, GelDoc XR<sup>+</sup>). Τα μοριακά μεγέθη προσδιορίστηκαν με την βοήθεια δείκτη μοριακών βαρών (100bp DNA Ladder, New England, Biolabs).

### 2.5 Ενίσχυση των interdelta αλληλουχιών του *Saccharomyces cerevisiae*

Σε μικροσωληνάρια PCR 0,2ml προστέθηκαν 3μl καυστικού νατρίου (NaOH) 0,02N και διαλύθηκε μικρή ποσότητα βιομάζας. Ακολούθησε βρασμός στους 99°C για 10 λεπτά.

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 25μl το οποίο περιλάμβανε 1X Buffer Kara A, 2,5mM MgCl<sub>2</sub>, 2x BSA, 25pmol από κάθε εκκινητή, 200mM από κάθε dNTP και 1 U από την DNA πολυμεράση (KAPA Taq DNA Polymerase, KAPA Biosystems).

Τα μόρια εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι :

**δ.1.2** : 5'-TCAACAATGGAATCCCAAC-3'

**δ.2.1** : 5'-CATCTTAACACCGTATATGA-3'

(Legras et al. 2003).

Η ενίσχυση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκυκλοποιητή (Biorad T100™ Thermal Cycler) σύμφωνα με το ακόλουθο πρόγραμμα:

Στάδιο της PCR	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος
1. Αρχική Αποδιάταξη	94° C	3min
2. Αποδιάταξη	94° C	30sec
3. Υβριδισμός εκκινητών	46° C	30sec
4. Επιμήκυνση	72° C	90min
<b>Επανάληψη σταδίων 2-4 για 35 φορές</b>		
5. Τελική επιμήκυνση	72° C	10min
<b>Διατήρηση στους 10° C</b>		

Τα προϊόντα της αντίδρασης διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2% w/v (AppliChem), ανιχνεύτηκαν έπειτα από χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο (AppliChem), 5μl/100ml και φωτογραφήθηκαν κάτω από φως UV ακτινοβολίας με φωτογραφική μηχανή (Biorad, GelDoc XR<sup>+</sup>). Τα μοριακά μεγέθη προσδιορίστηκαν με την βοήθεια δείκτη μοριακών βαρών (100bp DNA Ladder, New England, Biolabs).

## 2.6 Ενίσχυση μικροδορυφορικών αλληλουχιών του γενωμικού DNA του είδους *Torulasporea delbrueckii*

Χρησιμοποιήθηκε το γενωμικό DNA από ένα αντιπροσωπευτικό στέλεχος (E11SL8) που ανήκει στο είδος *T. delbrueckii*.

Πραγματοποιήθηκε ενίσχυση 7 διαφορετικών περιοχών του γενωμικού DNA, με βάση τους σχεδιασμένους εκκινητές από τους Albertin et al. 2014. Οι forward εκκινητές είχαν στην αρχή της αλληλουχίας τους, την αλληλουχία του παγκόσμιου εκκινητή M13, που σε συνδυασμό με τους σημασμένους εκκινητές M13 με FAM και HEX, επέτρεψαν την μειωμένου κόστους ανάλυση του μήκους των ενισχυμένων περιοχών, όπως έχει προταθεί από τον Schuelke το 2000. Λόγω του διαφορετικού μήκους των 7 προϊόντων, και των δύο διαφορετικών φθορίζοντων ενώσεων, επιτράπηκε η μίξη μέχρι και τεσσάρων προϊόντων ταυτόχρονα (multiplex). Τα προϊόντα των PCR "περάστηκαν" από αναλυτή DNA ABI3730xl (MacroGen Inc. Seoul, South Korea) με την χρήση του 600LIZ ως πρότυπο μεγέθους (Applied Biosystems). Η οπτικοποίηση και ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε μέσω του λογισμικού Peak Scanner™ ver. 1.0 (Applied Biosystems).

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 30μl το οποίο περιλάμβανε 5ng μητρικού DNA, 1X Buffer Kapa A, 0,16μM από τους reverse και M13 εκκινητές, και 0,04μM από τον forward εκκινητή, 100μM από κάθε dNTP και 1 U από την DNA πολυμεράση (KAPA Taq DNA Polymerase, KAPABiosystems).

Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

**FAMM13:** 5'-CACGACGTTGTAAAACGAC-3'

**HEXM13:** 5'-CACGACGTTGTAAAACGAC-3'

**TD1AF:** 5'-CACGACGTTGTAAAACGACAGATGCAACCACAATGGCAA-3'

**TD1AR:** 5'-TGCGATTGAAACTGTTGATTG-3'

**TD1BF:** 5'-CACGACGTTGTAAAACGACTTCACAAGTAGATGCCGATGT-3'

**TD1BR:** 5'-TCCCGTCCTTCAAGTTAAACA-3'

**TD1CF:** 5'-CACGACGTTGTAAAACGACGTAACATGTTTCGTAACGGG-3'

**TD1CR:** 5'-CCTGGGATTCCATCCCAAT-3'

**TD2AF:** 5'-CACGACGTTGTAAAACGACGATGATGATGGTGATGCGAA-3'

**TD2AR:** 5'-TCTTACAGAACTTTTCCCCGA-3'

**TD5AF:** 5'-CACGACGTTGTAAAACGACAGGGACCCCCACCTAAATTAA-3'

**TD5AR:** 5'-CGAAAAAGTGAAACTACCTCGT-3'

**TD6AF:** 5'-CACGACGTTGTAAAACGACAACAAGGGCTTATCATCCATT-3'

**TD6AR:** 5'-ACCCCGCTTCTTCTTCTTT-3'

**TD7AF:** 5'-CACGACGTTGTAAAACGACGAGGGAGTGGTACTATGGTGG-3'

**TD7AR:** 5'-ACGCAGTGGTGTCTTGAAT-3'

**TD8AF:** 5'-CACGACGTTGTAAAACGACAAATCAGTCGAGTAGGTTGCG-3'

**TD8AR:** 5'-TCCACCGGAATGTTCAC-3'

Η ενίσχυση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκυκλοποιητή (Biorad T100™ Thermal Cycler) σύμφωνα με το ακόλουθο πρόγραμμα:

Στάδιο της PCR	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος
1. Αρχική Αποδιάταξη	95° C	5min
2. Αποδιάταξη	95° C	35sec
3. Υβριδισμός εκκινήτων	Πίνακας 2	50sec
4. Επιμήκυνση	72° C	40sec
Επανάληψη σταδίων 2-4 για 35 φορές		
5. Τελική επιμήκυνση	72° C	7min
Διατήρηση στους 10° C		

Οι θερμοκρασίες πρόσδεσης των εκκινήτων στα προγράμματα ενίσχυσης και το μοτίβο της κάθε μικροδορυφικής περιοχής φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας 2.1.** Θερμοκρασίες πρόσδεσης των διαφορετικών εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν και μοτίβο επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών που περιλαμβάνονται στο ενισχυμένο προϊόν.

Εκκινήτες	Μοτίβο	Θερμοκρασία πρόσδεσης
<b>TD1A</b>	CAA	50
<b>TD1B</b>	GT	51
<b>TD1C</b>	TTA	-
<b>TD2A</b>	GTT	51
<b>TD5A</b>	GT	51
<b>TD6A</b>	CAA/CAG	55
<b>TD7A</b>	TTAA	48
<b>TD8A</b>	TTG/CTG	53

Τα προϊόντα της αντίδρασης διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2,5% w/v (AppliChem), ανιχνεύτηκαν έπειτα από χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο (AppliChem), 5μl/100ml και φωτογραφήθηκαν κάτω από φως UV ακτινοβολίας με φωτογραφική μηχανή (Biorad, GelDoc XR<sup>+</sup>). Τα μοριακά μεγέθη προσδιορίστηκαν με την βοήθεια δείκτη μοριακών βαρών (100bp DNA Ladder, New England, Biolabs).

Η ενίσχυση του προϊόντος με τους εκκινητές 1C δεν επιτεύχθηκε.

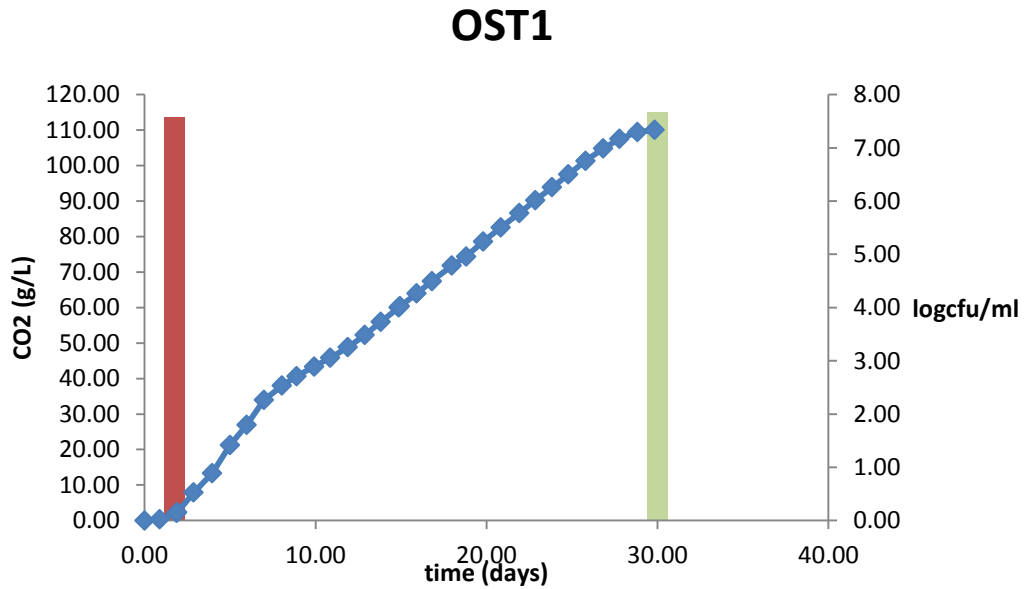
# **3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

### 3.1 Κινητική αυθόρμητων ζυμώσεων και απαρίθμηση μικροοργανισμών

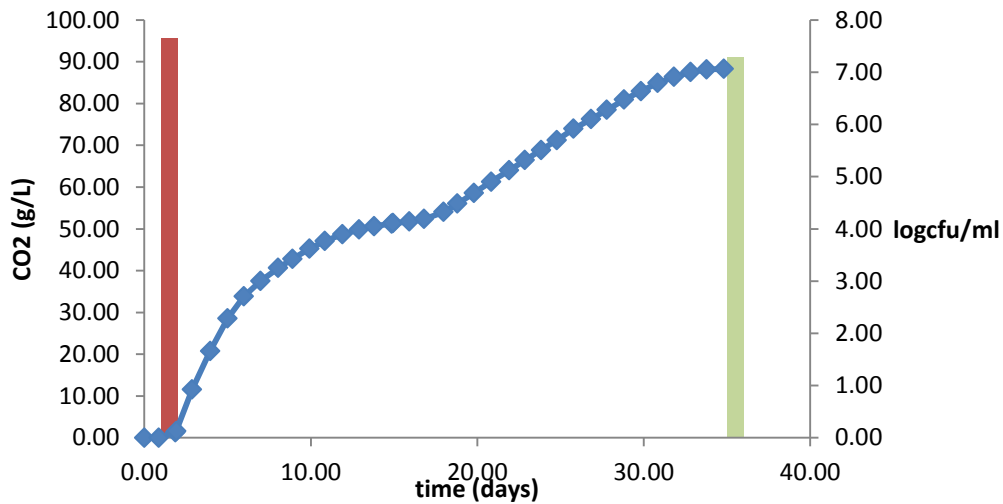
Η πορεία των αυθόρμητων ζυμώσεων καθώς και οι πληθυσμοί των ζυμών σε δύο στάδια της ζύμωσης (αρχικό και τελικό) φαίνεται στα παρακάτω διαγράμματα.

#### Σαντορίνη

α. Θηρασία

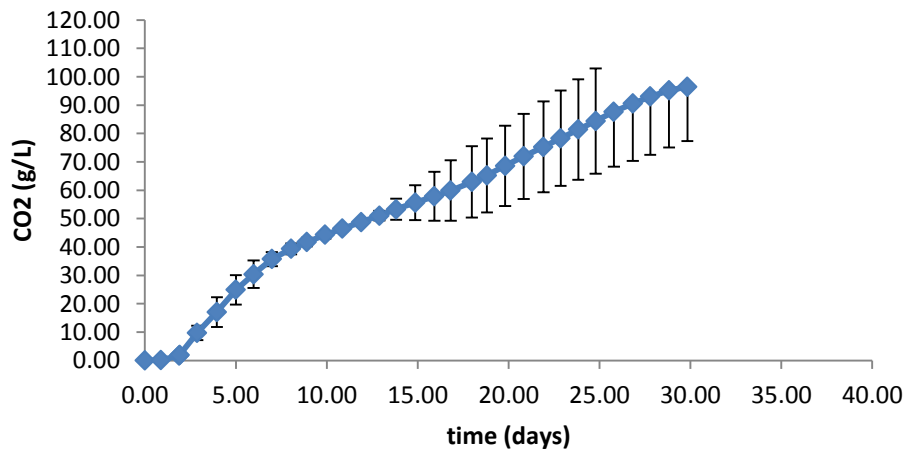


## OST2



**Διαγράμματα 3.1 και 3.2.** Η πορεία ζύμωσης φαίνεται μεσω της μπλε γραμμής, ενώ οι πληθυσμοί (logcfu/ml) των ολικών ζυμών (non-*Saccharomyces*) στο αρχικό, και το τελικό στάδιο (*S. cerevisiae*) απεικονίζονται με τις κόκκινες και πράσινες ευθείες αντίστοιχα.

## OST AVG

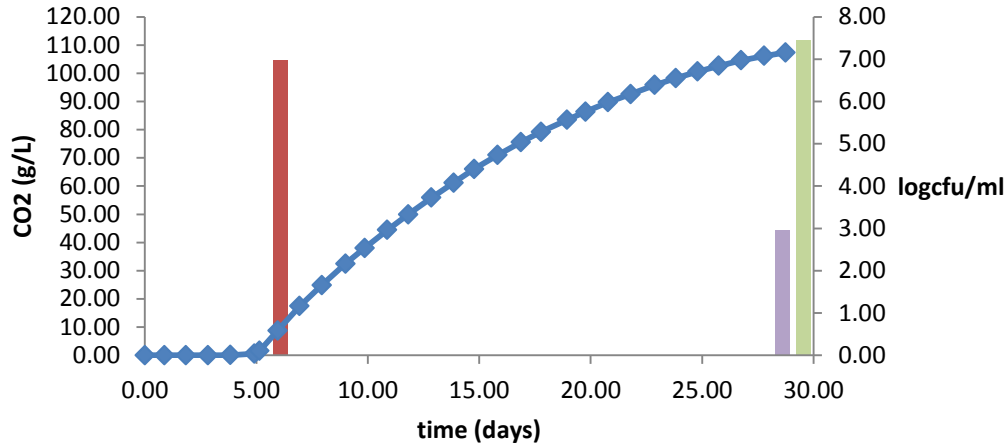


**Διάγραμμα 3.3.** Καμπύλη ζύμωσης της μέσης τιμής των δύο δειγμάτων (OST1 και OST2). Οι κεραίες παριστάνουν την τυπική απόκλιση.

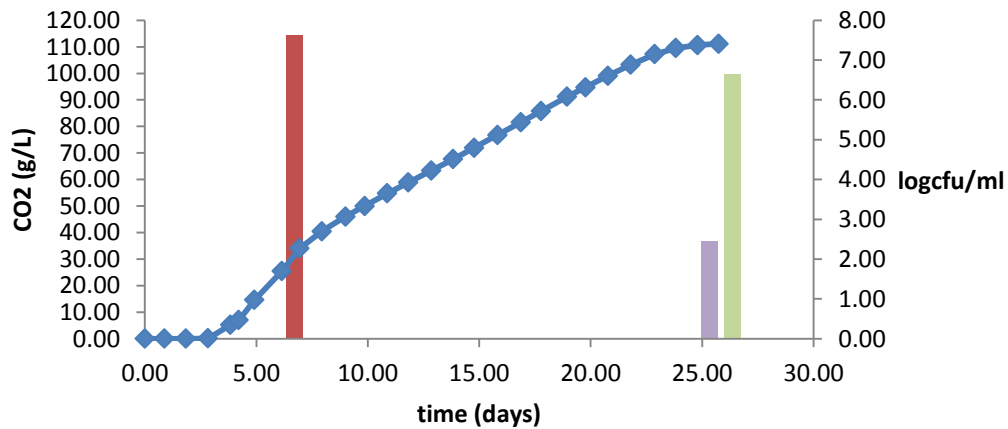


β.Βουρβούλος

### OSV1

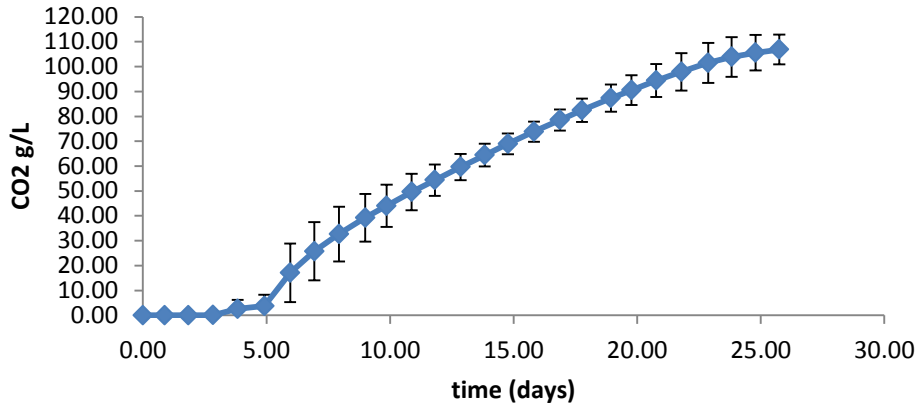


### OSV2



**Διαγράμματα 3.4 και 3.5.** Η πορεία ζύμωσης φαίνεται μεσω της μπλε γραμμής, ενώ οι πληθυσμοί (logcfu/ml) των ολικών ζυμών (non-*Saccharomyces*) στο αρχικό, και το τελικό στάδιο (*S. cerevisiae*) απεικονίζονται με τις κόκκινες και πράσινες ευθείες αντίστοιχα. Η μωβ ευθεία παριστάνει των πληθυσμό των non-*Saccharomyces* ζυμών στο τελικό στάδιο της ζύμωσης.

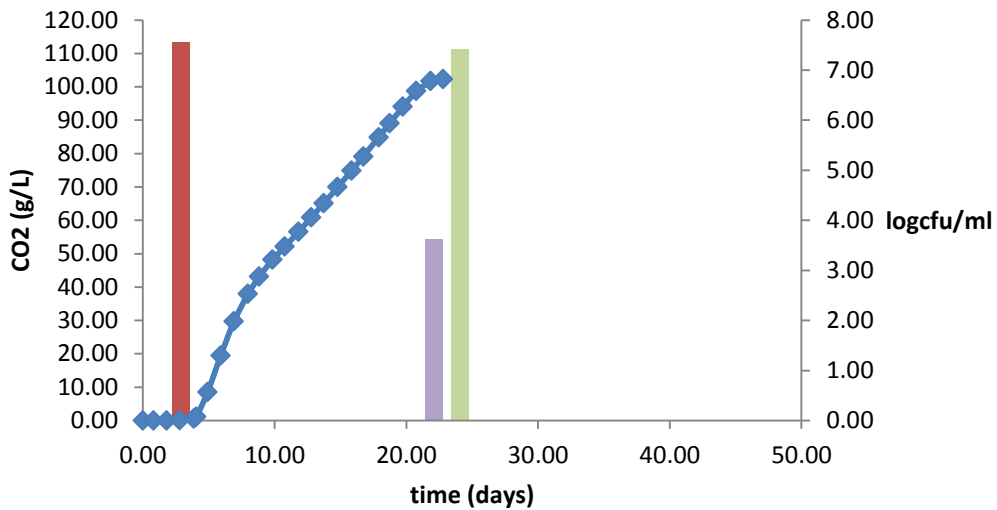
### OSV AVG



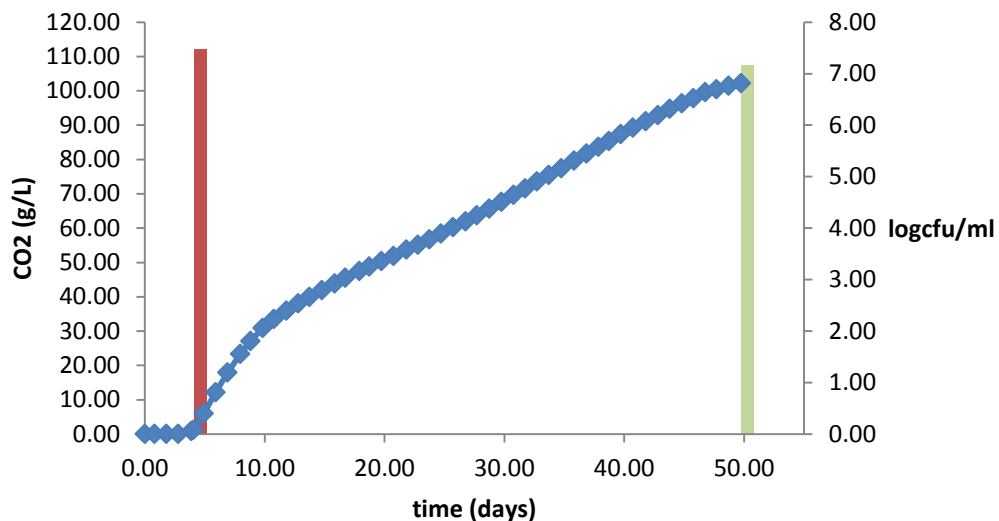
**Διάγραμμα 3.6.** Καμπύλη ζύμωσης της μέσης τιμής των δύο δειγμάτων (OST1 και OST2). Οι κεραίες παριστάνουν την τυπική απόκλιση.

γ. Πύργος

### OSP1



## OSP2



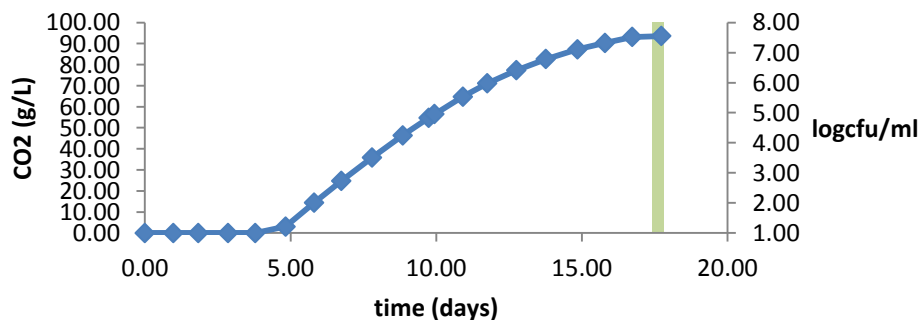
**Διαγράμματα 3.7 και 3.8.** Η πορεία ζύμωσης φαίνεται μεσω της μπλε γραμμής, ενώ οι πληθυσμοί (logcfu/ml) των ολικών ζυμών (non-*Saccharomyces*) στο αρχικό και το τελικό στάδιο (*S. cerevisiae*) απεικονίζονται με τις κόκκινες και πράσινες ευθείες αντίστοιχα. Η μωβ ευθεία παριστάνει των πληθυσμό των non-*Saccharomyces* ζυμών στο τελικό στάδιο της ζύμωσης.

### Αττική

#### α.Ασύρτικο

Στα δείγματα OAK1 και OAK2 δεν κατάφερε να πραγματοποιηθεί ζύμωση. Στο δείγμα OAK η ζύμωση ολοκληρώθηκε και η πορεία της φαίνεται παρακάτω.

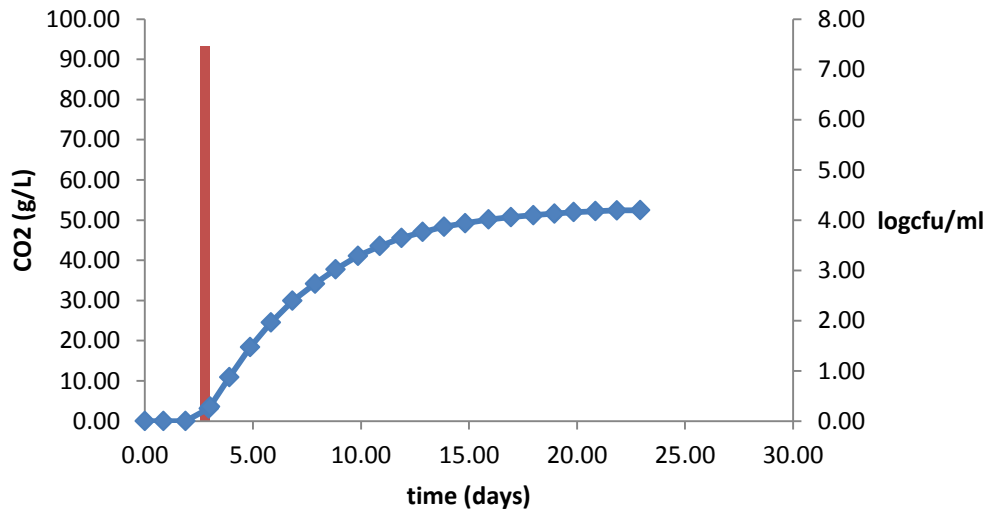
## OAK



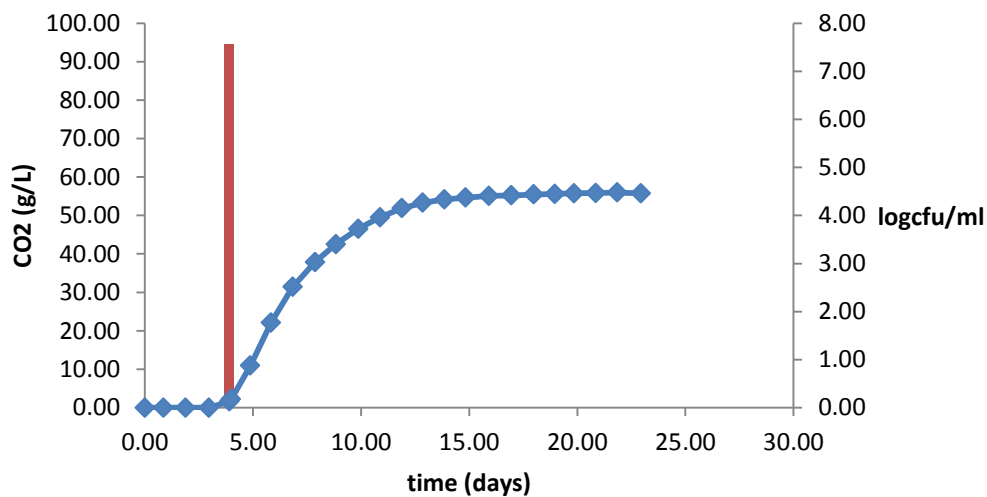
**Διάγραμμα 3.9.** Η πορεία ζύμωσης φαίνεται μεσω της μπλε γραμμής, ενώ ο πληθυσμος (λογαριθμική κλίμακα) των ζυμών στο τελικό στάδιο (*S. cerevisiae*) απεικονίζεται με την πράσινη ευθεία.

β.Σαββατιανό

### OAM1

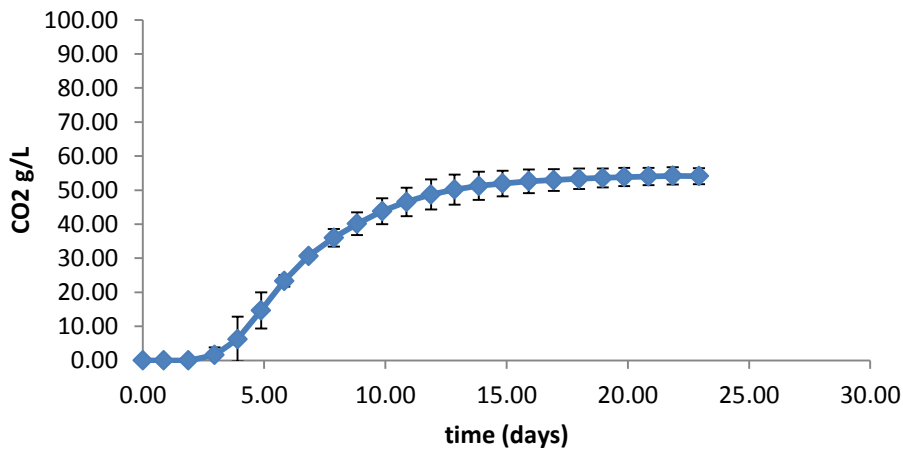


### OAM2



**Διαγράμματα 3.10 και 3.11.** Η πορεία ζύμωσης φαίνεται μεσω της μπλε γραμμής, ενώ οι πληθυσμοί (logcfu/ml) των ολικών ζυμών (*non-Saccharomyces*) στο αρχικό στάδιο απεικονίζονται με τις κόκκινες ευθείες.

## OAM AVERAGE



**Διάγραμμα 3.12.** Καμπύλη ζύμωσης της μέσης τιμής των δύο δειγμάτων (OAM1 και OAM2). Οι κεραίες παριστάνουν την τυπική απόκλιση.

Όλα τα δείγματα από την περιοχή της Σαντορίνης αποζύμωσαν, ενώ από την περιοχή της Αττικής, 2 δείγματα δεν ξεκίνησαν καθόλου την ζύμωση, 2 δεν αποζύμωσαν και μόνο ένα ολοκλήρωσε την ζύμωση.

**Πίνακας 3.1.** Αριθμός αυθόρμητων ζυμώσεων και ποσοστά επιτυχίας συνολικά και ανά περιοχή

Τοποθεσία	Αριθμός δειγμάτων	Ζυμωμένα γλεύκη	Αζύμωτα γλεύκη	Ποσοστό αποζύμωσης
Σαντορίνη	6	6	0	100%
Αττική	5	1	4	20%
<b>Σύνολο</b>	<b>11</b>	<b>7</b>	<b>4</b>	<b>63,6%</b>

### 3.2 Βασικές οινολογικές αναλύσεις

**Πίνακας 3.2.** Φαίνονται τα αποτελέσματα των αναλύσεων του pH, των ολικών σακχάρων και της ολικής οξύτητας από το στάδιο G (μούστος), πριν την έναρξη των αυθόρμητων ζυμώσεων δειγμάτων της Σαντορίνης. Αναγράφονται οι μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις ανά ζεύγος.

<b>G</b>	<b>OSV</b>	<b>OST</b>	<b>OSP</b>
pH	3.015±0.04	3.095±0.08	3.05±0.11
Sugars (g/L)	229.35±2.47	216.7±22.06	213.05±0.78
Total Acidity (g/L)	4.8±0.28	4.45±0.35	5.15±1.06

**Πίνακας 3.3.** Φαίνονται τα αποτελέσματα των αναλύσεων του pH, της ολικής και της πτητικής οξύτητας από τα στάδια EF των αυθόρμητων ζυμώσεων δειγμάτων της Σαντορίνης. Αναγράφονται οι μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις ανά ζεύγος.

<b>EF</b>	<b>OSV1</b>	<b>OSV2</b>	<b>OST1</b>	<b>OST2</b>	<b>OSP1</b>	<b>OSP2</b>
pH	3.01	2.99	3.05	2.98	3.02	2.93
pH AVERAGE	3±0.01		3.02±0.05		2.98±0.06	
Total Acidity (g/L)	8.14	6.9	6.6	7.2	6.11	8.4
Total Acidity (g/L) AVERAGE	7.52±0.88		6.9±0.42		7.26±1.62	
Volatile Acidity (g/L)	0.22	0.72	0.80	0.71	0.41	0.66
Volatile Acidity (g/L) AVERAGE	0.47±0.36		0.75±0.67		0.53±0.18	

**Πίνακας 3.4.** Φαίνονται τα αποτελέσματα των αναλύσεων του pH, των ολικών σακχάρων και της ολικής οξύτητας από τα στάδια BF των αυθόρμητων ζυμώσεων δειγμάτων της Αττικής. Αναγράφονται οι μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις ανά ζεύγος.

<b>G</b>	<b>OAK1</b>	<b>OAK2</b>	<b>OAK</b>	<b>OAM1</b>	<b>OAM2</b>
pH	3.17	3.25	2.95	3.58	3.63
pH AVERAGE	3.21±0.06			3.61±0.03	
Sugars (g/L)	198.8	210.3	201.1	177.2	191.9
Sugars (g/L) AVERAGE	204.55±8.13			184.55±7.35	
Total Acidity (g/L)	5.4	4.7	5.9	3.7	3.6
Total Acidity (g/L) AVERAGE	5.05±0.49			3.65±0.05	

Το δείγμα OAK στο τέλος της ζύμωσης (EF) είχε pH 2.95, ολική οξύτητα 9.75 g/L και πτητική οξύτητα 0.21 g/L

Ανάλυση γλευκών και οίνων μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης

**Πίνακας 3.5.** Συγκεντρώσεις (g/L) των χημικών ενώσεων (πρώτη στήλη), για κάθε διαφορετικό δείγμα μούστου (G), με βάση την μέθοδο HPLC.

<b>G</b>	<b>OSP1G</b>	<b>OSP2G</b>	<b>OST1G</b>	<b>OST2G</b>	<b>OSV1G</b>	<b>OSV2G</b>	<b>OAKG</b>	<b>OAM1G</b>	<b>OAM2G</b>
Citric (g/L)	0.07	0	0.08	0.10	0	0.16	0	0.11	0.09
Tartaric (g/L)	5.20	6.28	4.70	5.19	5.70	5.38	6.63	3.76	3.59
Glucose (g/L)	111.07	113.13	121.03	104.96	120.00	121.63	107.04	90.48	97.07
Malic (g/L)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fructose (g/L)	100.96	102.32	110.04	96.02	108.95	110.04	98.69	88.58	94.57
Succinic (g/L)	0	0.50	0	0	0	0	0	0	0
Lactic (g/L)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glycerol (g/L)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acetic (g/L)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ethanol (g/L)	0	0	0	0	0	0	0	0	0



**Πίνακας 3.6.** Συγκεντρώσεις (g/L) των χημικών ενώσεων (πρώτη στήλη), για κάθε διαφορετικό δείγμα στο τέλος της ζύμωσης (EF), με βάση την μέθοδο HPLC. Οι ζυμώσεις OAM1 και OAM2 δεν ολοκληρώθηκαν (MF).

EF	OSP1EF	OSP2EF	OST1EF	OST2EF	OSV1EF	OSV2EF	OAKEF	OAM1MF	OAM2MF
Citric (g/L)	0.28	0.30	0.51	0.50	0.60	0.42	0.61	0.24	0.47
Tartaric (g/L)	3.25	4.09	2.61	3.06	4.19	3.11	5.24	1.57	1.74
Glucose (g/L)	0.47	0.74	0.44	0.36	0.73	0.61	0.97	32.66	45.60
Malic (g/L)	1.16	1.27	1.38	1.31	1.93	1.20	2.19	0.05	0.05
Fructose (g/L)	1.00	2.82	1.99	1.57	6.84	1.79	1.02	33.84	28.74
Succinic (g/L)	0.71	1.34	1.23	1.38	1.49	1.08	1.34	0.43	0.80
Lactic (g/L)	0.15	0.18	0.27	0.27	0.34	0.23	0.43	0.00	0.00
Glycerol (g/L)	7.95	9.34	9.56	8.61	7.04	9.52	6.73	5.69	6.31
Acetic (g/L)	0.54	0.76	0.99	0.88	0.33	0.91	0.37	0.46	0.55
Ethanol (g/L)	107.71	107.08	116.15	101.07	112.28	116.84	102.49	56.90	58.75

### 3.3 Μοριακή ταυτοποίηση των απομονωμένων ζυμών

Συνολικά έγιναν 463 απομονώσεις στελεχών ζυμών, από τις περιοχές της Σαντορίνης και της Αττικής όπως περιγράφηκε παραπάνω. Οι απομονώσεις έγιναν κατά τα στάδια G, BF, και EF. Από τις προαναφερθείσες απομονώσεις, τα στελέχη προερχόμενα από το στάδιο **G** και **BF** ταυτοποιήθηκαν με την μέθοδο πολυμορφισμού μήκους θραυσμάτων (RFLP). Στην παρούσα εργασία τα μεγέθη των προϊόντων PCR ομαδοποιήθηκαν σε 8 ομάδες με μήκη 340, 390, 500, 600, 620, 750, 800, 820 και 850 bp. Με την χρήση των περιοριστικών ενδονουκλεασών HinfI, HaeIII, HhaI και DdeI ή DraI προέκυψαν 6 διαφορετικά πρότυπα περιορισμού τα οποία αντιστοιχούν στα είδη *Candida gabralta*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *H. opuntiae*, *H. uvarum*, *Saccharomyces cerevisiae*, και *Torulaspora delbrueckii* (Esteve-Zarzoso et al. 1999, Nisiotou and Nychas 2007).

**Πίνακας 3.7.** Μεγέθη της 5,8S ITS περιοχής και των θραυσμάτων περιορισμού των απομονωμένων ζυμών.

Είδος	Προϊόν PCR (bp)	Θραύσματα περιορισμού μετά την δράση των ενζύμων (bp)				
		HhaI	HaeIII	HinfI	DdeI	DraI
<i>H. uvarum</i>	750	320+310+15	750	340+190+170+60	290+180+90+85+75+50	
<i>H. guilliermondii</i>	750	320+310+15	750	340+190+170+60	360+180+85+70+50	420+150+130+30
<i>H. opuntiae</i>	750	320+310+15	750	340+190+170+60	360+180+85+70+50	420+280
<i>S. cerevisiae</i>	820	360+340+130	320+210+180+130	360+120		
<i>C. gabralta</i>	850	400+180+160	670+230	360+270		
<i>T. delbrueckii</i>	800	320+210+140+100	800	410+380		

### 3.4 Ανάλυση της ζυμογλωρίδας

Και στις δύο γεωγραφικές περιοχές (Σαντορίνη και Αττική) όπως φαίνεται στον πίνακα 2 τα κυρίαρχα είδη που απομονώθηκαν από τα στάδια **BF** ανήκουν στο γένος *Hanseniaspora*, το πιο συνηθισμένο γένος που επικρατεί κατά την αρχή της ζύμωσης.

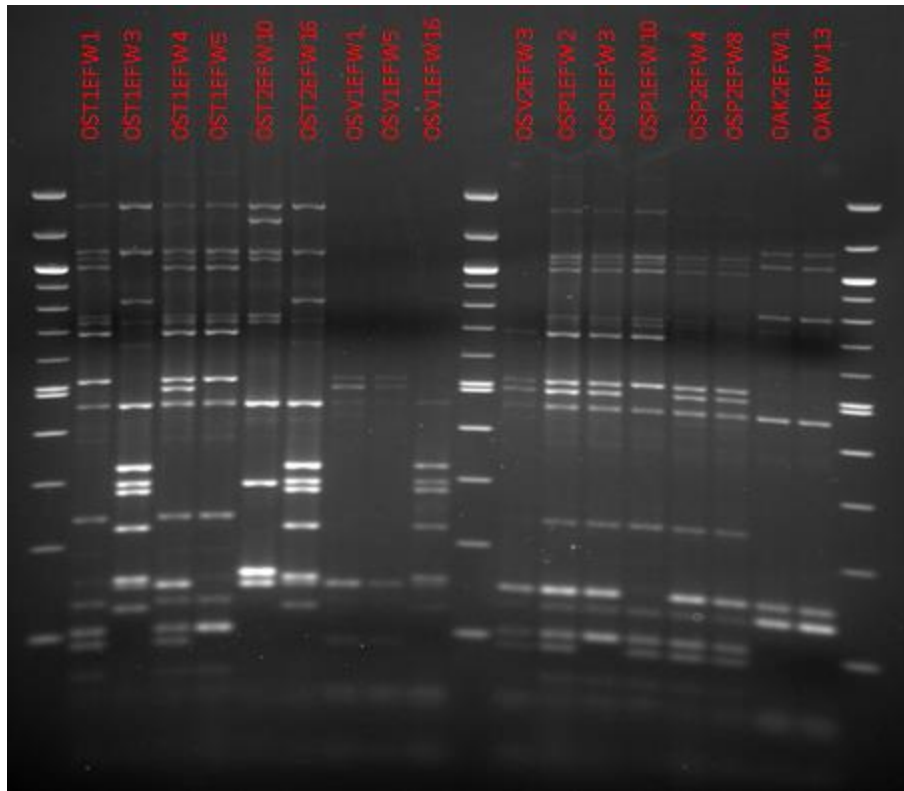
**Πίνακας 3.8.** Αριθμός και ποσοστό των απομονωμένων στελεχών από το στάδιο BF των αυθόρμητων ζυμώσεων, των τεσσάρων διαφορετικών περιοχών.

Είδος	Σαντορίνη (Ασύρτικο)			Αττική (Σαββατιανό)
	Θηρασία	Βουρβούλος	Πλατιά	
<i>C. gabralta</i>	24.20%	-	-	-
<i>H.guilliermondii</i>	-	25.00%	<b>49.00%</b>	3.30%
<i>H. oruntiae</i>	-	-	-	<b>50%</b>
<i>H. uvarum</i>	<b>75.80%</b>	8.30%	36.70%	46.70%
<i>S. cerevisiae</i>	-	<b>65%</b>	14.30%	-
<i>T. delbrueckii</i>	-	1.70%	-	-
<b>Αριθμός ειδών</b>	2	4	3	3

Όπως φαίνεται στον παραπάνω πίνακα, στην περιοχή της Αττικής επικρατέστερο είδος είναι το *Hanseniaspora oruntiae*, ενώ στην περιοχή της Σαντορίνης το είδος που συναντήθηκε και στις 3 διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές είναι το *Hanseniaspora uvarum*. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως στην περιοχή του Βουρβούλου επικρατέστερο είδος με ποσοστό της τάξης του 65% ήταν το *Saccharomyces cerevisiae*.

### 3.5 Ενίσχυση των interdelta αλληλουχίων του *Saccharomyces cerevisiae*

Συνολικά ενισχύθηκαν interdelta αλληλουχίες 84 στελεχών εκ των οποίων τα 8 προέρχονται από την Αττική και τα υπόλοιπα από τους αμπελώνες της Σαντορίνης όπως έχει περιγραφεί παραπάνω. Όλα τα στελέχη προέκυψαν από τις αυθόρμητες ζυμώσεις γλεύκους της ποικιλίας Ασύρτικο, καθώς η ζύμωση από μούστο σταφυλιών ποικιλίας Σαββατιανό δεν ολοκληρώθηκε, φτάνοντας μέχρι την μέση της ζύμωσης, όπως φάνηκε και στα διαγράμματα 13 και 14. Μέσω της ανάλυσης των ενισχυμένων αλληλουχίων αποκαλύφθηκαν 12 διαφορετικά προφίλ (γονότυποι). Από αυτούς τους γονότυπους οι 8 ήταν μοναδικοί και ειδικότερα 2 από αυτούς συναντήθηκαν σε μονάχα σε 2 απομονωμένα στελέχη αντίστοιχα (OST2EFW8 και OSV1EFW16).



**Εικόνα 3.1.** Απεικόνιση των διαφορετικών γονοτύπων που προέκυψαν με βάση τις διαφορετικού αριθμού και μοριακού βάρους μπάντες. Δεξιά παρατηρούνται τα δύο ίδια γοντυπικά προφίλ στελεχών της Αττικής. Τα υπολοίπα προφίλ προέρχονται από στελέχη των τριών περιοχών της Σαντορίνης.

### 3.6 Ανάλυση των πληθυσμών *Saccharomyces cerevisiae*

Το ποσοστό βιοποικιλότητας του *Saccharomyces cerevisiae* που προέκυψε από τις δειγματοληψίες που έχουν περιγραφεί, σύμφωνα με την σχέση του συνολικού αριθμού διαφορετικών προφίλ προς τα ολικά στελέχη, ήταν της τάξης του **14,29%**. Ο αριθμός των διαφορετικών στελεχών και η συχνότητα εμφάνισης τους φαίνεται στον πίνακα 3.

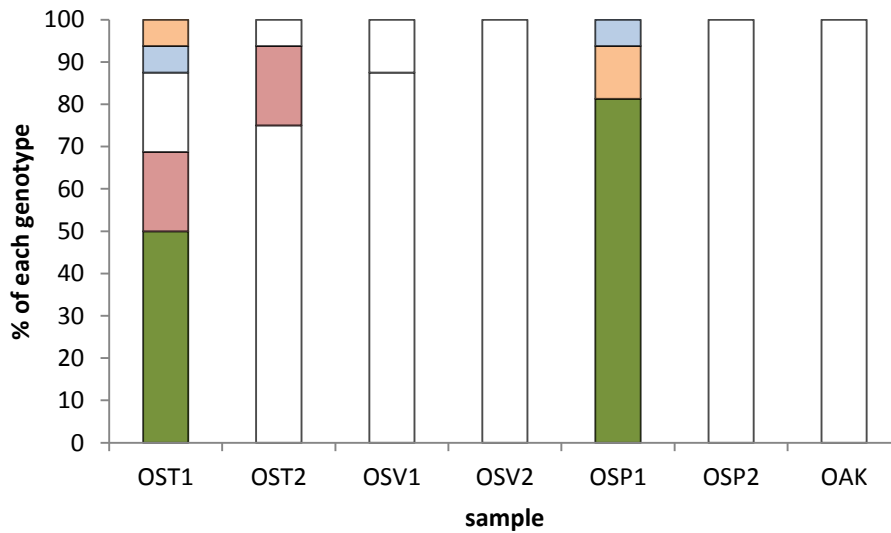
**Πίνακας 3.9.** Προφίλ του *S. cerevisiae* βάσει της ενίσχυσης interdelta αλληλουχιών και ποσοστό (%) εμφάνισης τους.

Προφίλ	%
I	14.29
II	7.14
III	25.00
IV	3.57
V	2.38
VI	3.57
VII	9.52
VIII	1.19
IX	4.76
X	19.05
XI	1.19
XII	9.52

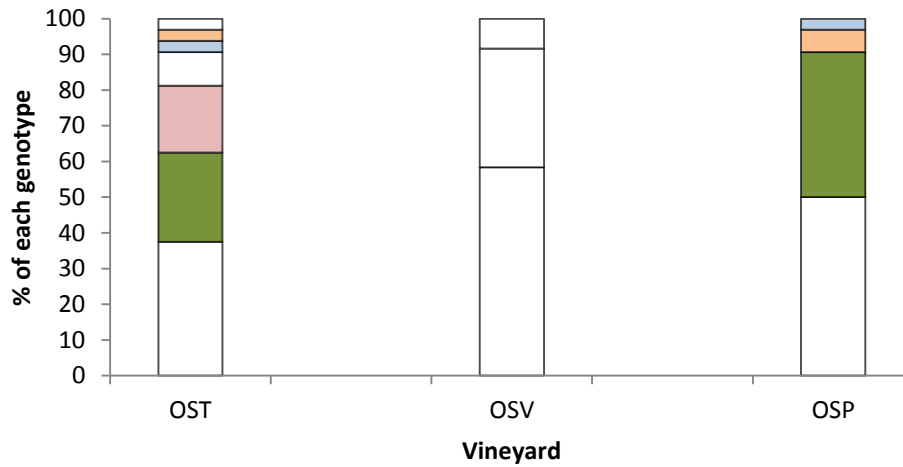
Τα 4 προφίλ που εντοπίστηκαν σε παραπάνω του ενός δείγματος είναι τα II,III,IV και V. Υψηλότερο ποσοστό εμφάνισης παρουσίασε το προφίλ III (25%) και αμέσως μετά το προφίλ X (19.05%). Τα προφίλ VIII και XI με το χαμηλότερο ποσοστό, 1.19% έκαστως, αντιστοιχούν στα στελέχη OST2EFW8 και OSV1EFW16, που αναφέρθηκαν παραπάνω. Το προφίλ XII αντιστοιχεί σε στελέχη που απομονώθηκαν από την περιοχή της Αττικής και είναι το μοναδικό που συναντήθηκε από αυτήν την περιοχή.

Στα δύο παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζεται η κατανομή της βιοποικιλότητας του *S. cerevisiae* ανά δείγμα (διάγραμμα 3.17) και άνα περιοχή (διάγραμμα 3.18). Τα πρότυπα που απαντώνται μόνο σε ένα δείγμα αναπαριστώνται με λευκό χρώμα, ενώ τα τέσσερα διαφορετικά χρώματα που φαίνονται στα διαγράμματα υποδηλώνουν το ποσοστό εμφάνισης των ίδιων γονοτύπων που απαντώνται σε δύο διαφορετικά δείγματα.

Παρατηρώντας τα ραβδογράμματα διαπιστώνεται πως ένας ίδιος γονότυπος βρέθηκε σε δύο διαφορετικά δείγματα, αλλά στον ίδιο αμπελώνα (μωβ χρώμα). Τα υπόλοιπα τρία κοινά προφίλ που εντοπίστηκαν σε διαφορετικά δείγματα, προέρχονται αντίστοιχα και από διαφορετικούς αμπελώνες. Επιπλέον τα τρία προφίλ του αμπελώνα της περιοχής Βουρβούλος είναι μοναδικά και δεν εντοπίστηκαν στις άλλες περιοχές. Το ίδιο ισχύει και για το μοναδικό προφίλ που εντοπίστηκε στον αμπελώνα από την περιοχή των Σπάτων Αττικής.



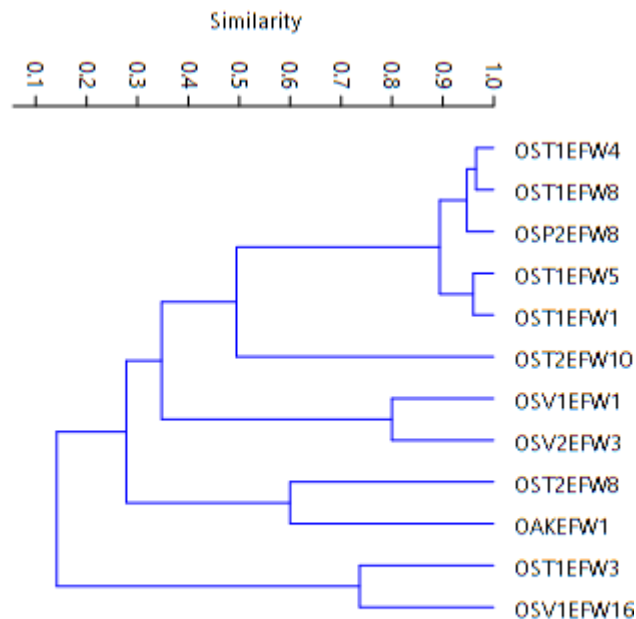
**Διάγραμμα 3.12.** Κατανομή των γονοτυπικών προφίλ του *S. cerevisiae* ανά δείγμα.



**Διάγραμμα 3.13.** Κατανομή των γονοτυπικών προφίλ του *S. cerevisiae* ανά τους τρεις αμπελώνες της περιοχής της Σαντορίνης.

Όπως φαίνεται στο διάγραμμα 3.17 το κοινό προφίλ με το πράσινο χρώμα συναντάται στα δείγματα OST1 και OSP1 και είναι αυτό που έχει το μεγαλύτερο ποσοστό εμφάνισης στα δύο δείγματα. Στα ίδια δείγματα συναντώνται, σε μικρότερα ποσοστά, και οι δύο άλλοι κοινοί γονότυποι (γαλάζιο και πορτοκαλί χρώμα).

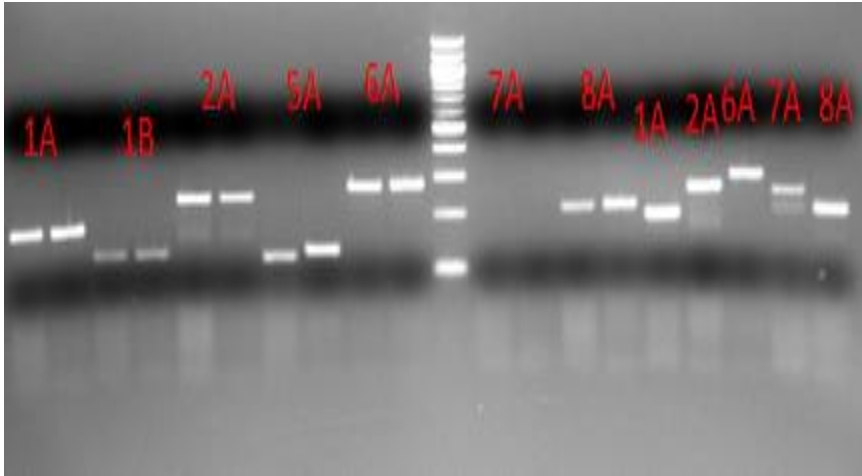
Για κάθε διαφορετικό γονότυπο δημιουργήθηκε ένας πίνακας με τιμές 0 και 1 δηλώνοντας έτσι την απουσία ή την παρουσία κάθε πολυμορφικής μπάντας ξεχωριστά. Στην συνέχεια χρησιμοποιήθηκε το λειτουργικό PAST για να βρεθεί η γενετική απόσταση των προτύπων με την δημιουργία δενδρογράμματος (εικόνα 1). Τα δενδρογράμματα κατασκευάστηκαν με την ιεραρχική μέθοδο ομαδοποίησης UPGMA, με βάση τον συντελεστή Dice.



**Εικόνα 3.2.** Δενδρόγραμμα με βάση την μέθοδο UPGMA και τον συντελεστή Dice για τα 12 διαφορετικά προφίλ. Ο οριζόντιος άξονας παριστάνει το ποσοστό ομοιότητας (Dice) βάσει των υπολογιζόμενων γενετικών αποστάσεων.

### 3.7 Ενίσχυση μικροδορυφορικών αλληλουχιών του γενωμικού DNA του είδους *Torulaspota delbrueckii*

Παρακάτω απεικονίζεται το προϊόν ενίσχυσης διαφόρων στελεχών (δεν αναφέρεται ποια στελέχη) καθώς και το ακριβές μήκος του ενισχυμένου προϊόντος του στελέχους E11SL8 .



**Εικόνα 3.3.** Απεικονίζεται το προϊόν ενίσχυσης για τα 7 ζεύγη εκκινητών. Από αριστερά προς δεξιά ανά δύο ίδια στελέχη για κάθε ζεύγος. Τα 5 τελευταία αποτελούν προϊόντα διαφορετικών στελεχών ενίσχυσης.

**Πίνακας 3.10.** Ακριβές μήκος (bp) των προϊόντων ενίσχυσης του στελέχους E11SL8 που περιγράφηκαν παραπάνω.

Εκκινητές	Μήκος (bp)	Φθορίζουσα	Multiplex
1A	185	HEX	M1
1B	139	HEX	M2
2A	261	FAM	M1
5A	131	FAM	M1
6A	278	FAM	M2
7A	252	HEX	M2
8A	211	FAM	M2



# **4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

#### **4.1 Σύσταση ζυμοχλωρίδας των μη-*Saccharomyces* ζυμών στο αρχικό στάδιο της ζύμωσης από αμπελώνες της Σαντορίνης και της Αττικής**

Στο συγκεκριμένο κομμάτι της εργασίας απομονώθηκαν στελέχη ζυμών από τέσσερις διαφορετικούς αμπελώνες, των περιοχών της Σαντορίνης και της Αττικής, όπως έχουν περιγραφεί. Οι ποικιλίες που εξετάστηκαν ήταν το Ασύρτικο για την Σαντορίνη, ενώ για την Αττική πέραν από το Ασύρτικο εξετάστηκε και η ποικιλία Σαββατιανό.

Συνολικά, ταυτοποιήθηκαν 5 διαφορετικά είδη μη-*Saccharomyces*, αριθμός όχι ιδιαίτερα μεγάλος. Τα είδη και οι πληθυσμοί που απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν, κατά τις πρώτες μέρες της αυθόρμητης ζύμωσης, επιβεβαιώνουν παλαιότερες έρευνες. (Nisiotou and Nychas 2007).

Στην Σαντορίνη επικρατέστερο είδος ήταν το *H. uvarum*. Αυτά τα αποτελέσματα έρχονται να επιβεβαιώσουν την "παγκόσμια κυριαρχία" του είδους σε ώριμα σταφύλια και στα αρχικά στάδια της ζύμωσης (Sabate et al. 2012, Clavijo et al. 2010, Chavan et al. 2009, Drumonde-Neves 2017, Nisiotou and Nychas 2007), ιδίως σε περιοχές με θερμά κλίματα. Στην Αττική το *H. oruntiae* βρέθηκε σε ποσοστό 50%, ενώ ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός πως στην Σαντορίνη δεν συναντήθηκε καθόλου το συγκεκριμένο είδος για την συγκεκριμένη χρονιά. Το *H. oruntiae* βρέθηκε σε ποσοστό 93,75% στο δείγμα OAM1, ενώ στο δείγμα OAM2 (ίδιος αμπελώνας Αττικής) το *H. uvarum* ήταν σε ποσοστό 100%. Αυτά τα δεδομένα έρχονται να ενισχύσουν τις υποθέσεις περί ανταγωνισμού των δύο ειδών (Drumonde-Neves et al. 2017, Settani et al. 2012) (ζυμώσεις από σταφυλιά ποικιλίας Σαββατιανό του ίδιου αμπελώνα), καθώς φάνηκε η επικράτηση του ενός από τα δύο είδη σε κάθε περίπτωση, χωρίς να βρεθεί το άλλο εντός τους ίδιου δείγματος. Αυτές οι ενδείξεις, επομένως, μπορούν να αποτελέσουν το έναυσμα για μελλοντικές έρευνες πάνω στην αλληλεπίδραση των δύο ειδών τόσο φαινοτυπικά, αλλά και σε μοριακό επίπεδο (μεταγραφωμική και πρωτεομική ανάλυση).

#### **4.2 Σύνδεση μεταξύ της πορείας αυθόρμητων ζυμώσεων και της μικροχλωρίδας**

Παρατηρώντας τις κινητικές των έξι ζυμώσεων, από τους τρεις διαφορετικούς αμπελώνες της Σαντορίνης, βλέπουμε πως δεν υπάρχει κάποιο σταθερό μοτίβο που να επικρατεί σε παραπάνω των δύο ζυμώσεων. Ταυτοχρόνως, οι πληθυσμοί των ζυμών στην αρχή (περίπου  $10^7$ ) και στο τέλος ( $10^7$ - $10^8$  για *S. cerevisiae* και  $10^2$ - $10^3$  για μη-*Saccharomyces*) της ζύμωσης ακολουθούν τα δεδομένα που υπάρχουν στην βιβλιογραφία (Fleet 2003, Nisiotou et al. 2007).

Από την περιοχή της Θηρασίας η ζύμωση του δείγματος OST1 διήρκησε 30 μέρες, ενώ η ζύμωση του OST2 διήρκησε 35 μέρες. Και στα δύο δείγματα ο ρυθμός ζύμωσης είναι

σχετικά υψηλός μέχρι τις πρώτες 5 μέρες περίπου, λόγω της αρχικής κατανάλωσης σακχάρων από τις άγριες ζύμες (Fleet 2003), ενώ στην συνέχεια ο ρυθμός αυτός πέφτει ελάχιστα και σταθεροποιείται, λόγω της επικράτησης του *S. cerevisiae*. Οι ζυμώσεις των δειγμάτων από την περιοχή του Βουρβούλου ολοκληρώθηκαν σε 29 (OSV1) και 25 (OSV2). Ο ρυθμός των ζυμώσεων ήταν μεγαλύτερος σε σχέση με αυτόν από τα δείγματα της Θηρασίας. Τέλος τα δείγματα από την περιοχή της Πλατιάς παρουσίασαν "ιδιαίτερα" αποτελέσματα, καθώς ώντας, τα σταφύλια, από τον ίδιο αμπελώνα, η ζύμωση του OSP1 ήταν η πιο γρήγορη (23 μέρες), ενώ η ζύμωση του OSP2 ολοκληρώθηκε μετά από 50 μέρες.

Συγκρίνοντας τις δύο ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν από τον ίδιο αμπελώνα, και συνυπολογίζοντας και τους ταυτοποιημένους μικροοργανισμούς κάθε δείγματος, μπορούμε να συμπεράνουμε πως τα δείγματα OST1 και OST2 έχουν παρόμοια πορεία, με τον *S. cerevisiae* να επικρατεί στο τέλος (EF), ενώ στο αρχικό στάδιο (BF) επικρατέστερο είδος ήταν το *H. uvarum*. Πρέπει να σημειωθεί πως αυτά τα δύο δείγματα ήταν τα μοναδικά, ολόκληρης της παρούσας εργασίας, από τα οποία καταφέραν να ανιχνευθούν και να ταυτοποιηθούν μικροοργανισμοί (*H. oruntiae*, *Candida gabralta*) στο στάδιο των ώριμων συνθλιμμένων σταφυλιών (G). Όσον αφορά τα δείγματα από τους αμπελώνες της περιοχής του Βουρβούλου (OSV1 και OSV2), παρατηρούμε πως και αυτά έχουν παρόμοια και ταχεία πορεία ζύμωσης. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως στο στάδιο BF του OSV1 τα επικρατούντα στελέχη άνηκαν στο είδος *S. cerevisiae*, κάτι το οποίο μπορεί να εξηγήει την απόλυτα ομαλή (συγκριτικά με τις υπόλοιπες) πορεία ζύμωσης. Αντίστοιχα, επικρατές είδος του δείγματος OSV2 (BF) ήταν το *H. guilliermondii*. Και στα δύο δείγματα, στο τελικό στάδιο (EF), πέραν του *S. cerevisiae* απομονώθηκαν και είδη μη-*Saccharomyces*, τα *T. delbrueckii* και *H. guilliermondii* (OSV1 και OSV2 αντίστοιχα). Τέλος στα δείγματα OSP1 και OSP2, επικρατέστερα είδη του σταδίου BF ήταν τα *H. guilliermondii* και *H. uvarum* αντίστοιχα. Ενώ το *H. guilliermondii* ταυτοποιήθηκε και στο τελικό στάδιο της ζύμωσης του δείγματος OSP1. Αντίθετα στο στάδιο EF του δείγματος OSP2, δεν απομονώθηκε κάποια άγρια ζύμη, και ο πολύ μικρός ρυθμός ζύμωσης πιθανώς οφείλεται στο μοναδικού γονοτυπικού προφίλ, απομονωμένο στέλεχος *S. cerevisiae*.

Τα αποτελέσματα από την ανάλυση με HPLC επικυρώνουν τα αποτελέσματα των μετρήσεων της πτητικής οξύτητας (οφείλεται κυρίως στο οξικό). Επομένως οι διαφορετικές τιμές (0,72 και 0,41) των δειγμάτων OSV2 και OSP1 αντίστοιχα πιθανώς να συσχετίζονται με τα στελέχη *H. guilliermondii* που απομονώθηκαν στο τέλος της ζύμωσης (Sgouros et al. 2018). Αυτή η εικασία αφήνει περιθώρια για περαιτέρω μελέτη πάνω στα βιοδυναμικά χαρακτηριστικά των διαφορετικών στελεχών.

### **4.3 Βιοποικιλότητα των στελεχών *Saccharomyces cerevisiae***

Με βάση την ανάλυση των interdelta αλληλουχιών προέκυψαν 12 διαφορετικά μοριακά πρότυπα, τα οποία συνδυασμένα με το ποσοστό εμφάνισης τους στις συνολικές απομονώσεις έδωσαν ένα ευρύ φάσμα βιοποικιλότητας. Συγκεκριμένα το ποσοστό βιοποικιλότητας για τις δύο περιοχές (Σαντορίνη και Αττική) ήταν 14,29%. Κοντινό ποσοστό με αυτό έχει αναφερθεί σε αμπελώνες της περιοχής Vinhos verdes της Πορτογαλίας (18%), όμως με μοριακή μέθοδο ανάλυσης την mt-DNA RFLP (Schuller et al. 2005). Τέτοιες έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί σε πολλές περιοχές με παράδοση στην αμπελουργία (Μπορντό, Καμπανία, Ταρραγόνα, Τοσκάνη, Σικελία, Παταγονία).

Επομένως δεν είναι δυνατόν να γίνει σύγκριση ερευνών βιοποικιλότητας του είδους, που έχουν βασιστεί σε διαφορετικές μοριακές τεχνικές ταυτοποίησης. Επίσης ο τρόπος και η πορεία διαδικασίας των αυθόρμητων ζυμώσεων πρέπει να είναι ομόλογος από μελέτη σε μελέτη για να μπορέσει να πραγματοποιηθεί σύγκριση. (Sabate et al., 1998; Torija et al., 2001; Csoma et al., 2010).

Στην παρούσα ανάλυση δεν βρέθηκε κάποιο πρότυπο που να επικρατεί αισθητά σε σχέση με τα υπόλοιπα, καθώς το υψηλότερο ποσοστό (25%) άνηκε στο προφίλ III, ενώ τα προφίλ X και I ευρέθησαν σε ποσοστά 19,05% και 14,29% αντίστοιχα. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως τα υπόλοιπα προφίλ ήταν σε ποσοστά μικρότερα του 10%.

Αναλύοντας ξεχωριστά τους αμπελώνες, παρατηρήθηκε πως στην περιοχή της Θηρασίας προέκυψαν 7 διαφορετικά προφίλ, ενώ το δείγμα OST1 ήταν αυτό με την μεγαλύτερη βιοποικιλότητα, καθώς ταυτοποιήθηκαν 5 διαφορετικά στελέχη *S. cerevisiae* που ολοκλήρωσαν την ζύμωση. Στα υπόλοιπα δείγματα συναντήθηκαν από ένα έως τρία διαφορετικά στελέχη.

### **4.4 Ανάλυση των αποτελεσμάτων της ενίσχυσης των μικροδορυφορικών αλληλουχιών του *Torulaspora delbrueckii***

Στο δεύτερο κομμάτι της εργασίας έγινε ανάδειξη και αριστοποίηση της μεθόδου PCR και ανάλυσης του μήκους των ενισχυμένων προϊόντων με βάση την μέθοδο που περιγράφηκε στην ενότητα υλικά-μέθοδοι. Αυτή η μέθοδος, επομένως, αποτελεί το θεμέλιο για την μετέπειτα πλυθησµιακή γενετική ανάλυση των αποµένων στελεχών του είδους *Torulaspora delbrueckii* από διαφορετικούς αμπελώνες και χρονολογίες, με σκοπό την αποκρυπτογράφηση των ενδοειδικών εξελικτικών και φυλογενετικών τους σχέσεων.

## **5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- A. A., E.-B., el-sahn, M., & Shehata, M. (2011). *Yeasts Producing Killer Toxins: An Overview*. *Alex. J. Fd. Sci. & Technol.* (Vol. 8).
- Aguilera, F., Peinado, R. A., Millán, C., Ortega, J. M., & Mauricio, J. C. (2006). Relationship between ethanol tolerance, H<sup>+</sup>-ATPase activity and the lipid composition of the plasma membrane in different wine yeast strains. *International Journal of Food Microbiology*, *110*(1), 34–42. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2006.02.002>
- Almeida, M. J., & Pais, C. (1996). Leavening ability and freeze tolerance of yeasts isolated from traditional corn and rye bread doughs. *Applied and Environmental Microbiology*, *62*(12), 4401–4404. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8953712>
- Alves-Araujo, C., Almeida, M. J., Sousa, M. J., & Leao, C. (2004). Freeze tolerance of the yeast *Torulaspora delbrueckii*: cellular and biochemical basis. *FEMS Microbiology Letters*, *240*(1), 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.09.008>
- Andorrà, I., Berradre, M., Mas, A., Esteve-Zarzoso, B., & Guillamón, J. M. (2012). Effect of mixed culture fermentations on yeast populations and aroma profile. *LWT - Food Science and Technology*, *49*(1), 8–13. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2012.04.008>
- Arthofer, W., Steiner, F. M., & Schlick-Steiner, B. C. (2011). Rapid and cost-effective screening of newly identified microsatellite loci by high-resolution melting analysis. *Molecular Genetics and Genomics*, *286*(3), 225. <https://doi.org/10.1007/s00438-011-0641-0>
- Banilas, G., Sgouros, G., & Nisiotou, A. (2016). Development of microsatellite markers for *Lachancea thermotolerans* typing and population structure of wine-associated isolates. *Microbiological Research*, *193*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2016.08.010>
- Barata, A., Gonzalez, S., Malfeito-Ferreira, M., Querol, A., & Loureiro, V. (2008). Sour rot-damaged grapes are sources of wine spoilage yeasts. *FEMS Yeast Research*, *8*(7), 1008–1017. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00399.x>
- Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., & Loureiro, V. (2012). The microbial ecology of wine grape berries. *International Journal of Food Microbiology*, *153*(3), 243–259. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2011.11.025>
- Barata, A., Seborro, F., Belloch, C., Malfeito-Ferreira, M., & Loureiro, V. (2008). Ascomycetous yeast species recovered from grapes damaged by honeydew and sour rot. *Journal of Applied Microbiology*, *104*(4), 1182–1191. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03631.x>
- Barnett, J. A., Delaney, M. A., Jones, E., Magson, A. B., & Winch, B. (1972). The numbers of yeasts associated with wine grapes of Bordeaux. *Archiv Für Mikrobiologie*, *83*(1), 52–55. <https://doi.org/10.1007/BF00425044>
- Belda, I., Zarraonaindia, I., Perisin, M., Palacios, A., & Acedo, A. (2017). From Vineyard Soil to Wine Fermentation: Microbiome Approximations to Explain the “terroir” Concept . *Frontiers in Microbiology* . Retrieved from <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.00821>
- Bely, M., Stoeckle, P., Masneuf-Pomarède, I., & Dubourdieu, D. (2008). Impact of mixed

- Torulaspora delbrueckii–Saccharomyces cerevisiae culture on high-sugar fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 122(3), 312–320.  
<https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2007.12.023>
- Bisson, L. F. (1999). Stuck and Sluggish Fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50(1), 107 LP-119. Retrieved from  
<http://www.ajevonline.org/content/50/1/107.abstract>
- Bokulich, N. A., Collins, T. S., Masarweh, C., Allen, G., Heymann, H., Ebeler, S. E., & Mills, D. A. (2016). Associations among Wine Grape Microbiome, Metabolome, and Fermentation Behavior Suggest Microbial Contribution to Regional Wine Characteristics. *MBio*, 7(3), e00631-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.00631-16>
- Bokulich, N. A., & Mills, D. A. (2012). Differentiation of mixed lactic acid bacteria communities in beverage fermentations using targeted terminal restriction fragment length polymorphism. *Food Microbiology*, 31(1), 126–132.  
<https://doi.org/10.1016/J.FM.2012.02.007>
- Bokulich, N. A., Thorngate, J. H., Richardson, P. M., & Mills, D. A. (2014). Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(1), E139–E148. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1317377110>
- Bowen, N. J., & Jordan, I. K. (2002). Transposable elements and the evolution of eukaryotic complexity. *Current Issues in Molecular Biology*, 4(3), 65–76.
- Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). White, T. J., T. D. Bruns, S. B. Lee, and J. W. Taylor. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics (pp. 315–322).
- Brysch-Herzberg, M., & Seidel, M. (2015). Yeast diversity on grapes in two German wine growing regions. *International Journal of Food Microbiology*, 214, 137–144.  
<https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2015.07.034>
- Buckler 4th, E. S., Ippolito, A., & Holtsford, T. P. (1997). The evolution of ribosomal DNA: divergent paralogues and phylogenetic implications. *Genetics*, 145(3), 821–832. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9055091>
- Burns, K. N., Kluepfel, D. A., Strauss, S. L., Bokulich, N. A., Cantu, D., & Steenwerth, K. L. (2015). Vineyard soil bacterial diversity and composition revealed by 16S rRNA genes: Differentiation by geographic features. *Soil Biology and Biochemistry*, 91, 232–247.  
<https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2015.09.002>
- Cambon, B., Dequin, S., Valero, E., Schuller, D., & Casal, M. (2007). Biodiversity of Saccharomyces yeast strains from grape berries of wine-producing areas using starter commercial yeasts. *FEMS Yeast Research*, 7(2), 317–329. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00161.x>
- Cameron, J. R., Loh, E. Y., & Davis, R. W. (1979). Evidence for transposition of dispersed repetitive DNA families in yeast. *Cell*, 16(4), 739–751.
- Capece, A., Romaniello, R., Siesto, G., & Romano, P. (2012). Diversity of Saccharomyces

- cerevisiae yeasts associated to spontaneously fermenting grapes from an Italian “heroic vine-growing area.” *Food Microbiology*, 31(2), 159–166.  
<https://doi.org/10.1016/J.FM.2012.03.010>
- Capriotti, A. (1957). *Torulasporea nilssonii* nov. spec. *Archiv Für Mikrobiologie*, 28(3), 247–254.  
<https://doi.org/10.1007/BF00411496>
- Chambers, P. J., & Pretorius, I. S. (2010). Fermenting knowledge: the history of winemaking, science and yeast research. *EMBO Reports*, 11(12), 914–920.  
<https://doi.org/10.1038/embor.2010.179>
- Chavan, P., Mane, S., Kulkarni, G., Shaikh, S., Ghormade, V., Nerkar, D. P., ... Deshpande, M. V. (2009). Natural yeast flora of different varieties of grapes used for wine making in India. *Food Microbiology*, 26(8), 801–808. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2009.05.005>
- Chen, K., Escott, C., Loira, I., del Fresno, J. M., Morata, A., Tesfaye, W., ... Benito, S. (2018). Use of non-Saccharomyces yeasts and oenological tannin in red winemaking: Influence on colour, aroma and sensorial properties of young wines. *Food Microbiology*, 69, 51–63.  
<https://doi.org/10.1016/J.FM.2017.07.018>
- Ciani, M., Beco, L., & Comitini, F. (2006). Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 108(2), 239–245. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2005.11.012>
- Ciani, M., & Maccarelli, F. (1997). Oenological properties of non-Saccharomyces yeasts associated with wine-making. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14(2), 199–203. <https://doi.org/10.1023/A:1008825928354>
- Ciani, M., & Picciotti, G. (1995). The growth kinetics and fermentation behaviour of some non-Saccharomyces yeasts associated with wine-making. *Biotechnology Letters*, 17(11), 1247–1250. <https://doi.org/10.1007/BF00128395>
- Clavijo, A., Calderón, I. L., & Paneque, P. (2010). Diversity of Saccharomyces and non-Saccharomyces yeasts in three red grape varieties cultured in the Serranía de Ronda (Spain) vine-growing region. *International Journal of Food Microbiology*, 143(3), 241–245.  
<https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2010.08.010>
- Combina, M., Mercado, L., Borgo, P., Elia, A., Jofré, V., Ganga, A., ... Catania, C. (2005). Yeasts associated to Malbec grape berries from Mendoza, Argentina. *Journal of Applied Microbiology*, 98(5), 1055–1061. <https://doi.org/doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02540.x>
- Comitini, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., & Ciani, M. (2011). Selected non-Saccharomyces wine yeasts in controlled multistarter fermentations with Saccharomyces cerevisiae. *Food Microbiology*, 28(5), 873–882.  
<https://doi.org/10.1016/J.FM.2010.12.001>
- Compant, S., Clément, C., & Sessitsch, A. (2010). *Plant Growth-Promoting Bacteria in the Rhizosphere and Endosphere of Plants: Their Role, Colonization, Mechanisms Involved and Prospects for Utilization*. *Soil Biology and Biochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.11.024>
- Compant, S., Reiter, B., Sessitsch, A., Nowak, J., Clément, C., & Ait Barka, E. (2005). Endophytic



- Colonization of *Vitis vinifera* L. by Plant Growth-Promoting Bacterium *Burkholderia* sp. Strain PsJN. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(4), 1685 LP-1693. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.4.1685-1693.2005>
- Coton, E., Coton, M., Levert, D., Casaregola, S., & Sohier, D. (2006). Yeast ecology in French cider and black olive natural fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 108(1), 130–135. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2005.10.016>
- Drumonde-Neves, J., Franco-Duarte, R., Lima, T., Schuller, D., & Pais, C. (2017). Association between Grape Yeast Communities and the Vineyard Ecosystems. *PloS One*, 12(1), e0169883–e0169883. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169883>
- Eigel, A., & Feldmann, H. (1982). Ty1 and delta elements occur adjacent to several tRNA genes in yeast. *The EMBO Journal*, 1(10), 1245–1250. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6327259>
- Escribano-Viana, R., González-Arenzana, L., Portu, J., Garijo, P., López-Alfaro, I., López, R., ... Gutiérrez, A. R. (2018). Wine aroma evolution throughout alcoholic fermentation sequentially inoculated with non- *Saccharomyces*/*Saccharomyces* yeasts. *Food Research International*, 112, 17–24. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2018.06.018>
- Fleet, G. H. (1993). *Wine Microbiology and Biotechnology*. Taylor & Francis. Retrieved from [https://books.google.gr/books?id=vd\\_OmtncI0QC](https://books.google.gr/books?id=vd_OmtncI0QC)
- Fleet, G. H. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1–2), 11–22.
- Freire, L., Passamani, F. R. F., Thomas, A. B., Nassur, R. de C. M. R., Silva, L. M., Paschoal, F. N., ... Batista, L. R. (2017). Influence of physical and chemical characteristics of wine grapes on the incidence of *Penicillium* and *Aspergillus* fungi in grapes and ochratoxin A in wines. *International Journal of Food Microbiology*, 241, 181–190. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2016.10.027>
- Gadaga, T. ., Mutukumira, A. ., & Narvhus, J. . (2000). Enumeration and identification of yeasts isolated from Zimbabwean traditional fermented milk. *International Dairy Journal*, 10(7), 459–466. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(00\)00070-4](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(00)00070-4)
- Galeote, V., Bigey, F., Devillers, H., Ortiz-Merino, R. A., Dequin, S., Wolfe, K. H., & Neuvéglise, C. (2018). Genome Sequence of *Torulaspora microellipsoides* CLIB 830(T). *Genome Announcements*, 6(26), e00615-18. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00615-18>
- Gilbert, J. A., van der Lelie, D., & Zorraonaindia, I. (2014). Microbial terroir for wine grapes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(1), 5–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1320471110>
- Gomez-Angulo, J., Vega-Alvarado, L., Escalante-Garcia, Z., Grande, R., Gschaedler-Mathis, A., Amaya-Delgado, L., ... Sanchez-Flores, A. (2015). Genome Sequence of *Torulaspora delbrueckii* NRRL Y-50541, Isolated from Mezcal Fermentation. *Genome Announcements*, 3(4). <https://doi.org/10.1128/genomeA.00438-15>
- Gordon, J. L., Armisén, D., Proux-Wéra, E., ÓHéigeartaigh, S. S., Byrne, K. P., & Wolfe, K. H.

- (2011). Evolutionary erosion of yeast sex chromosomes by mating-type switching accidents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(50), 20024–20029. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112808108>
- Grangeteau, C., Roullier-Gall, C., Rousseaux, S., Gougeon, R. D., Schmitt-Kopplin, P., Alexandre, H., & Guilloux-Benatier, M. (2017). Wine microbiology is driven by vineyard and winery anthropogenic factors. *Microbial Biotechnology*, 10(2), 354–370. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12428>
- Guerzoni, E., & Marchetti, R. (1987). Analysis of yeast flora associated with grape sour rot and of the chemical disease markers. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(3), 571–576. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16347305>
- Han, B., Wang, C., Tang, Z., Ren, Y., Li, Y., Zhang, D., ... Zhao, X. (2015). Genome-Wide Analysis of Microsatellite Markers Based on Sequenced Database in Chinese Spring Wheat (*Triticum aestivum* L.). *PLOS ONE*, 10(11), e0141540. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141540>
- Henderson, C. M., Lozada-Contreras, M., Jiranek, V., Longo, M. L., & Block, D. E. (2013). Ethanol production and maximum cell growth are highly correlated with membrane lipid composition during fermentation as determined by lipidomic analysis of 22 *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(1), 91–104. <https://doi.org/10.1128/AEM.02670-12>
- Hernandez-Lopez, M. J., Prieto, J. A., & Randez-Gil, F. (2003). Osmotolerance and leavening ability in sweet and frozen sweet dough. Comparative analysis between *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeast strains. *Antonie van Leeuwenhoek*, 84(2), 125–134.
- Herraiz, T., Reglero, G., Herraiz, M., Martin-Alvarez, P. J., & Cabezudo, M. D. (1990). The Influence of the Yeast and Type of Culture on the Volatile Composition of Wines Fermented Without Sulfur Dioxide. *American Journal of Enology and Viticulture*, 41(4), 313 LP-318. Retrieved from <http://www.ajevonline.org/content/41/4/313.abstract>
- Hillis, D., & Dixon, M. (1992). *Hillis DM, Dixon MT.. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. Q Rev Biol 66: 411-453. The Quarterly review of biology* (Vol. 66). <https://doi.org/10.1086/417338>
- Isolation and Identification of Endogenous Yeast Strains in Grapes and Must Solids of *Mavrodafni kefalonias* and Antioxidant Activity of the Produced Red Wine. (2016). *Fermentation Technology*. OMICS International., <https://doi.org/10.4172/2167-7972.1000125>
- Jara, C., Laurie, V. F., Mas, A., & Romero, J. (2016). Microbial Terroir in Chilean Valleys: Diversity of Non-conventional Yeast . *Frontiers in Microbiology* . Retrieved from <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.00663>
- Kántor, A., Kacaniova, M., & Kluz, M. (2015). *Natural microflora of wine grape berries. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* (Vol. 04). <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2015.4.special1.32-36>

- Kiss, L. (2012). Limits of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) sequences as species barcodes for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(27), E1811–E1812. <https://doi.org/10.1073/pnas.1207143109>
- Knight, S., Klaere, S., Fedrizzi, B., & Goddard, M. R. (2015). Regional microbial signatures positively correlate with differential wine phenotypes: evidence for a microbial aspect to terroir. *Scientific Reports*, *5*, 14233. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/srep14233>
- Kotzekidou, P. (1997). Identification of yeasts from black olives in rapid system microtitre plates. *Food Microbiology*, *14*(6), 609–616. <https://doi.org/10.1006/FMIC.1997.0133>
- Kurtzman, C. (1998). *Torulaspota Lindner*. In *The Yeasts, A Taxonomic Study, 4th Edn.* (pp. 404–408). <https://doi.org/10.1016/B978-044481312-1/50055-1>
- Kurtzman, C. P. (2011). Chapter 13 - Discussion of Teleomorphic and Anamorphic Ascomycetous Yeasts and Yeast-like Taxa. In C. P. Kurtzman, J. W. Fell, & T. B. T.-T. Y. (Fifth E. Boekhout (Eds.)) (pp. 293–307). London: Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00013-6>
- Kurtzman, C. P., & Robnett, C. J. (2003). Phylogenetic relationships among yeasts of the “*Saccharomyces complex*” determined from multigene sequence analyses. *FEMS Yeast Research*, *3*(4), 417–432. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(03\)00012-6](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(03)00012-6)
- Kurtzman, C. P., & Suzuki, M. (2010). Phylogenetic analysis of ascomycete yeasts that form coenzyme Q-9 and the proposal of the new genera *Babjeviella*, *Meyerozyma*, *Millerozyma*, *Priceomyces*, and *Scheffersomyces*. *Mycoscience*, *51*(1), 2–14. <https://doi.org/10.1007/S10267-009-0011-5>
- L. Raymond Eder, M., Reynoso, C., C. Lauret, S., & L. Rosa, A. (2017). *Isolation and Identification of the Indigenous Yeast Population during Spontaneous Fermentation of Isabella (Vitis labrusca L.) Grape Must*. *Frontiers in Microbiology* (Vol. 8). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00532>
- Lachance, M. A. (1995). Yeast communities in a natural tequila fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek*, *68*(2), 151–160.
- Lambrechts, M., & Pretorius, I. (2000). *Yeast and its importance to wine aroma-a review*. *South Afr J Enol Vitic* (Vol. 21).
- Legras, J.-L., & Karst, F. (2003). Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation. *FEMS Microbiology Letters*, *221*(2), 249–255. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00205-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00205-2)
- Li, S.-S., Cheng, C., Li, Z., Chen, J.-Y., Yan, B., Han, B.-Z., & Reeves, M. (2010). Yeast species associated with wine grapes in China. *International Journal of Food Microbiology*, *138*(1–2), 85–90. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2010.01.009>
- Limtong, S., & Koowadjanakul, N. (2012). Yeasts from phylloplane and their capability to produce indole-3-acetic acid. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, *28*(12), 3323–3335. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1144-9>

- Litt, M., & Luty, J. A. (1989). A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*, 44(3), 397–401.
- Liu, S., Laaksonen, O., & Yang, B. (2019). Volatile composition of bilberry wines fermented with non-Saccharomyces and Saccharomyces yeasts in pure, sequential and simultaneous inoculations. *Food Microbiology*, 80, 25–39. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2018.12.015>
- Loretan, T., Mostert, J. F., & Viljoen, B. C. (2003). Microbial flora associated with South African household kefir : research letter. *South African Journal of Science*, 99(1–2), 92–94. Retrieved from <https://journals.co.za/content/sajsci/99/1-2/EJC97578>
- Ma, M., & Liu, Z. L. (2010). Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(3), 829–845. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2594-3>
- Martinez, J., Toledano, F., Milla'n, C., & Ortega, J. M. (1990). Development of alcoholic fermentation in non-sterile musts from 'Pedro Ximenez' grapes inoculated with pure cultures of selected yeasts. *Food Microbiology*, 7(3), 217–225. [https://doi.org/10.1016/0740-0020\(90\)90027-F](https://doi.org/10.1016/0740-0020(90)90027-F)
- Martini, A., Ciani, M., & Scorzetti, G. (1996). Direct Enumeration and Isolation of Wine Yeasts from Grape Surfaces. *American Journal of Enology and Viticulture*, 47(4), 435 LP-440. Retrieved from <http://www.ajevonline.org/content/47/4/435.abstract>
- Masneuf-Pomarede, I., Bely, M., Marullo, P., & Albertin, W. (2016). The Genetics of Non-conventional Wine Yeasts: Current Knowledge and Future Challenges . *Frontiers in Microbiology* . Retrieved from <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2015.01563>
- Maulani, S., Hosseini, S., Elikaie, A., & Mirnurollahi, S. (2012). Isolated microorganisms from Iranian grapes and its derivatives. *Iranian Journal of Microbiology*, 4(1), 25–29. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22783457>
- Medina, K., Boido, E., Fariña, L., Gioia, O., Gomez, M. E., Barquet, M., ... Carrau, F. (2013). Increased flavour diversity of Chardonnay wines by spontaneous fermentation and co-fermentation with *Hanseniaspora vineae*. *Food Chemistry*, 141(3), 2513–2521. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2013.04.056>
- Moreira, N., Mendes, F., Guedes de Pinho, P., Hogg, T., & Vasconcelos, I. (2008). Heavy sulphur compounds, higher alcohols and esters production profile of *Hanseniaspora uvarum* and *Hanseniaspora guilliermondii* grown as pure and mixed cultures in grape must. *International Journal of Food Microbiology*, 124(3), 231–238. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2008.03.025>
- Moreira, N., Pina, C., Mendes, F., Couto, J. A., Hogg, T., & Vasconcelos, I. (2011). Volatile compounds contribution of *Hanseniaspora guilliermondii* and *Hanseniaspora uvarum* during red wine vinifications. *Food Control*, 22(5), 662–667. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2010.07.025>
- Mortimer, R., & Polsinelli, M. (1999). On the origins of wine yeast. *Research in Microbiology*,

150(3), 199–204. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(99\)80036-9](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(99)80036-9)

- Ness, F., Lavallée, F., Dubourdieu, D., Aigle, M., & Dulau, L. (1993). Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 62(1), 89–94. <https://doi.org/doi:10.1002/jsfa.2740620113>
- Nguyen, N. H., Suh, S.-O., Erbil, C. K., & Blackwell, M. (2006). *Metschnikowia noctiluminum* sp. nov., *Metschnikowia corniflorae* sp. nov., and *Candida chrysolidarum* sp. nov., isolated from green lacewings and beetles. *Mycological Research*, 110(3), 346–356. <https://doi.org/10.1016/J.MYCRES.2005.11.010>
- Nisiotou, A. A., Spiropoulos, A. E., & Nychas, G.-J. E. (2007). Yeast Community Structures and Dynamics in Healthy and Botrytis-Affected Grape Must Fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(21), 6705 LP-6713. <https://doi.org/10.1128/AEM.01279-07>
- Nisiotou, A., Sgouros, G., Mallouchos, A., Nisiotis, C.-S., Michaelidis, C., Tassou, C., & Banilas, G. (2018). The use of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* and *Starmerella bacillaris* strains as a tool to create chemical complexity in local wines. *Food Research International*, 111, 498–508. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2018.05.035>
- Pacheco, A. (2012). The Emerging Role of the Yeast *Torulaspora delbrueckii* in Bread and Wine Production: Using Genetic Manipulation to Study Molecular Basis of Physiological Responses. In J. Santos (Ed.) (p. Ch. 13). Rijeka: IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/46024>
- Papalexandratou, Z., Falony, G., Romanens, E., Jimenez, J. C., Amores, F., Daniel, H.-M., & De Vuyst, L. (2011). Species Diversity, Community Dynamics, and Metabolite Kinetics of the Microbiota Associated with Traditional Ecuadorian Spontaneous Cocoa Bean Fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(21), 7698 LP-7714. <https://doi.org/10.1128/AEM.05523-11>
- Pincus, D. H., Orenge, S., & Chatellier, S. (2007). Yeast identification — past, present, and future methods. *Medical Mycology*, 45(2), 97–121. <https://doi.org/10.1080/13693780601059936>
- Pinto, C., Pinho, D., Cardoso, R., Custódio, V., Fernandes, J., Sousa, S., ... Gomes, A. C. (2015). Wine fermentation microbiome: a landscape from different Portuguese wine appellations. *Frontiers in Microbiology*. Retrieved from <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2015.00905>
- Portillo, M. del C., & Mas, A. (2016). Analysis of microbial diversity and dynamics during wine fermentation of Grenache grape variety by high-throughput barcoding sequencing. *LWT - Food Science and Technology*, 72, 317–321. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2016.05.009>
- Prakitchaiwattana, C. J., Heard, G. M., & Fleet, G. H. (2004). Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. *FEMS Yeast Research*, 4(8), 865–877. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.05.004>
- Pramateftaki, P. V., Lanaridis, P., & Typas, M. A. (2000). Molecular identification of wine yeasts at species or strain level: a case study with strains from two vine-growing areas of Greece. *Journal of Applied Microbiology*, 89(2), 236–248.

- Pretorius, I., & B. HØJ, P. (2008). *Grape and wine biotechnology: Challenges, opportunities and potential benefits*. *Australian Journal of Grape and Wine Research* (Vol. 11).  
<https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00281.x>
- Proux-Wéra, E., Byrne, K. P., & Wolfe, K. H. (2013). Evolutionary mobility of the ribosomal DNA array in yeasts. *Genome Biology and Evolution*, 5(3), 525–531.  
<https://doi.org/10.1093/gbe/evt022>
- Rampersad, S. N. (2014). ITS1, 5.8S and ITS2 secondary structure modelling for intra-specific differentiation among species of the *Colletotrichum gloeosporioides* sensu lato species complex. *SpringerPlus*, 3, 684. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-684>
- Raspor, P., Milek, D. M., Polanc, J., Smole Možina, S., & Čadež, N. (2006). Yeasts isolated from three varieties of grapes cultivated in different locations of the Dolenjska vine-growing region, Slovenia. *International Journal of Food Microbiology*, 109(1–2), 97–102.  
<https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2006.01.017>
- RENOUF, V., CLAISSE, O., & LONVAUD-FUNEL, A. (2005). Understanding the microbial ecosystem on the grape berry surface through numeration and identification of yeast and bacteria. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(3), 316–327.  
<https://doi.org/doi:10.1111/j.1755-0238.2005.tb00031.x>
- Romano, P., Suzzi, G., Domizio, P., & Fatichenti, F. (1997). Secondary products formation as a tool for discriminating non-Saccharomyces wine strains. *Antonie van Leeuwenhoek*, 71(3), 239–242. <https://doi.org/10.1023/A:1000102006018>
- Ros-Chumillas, M., Egea-Cortines, M., Lopez-Gomez, A., & Weiss, J. (2007). Evaluation of a rapid DNA extraction method to detect yeast cells by PCR in orange juice. *Food Control*, 18(1), 33–39. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2005.08.004>
- Sabate, J., Cano, J., Esteve-Zarzoso, B., & Guillamón, J. M. (2002). Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. *Microbiological Research*, 157(4), 267–274.  
<https://doi.org/10.1078/0944-5013-00163>
- Sadoudi, M., Tourdot-Maréchal, R., Rousseaux, S., Steyer, D., Gallardo-Chacón, J.-J., Ballester, J., ... Alexandre, H. (2012). Yeast–yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of non-Saccharomyces and Saccharomyces yeasts. *Food Microbiology*, 32(2), 243–253.  
<https://doi.org/10.1016/J.FM.2012.06.006>
- Saluja, P., K Yelchuri, R., K Sohal, S., Bhagat, G., & S Prasad, G. (2011). *Torulasporea indica* a novel yeast species isolated from coal mine soils. *Antonie van Leeuwenhoek* (Vol. 101).  
<https://doi.org/10.1007/s10482-011-9687-6>
- Santo, D. E., Galego, L., Gonçalves, T., & Quintas, C. (2012). Yeast diversity in the Mediterranean strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits' fermentations. *Food Research International*, 47(1), 45–50. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2012.01.009>
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., & Chen, W. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA

- barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(16), 6241–6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
- Schuelke, M. (2000). *An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments*. *Nature biotechnology* (Vol. 18). <https://doi.org/10.1038/72708>
- Schuller, D., Alves, H., Dequin, S., & Casal, M. (2005). Ecological survey of *Saccharomyces cerevisiae* strains from vineyards in the Vinho Verde Region of Portugal. *FEMS Microbiology Ecology*, 51(2), 167–177. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.08.003>
- Schuller, D., Cardoso, F., Sousa, S., Gomes, P., Gomes, A. C., Santos, M. A. S., & Casal, M. (2012). Genetic Diversity and Population Structure of *Saccharomyces cerevisiae* Strains Isolated from Different Grape Varieties and Winemaking Regions. *PLOS ONE*, 7(2), e32507. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032507>
- Schuller, D., & Casal, M. (2007). *Genetic structure of vineyard-associated Saccharomyces cerevisiae populations revealed by microsatellite analysis*. *Antonie van Leeuwenhoek* (Vol. 91). <https://doi.org/10.1007/s10482-006-9104-8>
- Sgouros, G., Chalvanti, I., Mallouchos, A., Paraskevopoulos, Y., Banilas, G., & Nisiotou, A. (2018). *Biodiversity and Enological Potential of Non-Saccharomyces Yeasts from Nemean Vineyards*. *Fermentation* (Vol. 4). <https://doi.org/10.3390/fermentation4020032>
- Skolnick, M. H., & Wallace, R. B. (1988). Simultaneous analysis of multiple polymorphic loci using amplified sequence polymorphisms (ASPs). *Genomics*, 2(4), 273–279. [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(88\)90014-6](https://doi.org/10.1016/0888-7543(88)90014-6)
- Stanley, D., Bandara, A., Fraser, S., Chambers, P. J., & Stanley, G. A. (2010). The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Applied Microbiology*, 109(1), 13–24. <https://doi.org/doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04657.x>
- Stefanini, I., Dapporto, L., Legras, J.-L., Calabretta, A., Di Paola, M., De Filippo, C., ... Cavalieri, D. (2012). Role of social wasps in *Saccharomyces cerevisiae* ecology and evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(33), 13398 LP-13403. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208362109>
- Stringini, M., Comitini, F., Taccari, M., & Ciani, M. (2008). Yeast diversity in crop-growing environments in Cameroon. *International Journal of Food Microbiology*, 127(1–2), 184–189. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2008.07.017>
- Subden, R. E., Husnik, J. I., van Twest, R., van der Merwe, G., & van Vuuren, H. J. J. (2003). Autochthonous microbial population in a Niagara Peninsula icewine must. *Food Research International*, 36(7), 747–751. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(03\)00034-6](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(03)00034-6)
- Tautz, D. (1993). Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. *EXS*, 67, 21–28.
- Taylor, D. L., Walters, W. A., Lennon, N. J., Bochicchio, J., Krohn, A., Caporaso, J. G., & Pennanen, T. (2016). Accurate Estimation of Fungal Diversity and Abundance through Improved Lineage-Specific Primers Optimized for Illumina Amplicon Sequencing. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(24), 7217 LP-7226. <https://doi.org/10.1128/AEM.02576->

- Tofalo, R., Perpetuini, G., Schirone, M., Fasoli, G., Aguzzi, I., Corsetti, A., & Suzzi, G. (2013). Biogeographical characterization of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast by molecular methods. *Frontiers in Microbiology*, *4*, 166. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00166>
- Varela, C., Sengler, F., Solomon, M., & Curtin, C. (2016). Volatile flavour profile of reduced alcohol wines fermented with the non-conventional yeast species *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces uvarum*. *Food Chemistry*, *209*, 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.FOODCHEM.2016.04.024>
- Varshney, R. K., Graner, A., & Sorrells, M. E. (2005). Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends in Biotechnology*, *23*(1), 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.11.005>
- Velázquez, R., Zamora, E., Álvarez, M. L., Hernández, L. M., & Ramírez, M. (2015). Effects of new *Torulaspora delbrueckii* killer yeasts on the must fermentation kinetics and aroma compounds of white table wine. *Frontiers in Microbiology*, *6*, 1222. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01222>
- Verdugo Valdez, A., Segura Garcia, L., Kirchmayr, M., Ramirez Rodriguez, P., Gonzalez Esquinca, A., Coria, R., & Gschaedler Mathis, A. (2011). Yeast communities associated with artisanal mezcal fermentations from *Agave salmiana*. *Antonie van Leeuwenhoek*, *100*(4), 497–506. <https://doi.org/10.1007/s10482-011-9605-y>
- Verginer, M., Leitner, E., & Berg, G. (2010). Production of volatile metabolites by grape-associated microorganisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(14), 8344–8350. <https://doi.org/10.1021/jf100393w>
- Villa, T. G., & Longo, E. (1996). Microbiology of Grape Surfaces and its Importance for Wine Quality BT - Aerial Plant Surface Microbiology. In C. E. Morris, P. C. Nicot, & C. Nguyen-The (Eds.) (pp. 209–220). Boston, MA: Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-0-585-34164-4\\_13](https://doi.org/10.1007/978-0-585-34164-4_13)
- Wang, Q.-M., Xu, J., Wang, H., Li, J., & Bai, F.-Y. (2009). *Torulaspora quercuum* sp. nov. and *Candida pseudohumilis* sp. nov., novel yeasts from human and forest habitats. *FEMS Yeast Research*, *9*(8), 1322–1326. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00567.x>
- Welthagen, J. J., & Viljoen, B. C. (1998). Yeast profile in Gouda cheese during processing and ripening. *International Journal of Food Microbiology*, *41*(3), 185–194. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00042-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00042-7)
- Westall, S., & Filtenborg, O. (1998). Spoilage yeasts of decorated soft cheese packed in modified atmosphere. *Food Microbiology*, *15*(2), 243–249. <https://doi.org/10.1006/FMIC.1997.0162>
- Wu, B., Buljic, A., & Hao, W. (2015). Extensive Horizontal Transfer and Homologous Recombination Generate Highly Chimeric Mitochondrial Genomes in Yeast. *Molecular Biology and Evolution*, *32*(10), 2559–2570. <https://doi.org/10.1093/molbev/msv127>
- YANAGIDA, F., ICHINOSE, F., SHINOHARA, T., & GOTO, S. (1992). DISTRIBUTION OF WILD YEASTS IN THE WHITE GRAPE VARIETIES AT CENTRAL JAPAN. *The Journal of General and Applied*



*Microbiology*, 38(5), 501–504. <https://doi.org/10.2323/jgam.38.501>

- You, K. M., Rosenfield, C.-L., & Knipple, D. C. (2003). Ethanol Tolerance in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Is Dependent on Cellular Oleic Acid Content. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(3), 1499–1503. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.3.1499-1503.2003>
- Zarraonaindia, I., Owens, S. M., Weisenhorn, P., West, K., Hampton-Marcell, J., Lax, S., ... Gilbert, J. A. (2015). The Soil Microbiome Influences Grapevine-Associated Microbiota. *MBio*, 6(2), e02527-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.02527-14>
- Zhang, Q., Zhao, X., Jiang, R., Li, Q., & Bai, F. (2009). [Ethanol tolerance in yeast: molecular mechanisms and genetic engineering]. *Sheng wu gong cheng xue bao = Chinese journal of biotechnology*, 25(4), 481–487.
- Zsófi, Z., Tóth, E., Rusjan, D., & Bálo, B. (2011). Terroir aspects of grape quality in a cool climate wine region: Relationship between water deficit, vegetative growth and berry sugar concentration. *Scientia Horticulturae*, 127(4), 494–499. <https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2010.11.014>