

# ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΜΣ: ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ: ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Μεταπτυχιακή διατριβή

**Μελέτη της προσκόλλησης και του σχηματισμού βιοϋμενίου από  
τη ζύμη αλλοίωσης του οίνου, *Brettanomyces bruxellensis***

Βασιλική Γ. Κεφαλλονίτη

Επιβλέπων Καθηγητής:  
Γεώργιος - Ιωάννης Ε. Νυχάς

ΑΘΗΝΑ  
2020

# ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Μεταπτυχιακή διατριβή

**Μελέτη της προσκόλλησης και του σχηματισμού βιοϋμενίου από  
τη ζύμη αλλοίωσης του οίνου, *Brettanomyces bruxellensis***

**“Adhesion and biofilm formation capacity of the wine spoilage  
yeast, *Brettanomyces bruxellensis*”**

Βασιλική Γ. Κεφαλλονίτη

Τριμελής Επιτροπή:

Νυχάς Γεώργιος - Ιωάννης, Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Πανάγου Ευστάθιος, Αν. Καθηγητής ΓΠΑ

Σκανδάμης Παναγιώτης, Αν. Καθηγητής ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ

2020

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι μικροοργανισμοί συναντώνται σε βιοϋμενία τα οποία αποτελούν δομημένα πολυμικροβιακά συσσωματώματα που συνδέονται σε βιοτικές και αβιοτικές επιφάνειες σχηματίζοντας ολοκληρωμένες κοινότητες. Η δημιουργία βιοϋμενίων από αλλοιογόνους μικροοργανισμούς μπορεί να έχει σημαντικές οικονομικές συνέπειες στην βιομηχανία τροφίμων και ποτών. Συχνά οι αντιμικροβιακοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται δεν είναι σε θέση να καταστρέψουν όλα τα βιώσιμα κύτταρα του βιοϋμενίου συνεπώς η βαθύτερη κατανόηση του μηχανισμού και των παραγόντων που επηρεάζουν το σχηματισμό των βιοϋμενίων με στόχο την εύρεση νέων τρόπων αντιμετώπισης είναι αναγκαία.

Αντικείμενο της παρούσας μελέτης ήταν αρχικά να αξιολογηθεί η ικανότητα προσκόλλησης και δημιουργίας βιοϋμενίων της ζύμης αλλοίωσης του οίνου, *Brettanomyces bruxellensis*. Αρχικά μελετήθηκε η ικανότητα προσκόλλησης έντεκα στελεχών του είδους και παράλληλα πραγματοποιήθηκε σύγκριση του δακτυλικού αποτυπώματος των πλαγκτονικών έναντι των προσκολλημένων κυττάρων με χρήση FTIR. Στη συνέχεια επιλέχθηκε ένα στέλεχος με υψηλό δυναμικό αλλοίωσης για τη βαθύτερη μελέτη του σχηματισμού του βιοϋμενίου. Συγκεκριμένα εξετάστηκαν οι παράγοντες που επηρεάζουν την προσκόλληση, η κινητική του σχηματισμού του βιοϋμενίου και η πιθανή αλλοίωση του οίνου από τα προσκολλημένα κύτταρα. Ως παράγοντες που επηρεάζουν την προσκόλληση αξιολογήθηκαν διαφορετικές συνθήκες (χαμηλό pH, αιθανόλη, διοξειδίο του θείου, κρασί, μούστος) και υλικά (ανοξειδωτο ατσάλι, γυαλί) που συναντώνται στην οινοποίηση. Για την ανάπτυξη του βιοϋμενίου με το πέρασμα του χρόνου χρησιμοποιήθηκαν κουπόνια από ανοξειδωτο ατσάλι και οι δειγματοληψίες έλαβαν χώρα στις 0, 24, 48, 72 και 144 ώρες, ενώ για το δυναμικό αλλοίωσης το «επιμολυσμένο» κόκκινο κρασί επώαστηκε στους 25°C για διάστημα δύο μηνών. Τέλος εφαρμόστηκαν νέες τεχνικές αντιμετώπισης της προσκόλλησης του στελέχους *B. bruxellensis* (33.1) σε κουπόνια από ανοξειδωτο ατσάλι, όπως η προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων χιτοζάνης και η παρουσία δύο διαφορετικών εμπορικών στελεχών του βακτηρίου *Oenococcus oeni*.

Από τα αποτελέσματα φάνηκε ότι τα στελέχη του μικροοργανισμού *B. bruxellensis* που εξετάστηκαν, δεν έχουν όλα την ίδια ικανότητα προσκόλλησης. Με την ανάλυση FTIR διαχωρίστηκε επιτυχώς το μεταβολικό αποτύπωμα των προσκολλημένων έναντι των πλαγκτονικών κυττάρων των έντεκα στελεχών ενώ όλα τα προσκολλημένα κύτταρα εμφάνισαν το ίδιο μεταβολικό αποτύπωμα προτείνοντας ένα πιθανό κοινό μηχανισμό προσκόλλησης για το συγκεκριμένο είδος. Όσον αφορά το στέλεχος *B. bruxellensis* (33.1), παρατηρήθηκε ότι οι στρεσογόνες συνθήκες του οίνου επηρεάζουν την προσκόλληση του ενώ ο πληθυσμός των προσκολλημένων κυττάρων παραμένει σταθερός τις πρώτες πέντε μέρες σχηματισμού του βιοϋμενίου. Τα προσκολλημένα κύτταρα παρουσιάζουν δυναμικό αλλοίωσης, δεδομένου ότι μετά από 2 μήνες σε επαφή με φρέσκο οίνο προκάλεσαν αλλαγές στο οργανοληπτικό προφίλ του προϊόντος. Τέλος, η χιτοζάνη και οι καλλιέργειες του *O. oeni* μπορούν να μειώσουν τα προσκολλημένα κύτταρα και για αυτό θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως νέοι τρόποι αντιμετώπισης του σχηματισμού βιομενίων.

Συμπερασματικά, η Φασματοσκοπία Υπερύθρου (FTIR) μπορεί να εφαρμοστεί σαν μέθοδος ανάλυσης του βιοϋμενίου παρόλη την πιθανή παραλλακτικότητα που μπορεί να παρουσιάζουν τα στελέχη του είδους *B. bruxellensis* ως προς την ικανότητα προσκόλλησης ενώ νέοι τρόποι αντιμετώπισης είναι πιθανόν να εφαρμοστούν επιτυχώς.

**Επιστημονική περιοχή:** Μικροβιολογία τροφίμων και ποτών

**Λέξεις κλειδιά:** Βιοϋμένια, προσκόλληση, *Brettanomyces bruxellensis*, αλλοίωση οίνου, FTIR

## **ABSTRACT**

Microorganisms can form biofilms which are structured multicellular communities that adhere to abiotic or living surfaces. Biofilms formed by spoilage microorganisms can have significant economic consequences for the food and beverage industry. The ability to form a biofilm belongs to the phenotypic characteristics that differ between strains within the same species. Often the antimicrobial agents used are not able to destroy all the viable cells of the biofilm so a deeper understanding of the mechanism and factors that affect the formation of the biofilm is necessary in order to find new ways to deal with it.

The main object of the present study was to evaluate the adhesion and biofilm ability of the wine spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*. Adhesion ability of eleven strains was initially studied and at the same time, the metabolic fingerprint of planktonic versus adherent cells was compared using FTIR. A strain with a high spoilage potential was then selected for the in-depth study of biofilm formation. Specifically, the factors that affect adhesion, the biofilm kinetics and the possible spoilage of wine by attached cells were examined. For this purpose, different conditions (low pH, ethanol, sulfur dioxide, wine, must) and materials (stainless steel, glass) found in winemaking were evaluated as factors affecting adhesion. Stainless steel coupons were used for the biofilm growth over time and sampling took place at 0, 24, 48, 72 and 144 hours, while for the spoilage potential the "contaminated" red wine was incubated at 25°C for two months. Finally, new techniques were used to treat the adhesion of *B. bruxellensis* (33.1) to stainless steel coupons, such as the treatment with different concentrations of chitosan and the presence of two different commercial strains of the lactic acid bacteria *Oenococcus oeni*.

The results showed that the examined strains of the microorganism *B. bruxellensis*, did not have the same adhesion capacity. FTIR analysis achieved to clearly discriminate the spectra profile of adhered vs planktonic cells of the eleven strains. All attached cells showed the same metabolic fingerprint as opposed to the planktonic ones, which showed greater variability, suggesting a possible common adherence mechanism for this species. In addition, it was observed that the stress conditions of wine affect the adhesion of *B. bruxellensis* (33.1), while the population of attached cells remains stable for the first five days of biofilm formation. The

attached cells show a potential for spoilage, since they caused changes in the organoleptic profile of the product after 2 months in contact with fresh wine. Finally, chitosan and *O. oeni* cultures can be used as new ways of dealing with the biofilm formation.

In conclusion, Infrared Spectroscopy (FTIR) can be applied as a method of biofilm analysis despite the possible variability of *B. bruxellensis* strains in adhesion capacity while new treatments are likely to be applied successfully.

**Scientific area:** Food and beverage microbiology

**Keywords:** Biofilms, adhesion, *Brettanomyces bruxellensis*, wine spoilage, FTIR

# ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εκπόνηση της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης έλαβε χώρα στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όσους μου προσέφεραν τη βοήθεια τους για την πραγματοποίηση της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης και πιο συγκεκριμένα:

- Τον επιβλέποντα καθηγητή κ. Γεώργιο- Ιωάννη Νυχά, Διευθυντή του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γ.Π.Α., για την ανάθεση και την επίβλεψη της συγκεκριμένης εργασίας.
- Τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον αναπληρωτή καθηγητή κ. Ευστάθιο Πανάγου, του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γ.Π.Α. και τον αναπληρωτή καθηγητή κ. Παναγιώτη Σκανδάμη, του Εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών του Γ.Π.Α.
- Την μετα-διδάκτορα κ. Μαρία Δημοπούλου, του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων για την καθοδήγηση της, τον πειραματικό σχεδιασμό και στήριξη της καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της μεταπτυχιακής μελέτης.
- Το προσωπικό του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, την κ. Πασχαλίτσα Τρυφίνοπούλου και τον κ. Αναστάσιο Σταματίου και τις υποψήφιες διδάκτορες Εβίτα Μάνθου, Ευγενία Σπυρέλλη και Ειρήνη Σχοινά.
- Τους συναδέλφους Γιώργο Αθίτσο, Γιάννη Καραγιάννη, Αγγελική Κόχυλα, Κατερίνα Λουλούδα, Χριστίνα Παπαχρήστου, Νίκο Σαρρή και Κατερίνα Τζαμουράνη για την βοήθεια τους στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γ.Π.Α.
- Τους φίλους μου Νίκη Τσούτσουρα, Σταυριάννα Μανωλάκου, Έλενα Νικολοπούλου, Ζωή Κόμη, Ιωάννα Βουγά, Γιώργο Καρακατσάνη και Ciara Campbell.
- Τη οικογένεια μου, με την στήριξη της οποίας έφτασα μέχρι εδώ.

# ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	i
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	v
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	viii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ.....	ix
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	x
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1. Τι είναι τα βιοϋμένια.....	1
1.2. Δημιουργία βιοϋμενίου.....	1
1.3. Φασματοσκοπία Υπερύθρου με Μετασχηματισμό Fourier (FTIR) και η εφαρμογή της στη μελέτη και ανάλυση των βιοϋμενίων.....	4
1.4. Βιοϋμένια στη βιομηχανία τροφίμων και ποτών.....	7
1.5. Οι μικροοργανισμοί του οίνου.....	9
1.5.1. Οι ζύμες του οίνου.....	11
1.5.1.1. <i>Brettanomyces bruxellensis</i> .....	12
1.5.2. Τα γαλακτικά βακτήρια του οίνου.....	18
1.5.2.1. <i>Oenococcus oeni</i> .....	18
1.5.3. Μικροβιακή αλλοίωση οίνου και σχηματισμός βιοϋμενίου.....	20
1.5.4. Τρόποι αντιμετώπισης της μικροβιακής αλλοίωσης στον οίνο.....	22
1.5.4.1. Χιτοζάνη.....	22
1.5.4.2. Αλληλεπίδραση μικροοργανισμών στον οίνο.....	23
1.6. Σκοπός.....	24
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	25
2.1. Στελέχη μικροοργανισμών.....	25
2.2. Θρεπτικά υλικά.....	26
2.3. Ενεργοποίηση κυττάρων μικροοργανισμού.....	26
2.4. Κινητική ανάπτυξης μικροοργανισμών.....	27



2.5.	Προσκόλληση και ανάπτυξη βιοϋμενίου.....	27
2.5.1.	Προετοιμασία εμβολίου .....	27
2.5.2.	Επιφάνεια και συνθήκες ανάπτυξης βιοϋμενίου .....	28
2.5.3.	Σχηματισμός βιοϋμενίου .....	29
2.5.4.	Ποσοτικοποίηση του βιοϋμενίου με χρήση της μεθόδου στροβιλισμού με γυάλινα σφαιρίδια (bead vortexing method) .....	30
2.6.	Μελέτη βιοϋμενίου με Φασματοσκοπία Υπερύθρου (FTIR) .....	31
2.7.	Οργανοληπτικός έλεγχος .....	33
2.8.	Στατιστική ανάλυση.....	34
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	35
3.1.	Παραλλακτικότητα του είδους <i>Brettanomyces bruxellensis</i> στο σχηματισμό βιοϋμενίου .....	35
3.1.1.	Ικανότητα προσκόλλησης .....	35
3.1.2.	Μεταβολικό αποτύπωμα προσκολλημένων έναντι πλαγκτονικών κυττάρων....	37
3.2.	Μελέτη βιοϋμενίου .....	39
3.2.1.	Ικανότητα προσκόλλησης σε διαφορετικές συνθήκες .....	39
3.2.2.	Ικανότητα ανάπτυξης βιοϋμενίου στο πέρασμα του χρόνου.....	42
3.2.3.	Ικανότητα αλλοίωσης του οίνου από προσκολλημένα κύτταρα .....	44
3.3.	Τρόποι αντιμετώπισης της δημιουργίας βιοϋμενίου.....	46
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	49
4.1.	Παραλλακτικότητα ως προς την ικανότητα προσκόλλησης εντός του είδους .....	49
4.2.	Διαφορά ως προς το μεταβολικό αποτύπωμα.....	51
4.3.	Μελέτη προσκόλλησης και ανάπτυξης βιοϋμενίου .....	52
4.4.	Εναλλακτικοί τρόποι αντιμετώπισης προσκολλημένων κυττάρων .....	54
5.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	56
6.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	57

# ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

**Πίνακας 2.1:** Στελέχη μικροοργανισμών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

**Πίνακας 2.2:** Συνθήκες ανάπτυξης βιοϋμενίου.

**Πίνακας 3.1:** Μέσοι όροι των τιμών  $\log_{10}$  cfu/cm<sup>2</sup> ± τυπική απόκλιση για τον πληθυσμό των προσκολλημένων κυττάρων των 11 στελεχών του *B. bruxellensis*.

**Πίνακας 3.2:** Μέσοι όροι των τιμών  $\log_{10}$  cfu/cm<sup>2</sup> ± τυπική απόκλιση για τον πληθυσμό των προσκολλημένων κυττάρων και μέσοι όροι των τιμών  $\log_{10}$  cfu/ml ± τυπική απόκλιση για τον πληθυσμό των πλαγκτονικών κυττάρων του στελέχους *B. bruxellensis* 33.1 στις διαφορετικές συνθήκες οиноποίησης.

**Πίνακας 3.3:** Μέσοι όροι των τιμών  $\log_{10}$  cfu/cm<sup>2</sup> ± τυπική απόκλιση για τον πληθυσμό των προσκολλημένων κυττάρων και μέσοι όροι των τιμών  $\log_{10}$  cfu/ml ± τυπική απόκλιση για τον πληθυσμό των πλαγκτονικών κυττάρων του στελέχους *B. bruxellensis* 33.1 στα διαφορετικά υλικά κουπονιών που χρησιμοποιήθηκαν.

**Πίνακας 3.4:** Μέσοι όροι των τιμών  $\log_{10}$  cfu/cm<sup>2</sup> ± τυπική απόκλιση για την ανάπτυξη του βιοϋμενίου και μέσοι όροι των τιμών  $\log_{10}$  cfu/ml ± τυπική απόκλιση για τον πληθυσμό των πλαγκτονικών κυττάρων του στελέχους *B. bruxellensis* 33.1 στο πέρασμα του χρόνου.

**Πίνακας 3.5:** Μέσοι όροι των τιμών  $\log_{10}$  cfu/cm<sup>2</sup> ± τυπική απόκλιση για τον πληθυσμό των προσκολλημένων κυττάρων και μέσοι όροι των τιμών  $\log_{10}$  cfu/ml ± τυπική απόκλιση για τον πληθυσμό των πλαγκτονικών κυττάρων του στελέχους *B. bruxellensis* 33.1 στη χρήση χιτοζάνης ως μέσο βιοπροστασίας.

**Πίνακας 3.6:** Μέσοι όροι των τιμών  $\log_{10}$  cfu/cm<sup>2</sup> ± τυπική απόκλιση για τον πληθυσμό των προσκολλημένων κυττάρων και μέσοι όροι των τιμών  $\log_{10}$  cfu/ml ± τυπική απόκλιση για τον πληθυσμό των πλαγκτονικών κυττάρων του στελέχους *B. bruxellensis* 33.1 στη χρήση δυο στελεχών εμπορικών καλλιεργειών *O. oeni* ως μέσο βιοπροστασίας.

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

**Διάγραμμα 3.1:** Μέσος πληθυσμός των προσκολλημένων κυττάρων ( $\log_{10}$  cfu/cm<sup>2</sup>) 11 στελεχών του *B. bruxellensis* στην επιφάνεια κουπονιών από ανοξειδωτο ατσάλι και γυαλί, σε διάλυμα Ringer. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση μεταξύ ανεξάρτητων επαναλήψεων (n=6). Οι τιμές με διαφορετικά λατινικά γράμματα (A-C) διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ( $p \leq 0,05$ ).

**Διάγραμμα 3.2:** Απεικόνιση δυο διαστάσεων. Το πράσινο σημείο αντιπροσωπεύει τα δεδομένα για τον μάρτυρα, το κόκκινο τα δεδομένα για τα προσκολλημένα κύτταρα και τα μπλε σημεία αντιπροσωπεύουν τα δεδομένα για τα πλαγκτονικά κύτταρα. Για τα πλαγκτονικά κύτταρα, η κατανομή παρουσιάζει μεγαλύτερη διακύμανση σε σύγκριση με τα προσκολλημένα κύτταρα.

**Διάγραμμα 3.3:** Μέσος πληθυσμός των προσκολλημένων κυττάρων ( $\log_{10}$  cfu/cm<sup>2</sup>) του στελέχους *B. bruxellensis* 33.1 στην επιφάνεια κουπονιών από ανοξειδωτο ατσάλι, σε διαφορετικές συνθήκες. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση μεταξύ ανεξάρτητων επαναλήψεων (n=6). Οι τιμές με λατινικά κεφαλαία (A-D) γράμματα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ( $p \leq 0,05$ ) και αναφέρονται στα προσκολλημένα και κύτταρα.

**Διάγραμμα 3.4:** Μέσος πληθυσμός των προσκολλημένων κυττάρων ( $\log_{10}$  cfu/cm<sup>2</sup>) του στελέχους *B. bruxellensis* 33.1 στην επιφάνεια κουπονιών από ανοξειδωτο ατσάλι και γυαλί, σε διάλυμα Ringer. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση μεταξύ ανεξάρτητων επαναλήψεων (n=6). Διεξήχθη στατιστική ανάλυση μεταξύ των δύο συνθηκών.

**Διάγραμμα 3.5:** Μέσος πληθυσμός των προσκολλημένων ( $\log_{10}$  cfu/cm<sup>2</sup>) και των πλαγκτονικών ( $\log_{10}$  cfu/ml) κυττάρων του στελέχους του *B. bruxellensis* 33.1 σε κουπόνια ανοξειδωτου ατσαλιού και διάλυμα Ringer, στο πέραςμα του χρόνου (0, 24, 48, 72, 144 h). Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση μεταξύ ανεξάρτητων επαναλήψεων (n=6). Οι τιμές με διαφορετικά λατινικά κεφαλαία (A-B) γράμματα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ( $p \leq 0,05$ ) και αναφέρονται στα προσκολλημένα κύτταρα.

**Διάγραμμα 3.6:** Μέσες κεντραρισμένες τιμές έντασης των αρωματικών χαρακτηριστικών του κρασιού που επώαστηκε δύο μήνες με κουπόνι από ανοξειδωτο ατσάλι με προσκολλημένα κύτταρα του στελέχους *B. bruxellensis* 33.1. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση μεταξύ ανεξάρτητων επαναλήψεων (n=6). Διεξήχθη στατιστική ανάλυση μεταξύ των δύο συνθηκών για κάθε χαρακτηριστικό (ANOVA, \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

**Διάγραμμα 3.7:** Μέσος πληθυσμός των προσκολλημένων κυττάρων ( $\log_{10}$  cfu/cm<sup>2</sup>) του στελέχους *B. bruxellensis* 33.1 στην επιφάνεια κουπονιών από ανοξειδωτο ατσάλι, στον μάρτυρα και στις διαφορετικές συγκεντρώσεις χιτοζάνης. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση μεταξύ ανεξάρτητων επαναλήψεων (n=6). Οι τιμές με λατινικά κεφαλαία (A-B) γράμματα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ( $p \leq 0,05$ ) και αναφέρονται στα προσκολλημένα και κύτταρα.

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

**Εικόνα 1.1:** Στάδια σχηματισμού βακτηριακού βιοϋμενίου. Η μαύρη απόχρωση αντιπροσωπεύει πλαγκτονικά κύτταρα ενώ η γκρι τα κύτταρα του βιοϋμενίου (Korber et al., 2009).

**Εικόνα 1.2:** Σχηματική απεικόνιση «εγκατάστασης» FTIR και ιντερφερόμετρου Michelson (Basalekou et al., 2020).

**Εικόνα 1.3:** Στάδια διαδικασίας οινοποίησης (<https://www.shutterstock.com/>).

**Εικόνα 1.4:** Δενδρόγραμμα του *B. bruxellensis*. Φαίνονται έξι γενετικές ομάδες οι οποίες παρουσιάζονται με διαφορετικά χρώματα (Anramova et al., 2018).

**Εικόνα 1.5:** Κύτταρα *B. bruxellensis* στέλεχος 33.1 στο μικροσκόπιο (φακός 100x).

**Εικόνα 1.6:** Κύτταρα *B. bruxellensis* στέλεχος 33.1 σε τρυβλίο με θρεπτικό υλικό YPD.

**Εικόνα 1.7:** Κύτταρα *B. bruxellensis* στέλεχος 15.12 στο μικροσκόπιο (φακός 40x)

**Εικόνα 1.8:** Κύτταρα *B. bruxellensis* στέλεχος 15.12 σε τρυβλίο με θρεπτικό υλικό YPD.

**Εικόνα 1.9:** Σχηματισμός πηκτικών φαινολών μέσω της αποκαρβοξυλίωσης των υδροξυκιναμικών οξέων (Oelofse et al., 2016).

**Εικόνα 1.10:** Κύτταρα *O. oeni* στο μικροσκόπιο (1000x)

**Εικόνα 1.11:** Κύτταρα *O. oeni* σε τρυβλίο με θρεπτικό υλικό MRS.

**Εικόνα 1.12:** Απεικόνιση βιοϋμενίου που σχηματίζουν οι ζύμες άνθισης στην επιφάνεια του οίνου τύπου Sherry (Cañete et al., 2018).

**Εικόνα 2.1:** Σχηματική απεικόνιση βημάτων ενεργοποίησης κυττάρων μικροοργανισμών.

**Εικόνα 2.2:** Σχηματική απεικόνιση ποσοτικοποίησης του βιοϋμενίου με χρήση της μεθόδου στροβιλισμού με γυάλινα σφαιρίδια (bead vortexing method).

**Εικόνα 2.3:** Σχηματική απεικόνιση εφαρμογής Φασματοσκοπίας Υπερύθρου (FTIR) σε δείγματα πλαγκτονικών και προσκολλημένων κυττάρων.

**Εικόνα 2.4:** Σχηματική απεικόνιση ποσοτικοποίησης βιοϋμενίου με χρήση της μεθόδου στροβιλισμού με σφαιρίδια (bead vortexing method) και διαδικασίας οργανοληπτικού ελέγχου.

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1. Τι είναι τα βιοϋμένια

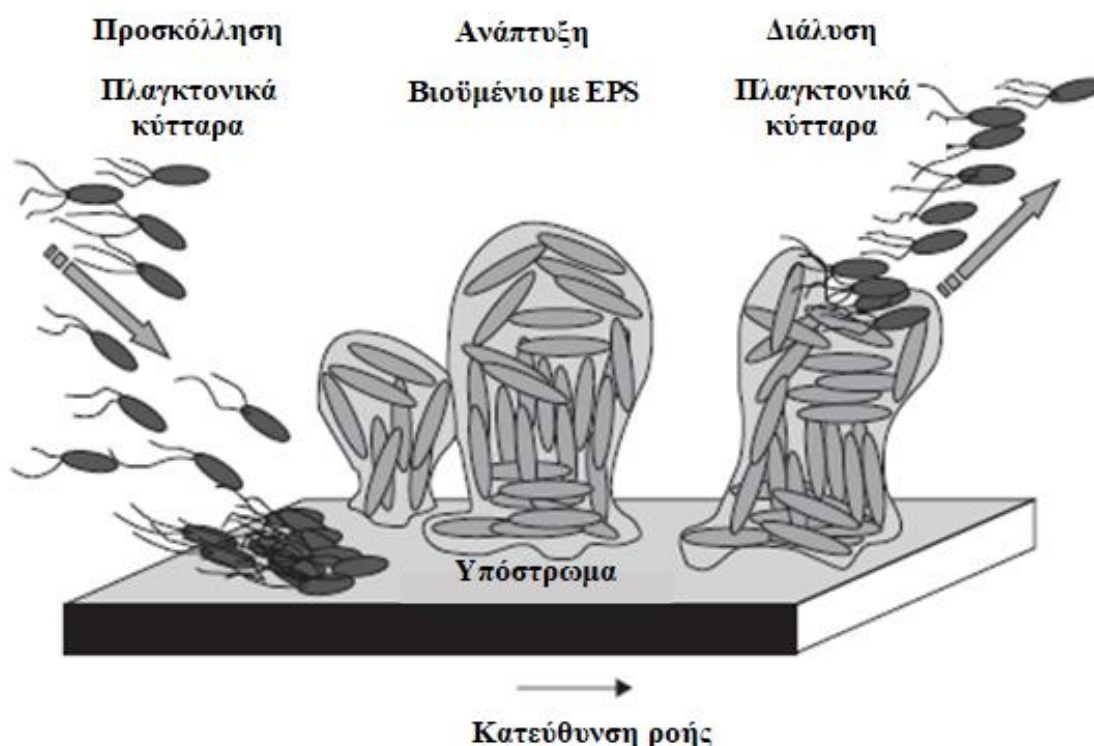
Τα βιοϋμένια είναι δομημένα πολυμικροβιακά συσσωματώματα που συνδέονται σε βιοτικές και αβιοτικές επιφάνειες σχηματίζοντας ολοκληρωμένες κοινότητες. Αυτή η σύνθετη τρισδιάστατη δομή αποτελείται κυρίως από εξωκυτταρικές πολυμερείς ουσίες (EPS), ενώ λιγότερο από το 10% της ξηρής μάζας αντιπροσωπεύεται από τους μικροοργανισμούς. Η σύνθεση του EPS είναι περίπλοκη και περιλαμβάνει μια μεγάλη ποικιλία πολυσακχαριτών, πρωτεϊνών, γλυκοπρωτεϊνών καθώς και γλυκολιπιδίων, και σύμφωνα με πρόσφατα ευρήματα υψηλές ποσότητες εξωκυτταρικού DNA (e-DNA) (Flemming and Wingender, 2010; Frølund et al., 1996). Τα κύτταρα ακινητοποιούνται στο δίκτυο των εξωκυττάρων αυτών ουσιών που τους προσφέρει προστασία, σταθερότητα, διασύνδεση και διάχυση θρεπτικών ουσιών (Dourou et al., 2011; Giaouris et al., 2013; Iñiguez-Moreno et al., 2019; Lianou et al., 2020; Lopez et al., 2010; Speranza et al., 2020; Tango et al., 2018; Tristezza et al., 2010).

## 1.2. Δημιουργία βιοϋμενίου

Αβιοτικές και βιοτικές επιφάνειες παρέχουν τις κατάλληλες συνθήκες, όπως για παράδειγμα θρεπτικά συστατικά, ενεργότητα νερού, θερμοκρασία, pH, για τον σχηματισμό των βιοϋμενίων (Korber et al., 2009). Η προσκόλληση μικροοργανισμών σε επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα και ποτά και ο επακόλουθος σχηματισμός βιοϋμενίων είναι ανεπιθύμητα στη βιομηχανία τροφίμων και ποτών, καθώς η απόσπαση κυττάρων από τη δομή του βιοϋμενίου μπορεί να οδηγήσει σε διασταυρούμενη επιμόλυνση, ειδικά σε στάδια μετά την επεξεργασία, προκαλώντας αλλοίωση και αμφισβήτηση της τελικής ασφάλειας του προϊόντος (Giaouris et al., 2013; Lianou et al., 2020; Tristezza et al., 2010; Wirtanen and Salo, 2016). Τα βιοϋμένια είναι ένας τρόπος προσαρμογής στις περιβαλλοντικές δυσμενείς συνθήκες, μέσω μεταβολικών διασταυρώσεων, αλληλεπιδράσεων μεταξύ των κυττάρων και επιπλέον χημικής και φυσικής αντίστασης (Bastard et al., 2016; Iñiguez-Moreno et al., 2019; Lebleux et al., 2020). Συνεπώς, ο κίνδυνος γίνεται ακόμη πιο σοβαρός, καθώς έχει παρατηρηθεί ότι τα κύτταρα των βιοϋμενίων έχουν μεγαλύτερη ανтимικροβιακή αντοχή σε σύγκριση με τα αντίστοιχα πλαγκτονικά (Giaouris et al., 2005; Iñiguez-Moreno et al., 2019; Lopez et al., 2010; Tristezza et al., 2010). Ο σχηματισμός των βιοϋμενίων από τους

μικροοργανισμούς μπορεί να επηρεάσει την παραγωγή και την επεξεργασία πολλών τροφίμων και ποτών ως προς την ασφάλεια και την ποιότητα τους (Korber et al., 2009).

Η μετάβαση των κυττάρων των μικροοργανισμών από την πλαγκτονική κατάσταση σε αυτή των βιοϋμενίων είναι μια δυναμική διαδικασία η οποία παρουσιάζεται στην Εικόνα 1.1 και περιλαμβάνει τέσσερα στάδια (Korber et al., 2009; Lianou et al., 2020; Tristezza et al., 2010). Τα στάδια αυτά περιλαμβάνουν 1) τον σχηματισμό μιας μεμβράνης από θρεπτικά συστατικά στις επιφάνειες, 2) την κυτταρική προσκόλληση, 3) τον σχηματισμό και την ανάπτυξη ώριμων βιοϋμενίων που προκύπτουν από μικροαποικίες που συγχωνεύονται και 4) την διάλυση και τον επαναποικισμό των βιοϋμενίων (Iñiguez-Moreno et al., 2019; Joseph et al., 2007; Korber et al., 2009; Lebleux et al., 2020). Στο βιοϋμένιο τα κύτταρα εμφανίζουν έναν μεταβλητό φαινότυπο σε σχέση με τα αντίστοιχα πλαγκτονικά κύτταρα, ο οποίος σχετίζεται με τον ρυθμό ανάπτυξης, τη μεταγραφή των γονιδίων και την ενεργοποίηση διαφορετικών βιοχημικών μονοπατιών (Dougou et al., 2011; Lianou et al., 2020). Από τη βιβλιογραφία προκύπτει ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά στη διαδικασία του σχηματισμού βιοϋμενίου μεταξύ μικροοργανισμών που προκαλούν αλλοίωση και των παθογόνων μικροοργανισμών (Korber et al., 2009).



**Εικόνα 1.1:** Στάδια σχηματισμού βακτηριακού βιοϋμενίου. Η μαύρη απόχρωση αντιπροσωπεύει πλαγκτονικά κύτταρα ενώ η γκρι τα κύτταρα του βιοϋμενίου (Korber et al., 2009).

Αρχικά, σε βιοτικές και αβιοτικές επιφάνειες δημιουργείται μια «μεμβράνη» από οργανικά και ανόργανα συστατικά ή μόρια (πρωτεΐνες, λιπίδια, νουκλεϊκά οξέα και άλλα βιομόρια), κάτι το οποίο μεταβάλλει τις φυσικοχημικές ιδιότητες της επιφάνειας (ελεύθερη ενέργεια της επιφάνειας, υδροφοβικότητα και ηλεκτροστατικό φορτίο) (Korber et al., 2009). Η προσκόλληση είναι μια φυσικοχημική διαδικασία αλληλεπίδρασης διαμοριακών δυνάμεων μεταξύ των μικροοργανισμών, της επιφάνειας και του περιβάλλοντος υγρού. Μόλις τα κύτταρα έρθουν σε επαφή με την επιφάνεια, μπορεί να προσκολληθούν αντιστρέψιμα ή μη, στην περίπτωση της αντιστρέψιμης προσκόλλησης τα κύτταρα τελικά θα αποσπαστούν και αυτό οφείλεται σε ασθενείς δυνάμεις μεταξύ κυττάρων και επιφάνειας. Όσον αφορά τη μη αντιστρέψιμη προσκόλληση, οι διαμοριακές δυνάμεις που λαμβάνουν μέρος ανήκουν σε τρεις κατηγορίες και συνδυάζονται. Αυτές είναι οι δυνάμεις διπόλου – διπόλου (Van der Waals), οι δυνάμεις δέκτη και δότη ηλεκτρονίων (δεσμός υδρογόνου, ιοντικός, ομοιοπολικός δεσμός) και οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Οι δυνάμεις διπόλου-διπόλου είναι ελκτικές, και οι ηλεκτροστατικές μπορεί να είναι ελκτικές ή απωστικές. Όμως είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι οι μακροχρόνια προσκόλληση δεν μπορεί να εξηγηθεί εξ ολοκλήρου από διαμοριακές δυνάμεις ή από θεωρίες ελεύθερης ενέργειας (Carpentier, 2014; Korber et al., 2009).

Υπάρχουν και μικροβιολογικοί μηχανισμοί οι οποίοι παίζουν σημαντικό ρόλο, όπως η παραγωγή και έκκριση εξωκυτταρικού πολυμερικού περιβλήματος EPS (Extracellular Polymeric Substances) καθώς και γονίδια που είναι υπεύθυνα για την μετάφραση συγκεκριμένων πρωτεϊνών (Butzke et al., 2010; Carpentier, 2014; Korber et al., 2009). Ως EPS ορίζονται ενυδατωμένα πολυμερή (εξωκυτταρικές πολυμερείς ουσίες) που εκκρίνουν τα κύτταρα και αποτελούνται από πολυσακχαρίτες, νουκλεϊκά οξέα (RNA, DNA), αμινοξέα, γλυκοπρωτεΐνες, φωσφοπρωτεΐνες, σάκχαρα, φωσφολιπίδια, ουρονικά οξέα και φαινολικές ενώσεις. Οι ενώσεις αυτές μπορούν να βρίσκονται σε διαφορετικές ποσότητες που εξαρτώνται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες, την ηλικία του βιοϋμενίου και τον τύπο των μικροοργανισμών που εμπλέκονται (Carpentier, 2014; Korber et al., 2009; Lebleux et al., 2020). Το EPS που παράγεται από τα κύτταρα δημιουργεί μια «μήτρα» και εκτός του ότι βοηθάει στην προσκόλληση και τη σταθερότητα του βιοϋμενίου παίζει και σημαντικό ρόλο στην αποθήκευση θρεπτικών ουσιών και την αντοχή σε αντιμικροβιακούς παράγοντες. Η πολύπλοκη σύνθεση του EPS διατηρεί τα κύτταρα το ένα κοντά στο άλλο, κάτι που επιτρέπει την «ανταλλαγή γενετικών πληροφοριών» και την επικοινωνία τόσο μεταξύ κυττάρων όσο και μεταξύ ειδών, μέσω δευτερογενών μεταβολιτών ή quorum-sensing. Λόγω του σχηματισμού του, το συσσωμάτωμα των κυττάρων γίνεται αρκετά μεγάλο και παγιδεύει οργανικά και ανόργανα υπολείμματα, θρεπτικά συστατικά και άλλους μικροοργανισμούς που

οδηγούν στο σχηματισμό ενός ώριμου βιοϋμενίου (Butzke et al., 2010; Carpentier, 2014; Korber et al., 2009; Speranza et al., 2020).

Σε συνέχεια της μη αντιστρέψιμης προσκόλλησης, τα κύτταρα αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται σε μικροαποικίες και καλύπτουν τις επιφάνειες διαμορφώνοντας ένα στρώμα αποτελούμενο από κύτταρα το οποίο εξελίσσεται σε ώριμο βιοϋμενίο. Από τη στιγμή που τα κύτταρα θα προσκολληθούν μη αντιστρέψιμα σε επιφάνειες, η κατάσταση τους αλλάζει και από πλαγκτονικά γίνονται κύτταρα βιοϋμενίου, κάτι το οποίο περιλαμβάνει αλλαγές στην έκφραση και μετάφραση γονιδίων (Korber et al., 2009). Έπειτα, ομάδες κυττάρων ή μεμονωμένα θυγατρικά κύτταρα απελευθερώνονται στην υγρή φάση. Αυτό το στάδιο ονομάζεται διάλυση ή επαναποικισμός των βιοϋμενίων. Τα θυγατρικά κύτταρα που είναι έτοιμα να απελευθερωθούν από το βιοϋμενίο έχουν ήδη υιοθετήσει τον φαινότυπο πλαγκτονικών κυττάρων (Korber et al., 2009).

### **1.3. Φασματοσκοπία Υπερύθρου με Μετασχηματισμό Fourier (FTIR) και η εφαρμογή της στη μελέτη και ανάλυση των βιοϋμενίων**

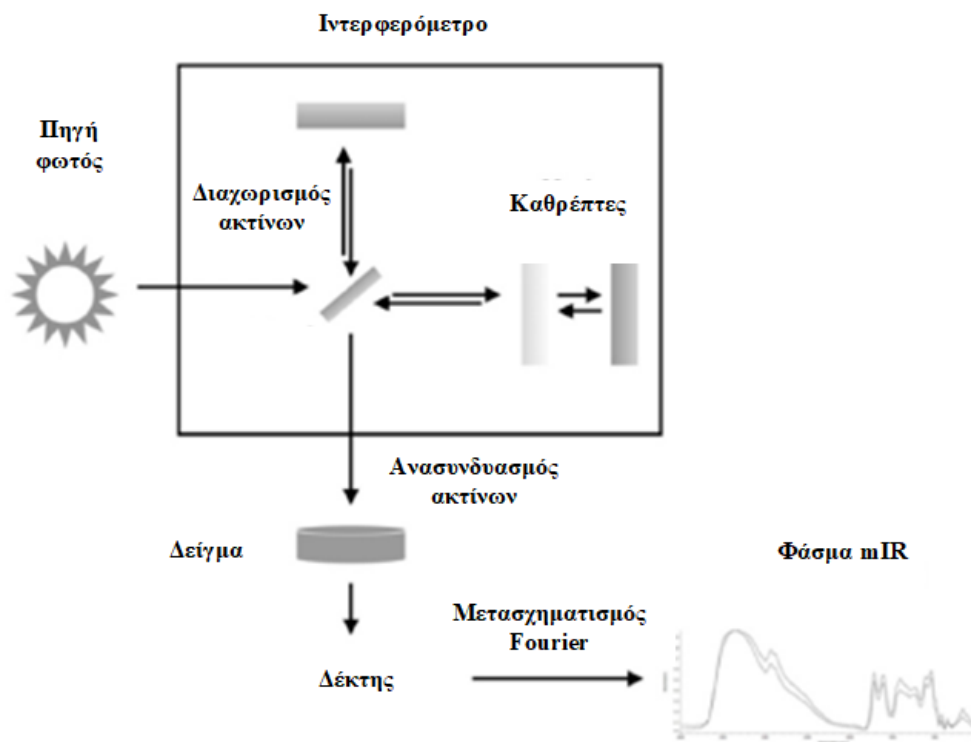
Οι πολύπλοκες και ετερογενείς δομές των βιοϋμενίων μπορούν να μελετηθούν με διαφορετικές τεχνικές και ανάλογα με το στόχο της εκάστοτε μελέτης. Χρησιμοποιούνται μέθοδοι χρώσης (κρυσταλλικό ιώδες, μπλε του μεθυλενίου, φθουορεσκεΐνη-δι-οξικό, δοκιμασία LIVE / DEAD BacLight) και μεταβολικές μέθοδοι (ρεσαζουρίνης, μέθοδοι υδροξειδίου του τετραζολίου). Εφαρμόζονται επίσης μέθοδοι μοριακής βιολογίας (PCR, τεχνική *in situ* υβριδισμού φθορισμού) και μικροσκοπικών τεχνικών (φασματομετρία μάζας, Confocal Laser Scanning Microscopy, φασματοσκοπία Raman, ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, μικροσκόπιο ακτίνων X, ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης). Λόγω της πολυπλοκότητας του βιοϋμενίου, για τη διεξοδική μελέτη του απαιτείται συνδυασμός διαφορετικών πειραματικών προσεγγίσεων (Pantanella et al., 2013). Για την μελέτη των βιοϋμενίων έχει χρησιμοποιηθεί η φασματοσκοπία υπερύθρων, η οποία παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη χημική σύσταση του εξωκυτταρικού πολυμερικού περιβλήματος (Di Martino, 2018). Επιπλέον, η συγκεκριμένη μέθοδος έχει χρησιμοποιηθεί και για τη σύγκριση κυττάρων βιοϋμενίου με πλαγκτονικά (Quilès et al., 2010).

Η φασματοσκοπία υπερύθρου είναι μια τεχνική που βασίζεται στη χρήση της υπέρυθρης ακτινοβολίας (IR), το βασικό χαρακτηριστικό της οποίας είναι ότι προέρχεται από τη θερμική εκπομπή κατάλληλης, θερμής, πηγής (Alvarez-Ordóñez et al., 2011; Naumann, 2006). Τα φάσματα υπερύθρων των περισσότερων υλικών αποτελούνται από μεγάλο αριθμό ζωνών



απορρόφησης. Αυτές οι ζώνες προέρχονται από την αλληλεπίδραση (ανταλλαγή ενέργειας) μεταξύ διακριτών κβάντων φωτός και κινήσεων (δόνησης και περιστροφής) των μορίων που διεγείρονται από την απορρόφηση της υπέρυθρης ακτινοβολίας (Alvarez-Ordóñez et al., 2011; Naumann, 2006). Η απορρόφηση της υπεριώδους ακτινοβολίας διεγείρει τα ηλεκτρόνια στους δεσμούς σε υψηλότερη κατάσταση δόνησης, προκαλώντας δονήσεις κάμψης ή παραμορφώσεως των μοριακών δεσμών (Valand et al., 2020). Με τον τρόπο αυτό, απορροφάται ενέργεια σε συχνότητες που αντιστοιχούν στον τρόπο δόνησης του αντίστοιχου μορίου ή της χημικής ομάδας (Alvarez-Ordóñez et al., 2011). Ένα μόριο θα απορροφά την υπεριώδη ακτινοβολία μόνο εάν η απορρόφηση του συγκεκριμένου κυματαριθμού προκαλεί αλλαγή στις καταστάσεις ηρεμίας ή διέγερσης. Σε ένα τυπικό βιολογικό δείγμα τα συστατικά υπάρχουν σε μια συμπυκνωμένη φάση (στερεά, υγρά ή διαλύματα) και έτσι παρατηρούνται μόνο κινήσεις δόνησης (Naumann, 2006). Κατά συνέπεια, τα φάσματα της υπέρυθρης ακτινοβολίας των βιολογικών δειγμάτων είναι μόνο φάσματα δόνησης. Η μονάδα του κυματαριθμού είναι το αντιστρόφως ανάλογο του εκατοστόμετρου ( $\text{cm}^{-1}$ ) (Naumann, 2006; Valand et al., 2020).

Στη Φασματοσκοπία Υπερύθρου με Μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy - FTIR), η υπέρυθρη ακτινοβολία εκπέμπεται από μια πηγή και περνά μέσω του ιντερφερομέτρου Michelson στο δείγμα. Το ιντερφερόμετρο αποτελείται από μια πηγή φωτός, έναν ημι-ανακλαστήρα και δύο κάθετους καθρέφτες, ένα στατικό και ένα κινούμενο. Στο πρώτο μέρος του ιντερφερομέτρου, η δέσμη φωτός διαχωρίζεται μεταδίδοντας το ένα μισό και αντανακλώντας το άλλο. Αυτές οι διαχωρισμένες ακτίνες αντανακλούνται από τους δύο καθρέφτες, τον σταθερό και τον κινούμενο, πίσω στον δέκτη, όπου ανασυνδυάζονται και σχηματίζουν παρεμβολές. Το παραγόμενο «ιντερφερόγραμμα» μετρά την αλλαγή στην ένταση της ακτινοβολίας. Στον υπολογιστή πραγματοποιείται ο μετασχηματισμός Fourier και το ιντερφερόγραμμα μετατρέπεται σε φάσμα (Basalekou et al., 2020). Η παραπάνω διαδικασία απεικονίζεται στην Εικόνα 1.2. Το φάσμα είναι μια γραφική παράσταση της μετρούμενης έντασης IR (υπερύθρου φάσματος) έναντι του μήκους κύματος του φωτός που εμφανίζεται με φθίνουσα σειρά των κυματαριθμών και μετράται σε  $\text{cm}^{-1}$ . Οι κορυφές του φάσματος ονομάζονται ζώνες απορρόφησης και αντιστοιχούν σε διαφορετικούς τύπους δεσμών, ειδικά για τις δονήσεις των ατόμων του δείγματος (Basalekou et al., 2020; Valand et al., 2020).



**Εικόνα 1.2:** Σχηματική απεικόνιση «εγκατάστασης» FTIR και ιντερφερόμετρου Michelson (Basalekou et al., 2020).

Η υπέρυθη φασματοσκοπία με μετασχηματισμό Fourier (FTIR) είναι μια καλά εδραιωμένη εναλλακτική λύση αντί των παραδοσιακών μεθόδων ανάλυσης η οποία εφαρμόζεται στην μικροβιολογία και την τεχνολογία τροφίμων (Rodríguez-Saona and Allendorf, 2011). Πρόκειται για μια σύγχρονη μέθοδο μικροβιακής ανάλυσης η οποία είναι γρήγορη, υψηλής απόδοσης, μη καταστρεπτική και αφορά ένα μεγάλο φάσμα τύπων δειγμάτων. Απαιτεί μικρή προετοιμασία δείγματος και ελαχιστοποιείται η χρήση επικίνδυνων διαλυτών. Έχει χαμηλό λειτουργικό κόστος, ευκολία στη χρήση και δεν απαιτείται εκπαίδευση για τη λειτουργία της. Αυτά τα πλεονεκτήματα έχουν ως αποτέλεσμα την εξοικονόμηση χρόνου και κόστους και ταυτόχρονα την αύξηση του αριθμού των δειγμάτων που μπορούν να αναλυθούν (Rodríguez-Saona and Allendorf, 2011). Η υπέρυθη φασματοσκοπία με μετασχηματισμό Fourier, παρέχει ένα χαρακτηριστικό δακτυλικό αποτύπωμα των χημικών ή βιοχημικών ουσιών που υπάρχουν στο δείγμα (Basalekou et al., 2020; Rodríguez-Saona and Allendorf, 2011; Valand et al., 2020). Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διάκριση, την ταξινόμηση, τον ποσοτικό προσδιορισμό και την ταυτοποίηση βιολογικών συστημάτων (Rodríguez-Saona and Allendorf, 2011). Έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς στην μικροβιολογία για την αναγνώριση και τον χαρακτηρισμό βακτηρίων, ζυμών, μυκήτων και φυκών (Alvarez-Ordóñez et al., 2011). Συνεπώς, η φασματοσκοπία FTIR μπορεί να παρέχει στη βιομηχανία τροφίμων και ποτών γρήγορα και ειδικά εργαλεία για την αξιολόγηση της ποιότητας και της ασφάλειας. Η

ταχύτητα της δίνει την ευκαιρία για την εφαρμογή έγκαιρων διορθωτικών μέτρων κατά την παραγωγή (Rodriguez-Saona and Allendorf, 2011). Συμπερασματικά, σύμφωνα με τα παραπάνω, η φασματοσκοπία FTIR είναι ένα πολύτιμο εργαλείο στην ανάλυση του κρασιού. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον εντοπισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό των βασικών ενώσεων του, για την ταξινόμηση και την παρακολούθηση της διαδικασίας ζύμωσης ή ωρίμανσης του (Basalekou et al., 2020).

Η φασματοσκοπία FTIR μπορεί να εντοπίσει διαφοροποιήσεις στις φασματικές μετρήσεις που προέρχονται είτε από μεταβολική αλλαγή ή απλώς από αλλαγές στις περιβαλλοντικές φυσικοχημικές συνθήκες με άμεση εφαρμογή στη μελέτη βιοϋμενίων (Quilès et al., 2010; Tugarova et al., 2017). Τα κύτταρα που προέρχονται από το βιοϋμένιο παρουσιάζουν διαφορετικό φαινότυπο από τα πλαγκτονικά κύτταρα. Ο φαινότυπος δεν είναι μόνο διαφορετικός μεταξύ βιοϋμενίου και πλαγκτονικών κυττάρων αλλά αλλάζει και μεταξύ των σταδίων της δημιουργίας του βιοϋμενίου (Quilès et al., 2010). Για τον λόγο αυτό, μπορεί να είναι χρήσιμη στην αποσαφήνιση πιθανών αλλαγών μοριακών, δομικών και σε επίπεδο σύστασης που συνοδεύουν τον μετασχηματισμό πλαγκτονικών κυττάρων σε κύτταρα βιοϋμενίου αλλά και για τη λήψη πληροφοριών σχετικά με τη φυσικοχημική κατάσταση των βιοϋμενίων και για τη σύνθεση των μακροσυστατικών τους (Quilès et al., 2010; Tugarova et al., 2017).

#### **1.4. Βιοϋμένια στη βιομηχανία τροφίμων και ποτών**

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία στο κομμάτι της μικροβιολογίας τροφίμων, η έρευνα γύρω από τα βιοϋμένια εστιάζει κατά κύριο λόγο στη μελέτη παθογόνων μικροοργανισμών που μεταδίδονται μέσω των τροφίμων, ενώ δεν δίνεται η απαραίτητη προσοχή στη προσκόλληση και στην ικανότητα δημιουργίας βιοϋμενίων από αλλοιογόνους μικροοργανισμούς. Παρ'όλα αυτά, η δημιουργία βιοϋμενίων από αλλοιογόνους μικροοργανισμούς μπορεί να έχει σημαντικές οικονομικές συνέπειες στην βιομηχανία τροφίμων και ποτών τόσο εξαιτίας της αλλοίωσης του προϊόντος όσο και της «καταστροφής» του εξοπλισμού (Lianou et al., 2020). Ταυτόχρονα η δυνατότητα σχηματισμού βιοϋμενίων από τις ζύμες μελετάται λιγότερο συγκριτικά με αυτή των βακτηρίων (Lianou et al., 2020) και ιδιαίτερα σε επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων και την απομάκρυνση τους από αυτές (Wirtanen and Salo, 2016). Όμως πάρα την τεχνολογική τους αξία και την διαδεδομένη χρήση τους στις ζυμώσεις, οι ζύμες μπορούν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στην υποβάθμιση προϊόντων και να δράσουν ως αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί. Επιπλέον οι ερευνητικές μελέτες που αξιολογούν

το σχηματισμό βιοϋμενίου σε σχέση με τη μεταβλητότητα του στελέχους είναι σχετικά λίγες σε σύγκριση με αυτές που αξιολογούν άλλους παράγοντες όπως για παράδειγμα η αντίσταση του βιοϋμενίου σε αντίξοες συνθήκες. Μάλιστα οι περισσότερες από αυτές αφορούν παθογόνους μικροοργανισμούς και τα διαθέσιμα ερευνητικά δεδομένα μεταβλητότητας εντός των ειδών σε ζύμες είναι επίσης σπάνια (Lianou et al., 2020).

Η δημιουργία βιοϋμενίων συμβαίνει υπό κατάλληλες συνθήκες σε αβιοτικές και βιοτικές επιφάνειες και επηρεάζεται από ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες (Dourou et al., 2011). Η ικανότητα των κυττάρων να προσκολλούνται και να αναπτύσσουν βιοϋμένια εξαρτάται από την φάση ανάπτυξης, το γένος, το είδος, την προέλευση των στελεχών (για παράδειγμα απομόνωση από τρόφιμα ή εργαστηριακό στέλεχος), την παραγωγή EPS, τις φυσικοχημικές ιδιότητες (υδροφοβικότητα και επιφανειακό φορτίο), την έκθεση σε στρεσογόνες συνθήκες (για παράδειγμα αντιμικροβιακοί παράγοντες) και μεταλλάξεις σε γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που σχετίζονται με τα βιοϋμένια. Εξαρτάται επίσης από την διαθεσιμότητα θρεπτικών ουσιών, τη θερμοκρασία, την οξύτητα, το ιξώδες, την αλατότητα, τη σύνθεση του μέσου, την ατμόσφαιρα, την ύπαρξη διαθέσιμου νερού ή υγρασίας, τις ιδιότητες της επιφάνειας επαφής, την ύπαρξη αντιμικροβιακών παραγόντων και την επικοινωνία μεταξύ κυττάρων (Dourou et al., 2011; Iñiguez-Moreno et al., 2019; Korber et al., 2009; Wirtanen and Salo, 2016). Η θερμοκρασία, το pH και η σύνθεση του μέσου είναι τα πιο σημαντικά για τη μετατροπή των πλαγκτονικών σε κύτταρα βιοϋμενίου (Speranza et al., 2020). Τα βιοϋμένια μπορούν να σχηματιστούν στην επιφάνεια ανοξειδωτού ατσαλιού, αλουμινίου, γυαλιού, ξύλου, νιτριλίου (Buna-N), PTFE (Teflon) και νάιλον. Οι λείες επιφάνειες, καθαρίζονται ευκολότερα από επιφάνειες οι οποίες έχουν ρωγμές (Joseph et al., 2007).

Με τη χρήση πολλαπλών μεθόδων ελέγχου, μπορεί να επιτευχθούν συνεργιστικά ανασταλτικά αποτελέσματα, μια στρατηγική που ονομάζεται «τεχνολογία εμποδίων» (hurdle technology) (Edwards & Oswald, 2018). Οι φυσικές ιδιότητες των βιοϋμενίων καθιστούν τα κύτταρα δύσκολο να απομακρυνθούν από τις επιφάνειες και παρουσιάζουν φυσική και χημική αντοχή. Όσον αφορά την αντοχή έναντι σε αντιμικροβιακούς παράγοντες, είναι σημαντικό να βρεθεί ο κατάλληλος παράγοντας για κάθε μικροοργανισμό, διότι διαφορετικοί αντιμικροβιακοί παράγοντες έχουν διαφορετικές χημικές ιδιότητες, και συνεπώς έχουν διαφορετικά αποτελέσματα (Carpentier, 2014; Korber et al., 2009). Σημαντικό είναι όμως να αναφερθεί ότι ακόμα και όταν τα κύτταρα εντός του βιοϋμενίου θανατώνονται, εξακολουθούν να παρέχουν ένα σταθερό περιβάλλον για μικροβιακή ανάπτυξη, τροφοδοτώντας με θρεπτικά συστατικά και επιφάνεια για προσκόλληση (Joseph et al., 2007).

Στο περιβάλλον παραγωγής και επεξεργασίας τροφίμων και ποτών, τα βιοϋμένια αποτελούνται συνήθως από δύο ή περισσότερα είδη μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων ενεργών ή αδρανών κυττάρων. Όπως σε κάθε περιβάλλον, και στα βιοϋμένια υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ των μικροοργανισμών. Πιθανώς να υπάρχει αμοιβαία «ενθάρρυνση» των ωφέλιμων ειδών και αναστολή των υπολοίπων, από τα είδη που διαμόρφωσαν πρώτα το βιοϋμένιο. Η παρουσία μιας μικτής μικροβιακής «κοινότητας» προσθέτει επιπλέον πολυπλοκότητα στην προσκόλληση και στον σχηματισμό των βιοϋμενίων (Butzke et al., 2010; Speranza et al., 2020; Wirtanen & Salo, 2016). Οι αλληλεπιδράσεις και η επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων διαδραματίζουν βασικό ρόλο στην αρχική προσκόλληση τους, στην ανάπτυξη και τη δομή του βιοϋμενίου, στην διασπορά, αλλά και στην ανθεκτικότητα του βιοϋμενίου κατά των αντιμικροβιακών παραγόντων. Τα βιοϋμένια μεικτών ειδών είναι συνήθως πιο σταθερά από αυτά που αποτελούνται από ένα είδος (Giaouris et al., 2013).

### **1.5. Οι μικροοργανισμοί του οίνου**

Το κρασί, από τα αρχαία χρόνια αποτέλεσε μέρος της ζωής των ανθρώπων, τόσο στην διατροφή όσο και στον πολιτισμό τους. Η οινοποίηση είναι μια αρχαία τεχνική η οποία εξελίχθηκε και σταδιακά αναδείχθηκε σε κυρίαρχη επιχειρηματική δραστηριότητα, η οποία επηρεάζει σημαντικά την οικονομική ευημερία πολλών χωρών. Από τα παραδοσιακά μέχρι τα σύγχρονα οινοποιεία πραγματοποιείται η ζύμωση των σακχάρων των σταφυλιών ή άλλων φρούτων από τις ζύμες, η οποία οδηγεί στην παραγωγή αιθανόλης και κατά συνέπεια αλκοολούχων ποτών, όπως το κρασί. Το κρασί είναι το αποτέλεσμα μιας πολύπλοκης βιοχημικής διαδικασίας, η οποία ξεκινά με τη συγκομιδή των καρπών και συνεχίζεται με την εξαγωγή του χυμού των σταφυλιών (μούστος) μέσω της σύνθλιψης των καρπών. Ακολουθούν η αλκοολική και η μηλογαλακτική ζύμωση, η διαύγαση, το φιλτράρισμα, η ωρίμαση και ολοκληρώνεται με την εμφιάλωση, όπως παρουσιάζονται και στην Εικόνα 1.3 (Walker, 2014).



**Εικόνα 1.3:** Στάδια διαδικασίας οινοποίησης (<https://www.shutterstock.com/>).

Μεγάλο κομμάτι της επεξεργασίας πραγματοποιείται από μικροοργανισμούς και σημαντικό ρόλο παίζουν οι μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις, για τον λόγο αυτό απαιτείται τη χρήση των κατάλληλων μικροοργανισμών (Capozzi et al., 2015; Considine and Frankish, 2014; Pardo and Ferrer, 2019). Η κύρια φυσική πηγή μικροοργανισμών στο οινοποιείο είναι τα σταφύλια τα οποία στην επιφάνεια τους φέρουν ένα μικροβιακό φορτίο της τάξης των  $10^3$ - $10^5$  cfu /g (cfu=colony-forming unit). Η σύνθεση της μικροβιακής χλωρίδας αλλάζει καθώς αναπτύσσονται οι καρποί και εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις περιβαλλοντικές συνθήκες (θερμοκρασία, υγρασία) και από τις αμπελουργικές πρακτικές (χρήση φυτοφαρμάκων) (Capozzi et al., 2015; Considine & Frankish, 2014).

Η μικροβιακή μικροχλωρίδα του σταφυλιού αποτελείται από ζύμες, βακτήρια και μύκητες (Considine and Frankish, 2014; Walker, 2014). Παρόλο που στο σύνολο της η μικροχλωρίδα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη χημεία του κρασιού, οι ζύμες έχουν τον κυρίαρχο λόγο διότι πραγματοποιούν την αλκοολική ζύμωση. Ο πληθυσμός των ζυμών στην επιφάνεια των σταφυλιών κυμαίνεται μεταξύ  $10^4$ - $10^6$  cfu/g (Mas et al., 2016). Στις ζύμες που βρίσκονται στην επιφάνεια των σταφυλιών περιλαμβάνονται είδη των γενών *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Candida*, *Metschnikowia*, *Cryptococcus*, *Pichia*, *Dekkera*, *Torulaspora*, *Saccharomycodes*, *Zygosaccharomyces*, *Schizosaccharomyces* και *Kluyveromyces* (Capozzi et al., 2015; Considine and Frankish, 2014; Walker, 2014). Σε αυτό το στάδιο το είδος που είναι υπεύθυνο για την αλκοολική ζύμωση, ο *Saccharomyces cerevisiae*, βρίσκεται σε μικρούς πληθυσμούς (Mas et al., 2016). Όσον αφορά τα βακτήρια, στην επιφάνεια των σταφυλιών συναντώνται γαλακτικά βακτήρια που ανήκουν στα γένη *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*,

*Oenococcus* και οξικά βακτήρια που ανήκουν στα γένη *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter* και *Acetobacter* (Considine and Frankish, 2014; Walker, 2014). Τέλος, μύκητες που βρίσκονται στην επιφάνεια των σταφυλιών ανήκουν στα γένη *Botrytis*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Uncinula* και *Cladosporium* αλλά πρέπει να αναφερθεί ότι δεν λαμβάνουν μέρος στη διαδικασία της οινοποίησης (Walker, 2014).

### 1.5.1. Οι ζύμες του οίνου

Η διαδικασία της οινοποίησης περιλαμβάνει ένα ευρύ φάσμα μικροοργανισμών με διαφορετικό ρόλο στην ποιότητα του τελικού προϊόντος, άλλοι είναι ωφέλιμοι και άλλοι επιζήμιοι στην ποιότητα του κρασιού (Smith and Divol, 2016). Η μικροχλωρίδα των σταφυλιών μεταβάλλεται στα διαφορετικά στάδια της οινοποίησης. Μετά τη συγκομιδή, τη μεταφορά και τη σύνθλιψη των σταφυλιών, η μικροχλωρίδα του μούστου είναι παρόμοια με αυτή της επιφάνειας των σταφυλιών. Στη συνέχεια, αρχίζει να αναπτύσσεται ο *S. cerevisiae* και συνυπάρχει με τα υπόλοιπα είδη ζυμών. Καθώς αυξάνεται ο πληθυσμός των κυττάρων του αυξάνεται και η παραγόμενη αιθανόλη (Bovo et al., 2018; Carozzi et al., 2015; Mas et al., 2016; Stewart, 2014). Η αλκοολική ζύμωση ξεκινά με ζύμες που δεν ανήκουν στο γένος *Saccharomyces* αλλά στη πορεία πραγματοποιείται κυρίως από στελέχη του *S. cerevisiae*, τα οποία είναι ανθεκτικά σε υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης (> 15% v/v). Αντίθετα οι ζύμες που δεν ανήκουν στο γένος αυτό, οι λεγόμενες «άγριες ζύμες», συνήθως δεν είναι ανθεκτικές σε υψηλές ποσότητες αιθανόλης με αποτέλεσμα να μην επιβιώνουν όταν η συγκέντρωση της παραγόμενης αιθανόλης φτάσει στο 5% v/v, κάτι το οποίο συμβαίνει 4-10 μέρες μετά την έναρξη της ζύμωσης (Walker, 2014). Συνεπώς, ο *S. cerevisiae* σύντομα ξεπερνά σε πληθυσμό τις υπόλοιπες ζύμες, φτάνει σε πληθυσμό έως και  $10^8$  κύτταρα / ml και γίνεται το κυρίαρχο είδος της αλκοολικής ζύμωσης μέχρι και το τέλος της (Bovo et al., 2018; Carozzi et al., 2015; Considine and Frankish, 2014; Mas et al., 2016; Stewart, 2014). Παρόλο που η ζύμωση θα μπορούσε να ξεκινήσει από τις γηγενείς ζύμες, στα σύγχρονα οινοποιεία χρησιμοποιούνται ειδικά επιλεγμένες καλλιέργειες εκκίνησης του *S. cerevisiae*, κάτι το οποίο διασφαλίζει το επιθυμητό οργανοληπτικό αποτέλεσμα στον παραγόμενο οίνο. Οι καλλιέργειες εκκίνησης εμβολιάζονται στον μούστο σε πληθυσμό  $10^6$ - $10^7$  κύτταρα / ml για να διασφαλιστεί η υπεροχή των επιλεγμένων αυτών στελεχών στη διάρκεια της ζύμωσης (Carozzi et al., 2015; Considine and Frankish, 2014; Stewart, 2014; Walker, 2014).

Η πιο σημαντική ζύμη αλλοίωσης του κρασιού, και πιο συγκεκριμένα του κόκκινου, είναι το είδος *Brettanomyces bruxellensis*, η οποία εξετάστηκε και στην παρούσα μελέτη. Χαρακτηρίζεται από την ικανότητα του να παράγει ενώσεις που αλλάζουν το οργανοληπτικό

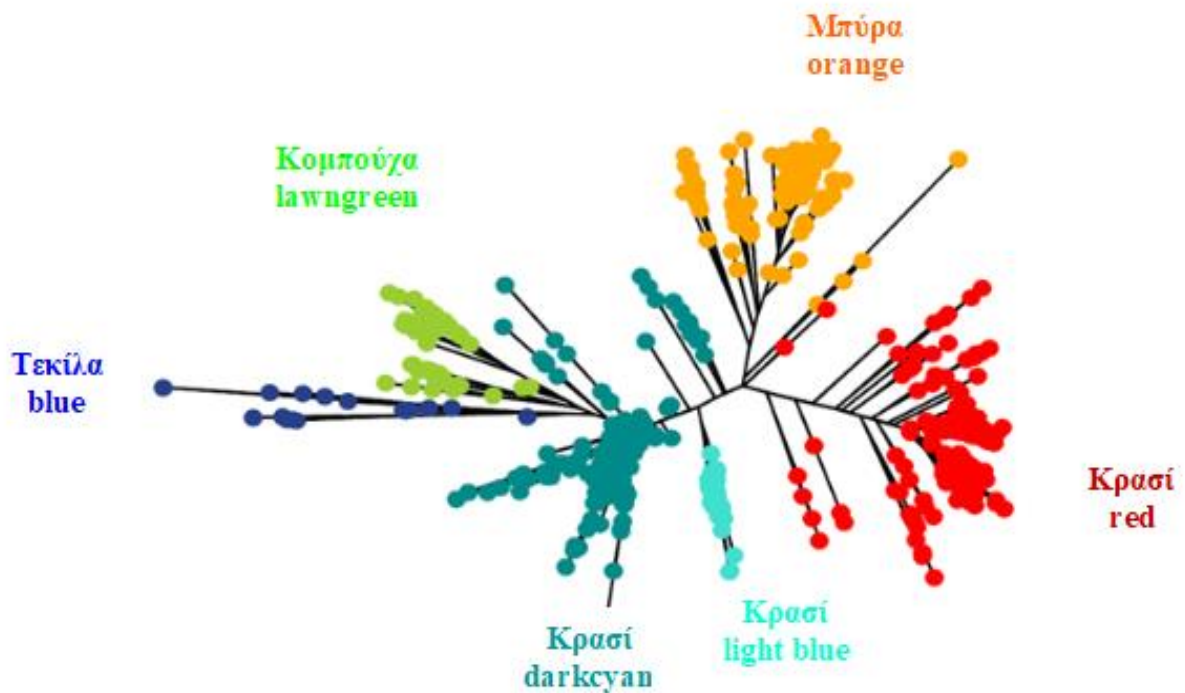
προφίλ του κρασιού (Agnolucci et al., 2017; Ciani and Comitini, 2014; Fleet, 2011; Smith and Divol, 2016).

#### **1.5.1.1. *Brettanomyces bruxellensis***

Η ταξινόμηση της ζύμης *Brettanomyces* αποτέλεσε αντικείμενο συζήτησης από την πρώτη περιγραφή της και υπήρξαν πολλές αναταξινόμήσεις τα τελευταία χρόνια (Steensels et al., 2015). Η τρέχουσα ταξινόμηση περιλαμβάνει δύο γένη, το γένος *Dekkera* και το γένος *Brettanomyces*. Το γένος *Dekkera* είναι τελομορφικός ασκομύκητας, δηλαδή αναπαράγεται εγγενώς και εκεί ανήκουν δύο είδη, το *Dekkera anomala*, το οποίο περιγράφηκε από τους Smith και van Grinsven το 1984 (αναμορφικό είδος το *Brettanomyces anomalus*, το οποίο περιγράφηκε από τον Custers το 1940) και το είδος *Dekkera bruxellensis*, το οποίο περιγράφηκε από τον van der Walt το 1964 (αναμορφικό είδος το *Brettanomyces bruxellensis*, το οποίο περιγράφηκε από τους Kufferath και van Laer το 1961). Το γένος *Brettanomyces* το οποίο είναι το μη σποριογόνο αναμορφικό ομόλογο / αντίστοιχο του *Dekkera*, το οποίο αναπαράγεται αγενώς περιλαμβάνει τρία είδη, το *Brettanomyces custersianus* (van der Walt, 1961), το *Brettanomyces naardenensis* (Kolfshoten και Yarrow, 1970) και *Brettanomyces nanus* (Smith, Boekhout, Kurtzman και O'Donnel 1994) (Agnolucci et al., 2017; Ciani and Comitini, 2014; Steensels et al., 2015). Το *Brettanomyces* ονομάστηκε έτσι λόγω της στενής σύνδεσής του με τη βρετανική βιομηχανία ζυθοποιίας. Η λέξη προέρχεται από τις ελληνικές λέξεις βρετανός και μύκητας (Pinto et al., 2020; Smith & Divol, 2016; Wedral et al., 2010). Το είδος *B. bruxellensis* απομονώνεται από το κρασί και από άλλες πηγές όπως τεκίλα, μπύρα, μηλίτη, χυμούς φρούτων, κεφίρ και ελιές (Agnolucci et al., 2017; Avramova et al., 2018; Smith and Divol, 2016; Wedral et al., 2010).

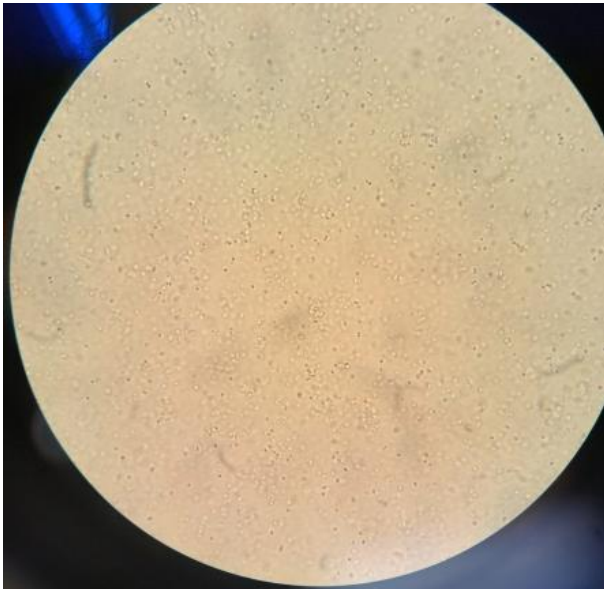
Πρόσφατα, με την αλληλούχιση του γονιδιώματος του *B. bruxellensis*, αποδείχθηκε ότι υπάρχει μεγάλη γονοτυπική ποικιλομορφία μεταξύ των στελεχών του είδους καθώς και των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών που εξαρτώνται από το στέλεχος (Avramova et al., 2018; Dimopoulou et al., 2019b). Με βάση τη μέθοδο των μικροδορυφόρων γονοτυπήθηκαν πολλές απομονωμένες αποικίες προερχόμενες και από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές και από διαφορετικά υποστρώματα (μπύρα, κρασί, μηλίτης, βιοαιθανόλη, kombucha) (Εικόνα 1.4). Η ανάλυση αυτή έδειξε τρεις κύριες γενετικές ομάδες και τρεις υπο-ομάδες που σχετίζονται με το επίπεδο ploidy των στελεχών και τα υποστρώματα απομόνωσης (Avramova et al., 2018; Dimopoulou et al., 2019b).



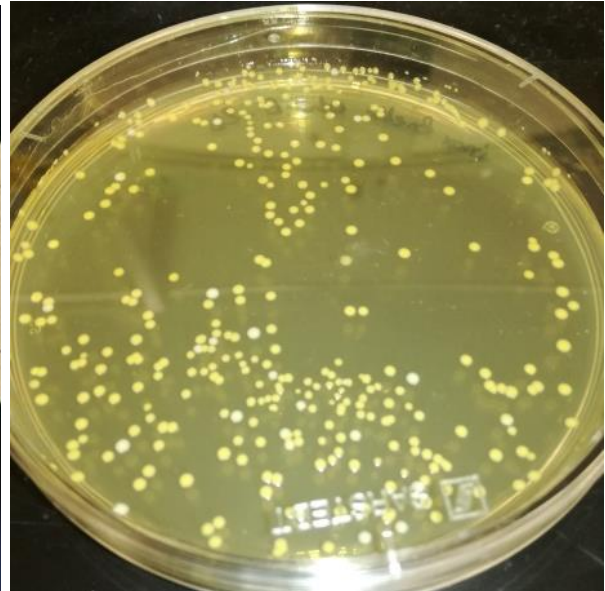


**Εικόνα 1.4:** Δενδρόγραμμα του *B. bruxellensis*. Φαίνονται έξι γενετικές ομάδες οι οποίες παρουσιάζονται με διαφορετικά χρώματα (Avramova et al., 2018).

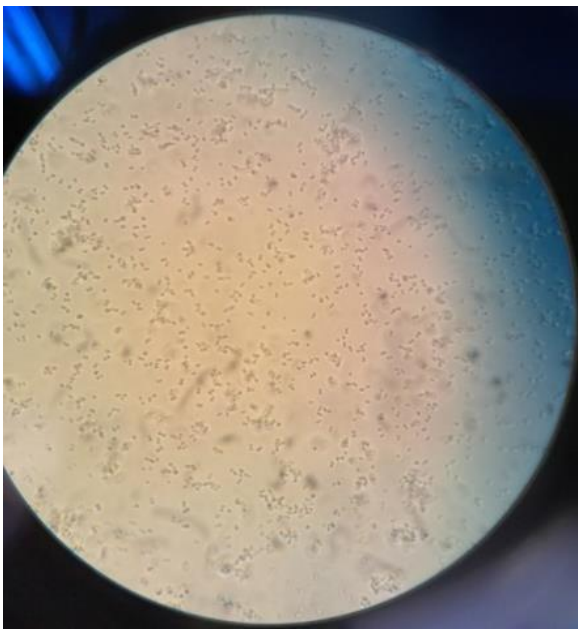
Τα κύτταρα του *B. bruxellensis* εμφανίζουν παραλλακτικότητα, είναι σφαιροειδή, ελλειψοειδή ή επιμήκη και μπορεί να σχηματίσουν ψευδομυκήλια (Smith, 2011) (Εικόνα 1.5, 1.6, 1.7, 1.8). Το είδος έχει αργή ανάπτυξη. Είναι ανθεκτικό και αναπτύσσεται σε περιβάλλον με υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης (έως 14,5-15% v/v), χαμηλό pH, διοξείδιο του άνθρακα ( $\text{CO}_2$ ), μειωμένα θρεπτικά συστατικά (σάκχαρα κάτω από 300 mg/l), χαμηλούς ρυθμούς μεταφοράς οξυγόνου (μικρότεροι από  $24 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) και οσμωτικό στρες (Agnolucci et al., 2017; Ciani and Comitini, 2014; Pinto et al., 2020). Έχει επιπλέον ανθεκτικότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις θειώδους ανυδρίτη ( $\text{SO}_2$ ) και στο κυκλοεξαμίδιο. Αναπτύσσεται ιδανικά σε θερμοκρασίες 25-28°C. Η παρουσία αιθανόλης και η περιορισμένη διαθεσιμότητα σακχάρου φαίνεται να έχουν σημαντικό ρόλο στην ικανότητά του να ανταγωνίζεται άλλους μικροοργανισμούς (Ciani and Comitini, 2014). Μπορεί να επιβιώσει σε όλες τις επιφάνειες του οινοποιείου όπως για παράδειγμα στους τοίχους, στις πρέσες, στις δεξαμενές ζύμωσης καθώς και μέσα στους πόρους του ξύλου των βαρελιών που χρησιμοποιούνται για την ωρίμανση του κρασιού (Smith and Divol, 2016).



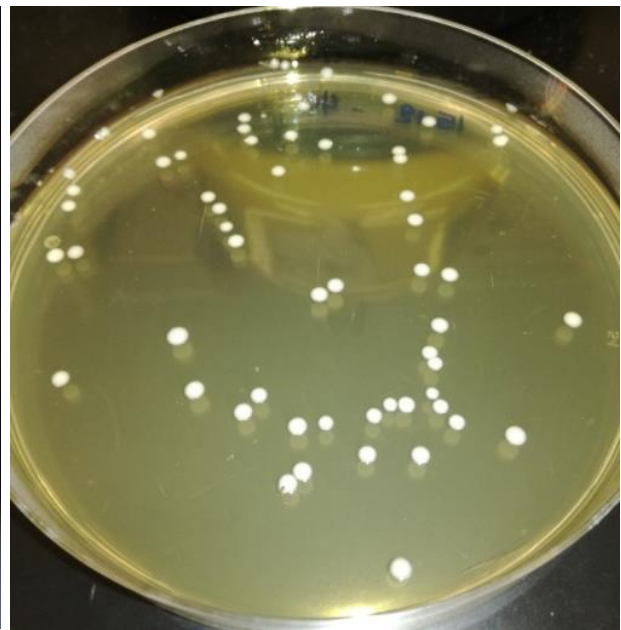
**Εικόνα 1.5:** Κύτταρα *B. bruxellensis* στέλεχος 33.1 στο μικροσκόπιο (φακός 100x).



**Εικόνα 1.6:** Κύτταρα *B. bruxellensis* στέλεχος 33.1 σε τρυβλίο με θρεπτικό υλικό YPD.



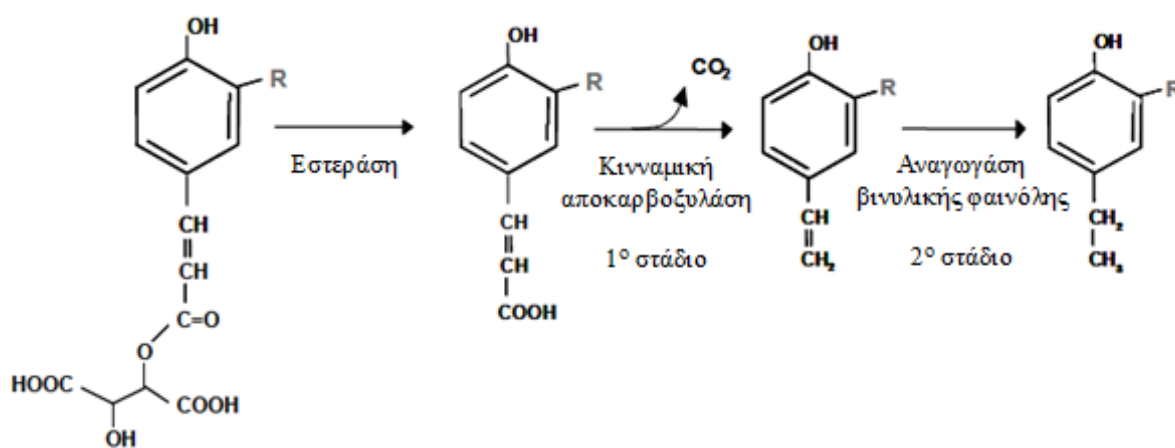
**Εικόνα 1.7:** Κύτταρα *B. bruxellensis* στέλεχος 15.12 στο μικροσκόπιο (φακός 40x).



**Εικόνα 1.8:** Κύτταρα *B. bruxellensis* στέλεχος 15.12 σε τρυβλίο με θρεπτικό υλικό YPD.

Μπορεί να μεταβολίσει μια ποικιλία σακχάρων και παράγει αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα (CO<sub>2</sub>) (Longin et al., 2016). Μια σημαντική μεταβολική δράση του *B. bruxellensis* είναι η παραγωγή ανεπιθύμητων ενώσεων, όπως πτητικών φαινολών (αιθυλφαινολών) και τετραϋδροπυριδινών, των N-ετεροκυκλικών ενώσεων. Τα περισσότερα στελέχη ίσως και όλα στις σωστές συνθήκες, παράγουν 4-αιθυλφαινόλη (4EP), 4-αιθυλγκουαιακόλη (4EG) και 4-αιθυλκατεχόλη (4EC) (Agnolucci et al., 2017; Butzke et al., 2010; Ciani and Comitini, 2014;

Malfeito-Ferreira, 2014; Pinto et al., 2020; Smith and Divol, 2016; Smith, 2011; Steensels et al., 2015). Η παραγωγή πτητικών φαινολών πραγματοποιείται με την μετατροπή των υδροξυκινναμικών οξέων (π.χ. φερουλικό, π-κουμαρικό και καφεϊκό οξύ) που υπάρχουν φυσικά σε μούστους και κόκκινα κρασιά. Ο σχηματισμός των ενώσεων αυτών, πραγματοποιείται σε δύο στάδια, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.9. Στο πρώτο, τα υδροξυκινναμικά οξέα αποκαρβοξυλιώνονται από μια κινναμική αποκαρβοξυλάση και σχηματίζονται υδροξυτυρένια, 4-βινυλοφαινόλη από π-κουμαρικό οξύ και 4-βινυλογουαιακόλη από φερουλικό οξύ. Στο δεύτερο βήμα της αντίδρασης πραγματοποιείται η αναγωγή των παράγωγων βινυλίου σε 4-αιθυλφαινόλη, 4-αιθυλγκουαιακόλη και 4-αιθυλκατεχόλη με την αναγωγή της βινυλικής φαινόλης (Cibrario et al., 2020). Το δεύτερο βήμα αντίδρασης είναι αυτό που προκαλεί την μεγαλύτερη αλλοίωση στο κρασί, επειδή οι μορφές αιθυλίου παραμένουν ελεύθερες και πτητικές και ανιχνεύονται από τους καταναλωτές όταν η συγκέντρωσή τους υπερβαίνει τα 400 μg/l (Cibrario et al., 2020). Πολλοί από τους μικροοργανισμούς του οίνου μπορούν να πραγματοποιήσουν το πρώτο στάδιο της αντίδρασης. Όμως, πολύ λίγα είδη εκτός του *B. bruxellensis* είναι γνωστό ότι πραγματοποιούν το δεύτερο στάδιο της αντίδρασης. Μάλιστα από την βιβλιογραφία αναφέρεται ότι ίσως μόνο μερικά στελέχη του συγκεκριμένου μικροοργανισμού μπορούν «εκτελέσουν» το στάδιο αυτό (Cibrario et al., 2020).



Κινναμικό οξύ	Υδροξυκινναμικό οξύ	Υδροξυτυρένια	Παράγωγα αιθυλίου
R = H: π-κουμαρικό οξύ →	π-κουμαρικό οξύ →	4 βινυλοφαινόλη →	4-αιθυλοφαινόλη
R = OCH <sub>3</sub> : φερταρικό οξύ →	φερουλικό οξύ →	4 βινυλγκουαιακόλη →	4-αιθυλγκουαιακόλη
R = OH: καφταρικό οξύ →	καφεϊκό οξύ →	4 βινυλοφαινόλη →	4-αιθυλκατεχόλη

**Εικόνα 1.9:** Σχηματισμός πτητικών φαινολών μέσω της αποκαρβοξυλίωσης των υδροξυκινναμικών οξέων (Oelofse et al., 2016).

Οι ενώσεις αυτές σε χαμηλές συγκεντρώσεις μπορούν να συμβάλλουν στην πολυπλοκότητα του αρώματος του οίνου όμως σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από το όριο αντίληψης, επηρεάζουν αρνητικά το αισθητηριακό προφίλ του κρασιού και προκαλούν αλλοίωση και αυτό τις καθιστά ανεπιθύμητες (Agnolucci et al., 2017). Προσδίδουν μια χαρακτηριστική οσμή η οποία συχνά ορίζεται ως «χαρακτήρας Brett» ή «Brett effect» και είναι συχνότερο στα κόκκινα κρασιά. Περιγράφονται ως «φαρμακευτικές» στα λευκά κρασιά και «δέρμα», «ιδρώτας», «ζωικό», «στάβλος», «καπνιστό», «πικάντικο» στα κόκκινα κρασιά (Agnolucci et al., 2017; Ciani and Comitini, 2014; Cibrario et al., 2020; Fleet, 2011; Malfeito-Ferreira, 2014; Smith and Divol, 2016; Wedral et al., 2010). Ταυτόχρονα μειώνεται το φρουτώδες άρωμα και παρατηρείται θολότητα στο χρώμα του κρασιού ή ανεπιθύμητο χρώμα (Ciani and Comitini, 2014; Wedral et al., 2010). Αναφέρεται επίσης αλλοίωση στη γεύση και όχι μόνο στο αρωματικό προφίλ η οποία περιγράφεται ως «Mousy off flavours» (Smith and Divol, 2016; Steensels et al., 2015). Τα παραπάνω μεταβολικά χαρακτηριστικά μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά την ποιότητα του τελικού προϊόντος (Ciani and Comitini, 2014). Όσο πιο εκτεταμένη είναι η ανάπτυξη και όσο περισσότερα κύτταρα υπάρχουν στο κρασί, τόσο μεγαλύτερη είναι η επίδραση στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του κρασιού. Είναι αξιοσημείωτο ότι δεν παράγουν όλα τα στελέχη όλους τους χαρακτήρες και υπάρχει μεγάλη παραλλαγή στα επίπεδα και το φάσμα των χαρακτήρων που παράγονται. Είναι δύσκολο να προβλεφθεί η απόδοση ενός συγκεκριμένου στελέχους σε ένα συγκεκριμένο κρασί (Butzke et al., 2010). Η παραγωγή των ενώσεων αυτών επηρεάζεται από το στέλεχος του *B. bruxellensis*, την ποικιλία των σταφυλιών, τα χαρακτηριστικά του κρασιού, τη θερμοκρασία, το διαθέσιμο οξυγόνο, το pH του κρασιού, τη διαθεσιμότητα θρεπτικών ουσιών στο μούστο, το στάδιο της οινοποίησης στο οποίο συμβαίνει η μόλυνση, την παρουσία άλλων μεταβολιτών του είδους κ.α. (Butzke et al., 2010; Wedral et al., 2010).

Χαρακτηριστικό του είδους είναι ότι τα κύτταρα μπορούν να εισέλθουν σε μια βιώσιμη αλλά μη καλλιεργήσιμη κατάσταση (viable but not culturable - VBNC) (Agnolucci et al., 2017; Ciani and Comitini, 2014; Malfeito-Ferreira, 2014; Smith and Divol, 2016; Smith, 2011; Steensels et al., 2015). Η κατάσταση αυτή δίνει ψευδή εντύπωση ως προς την αποτελεσματικότητα των πρακτικών υγιεινής καθώς η μη ανίχνευση κυττάρων δεν συνεπάγεται αυτομάτως την απουσία τους (Butzke et al., 2010). Έτσι δύναται να αναπτυχθούν μελλοντικά, όταν οι συνθήκες του μέσου αλλάξουν και γίνουν ευνοϊκές και κατά συνέπεια να προκαλέσουν την αλλοίωση του τελικού προϊόντος (Ciani and Comitini, 2014). Η παραγωγή 4-βινυλφαινόλης (4VF) και 4-βινυλγουαιακόλης (4VG), που αποτελούν πρόδρομες ενώσεις των αιθυλφαινολών μπορεί να πραγματοποιηθεί επίσης από τα κύτταρα

που βρίσκονται σε βιώσιμη αλλά μη καλλιεργήσιμη κατάσταση και συνεπώς ακόμα και έτσι μπορούν να επηρεάσουν το αισθητηριακό προφίλ του κρασιού (Agnolucci et al., 2017). Επιπρόσθετα, ο *B. bruxellensis*, έχει την ικανότητα να σχηματίζει βιοϋμένιο σε τοιχώματα δεξαμενών, σε σωλήνες και σε άλλες επιφάνειες του οινοποιείου (Butzke et al., 2010; Smith and Divol, 2016; Vishwakarma, 2020). Πιο συγκεκριμένα το πρόβλημα εντοπίζεται στα ξύλινα βαρέλια στα οποία ωριμάζει το κόκκινο κρασί, καθώς το ξύλο είναι ένα εξαιρετικά πορώδες υλικό και δύσκολο να καθαριστεί (Malfeito-Ferreira, 2014). Τα βιοϋμένια είναι σχετικά ανθεκτικά σε χημικούς παράγοντες και απολυμαντικά (Carpentier, 2014).

Το είδος *B. bruxellensis* απομονώνεται συχνότερα από κόκκινα κρασιά παρά από λευκά, στα οποία εξαιτίας της υψηλής οξύτητας το διοξείδιο του θείου δρα πιο αποτελεσματικά (Malfeito-Ferreira, 2014; Wedral et al., 2010). Τα κόκκινα κρασιά είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στην αλλοίωση από *B. bruxellensis* λόγω της χαμηλότερης οξύτητάς τους, της υψηλότερης περιεκτικότητάς τους σε πολυφαινόλες και της ωρίμανσης τους σε ξύλινα βαρέλια (Wedral et al., 2010). Επιπλέον, ο μικροοργανισμός αυτός είναι ικανός να χρησιμοποιεί κυτταρίνη και άλλα υποστρώματα ξύλου και μπορεί αν βρεθεί σε βάθος μέχρι και 8 mm μέσα στο ξύλο των βαρελιών. Τα λευκά κρασιά λόγω της απουσίας προδρόμων ενώσεων δεν παρουσιάζουν τον «χαρακτήρα Brett» (Smith and Divol, 2016; Wedral et al., 2010). Ο πιο πιθανός τρόπος μετάδοσης της συγκεκριμένης ζύμης είναι μολυσμένα κρασιά και ξύλινα ή πλαστικά βαρέλια. Όταν αγοράζεται μολυσμένο κρασί, μπορεί να μολύνει ολόκληρο το οινοποιείο. Αντίστοιχα, με την αγορά μεταχειρισμένων βαρελιών κόκκινου κρασιού από άλλα οινοποιεία είναι πολύ πιθανό να υπάρξει επιμόλυνση *B. bruxellensis* (Butzke et al., 2010).

Ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός είναι παρών σε οποιοδήποτε στάδιο της οινοποίησης όμως είναι συνδεδεμένος κυρίως με τα στάδια της ωρίμανσης σε ξύλινα βαρέλια, με κολλημένες ή αργές αλκοολικές ζυμώσεις και το στάδιο της μηλογαλακτικής ζύμωσης εξαιτίας της αντοχής του σε χαμηλά σάκχαρα και υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης (Agnolucci et al., 2017; Ciani and Comitini, 2014; Malfeito-Ferreira, 2014; Wedral et al., 2010). Κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, η εξέλιξη του πληθυσμού *S. cerevisiae* δεν επηρεάζεται από την παρουσία του *B. bruxellensis*, οι πληθυσμοί του οποίου είναι χαμηλοί (Ciani and Comitini, 2014). Ωστόσο, προς το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης και στην αρχή της μηλογαλακτικής τα κύτταρα *S. cerevisiae* μειώνονται, ενώ τα κύτταρα του *B. bruxellensis* αναπτύσσονται λόγω της υψηλής αντοχής τους σε αιθανόλη και της ικανότητάς τους να αξιοποιούν τα εναπομείναντα θρεπτικά συστατικά (Agnolucci et al., 2017; Malfeito-Ferreira, 2014; Wedral et al., 2010). Επιπλέον, στο τέλος της ωρίμανσης και πριν από την εμφιάλωση, μπορούν να ανιχνευθούν πληθυσμοί του *B. bruxellensis* οι οποίοι σε περίπτωση που

αναπτυχθούν αργότερα θα αλλοιώσουν το κρασί κατά την αποθήκευση των φιαλών (Ciani and Comitini, 2014). Λόγω των παραπάνω χαρακτηριστικών, ο *B. bruxellensis* θεωρείται ο κύριος αλλοιογόνος μικροοργανισμός του κρασιού, ο οποίος μπορεί να επιφέρει σοβαρές οικονομικές συνέπειες στην οινοποίηση.

### 1.5.2. Τα γαλακτικά βακτήρια του οίνου

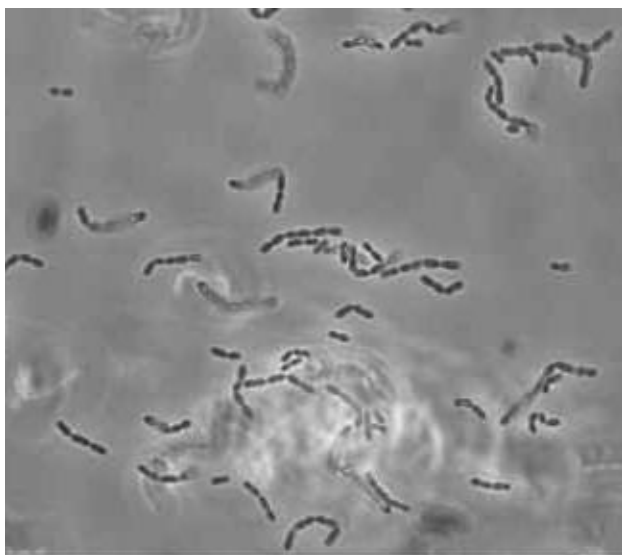
Τα οξυγαλακτικά βακτήρια αποτελούν μέρος της μικροχλωρίδας της επιφάνειας των σταφυλιών, και στον μούστο βρίσκονται σε πληθυσμό  $10^2$ - $10^4$  κύτταρα / ml (Considine and Frankish, 2014). Το βακτήριο *Oenococcus oeni* είναι ο κύριος μικροοργανισμός της μηλογαλακτικής ζύμωσης η οποία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην μείωση της οξύτητας του κρασιού, στην μικροβιακή σταθερότητα, στην γεύση και στο άρωμα του (Bartowsky, 2014; Considine and Frankish, 2014; Gil-Sánchez et al., 2019). Πραγματοποιείται κυρίως στα κόκκινα κρασιά αλλά και σε ορισμένα λευκά κρασιά. Πρόκειται για την ακρίβεια για μια αποκαρβοξυλίωση παρά για μια ζύμωση. Πιο συγκεκριμένα, το L-μηλικό οξύ μετατρέπεται σε L-γαλακτικό οξύ και παράγεται διοξείδιο του άνθρακα ( $\text{CO}_2$ ) (Bartowsky, 2014; Gil-Sánchez et al., 2019; Malfeito-Ferreira, 2014). Στη αρχή της αλκοολικής ζύμωσης το βακτήριο *O. oeni* αυξάνεται και φτάνει σε πληθυσμό τα  $10^5$  κύτταρα / ml. Στη συνέχεια μειώνεται σε  $10^2$ - $10^3$  κύτταρα / ml. Κατά την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης και αφού ο *S. cerevisiae* μειώνεται, τα οξυγαλακτικά βακτήρια αυξάνονται ξανά και όταν ο αριθμός τους φτάνει περίπου  $10^6$  κύτταρα / ml ή περισσότερο, ξεκινά η μηλογαλακτική ζύμωση. Ακόμη και κατά την ωρίμανση και την αποθήκευση, ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων εναλλάσσεται μεταξύ περιόδων ανάπτυξης και μείωσης που διαδέχονται η μια την άλλη ανάλογα με το είδος και το στέλεχος (Considine and Frankish, 2014). Η μηλογαλακτική ζύμωση μπορεί να πραγματοποιηθεί από τα γηγενή οξυγαλακτικά βακτήρια, παρόλα αυτά υπάρχουν και εμπορικά στελέχη τα οποία λειτουργούν ως εκκινητές (Malfeito-Ferreira, 2014).

#### 1.5.2.1. *Oenococcus oeni*

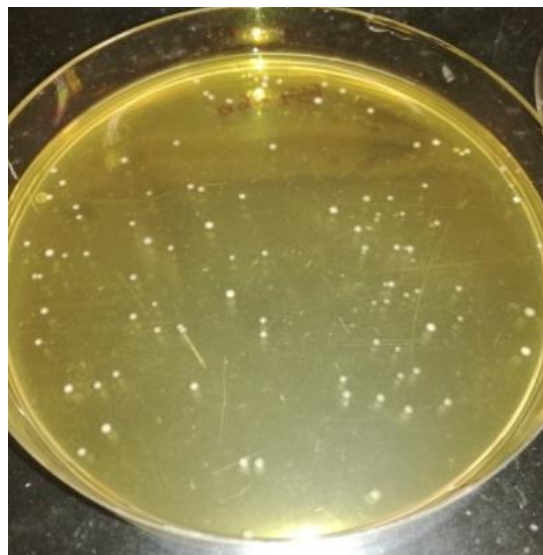
Το είδος *O. oeni* ανήκει στο γένος *Oenococcus*, στην οικογένεια Leuconostocaceae. Μέχρι το 1995 ήταν γνωστό ως *Leuconostoc oeni*. Δυο είδη που ανήκουν στο γένος, το *Oenococcus oeni* και το *Oenococcus kitaharae* (Lonvaud-Funel, 2014). Πρόκειται για οξυγαλακτικό βακτήριο και όπως προαναφέρθηκε, είναι ο κύριος μικροοργανισμός της μηλογαλακτικής ζύμωσης. Όλα τα γένη οξυγαλακτικών βακτηρίων που σχετίζονται με το κρασί είναι σε θέση να πραγματοποιήσουν μηλογαλακτική ζύμωση όμως μόνο το *Oenococcus* σχετίζεται με

θετικές ιδιότητες στο κρασί, ενώ τα είδη που ανήκουν στα υπόλοιπα γένη συνδέονται γενικά με την αλλοίωση του (Bartowsky, 2014; Considine and Frankish, 2014; Gil-Sánchez et al., 2019; Lonvaud-Funel, 2014).

Το βακτήριο *O. oeni* είναι κόκκος, μη σποριογόνο, θετικό κατά Gram βακτήριο, τα κύτταρα του οποίου είναι σφαιρικά και σε αλυσίδες (Bartowsky, 2014; Gil-Sánchez et al., 2019) (Εικόνα 1.10, 1.11). Έχει αργή ανάπτυξη και αναπτύσσεται σε αναερόβιες ή αερόβιες συνθήκες, είναι δηλαδή μικροαερόφιλος μικροοργανισμός (Bartowsky, 2014). Αυτό το είδος είναι καλά προσαρμοσμένο στο στρεσογόνο περιβάλλον του κρασιού, δηλαδή στα χαμηλά θρεπτικά συστατικά υψηλή οξύτητα (pH ίσο ή μικρότερο του 3,5), υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης, παρουσία διοξειδίου του θείου (SO<sub>2</sub>) και πολυφαινολών (Bartowsky, 2014; Dimopoulou et al., 2019b; Lonvaud-Funel, 2014). Είναι μεσόφιλος μικροοργανισμός δηλαδή αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες περίπου 20-30 °C αλλά είναι ανθεκτικός και σε χαμηλές θερμοκρασίες (Gil-Sánchez et al., 2019). Μεταβολίζει τη γλυκόζη από την οδό φωσφορικής πεντόζης και παράγει γαλακτικό οξύ, αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα (CO<sub>2</sub>). Επιπλέον με δεδομένο ότι πραγματοποιεί μηλογαλακτική ζύμωση, μεταβολίζει και το μηλικό οξύ ώστε να παράγει γαλακτικό οξύ και διοξείδιο του άνθρακα (CO<sub>2</sub>) (Bartowsky, 2014; Dimopoulou et al., 2018; Gil-Sánchez et al., 2019; Lonvaud-Funel, 2014).



**Εικόνα 1.10:** Κύτταρα *O. oeni* στο μικροσκόπιο (1000x).



**Εικόνα 1.11:** Κύτταρα *O. oeni* σε τρυβλίο με θρεπτικό υλικό MRS.

### 1.5.3. Μικροβιακή αλλοίωση οίνου και σχηματισμός βιοϋμενίου

Αλλοίωση προκαλούμενη από μικροοργανισμούς μπορεί να συμβεί σε οποιοδήποτε στάδιο σε όλη την αλυσίδα παραγωγής καθώς επιμόλυνση μπορεί να προκύψει από τα σταφύλια, από τον εξοπλισμό του οινοποιείου αλλά ακόμα και από έντομα. Πέρα από την μικροχλωρίδα της επιφάνειας των σταφυλιών, κατά τη συγκομιδή και μεταφορά τους στο οινοποιείο, μεταφέρονται μικροοργανισμοί οι οποίοι αποτελούν επιμολύνσεις και δεν έχουν προφανή ρόλο στην οινοποίηση (Malfeito-Ferreira, 2014). Οι μικροοργανισμοί αλλοίωσης του οίνου περιλαμβάνουν κυρίως οξυγαλακτικά και οξικά βακτήρια και ζύμες των γενών *Dekkera* / *Brettanomyces*, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Metschnikowia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* και *Zygosaccharomyces* (Considine and Frankish, 2014; Fleet, 2011; Malfeito-Ferreira, 2014).

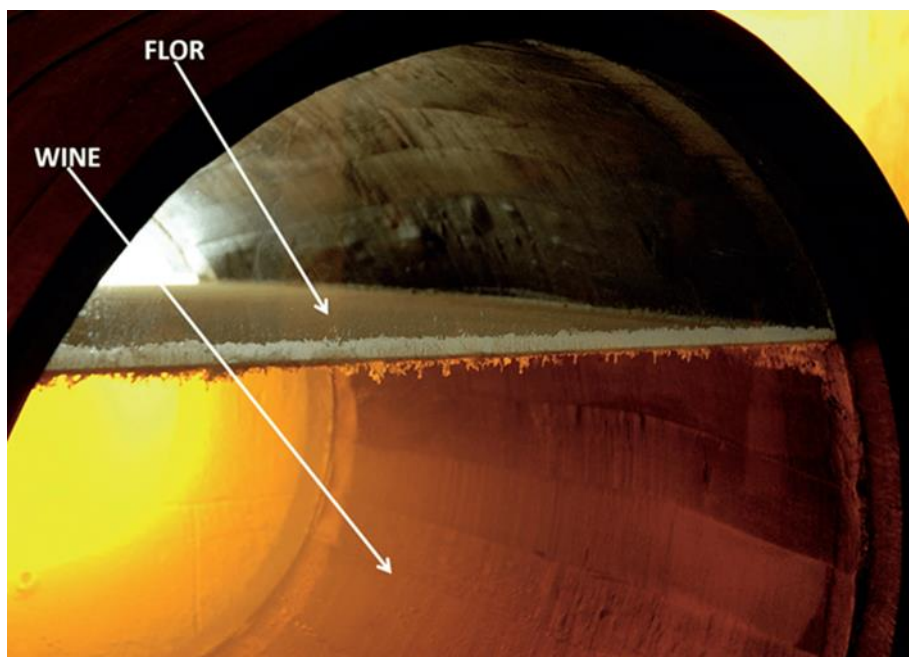
Τα συνηθισμένα φαινόμενα αλλοίωσης είναι ο σχηματισμός βιοϋμενίου, η θολότητα, ιζήματα και παραγωγή αερίου σε εμφιαλωμένα κρασιά και η αλλαγή σε οσμή και γεύση (Malfeito-Ferreira, 2019). Είναι επίσης σημαντικό να σημειωθεί ότι η αλλοιογόνος δράση μπορεί να διαφέρει μεταξύ στελεχών που ανήκουν στο ίδιο είδος. Στελέχη σε ένα είδος μπορεί να είναι σημαντικοί παράγοντες αλλοίωσης, ενώ άλλα στελέχη μπορεί να μην είναι επιζήμια (Fleet, 2011). Οι συνέπειες της αλλοίωσης περιλαμβάνουν την οικονομική ζημιά για παράδειγμα λόγω απώλειας προϊόντος, κόστος καθαρισμού, κόστος ανάκλησης προϊόντος και αρνητικές επιπτώσεις στην φήμη της εταιρείας (Fleet, 2011; Malfeito-Ferreira, 2014). Συνήθως οι οινοποιοί ελέγχουν την μικροχλωρίδα με την προσθήκη καλλιεργειών εκκίνησης *S. cerevisiae* και *O. oeni* ή με οινολογικές πρακτικές όμως αυτό δεν εγγυάται ότι γηγενή είδη ή μικροοργανισμοί που έχουν προέλθει από διασταυρούμενη επιμόλυνση δεν θα αναπτυχθούν. Για τον λόγο αυτό είναι σημαντική η εφαρμογή των απαραίτητων μέτρων υγιεινής σε συνδυασμό με τη διατήρηση φυσικοχημικών συνθηκών που παρεμποδίζουν την ανάπτυξη μικροοργανισμών στα διάφορα στάδια της οινοποίησης προκειμένου να αποφευχθούν αλλοιώσεις στο τελικό προϊόν (Fleet, 2011; Hernández et al., 2018; Walker, 2014).

Ο σχηματισμός βιοϋμενίου στην βιομηχανία του οίνου ξεκινά κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ζύμωσης, όπου υπάρχουν μικροοργανισμοί στις δεξαμενές αποθήκευσης, στις αντλίες, στις βαλβίδες και στα πληρωτικά (Vishwakarma, 2020). Έχει μελετηθεί η δημιουργία βιοϋμενίων σε κρασί (Tristezza et al., 2010), χυμό σταφυλιού και μούστο (Bono et al., 2018) καθώς και σε μέσο που πλησιάζει στις ιδιότητες του κρασιού (Dimopoulou et al., 2019b; Joseph et al., 2007). Ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη των Bastard et al., 2016, όπου εξετάστηκε η υπόθεση τα κύτταρα του βακτηρίου *O. oeni* που προέρχονται από βιοϋμένιο, να



διατηρούν τις οινολογικές τους ιδιότητες και τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι το βιοϋμένιο ρυθμίζει το οργανοληπτικό προφίλ του κρασιού. Οι περισσότερες μελέτες σχηματισμού βιοϋμένιου επικεντρώνονται στο βακτήριο *O. oeni* (Bastard et al., 2016; Dimopoulou et al., 2018), στη ζύμη *S. cerevisiae* (Bovo et al., 2018; Speranza et al., 2020; Tristezza et al., 2010) και στη ζύμη *B. bruxellensis* (Dimopoulou et al., 2019b; Joseph et al., 2007; Lebleux et al., 2020; Tristezza et al., 2010).

Από την άλλη πλευρά τα βιοϋμένια μπορεί να είναι και ωφέλιμα, όπως στην περίπτωση της παραγωγής κρασιού τύπου Sherry (πχ Jerez-Xerez-Sherry, Ισπανία). Πιο συγκεκριμένα, είναι μια διαδικασία στην οποία κύτταρα του γένους *Saccharomyces*, αναπτύσσονται στην ελεύθερη επιφάνεια του οίνου. Αυτές οι ζύμες ονομάζονται «flor yeasts» (ζύμες άνθισης) και το σχηματιζόμενο βιοϋμένιο «velo de flor» (Εικόνα 1.12). Τα κύτταρα του βιοϋμένιου κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης έχουν συνεχή μεταβολική δραστηριότητα η οποία οδηγεί σε έναν σημαντικό βιοχημικό μετασχηματισμό, παράγοντας τελικά ένα προϊόν με μοναδικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (Gutiérrez et al., 2010).



**Εικόνα 1.12:** Απεικόνιση βιοϋμένιου που σχηματίζουν οι ζύμες άνθισης στην επιφάνεια του οίνου τύπου Sherry (Cañete et al., 2018).

#### 1.5.4. Τρόποι αντιμετώπισης της μικροβιακής αλλοίωσης στον οίνο

Ο οίνος θεωρείται ένα αφιλόξενο περιβάλλον για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Χαρακτηρίζεται από έλλειψη θρεπτικών ουσιών, παρουσία αιθανόλης (10-15% v/v), υψηλά επίπεδα θειώδους ανυδρίτη, χαμηλό pH (3-4) και έλλειψη οξυγόνου (Marsit and Dequin, 2015; Steensels et al., 2015). Η ζύμωση κόκκινου κρασιού πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 25-30°C, ενώ του λευκού στους 15-20°C. Ως αντιμικροβιακός παράγοντας χρησιμοποιείται ο θειώδης ανυδρίτης (διοξείδιο του θείου) (SO<sub>2</sub>), ο οποίος προστίθεται κατά τη συγκομιδή των σταφυλιών, κατά τη σύνθλιψη των καρπών ή μόλις ολοκληρωθεί η ζύμωση με σκοπό την τη μείωση του κινδύνου οξείδωσης και αλλοίωσης μέσω της καταστολής γηγενών ζυμών και βακτηρίων (Considine and Frankish, 2014; Smith and Divol, 2016).

Ωστόσο, η συνεχόμενη έκθεση των κυττάρων των μικροοργανισμών σε αντίξοες συνθήκες και αντιμικροβιακούς παράγοντες οδηγεί στην προσαρμογή τους, την επιβίωση και την ανάπτυξη τους. Τα κύτταρα που βρίσκονται στη στατική φάση ανάπτυξης είναι πιο ανθεκτικά σε φυσικοχημικές καταπονήσεις από τα κύτταρα της εκθετικής φάσης (Fleet, 2011). Συνεπώς, υπάρχει μια ανάγκη για μείωση των επιπέδων του θειώδους ανυδρίτη καθώς υπάρχει ο κίνδυνος της ανάπτυξης ανθεκτικότητας από τους μικροοργανισμούς (Berbegal et al., 2018; Ferreira et al., 2013). Ως εκ τούτου, έχουν προταθεί αρκετές νέες τεχνολογίες για τον έλεγχο των μικροοργανισμών, όπως υψηλή υδροστατική πίεση (High Hydrostatic Pressure - HHP), ακτινοβολία UV-C (254 nm), υπέρηχοι υψηλής ισχύος (High Power Ultrasounds - HPU), μικροκύματα, όζον και ηλεκτρολυμένο νερό, μεταχείριση με παλμικό ηλεκτρικό πεδίο (Pulsed Electric Field - PEF), μεταλλικά νανοσωματίδια, νέοι παράγοντες σταθεροποίησης που βασίζονται σε φυσικά αντιμικροβιακά (χιτοζάνη, ενώσεις αιθερίων ελαίων) και τεχνικές που βασίζονται στη χρήση επιλεγμένων καλλιεργειών εκκίνησης (οξυγαλακτικά βακτήρια, non-Saccharomyces ζύμες) (Pinto et al., 2020).

##### 1.5.4.1. Χιτοζάνη

Η χιτοζάνη είναι ένα υδρόφιλο βιοπολυμερές που λαμβάνεται βιομηχανικά με N-αποακετυλίωση της χιτίνης και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αντιμικροβιακός παράγοντας (Taillandier et al., 2015). Η χρήση της στην οινοποίηση έχει εγκριθεί πρόσφατα στην Ευρώπη από τον Οργανισμό Internationale de la Vigne et du Vin (O.I.V) (Pinto et al., 2020).

Η χιτοζάνη μυκητιακής προέλευσης μπορεί να προκαλέσει φυσικές και βιολογικές επιδράσεις στα κύτταρα του *B. bruxellensis* (Garcia et al., 2020; Taillandier et al., 2015). Πέντε βασικοί μηχανισμοί έχουν προταθεί για άλλους μικροοργανισμούς στη βιβλιογραφία: (i)

αλληλεπιδράσεις μεταξύ θετικά φορτισμένων μορίων χιτοζάνης και αρνητικά φορτισμένων μορίων των κυτταρικών τοιχωμάτων των μικροοργανισμών έχουν ως αποτέλεσμα αλλαγές στη δομή και τη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης, οδηγώντας σε απώλεια ικανότητας ανάπτυξης και θάνατο. Περισσότερο αρνητικά φορτισμένη επιφάνεια κυττάρων θα είχε ως αποτέλεσμα την απορρόφηση μεγαλύτερης ποσότητας χιτοζάνης και μεγαλύτερες αλλαγές στη δομή του κυτταρικού τοιχώματος και στη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης, (ii) η χιτοζάνη δρα ως χηλικός παράγοντας που δεσμεύει επιλεκτικά ιχνοστοιχεία και στη συνέχεια αναστέλλει τη μικροβιακή ανάπτυξη, (iii) αναστέλλει διάφορα ένζυμα, (iv) διεισδύει στο κυτοσόλιο, συνδέεται με το DNA, παρεμβάλλοντας στη σύνθεση mRNA και πρωτεϊνών, για παράδειγμα μπορεί να παρεμβαίνει στη σύνθεση των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη διαδικασία προσκόλλησης και (v) μπορεί να σχηματίζει ένα αδιαπέραστο πολυμερές στρώμα στην επιφάνεια των κυττάρων που εμποδίζει την είσοδο θρεπτικών ουσιών σε αυτό (Garcia et al., 2020; Taillandier et al., 2015).

#### **1.5.4.2. Αλληλεπίδραση μικροοργανισμών στον οίνο**

Αλληλεπιδράσεις, συνέργειες και ανταγωνισμοί, συμβαίνουν μεταξύ των μικροοργανισμών σε όλη την διάρκεια της οινοποίησης, συμπεριλαμβανομένων τόσο των εμβολιασμένων όσο και των μη εμβολιασμένων γηγενών μικροοργανισμών (Pardo and Ferrer, 2019). Οι ανταγωνιστικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ ζυμών και βακτηρίων δεν είναι σαφείς όμως πολλοί είναι οι παράγοντες που τις επηρεάζουν όπως το είδος και το στέλεχος, η παραγωγή των μεταβολιτών των ζυμών (για παράδειγμα αιθανόλη), το διοξείδιο του θείου (SO<sub>2</sub>), μεσαίας αλυσίδας λιπαρά οξέα, πρωτεϊνικής φύσης αντιμικροβιακοί μεταβολίτες ζυμών, οι βακτηριοσίνες, θρεπτικά συστατικά του μέσου, το στάδιο της οινοποίησης κ.α. Μέσω των αλληλεπιδράσεων των μικροοργανισμών μπορεί να μεταβληθούν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος, με αποτέλεσμα αλλαγή στο προφίλ των αρωματικών ενώσεων των κρασιών που προκύπτουν (Pardo and Ferrer, 2019). Υπάρχουν ζύμες που αναστέλλουν ή διεγείρουν την ανάπτυξη των βακτηρίων και άλλες οι οποίες δεν εμφανίζουν ούτε αρνητική ούτε θετική δραστηριότητα που να σχετίζεται με τα βακτήρια. Στην περίπτωση της αναστολής της βακτηριακής δραστηριότητας συνεπάγεται μείωση της μηλογαλακτικής ζύμωσης και το αντίστροφο. Επιπλέον έχει αναφερθεί ότι τα οξυγαλακτικά βακτήρια μπορεί να είναι ανταγωνιστικά έναντι των ζυμών και να επιδράσουν αρνητικά στην ανάπτυξη και στον μεταβολισμό τους, προκαλώντας κολλημένες ή αργές ζυμώσεις (Fleet, 2011; Pardo & Ferrer, 2019).

Ο ανταγωνισμός μεταξύ των μικροοργανισμών θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως μέτρο ελέγχου ή βιοπροστασίας (Berbegal et al., 2018, 2017; Pinto et al., 2020). Έχουν προταθεί τρεις βασικές στρατηγικές, η μείωση των προδρόμων ενώσεων των πτητικών φαινολών, η βιοπροστασία με χρήση επιλεγμένων ζυμών και η μείωση του χρονικού διαστήματος μεταξύ της αλκοολικής και της μηλογαλακτικής ζύμωσης με τη χρήση επιλεγμένων μηλογαλακτικών εκκινητών (Pinto et al., 2020). Παρόλο που ο *B. bruxellensis* μπορεί να ανιχνευθεί σε οποιοδήποτε στάδιο της διαδικασίας οινοποίησης, συνήθως απομονώνεται στο τέλος της αλκοολικής ζύμωσης, πριν από την μηλογαλακτική ζύμωση ή κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του κρασιού στα βαρέλια. Η περίοδος αυτή είναι ευνοϊκή για την ανάπτυξη του *B. bruxellensis* επειδή το κρασί δεν προστατεύεται από το διοξείδιο του θείου και δεν υπάρχει ανταγωνισμός από άλλους μικροοργανισμούς οίνου. Οι καλλιέργειες εκκίνησης περιορίζουν τα υπολειπόμενα θρεπτικά συστατικά που χρησιμοποιεί ο *B. bruxellensis* για να επιβιώσει και να αναπτυχθεί στο κρασί και για τον λόγο αυτό προτείνονται ως ένας χρήσιμος τρόπος για τον έλεγχο του πολλαπλασιασμού του *B. bruxellensis* (Berbegal et al., 2018, 2017).

## 1.6. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης ήταν αρχικά να αξιολογηθεί η ικανότητα προσκόλλησης διαφορετικών στελεχών του αλλοιογόνου μικροοργανισμού *B. bruxellensis*, οι παράγοντες που την επηρεάζουν και το δυναμικό αλλοίωσης των προσκολλημένων κυττάρων καθώς και να εξεταστούν τρόποι αντιμετώπισης. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκαν έντεκα στελέχη και επιλέχθηκε ένα από αυτά το οποίο εξετάστηκε περαιτέρω. Ως παράγοντες προσκόλλησης εξετάστηκαν διαφορετικές συνθήκες (χαμηλό pH, αιθανόλη, διοξείδιο του θείου, κρασί, μούστος) και υλικά (ανοξείδωτο ατσάλι, γυαλί) στους 25°C. Ως πιθανός τρόπος αντιμετώπισης χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις χιτοζάνης και δύο εμπορικά στελέχη του βακτηρίου *O. oeni*. Επιπλέον, με σκοπό την ανάδειξη των βιοχημικών μεταβολών που εμπλέκονται στο σχηματισμό του βιοϋμενίου, ελήφθησαν δείγματα για ανάλυση με τη χρήση φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR).

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1. Στελέχη μικροοργανισμών

Τα έντεκα στελέχη της ζύμης *B. bruxellensis* που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.1 και έχουν παραχωρηθεί από τη διεθνή συλλογή NRRL (Dimoroulou et al., 2019b) και από το Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Υγιεινής Τροφίμων του ΑΠΘ (Dimoroulou et al., 2019a). Όλα τα στελέχη που μελετήθηκαν είχαν απομονωθεί είτε από ζυμώμενο γλεύκος είτε από οίνο. Το σύνολο των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη βρίσκονταν αποθηκευμένα σε θερμοκρασία -80°C μέσα σε φιαλίδια τα οποία περιείχαν 80% θρεπτικό υπόστρωμα YPD και 20% γλυκερόλη για την προστασία των κυττάρων. Επιπλέον χρησιμοποιήθηκαν δύο βακτηριακά εμπορικά στελέχη, του είδους, *O. oeni*, όπως φαίνεται στον Πίνακα 2.1.

**Πίνακας 2.1:** Στελέχη μικροοργανισμών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

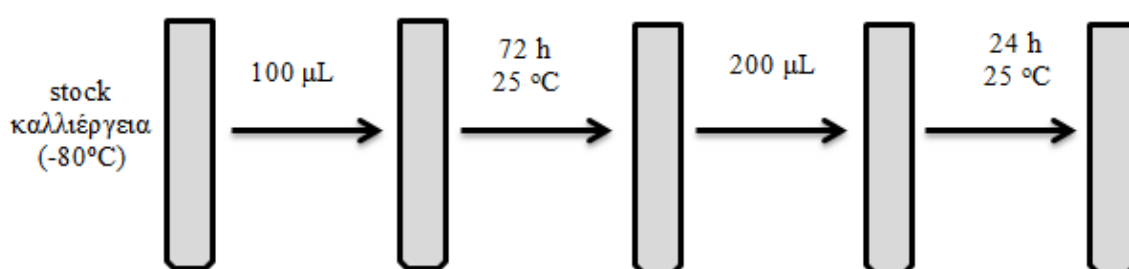
Είδος	Στέλεχος	Συλλογή
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	33.1	ΑΠΘ
	15.12	ΑΠΘ
	45.3	ΑΠΘ
	3	NRRL
	5	NRRL
	9	NRRL
	11	NRRL
	14	NRRL
	15	NRRL
	16	NRRL
19	NRRL	
<i>Oenococcus oeni</i>	CH11	CHR HANSEN
	B7	LAFFORT

## 2.2. Θρεπτικά υλικά

Στο σύνολο των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν υγρά και στερεά θρεπτικά υλικά ανάπτυξης. Για τη ζύμη χρησιμοποιήθηκε YPD broth (σύσταση ανά λίτρο): 10g yeast extract (Laboratories Conda S.A., Madrid), 20g bacteriological peptone (LAB M, U.K.), 10g D-glucose anhydrous (PENTA s.r.o., Prague), ενώ στο YPD agar προστέθηκε 15g/l agar bacteriological (Agar Bios Special LL, Biolife, Italiana S.r.l, Milano, Italy). Για την ανάπτυξη του βακτηρίου χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υλικό MRS broth (MRS Agar ISO Formulation, Biolife, Italiana S.r.l, Milano, Italy) και MRS agar (15 g/l). Οι πλύσεις των κυττάρων και οι δεκαδικές αραιώσεις πραγματοποιήθηκαν με αποστειρωμένο διάλυμα Ringer (quarter strength Ringer's solution, LAB M, U.K.).

## 2.3. Ενεργοποίηση κυττάρων μικροοργανισμού

Η πρώτη καλλιέργεια πραγματοποιούνταν με την προσθήκη 100 μl από την stock καλλιέργεια (-80°C) σε 10 ml YPD broth, ακολουθούσε επώαση στους 25°C για 72 ώρες όπου πραγματοποιούνταν ανανέωση των καλλιεργειών με προσθήκη 200 μl από την πρώτη καλλιέργεια (25°C) σε 10 ml YPD και τελική επώαση στους 25°C για 24 ώρες φαίνεται στην Εικόνα 2.1. Ο σκοπός ήταν τα κύτταρα να βρίσκονται στην αρχή της στατικής φάσης στην τελική καλλιέργεια για να μελετηθεί μόνο η προσκόλληση των κυττάρων στις διαφορετικές επιφάνειες χωρίς να υπάρχει η δυνατότητα παράλληλης ανάπτυξης.



Εικόνα 2.1: Σχηματική απεικόνιση βημάτων ενεργοποίησης κυττάρων μικροοργανισμών.

## **2.4. Κινητική ανάπτυξης μικροοργανισμών**

Η κινητική ανάπτυξης της ζύμης που μελετήθηκε σε μέσο ανάπτυξης YPD πραγματοποιήθηκε με την αρίθμηση των ζωντανών κυττάρων σε στερεό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης και με την παράλληλη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας των καλλιιεργειών με συχνές δειγματοληψίες. Σκοπός του συγκεκριμένου πειράματος ήταν να βρεθεί η χρονική στιγμή στην οποία ο μικροοργανισμός φτάνει στην στατική φάση ούτως ώστε να διαμορφωθεί το πρωτόκολλο της προσκόλλησης και ανάπτυξης του βιοϋμενίου. Παράλληλα πραγματοποιήθηκε συσχέτιση της οπτικής πυκνότητας των καλλιιεργειών και του πληθυσμού των ζωντανών καλλιιεργήσιμων κυττάρων για τη ζύμη που μελετήθηκε. Πιο αναλυτικά, 2ml από τις κυτταρικές καλλιιεργειες λαμβάνονταν ασηπτικά για τις παρακάτω χρονικές στιγμές: 0, 5, 9, 24, 30, 48, 53, 73 ώρες. Από κάθε δειγματοληψία 1 ml χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση της οπτικής πυκνότητας φωτομετρικά στα 600nm (όργανο Citra 40) και 1 ml για τις δεκαδικές αραιώσεις όπου 100 μl επιστρώθηκαν στο κατάλληλο στερεό θρεπτικό υλικό έπειτα από δεκαδικές αραιώσεις σε αποστειρωμένο διάλυμα Ringer. Τα τρυβλία επωάστηκαν στους 25°C για περίπου 48 ώρες για τη ζύμη και 144 ώρες για το γαλακτικό βακτήριο. Ακολούθησε απαρίθμηση των σχηματιζόμενων αποικιών των κυττάρων (30-300 στο τρυβλίο) οι οποίες εκφράστηκαν σε δεκαδικό λογάριθμο cfu ανά ml καλλιιεργειας ( $\log_{10}$  cfu/ml).

## **2.5. Προσκόλληση και ανάπτυξη βιοϋμενίου**

### **2.5.1. Προετοιμασία εμβολίου**

Η προετοιμασία του εμβολίου διαμορφώθηκε από τα αποτελέσματα της κινητικής ανάπτυξης του μικροοργανισμού. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε παρουσιάζεται στην Εικόνα 2.1, στην ενότητα 2.3. Πριν την έναρξη κάθε πειράματος οι καλλιιεργειες φωτομετρούνταν στα 600 nm και όλα τα δείγματα αραιώθηκαν στην ίδια τελική οπτική πυκνότητα (OD:1). Ακολουθούσε φυγοκέντριση σε 5000 g στους 4°C για 10 λεπτά (Multifuge IS-R, Thermo Electron Corporation), έκπλυση του ιζήματος των κυττάρων δύο φορές με 5 ml αποστειρωμένου διαλύματος Ringer και επαναιώρηση στον κατάλληλο όγκο διαλύματος Ringer ούτως ώστε ο πληθυσμός όλων των δειγμάτων να αντιστοιχεί σε  $10^8$  cfu/ml.

## 2.5.2. Επιφάνεια και συνθήκες ανάπτυξης βιοϋμενίου

Για τη μελέτη της προσκόλλησης και ανάπτυξης του βιοϋμενίου επιλέχθηκαν κουπόνια από ανοξείδωτο ατσάλι (Stainless steel/ SS coupons) (πλακίδια διαστάσεων 3cm× 0,8cm× 0,1cm, τύπου AISi-304, Χαλυβουργική Α.Ε., Αθήνα, Ελλάδα) και κουπόνια γυαλιού (3cm× 1cm× 0,1cm) ως δύο υλικά που χρησιμοποιούνται ευρέως στην οινοποίηση. Η επώαση πραγματοποιήθηκε στους 25°C.

Τα κουπόνια τοποθετήθηκαν εντός δοκιμαστικών σωλήνων, όπου και αποστειρώθηκαν εμβαπτισμένα σε 4,5 ml διαφορετικού μέσου ανάλογα με τη πειραματική διαδικασία. Τα μέσα που επιλέχθηκαν να δοκιμαστούν έχουν άμεση συνάφεια με τις συνθήκες οινοποίησης. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της προσκόλλησης συνθήκες οινολογικού «stress» όπως η παρουσία αιθανόλης, χαμηλού pH, θειώδη ανυδρίτη, μούστου και κρασιού καθώς επίσης και αντιμικροβιακές τεχνικές που εφαρμόζονται όπως η προσθήκη χιτοζάνης ή τρόποι βιοπροστασίας. Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν: αποστειρωμένο διάλυμα Ringer (μάρτυρας), αποστειρωμένο διάλυμα Ringer στο οποίο προστέθηκε αιθανόλη με τελική συγκέντρωση 5%, αποστειρωμένο διάλυμα Ringer με προσθήκη θειώδους ανυδρίτη (20 g/ hl), κόκκινο κρασί (12,5% vol, χωρίς προσθήκη θειώδους ανυδρίτη) και ερυθρός μούστος. Όσο αφορά τις αντιμικροβιακές τεχνικές χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένο διάλυμα Ringer με προσθήκη εμπορικού σκευάσματος χιτοζάνης (Stab Micro, Esseco s.r.l. – Divisione Enartis, 28069 San Martino, Trecate NO Italy) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (5 g/hl, 10 g/hl και 20 g/hl) καθώς και η παρουσία δύο διαφορετικών εμπορικών στελεχών του γαλακτικού βακτηρίου *O. oeni* σε πληθυσμό 10<sup>6</sup> cfu/ml (Lactoenos® B7 DIRECT, Laffort και Viniflora® CH11, Chr. Hansen Holding A/S Boege Alle 10-12 2970 Hoersholm Denmark). Οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν με τα αντίστοιχα χαρακτηριστικά τους παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.2. Τέλος για τη μελέτη της κινητικής του βιοϋμενίου τα κουπόνια επώαστηκαν σε YPD broth.

Σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας συνιστάται δοκιμή προκειμένου να βρεθεί η σωστή δοσολογία της χιτοζάνης, τα 2-15 g/hl είναι η προτεινόμενη δοσολογία και ποικίλλει ανάλογα με τα χαρακτηριστικά του κρασιού και το μικροβιακό φορτίο. Ως προληπτικό μέσο εφαρμόζονται τα 3-5 g/hl σε περίπτωση μεταφοράς του κρασιού ενώ ως θεραπεία τα 10-20 g/hl.



**Πίνακας 2.2:** Συνθήκες ανάπτυξης βιοϋμενίου.

Συνθήκη	Χαρακτηριστικά
Μάρτυρας	Ringer, pH: 6,8±0,3
pH	Ringer, pH: 3,2±0,2
Αιθανόλη	Ringer, EtOH: 5%, pH: 6,6±0,2
Θειώδης ανυδρίτης	Ringer, SO <sub>2</sub> : 20 g/ hl, pH: 3,3±0,4
Κόκκινο Κρασί	pH:3,3±0,2, 12% vol
Μούστος	pH: 3,5±0,2
Χιτοζάνη C1	Ringer, χιτοζάνη 5 g / hl, pH: 5,1±0,1
Χιτοζάνη C2	Ringer, χιτοζάνη 10 g / hl, pH: 4,8±0,1
Χιτοζάνη C3	Ringer, χιτοζάνη 20 g/ hl, pH: 4,2±0,3
Βιοπροστασία με <i>O. oeni</i> CH11	Ringer, <i>O.oeni</i> CH11 pH: 6,8±0,3
Βιοπροστασία με <i>O. oeni</i> B7	Ringer, <i>O.oeni</i> B7, pH: 6,8±0,3

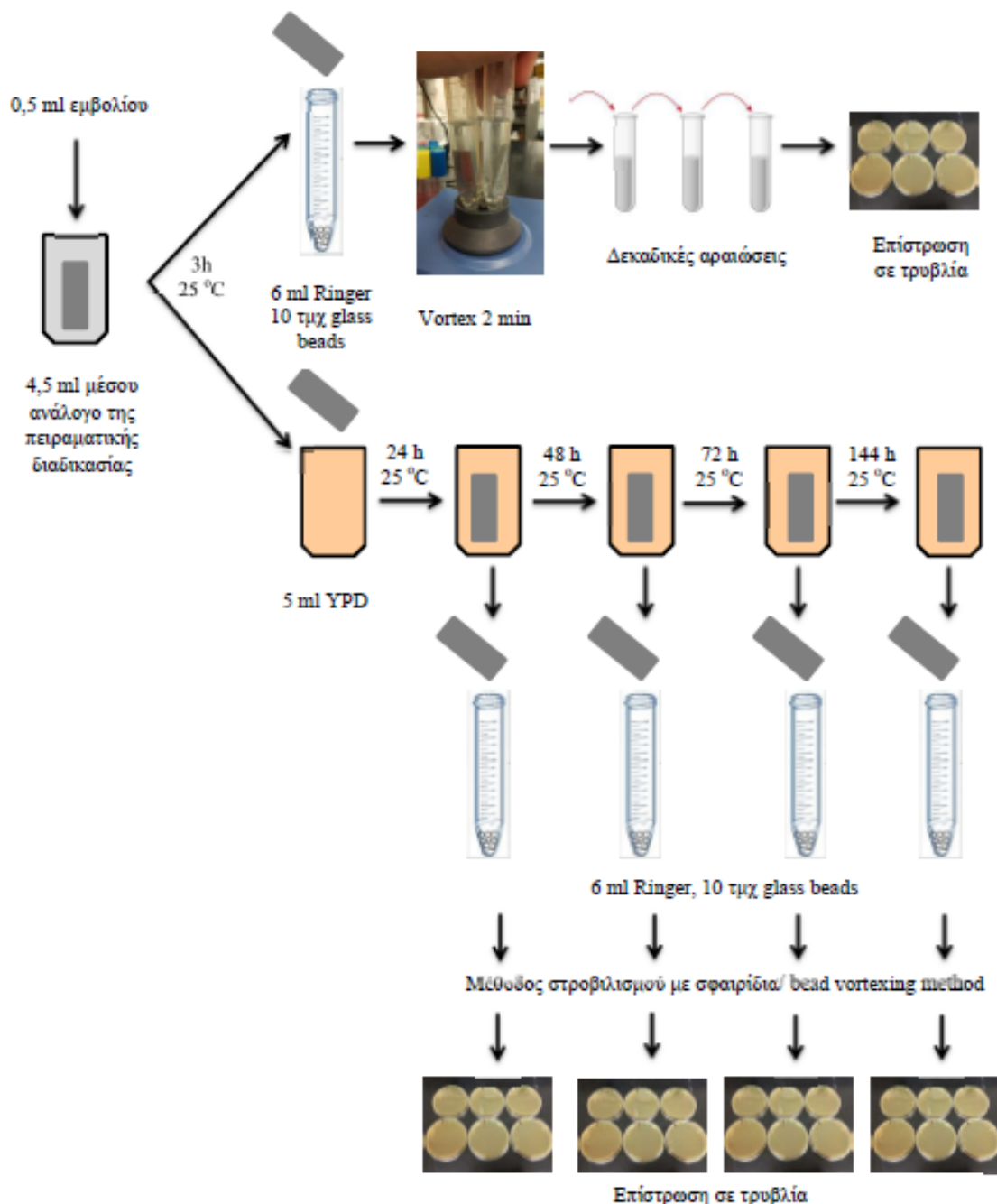
### 2.5.3. Σχηματισμός βιοϋμενίου

Κάθε αποστειρωμένος δοκιμαστικός σωλήνας που περιείχε είτε κουπόνια ανοξειδωτού ατσαλιού είτε κουπόνια γυαλιού και 4,5 ml διαλύματος αναλόγως τη πειραματική διαδικασία, ενοφθαλμίστηκε με 0,5 ml εμβολίου ούτως ώστε η συγκέντρωση των κυττάρων να είναι κατά προσέγγιση ίση με  $10^7$  cfu/ml.

Στη συνέχεια, για τα πειράματα που αφορούσαν μόνο την μελέτη της ικανότητας προσκόλλησης, οι δοκιμαστικοί σωλήνες επώαστηκαν στους 25°C για τρεις ώρες, εντός κλιβάνων υψηλής ακρίβειας (MIR-153 Sanyo Electric Co., Osaka, Japan), ώστε να επιτραπεί η προσκόλληση (adhesion) των μικροβιακών κυττάρων επάνω στα κουπόνια. Για τα πειράματα που αφορούσαν την μελέτη της ικανότητας ανάπτυξης βιοϋμενίου, μετά το πέρας των τριών ωρών (φάση προσκόλλησης), τα κουπόνια μεταφέρονταν, με τη βοήθεια λαβίδας και εντός θαλάμου νηματικής ροής, σε αποστειρωμένους δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν μέσο κατάλληλο και διέμεναν για το χρονικό διάστημα που απαιτούνταν για κάθε πείραμα. Πιο συγκεκριμένα τα κουπόνια παρέμειναν σε 5ml YPD broth για χρονικό διάστημα 0, 24, 48, 72 και 144 ωρών και σε 5ml κόκκινου κρασιού για δύο μήνες. Οι παραπάνω δοκιμαστικοί σωλήνες επώαστηκαν στους 25°C (MIR-153 Sanyo Electric Co., Osaka, Japan), συνθήκες στις οποίες εξετάστηκε η βιοϋμενική ανάπτυξη.

#### **2.5.4. Ποσοτικοποίηση του βιοϋμενίου με χρήση της μεθόδου στροβιλισμού με γυάλινα σφαιρίδια (bead vortexing method)**

Αναλόγως τη πειραματική διαδικασία, οι δειγματοληψίες πραγματοποιούνταν στις διάφορες ώρες με τον τρόπο που περιγράφεται παρακάτω. Τα κουπόνια ανοξειδωτού ατσάλιου μεταφέρονταν, με τη βοήθεια λαβίδας και εντός θαλάμου νηματικής ροής, σε αποστειρωμένους δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν 5 ml αποστειρωμένου διαλύματος Ringer και από εκεί συλλέγονταν ξανά με τη βοήθεια λαβίδας από τους δοκιμαστικούς σωλήνες και ξεπλένονταν από κάθε πλευρά με 5 ml αποστειρωμένου διαλύματος Ringer, με σκοπό την απομάκρυνση των ασθενώς προσκολλημένων κυττάρων. Στη συνέχεια τοποθετούνταν σε αποστειρωμένους σωλήνες Falcon που περιείχαν 6 ml αποστειρωμένου διαλύματος Ringer και 10 γυάλινα σφαιρίδια με επικάλυψη σιλικόνης (beads), οι οποίοι στροβιλίζονταν (σε αναδευτήρα στροβιλισμού vortex) για 2 λεπτά, με στόχο την αποκόλληση όλων των βιοϋμενικών κυττάρων από την επιφάνεια των κουπονιών (μέθοδος στροβιλισμού με σφαιρίδια/ bead vortexing method). Δεκαδικές αραιώσεις του εναιωρήματος (σε αποστειρωμένο διάλυμα Ringer) πραγματοποιήθηκαν και πριν και μετά την εφαρμογή της μεθόδου στροβιλισμού με σκοπό την καταμέτρηση των πλαγκτονικών και προσκολλημένων κυττάρων στο κουπόνι αντίστοιχα. Για την καταμέτρηση των ζυμών 100 μl του εναιωρήματος της κατάλληλης δεκαδικής αραιώσης επιστρώθηκε σε YPD agar ενώ σε MRS agar για τα γαλακτικά βακτήρια. Μετά από επώαση των τρυβλίων στους 25°C για το απαραίτητο χρονικό διάστημα για κάθε μικροοργανισμό, έγινε απαρίθμηση των σχηματιζόμενων αποικιών των βιοϋμενίων κυττάρων οι οποίες εκφράστηκαν σε δεκαδικό λογάριθμο cfu ανά cm<sup>2</sup> επιφάνειας κουπονιού ( $\log_{10}$  cfu/cm<sup>2</sup>), εκπροσωπώντας το σχηματιζόμενο επί της επιφάνειας του κουπονιού βιοϋμένιο και των πλαγκτονικών κυττάρων οι οποίες εκφράστηκαν σε δεκαδικό λογάριθμο cfu ανά ml δοκιμαστικού σωλήνα ( $\log_{10}$  cfu/ml). Η παραπάνω διαδικασία παρουσιάζεται σχηματικά στην Εικόνα 2.2. Όλες οι συνθήκες πραγματοποιήθηκαν σε 6 βιολογικές επαναλήψεις.



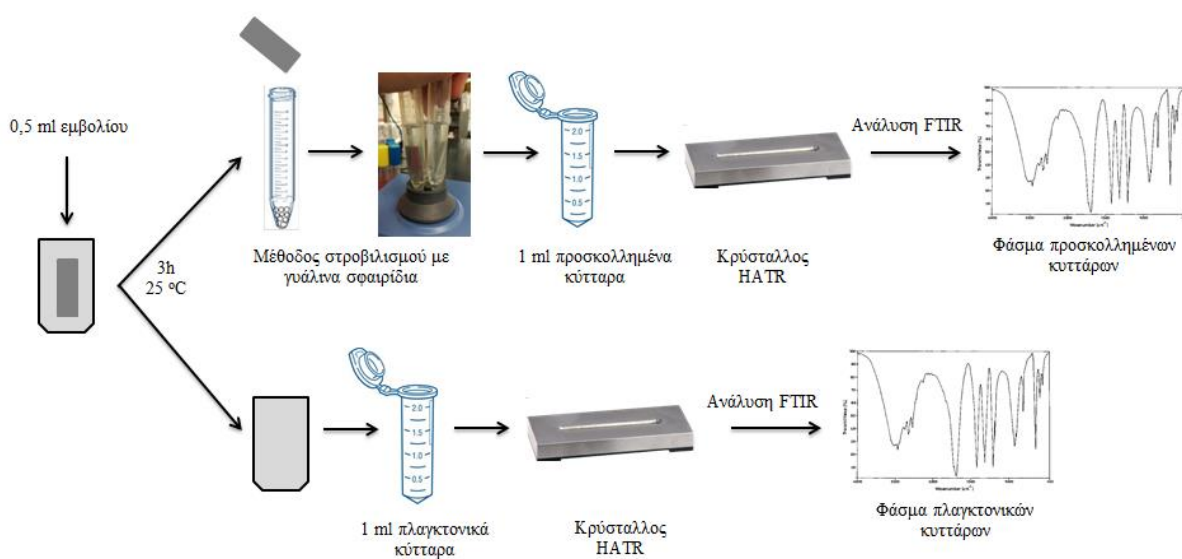
**Εικόνα 2.2:** Σχηματική απεικόνιση ποσοτικοποίησης του βιοϋμενίου με χρήση της μεθόδου στροβίλισμού με γυάλινα σφαιρίδια (bead vortexing method).

## 2.6. Μελέτη βιοϋμενίου με Φασματοσκοπία Υπερύθρου (FTIR)

Στη μελέτη αυτή για πρώτη φορά εφαρμόστηκε η Φασματοσκοπία Υπερύθρου (FTIR) για τη μελέτη του σχηματιζόμενου βιοϋμενίου. Πιο συγκεκριμένα η συγκριτική μελέτη των φασμάτων των πλαγκτονικών με αυτή των προσκολλημένων κυττάρων μπορεί να αναδείξει τις βιοχημικές μεταβολές που πιθανώς εμπλέκονται στο σχηματισμό του βιοϋμενίου.

Μετρήθηκαν συνολικά 135 δείγματα εκ των οποίων τα 3 ήταν ο μάρτυρας και από κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκε 1 ml κυτταρικού εναιωρήματος. Από τα falcon που περιείχαν το εναιώρημα των προσκολλημένων κυττάρων και από τους σωλήνες στους οποίους είχε γίνει η επώαση των κουπονιών για τρεις ώρες και περιείχαν τα πλαγκτονικά κύτταρα λαμβάνονταν 2 ml υγρού. Επιπλέον λήφθηκαν δείγματα 2 ml από το αποστειρωμένο διάλυμα Ringer το οποίο αποτέλεσε τον μάρτυρα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.3.

Οι αναλύσεις έγιναν σε φασματομέτρο FTIR-6200 JASCO (Jasco Corp., Τόκιο, Ιαπωνία), το οποίο ήταν εφοδιασμένο με κρύσταλλο ZnSe 45ο HATR (Horizontal Attenuated Total Reflectance) (PIKE Technologies, Madison, Wisconsin, United States). Τα δείγματα τοποθετούνταν στον κρύσταλλο και γινόταν η λήψη των υπέρυθρων φασματικών δεδομένων. Το λογισμικό Spectra Manager™ Code of Federal Regulations έκδοση 2 (Jasco Corp.), χρησιμοποιήθηκε για τη συλλογή των ληφθέντων φασμάτων (εύρος κυματηρίθμων από 4000 έως 400  $\text{cm}^{-1}$ ). Ο αριθμός των σαρώσεων ανά μέτρηση ήταν 100 και η κάθε μέτρηση διαρκούσε 2 λεπτά. Κάθε δείγμα αναλύθηκε μια φορά. Πριν από την πρώτη μέτρηση δείγματος λήφθηκαν τα φάσματα αναφοράς του κρυστάλλου (background spectra) και αυτή η διαδικασία επαναλήφθηκε μετά από κάθε πέντε μετρήσεις δειγμάτων. Στο τέλος κάθε μέτρησης ξεπλενόταν η επιφάνεια του κρυστάλλου με απιονισμένο νερό και καθαριζόταν με μπατονέτα στεγνή και μπατονέτα εμβαπτισμένη σε ακετόνη με σκοπό να απορροφήσει την υγρασία, ενώ αφέθηκε σε πλήρη ξηρότητα μέχρι την επόμενη προσθήκη δείγματος. Οι μετρήσεις με το όργανο έγιναν στο τέλος των μικροβιολογικών αναλύσεων αφού τα δείγματα είχαν αποθηκευτεί στην κατάψυξη ( $-20^{\circ}\text{C}$ ).



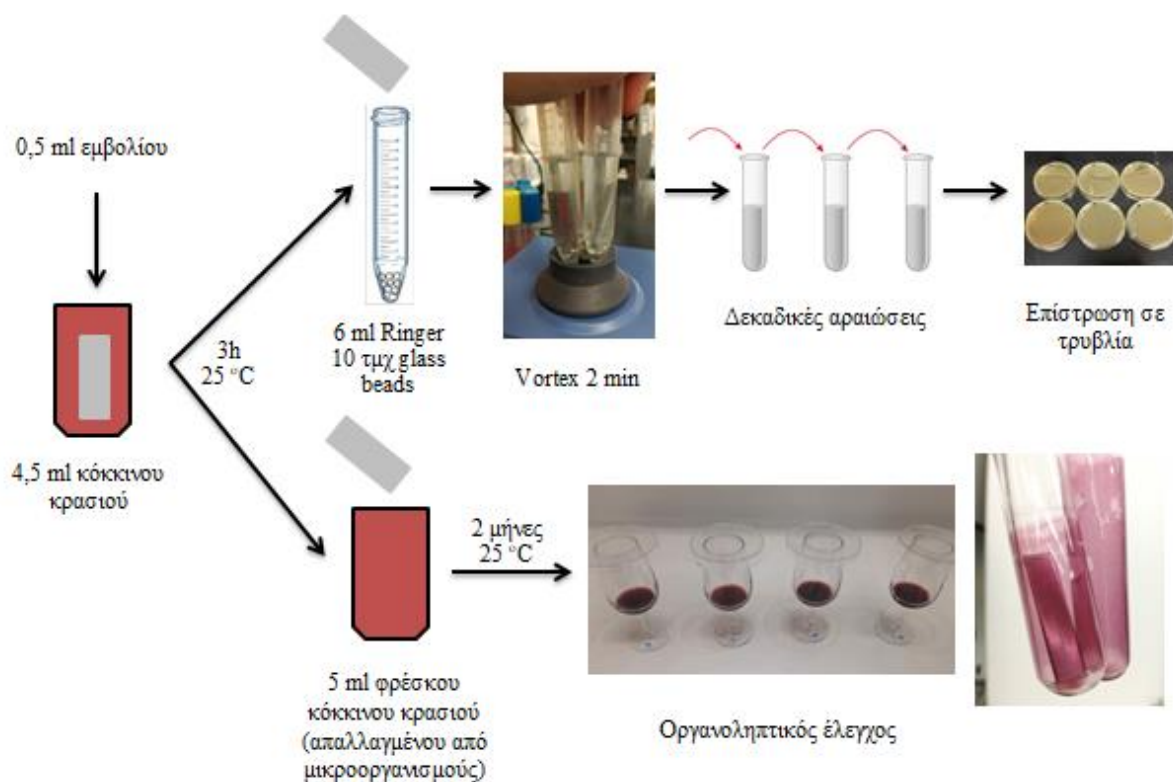
**Εικόνα 2.3:** Σχηματική απεικόνιση εφαρμογής Φασματοσκοπίας Υπερύθρου (FTIR) σε δείγματα πλαγκτονικών και προσκολλημένων κυττάρων.

Για την ανάλυση των δεδομένων της φασματοσκοπίας υπεράυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR) επιλέχθηκε το πρόγραμμα MetaboAnalyst και πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση PCA (Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών-Principal Component Analysis), προκειμένου να εντοπιστεί πιθανή διαφορά μεταξύ δειγμάτων προερχόμενων από πλαγκτονικά και προσκολλημένα κύτταρα.

## 2.7. Οργανοληπτικός έλεγχος

Κόκκινο κρασί από την Πελοπόννησο της ελληνικής ποικιλίας Αγιωργίτικο (12,5% vol, χωρίς προσθήκη θειώδους ανυδρίτη, pH:  $3,3 \pm 0,18$ ) επιλέχθηκε για να εξεταστεί το δυναμικό αλλοίωσης των προσκολλημένων κυττάρων στα κουπόνια μετά από δυο μήνες επώασης. Αρχικά πραγματοποιήθηκε προσκόλληση των κυττάρων (βλ. ενότητα 2.5) και στη συνέχεια κάθε κουπόνι μεταφέρθηκε ασηπτικά σε σωλήνα με φρέσκο ερυθρό κρασί για τη μελέτη της πιθανής αλλοίωσης από τα προσκολλημένα κύτταρα. Η παρουσία προσκολλημένων κυττάρων στα κουπόνια επιβεβαιώθηκε από την παρουσία αποικιών *B. bruxellensis* σε τρυβλία στις 0 ώρες για το στέλεχος που μελετήθηκε. Ο μάρτυρας, στην προκειμένη περίπτωση, ήταν το κρασί που επώαστηκε στις ίδιες συνθήκες με κουπόνια από ανοξείδωτο ατσάλι απαλλαγμένα από κύτταρα. Η αλλοίωση του οίνου μελετήθηκε με οργανοληπτική αξιολόγηση όπου για την απόκτηση του κατάλληλου όγκου δείγματος 4 ίδιες καλλιέργειες ενώθηκαν. Η παραπάνω διαδικασία παρουσιάζεται στην Εικόνα 2.4.

Για τον οργανοληπτικό έλεγχο, 20 ml κρασιού σε ποτήρια κρασιού ISO, κωδικοποιημένα με τυχαίους τριψήφιους αριθμούς σε θερμοκρασία δωματίου (18-20°C) ήταν διαθέσιμα σε πάνελ αποτελούμενο από 20 άτομα. Η ένταση των αισθητηριακών χαρακτηριστικών που εξετάστηκαν αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας κλίμακα 10 σημείων από χαμηλή (1) έως ισχυρή (10) ένταση για πέντε αρωματικά χαρακτηριστικά του κρασιού, φρουτώδες, ανθέων, ξυδιού, πικάντικο και δέρματος (ζωικά χαρακτηριστικά). Επιπλέον, ζητήθηκε από το πάνελ να κατατάξει τα δείγματα με σειρά προτίμησης. Τα κρασιά τοποθετήθηκαν και δοκιμάστηκαν σε τυχαία σειρά από κάθε δοκιμαστή.



**Εικόνα 2.4:** Σχηματική απεικόνιση ποσοτικοποίησης βιοϋμενίου με χρήση της μεθόδου στροβιλισμού με σφαιρίδια (bead vortexing method) και διαδικασίας οργανοληπτικού ελέγχου.

## 2.8. Στατιστική ανάλυση

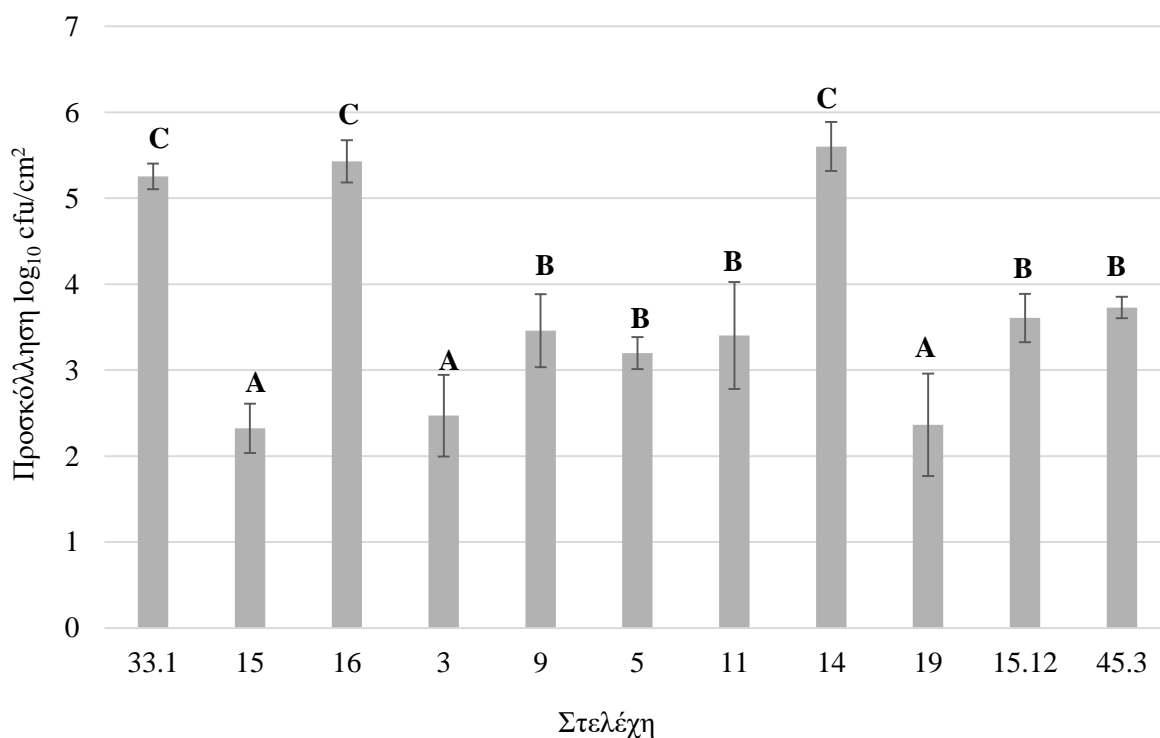
Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέση τιμή  $\pm$  τυπική απόκλιση των δύο ανεξάρτητων πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν ( $n=6$ ). Οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τη βοήθεια του στατιστικού λογισμικού R 3.6.3 (64 bit), σε επίπεδο σημαντικότητας 95%. Πραγματοποιήθηκε έλεγχος κανονικής κατανομής ( $p < 0,05$ ) και εφαρμόστηκε μονοπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης (One-Way ANOVA), ακολουθούμενη από το post hoc Tukey's.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1. Παραλλακτικότητα του είδους *Brettanomyces bruxellensis* στο σχηματισμό βιοϋμενίου

##### 3.1.1. Ικανότητα προσκόλλησης

Η παραλλακτικότητα εντός του είδους της ζύμης *B. bruxellensis* μελετήθηκε ως προς την ικανότητα προσκόλλησης σε επιφάνεια με οινολογικό ενδιαφέρον. Αρχικά, η έρευνα επικεντρώθηκε στην ικανότητα προσκόλλησης έντεκα στελεχών του *B. bruxellensis*, σε κουπόνια από ανοξείδωτο ατσάλι τα οποία παρέμειναν σε αποστειρωμένο διάλυμα Ringer για τρεις ώρες στους 25°C ενώ τα ίδια δείγματα χρησιμοποιήθηκαν και για τη μελέτη του μεταβολικού αποτυπώματος με FTIR όπως περιγράφεται στην παρακάτω ενότητα. Στο Διάγραμμα 3.1 και στον Πίνακα 3.1 που ακολουθούν παρουσιάζεται σε δεκαδικό λογάριθμο ο πληθυσμός των προσκολλημένων κυττάρων κάθε στελέχους.



**Διάγραμμα 3.1:** Μέσος πληθυσμός των προσκολλημένων κυττάρων (log<sub>10</sub> cfu/cm<sup>2</sup>) 11 στελεχών του *B. bruxellensis* στην επιφάνεια κουπονιών από ανοξείδωτο ατσάλι και γυαλί, σε διάλυμα Ringer. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση μεταξύ ανεξάρτητων επαναλήψεων (n=6). Οι τιμές με διαφορετικά λατινικά γράμματα (A-C) διαφέρουν στατιστικά σημαντικά (p ≤ 0,05).

**Πίνακας 3.1:** Μέσοι όροι των τιμών  $\log_{10}$  cfu/cm<sup>2</sup> ± τυπική απόκλιση για τον πληθυσμό των προσκόλλημένων κυττάρων των 11 στελεχών του *B. bruxellensis*.

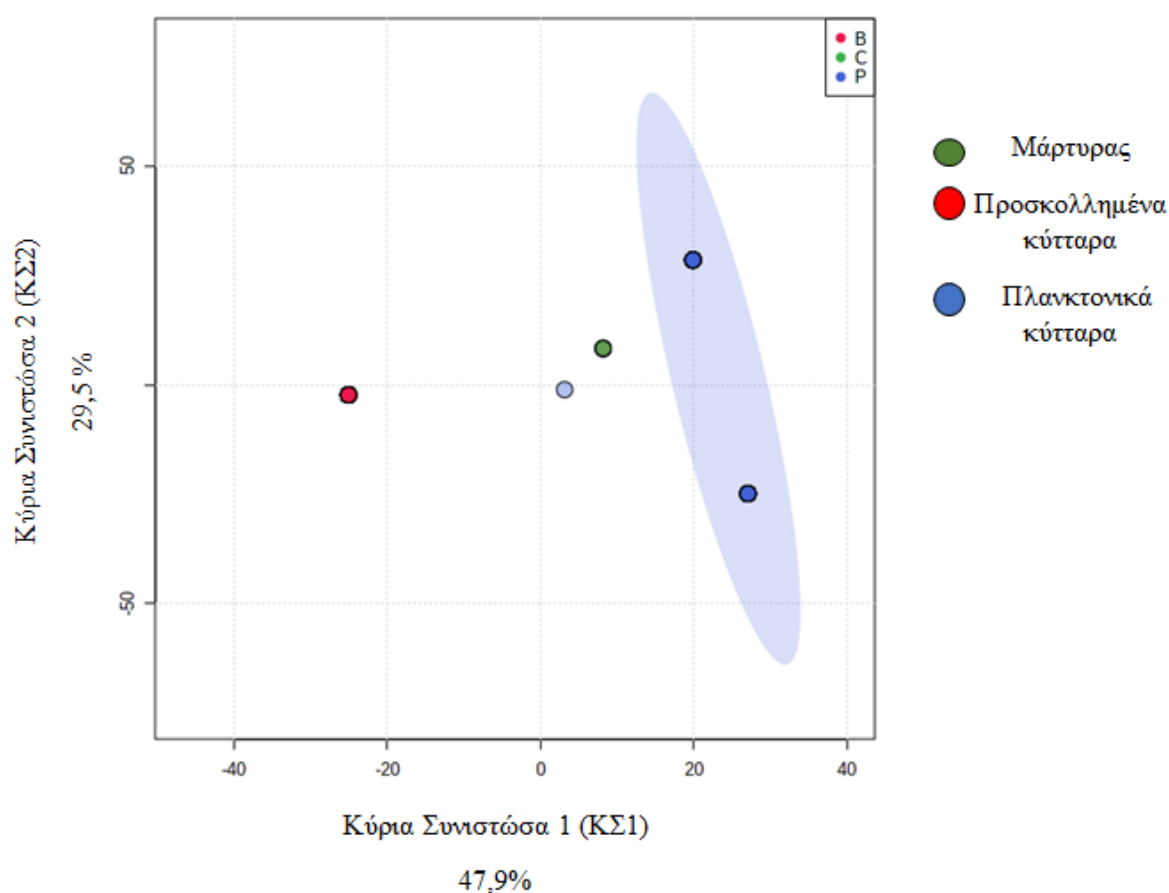
Στελέχη	Προσκόλληση $\log_{10}$ (cfu/cm <sup>2</sup> )
33.1	5,25±0,15
15	2,32±0,29
16	5,43±0,24
3	2,47±0,47
9	3,46±0,42
5	3,20±0,19
11	3,40±0,62
14	5,60±0,29
19	2,36±0,60
15.12	3,61±0,28
45.3	3,73±0,12

Όπως φαίνεται από το Διάγραμμα 3.1 και τον Πίνακα 3.1, όλα τα στελέχη που εξετάστηκαν προσκόλλησαν στην επιφάνεια του ανοξείδωτου ατσάλιου στις 3 ώρες. Πιο συγκεκριμένα, τα στελέχη χωρίζονται σε 3 ομάδες που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους ανάλογα με την προσκόλληση των κυττάρων. Στην ομάδα με την μεγαλύτερη ικανότητα προσκόλλησης ανήκουν τα στελέχη 33.1 ( $\log_{10}$  5,25±0,15 cfu/cm<sup>2</sup>), 14 ( $\log_{10}$  5,60±0,29 cfu/cm<sup>2</sup>) και 16 ( $\log_{10}$  5,43±0,24 cfu/cm<sup>2</sup>), ενώ στην ομάδα με την μικρότερη ικανότητα προσκόλλησης ανήκουν τα στελέχη 15 ( $\log_{10}$  2,32±0,29 cfu/cm<sup>2</sup>), 19 ( $\log_{10}$  2,36±0,60 cfu/cm<sup>2</sup>) και 3 ( $\log_{10}$  2,47±0,47 cfu/cm<sup>2</sup>).



### 3.1.2. Μεταβολικό αποτύπωμα προσκολλημένων έναντι πλαγκτονικών κυττάρων

Το μεταβολικό αποτύπωμα των έντεκα στελεχών του προηγούμενου πειράματος μελετήθηκε με φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR), με σκοπό την σύγκριση των φασμάτων μεταξύ εναιωρήματος προσκολλημένων και πλαγκτονικών κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα όπως περιγράφηκε και προηγουμένως στην ενότητα 2.6, αναλύθηκε το φάσμα του εναιωρήματος των κυττάρων πριν και μετά την εφαρμογή της μεθόδου στροβιλισμού με γυάλινα σφαιρίδια (bead vortex method). Μελετήθηκαν συνολικά 135 δείγματα, 66 (11 στελέχη \* 6 επαναλήψεις) από φάσματα πλαγκτονικών κυττάρων, 66 (11 στελέχη \* 6 επαναλήψεις) από φάσματα προσκολλημένων κυττάρων και 3 από τον μάρτυρα (αποστειρωμένο διάλυμα Ringer). Στο Διάγραμμα 3.2 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της Ανάλυσης Κύριων Συνιστωσών (Principal Component Analysis-PCA).



**Διάγραμμα 3.2:** Απεικόνιση δυο διαστάσεων. Το πράσινο σημείο αντιπροσωπεύει τα δεδομένα για τον μάρτυρα, το κόκκινο τα δεδομένα για τα προσκολλημένα κύτταρα και τα μπλε σημεία αντιπροσωπεύουν τα δεδομένα για τα πλαγκτονικά κύτταρα. Για τα πλαγκτονικά κύτταρα, η κατανομή παρουσιάζει μεγαλύτερη διακύμανση σε σύγκριση με τα προσκολλημένα κύτταρα.

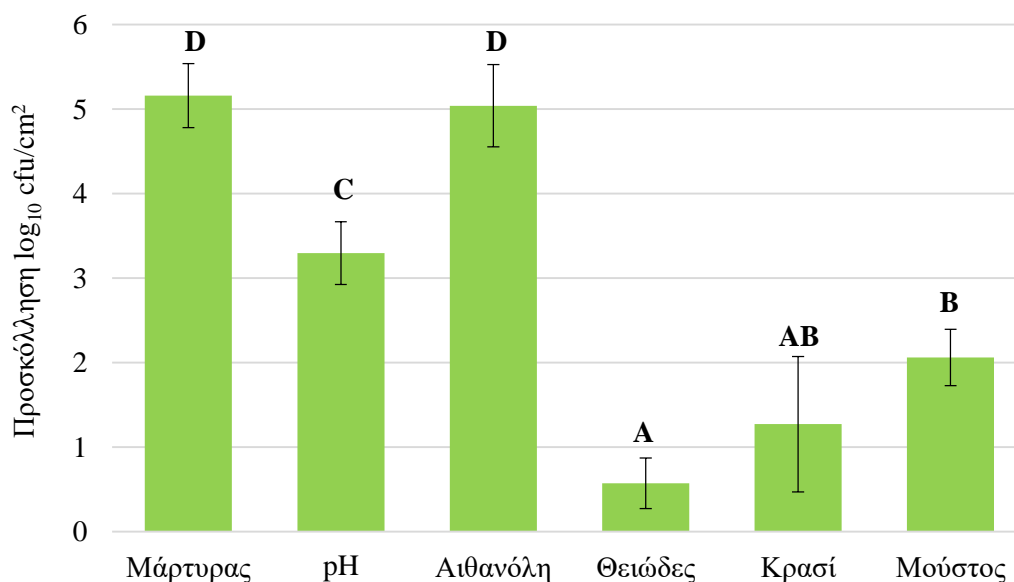
Με την στατιστική ανάλυση PCA συσχετίστηκαν όλα τα δεδομένα (135 δείγματα) τα οποία αποτελούσαν την απορρόφηση του μάρτυρα, των προσκολλημένων και πλαγκτονικών κυττάρων σε μήκη κύματος από 4000 έως 400  $\text{cm}^{-1}$ . Η ανάλυση οδήγησε στο διάγραμμα με δύο κύριες συνιστώσες (ΚΣ), το οποίο εξηγεί το 77,4% της συνολικής διακύμανσης (47,9% και 29,5% για ΚΣ1 και ΚΣ2 αντίστοιχα). Από το παραπάνω διάγραμμα, παρατηρείται ότι εντοπίζονται 3 ξεχωριστές ομάδες από τα δεδομένα και πιο συγκεκριμένα διακρίνονται ο μάρτυρας, τα προσκολλημένα κύτταρα και τα πλαγκτονικά κύτταρα. Επιπλέον φαίνεται πως τα προσκολλημένα κύτταρα δεν εμφανίζουν απόκλιση μεταξύ τους, παρόλο που προέρχονται από διαφορετικά στελέχη και καλλιέργειες (11 στελέχη και 6 ανεξάρτητες καλλιέργειες για κάθε στέλεχος). Αντίθετα, η κατανομή των πλαγκτονικών κυττάρων παρουσιάζει μεγαλύτερη μεταβλητότητα στο χώρο, κατά μήκος της Κύριας Συνιστώσας 2 (ΚΣ2). Τα πλαγκτονικά κύτταρα τοποθετήθηκαν πιο κοντά στο μάρτυρα σε σχέση με τα προσκολλημένα κύτταρα. Παρόλα αυτά, ακόμα και με αυτόν τον τρόπο κατά μήκος της Κύριας Συνιστώσας 1 (ΚΣ1) οι δυο ομάδες (προσκολλημένα και πλαγκτονικά κύτταρα) διαχωρίζονται ξεκάθαρα. Τα δείγματα του μάρτυρα και των πλαγκτονικών κυττάρων που βρίσκονται στο πάνω δεξιά τεταρτημόριο χαρακτηρίζονται από τις ιδιότητες που σχετίζονται θετικά με τις ΚΣ1 και ΚΣ2. Τα δείγματα των προσκολλημένων κυττάρων που βρίσκονται στο κάτω αριστερά τεταρτημόριο χαρακτηρίζονται από τις ιδιότητες που σχετίζονται αρνητικά με τις ΚΣ1 και ΚΣ2.

## 3.2. Μελέτη βιοϋμενίου

### 3.2.1. Ικανότητα προσκόλλησης σε διαφορετικές συνθήκες

Στη συνέχεια η έρευνα επικεντρώθηκε σε ένα στέλεχος του είδους για την περαιτέρω μελέτη σχηματισμού του βιοϋμενίου. Η επιλογή του συγκεκριμένου στελέχους βασίστηκε στο γεγονός ότι: 1) παρουσίασε υψηλή ικανότητα προσκόλλησης στην επιφάνεια του ανοξειδωτού ατσάλιου (βλ. ενότητα 3.1) 2) χαρακτηρίζεται από αντοχή στην παρουσία του θειώδη ανυδρίτη (Dimorouliou et al., 2019a). Η προσκόλληση μελετήθηκε σε συνθήκες οينوποίησης (μούστος, οίνος) αλλά και σε συνθήκες οινολογικού stress (αιθανόλη, χαμηλό pH, θειώδης ανυδρίτης). Πιο συγκεκριμένα εξετάστηκε η προσκόλληση κυττάρων σε κουπόνια από ανοξειδωτο ατσάλι καθώς και η επιβίωση των πλαγκτονικών κυττάρων σε: α) αποστειρωμένο διάλυμα Ringer (μάρτυρας), β) αποστειρωμένο διάλυμα Ringer με τελικό pH  $3,2\pm 0,2$ , γ) αποστειρωμένο διάλυμα Ringer με 5% αιθανόλη, δ) αποστειρωμένο διάλυμα Ringer με 20 g/hl θειώδη ανυδρίτη, ε) κόκκινο κρασί (12,5% vol, pH  $3,3\pm 0,2$ ) και στ) μούστο (pH:  $3,5\pm 0,2$ ). Επιπλέον εξετάστηκε η ικανότητα προσκόλλησης σε κουπόνια γυαλιού με μέσο αποστειρωμένο διάλυμα Ringer και συγκρίθηκε με την αντίστοιχη προσκόλληση σε ανοξειδωτο ατσάλι. Σε όλες τις περιπτώσεις η ικανότητα προσκόλλησης μελετήθηκε για τη διάρκεια των τριών ωρών στους 25°C.

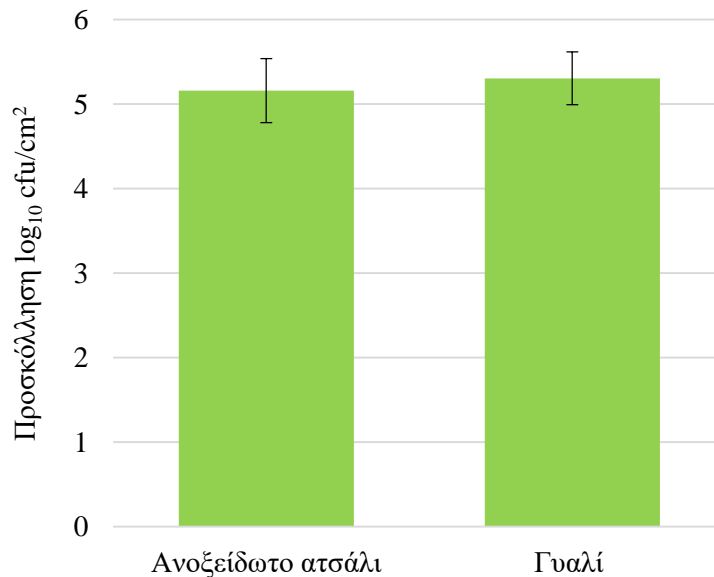
Στα Διαγράμματα 3.3, 3.4 παρουσιάζονται σε δεκαδικό λογάριθμο οι πληθυσμοί των προσκολλημένων κυττάρων στις διαφορετικές συνθήκες και υλικά για τα κύτταρα του *B. bruxellensis* (33.1), ενώ στους Πίνακες 3.2, 3.3 παρουσιάζονται οι πληθυσμοί των προσκολλημένων και των πλαγκτονικών κυττάρων στις διαφορετικές συνθήκες και υλικά που μελετήθηκαν.



**Διάγραμμα 3.3:** Μέσος πληθυσμός των προσκολλημένων κυττάρων ( $\log_{10}$  cfu/cm<sup>2</sup>) του στελέχους *B. bruxellensis* 33.1 στην επιφάνεια κουπονιών από ανοξείδωτο ασάλι, σε διαφορετικές συνθήκες. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση μεταξύ ανεξάρτητων επαναλήψεων (n=6). Οι τιμές με λατινικά κεφαλαία (A-D) γράμματα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ( $p \leq 0,05$ ) και αναφέρονται στα προσκολλημένα και κύτταρα.

**Πίνακας 3.2:** Μέσοι όροι των τιμών  $\log_{10}$  cfu/cm<sup>2</sup> ± τυπική απόκλιση για τον πληθυσμό των προσκολλημένων κυττάρων και μέσοι όροι των τιμών  $\log_{10}$  cfu/ml ± τυπική απόκλιση για τον πληθυσμό των πλαγκτονικών κυττάρων του στελέχους *B. bruxellensis* 33.1 στις διαφορετικές συνθήκες οινοποίησης.

Συνθήκη	Προσκόλληση $\log_{10}$ cfu/cm <sup>2</sup>	Πλαγκτονικά $\log_{10}$ cfu/ml
Μάρτυρας	5,16±0,38	7,50±0,08
pH	3,30±0,37	4,72±0,31
Αιθανόλη	5,04±0,49	7,28±0,09
Θειώδες	0,57±0,30	0,00±0,00
Κρασί	1,27±0,80	3,49±0,43
Μούστος	2,06±0,33	6,21±0,24



**Διάγραμμα 3.4:** Μέσος πληθυσμός των προσκολλημένων κυττάρων ( $\log_{10}$  cfu/cm<sup>2</sup>) του στελέχους *B. bruxellensis* 33.1 στην επιφάνεια κουπονιών από ανοξειδωτο ατσάλι και γυαλί, σε διάλυμα Ringer. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση μεταξύ ανεξάρτητων επαναλήψεων (n=6). Διεξήχθη στατιστική ανάλυση μεταξύ των δύο συνθηκών.

**Πίνακας 3.3:** Μέσοι όροι των τιμών  $\log_{10}$  cfu/cm<sup>2</sup> ± τυπική απόκλιση για τον πληθυσμό των προσκολλημένων κυττάρων και μέσοι όροι των τιμών  $\log_{10}$  cfu/ml ± τυπική απόκλιση για τον πληθυσμό των πλαγκτονικών κυττάρων του στελέχους *B. bruxellensis* 33.1 στα διαφορετικά υλικά κουπονιών που χρησιμοποιήθηκαν.

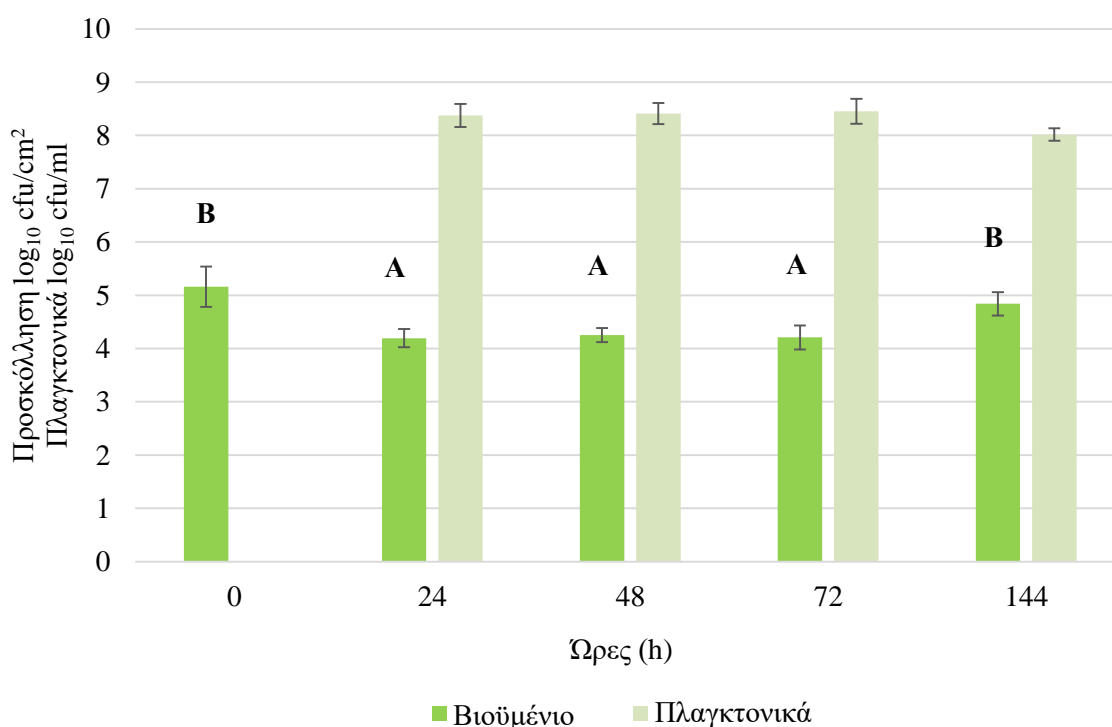
Υλικά κουπονιών	Προσκόλληση $\log_{10}$ (cfu/cm <sup>2</sup> )	Πλαγκτονικά $\log_{10}$ (cfu/ml)
Ανοξειδωτο ατσάλι	5,16±0,38	7,50±0,08
Γυαλί	5,31±0,31	7,23±0,14

Από το Διάγραμμα 3.3 και τον Πίνακα 3.2, παρατηρείται ότι η προσκόλληση των κυττάρων του στελέχους *B. bruxellensis* 33.1 διαφέρει στατιστικά σημαντικά μεταξύ των συνθηκών και διακρίνονται 4 ομάδες. Πιο συγκεκριμένα, στην ομάδα με τη μεγαλύτερη προσκόλληση ανήκουν ο μάρτυρας ( $\log_{10}$  5,16±0,38 cfu/cm<sup>2</sup>) και το Ringer με 5% αιθανόλη ( $\log_{10}$  5,04±0,49 cfu/cm<sup>2</sup>). Στην ομάδα με τη μικρότερη προσκόλληση ανήκουν το Ringer με 20 g/hl θειώδες ( $\log_{10}$  0,57±0,30 cfu/cm<sup>2</sup>) και το κόκκινο κρασί ( $\log_{10}$  1,27±0,80 cfu/cm<sup>2</sup>).

Από το Διάγραμμα 3.4 και τον Πίνακα 3.3, παρατηρείται ότι η προσκόλληση των κυττάρων του στελέχους *B. bruxellensis* 33.1 δεν διαφέρει στατιστικά σημαντικά μεταξύ των υλικών των κουπονιών που χρησιμοποιήθηκαν.

### 3.2.2. Ικανότητα ανάπτυξης βιοϋμενίου στο πέρασμα του χρόνου

Στη συνέχεια, εξετάστηκε η ικανότητα ανάπτυξης βιοϋμενίου με το πέρασμα του χρόνου (0, 24, 48, 72 και 144 ώρες) και η επιβίωση των αντίστοιχων πλαγκτονικών κυττάρων για το στέλεχος του *B. bruxellensis* που μελετήθηκε και προηγουμένως. Το διάστημα τα κύτταρα του μικροοργανισμού ήρθαν σε επαφή με την επιφάνεια του ανοξείδωτου ατσαλιού σε YPD broth ενώ η επώαση έγινε στους 25°C. Στο Διάγραμμα 3.5 και στον Πίνακα 3.4 που ακολουθούν παρουσιάζονται σε δεκαδικό λογάριθμο οι πληθυσμοί των προσκολλημένων κυττάρων και των πλαγκτονικών κυττάρων στο πέρασμα του χρόνου.



**Διάγραμμα 3.5:** Μέσος πληθυσμός των προσκολλημένων ( $\log_{10}$  cfu/cm<sup>2</sup>) και των πλαγκτονικών ( $\log_{10}$  cfu/ml) κυττάρων του στελέχους του *B. bruxellensis* 33.1 σε κουπόνια ανοξείδωτου ατσαλιού και διάλυμα Ringer, στο πέρασμα του χρόνου (0, 24, 48, 72, 144 h). Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση μεταξύ ανεξάρτητων επαναλήψεων (n=6). Οι τιμές με διαφορετικά λατινικά κεφαλαία (A-B) γράμματα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ( $p \leq 0,05$ ) και αναφέρονται στα προσκολλημένα κύτταρα.

**Πίνακας 3.4:** Μέσοι όροι των τιμών  $\log_{10}$  cfu/cm<sup>2</sup> ± τυπική απόκλιση για την ανάπτυξη του βιοϋμενίου και μέσοι όροι των τιμών  $\log_{10}$  cfu/ml ± τυπική απόκλιση για τον πληθυσμό των πλαγκτονικών κυττάρων του στελέχους *B. bruxellensis* 33.1 στο πέρασμα του χρόνου.

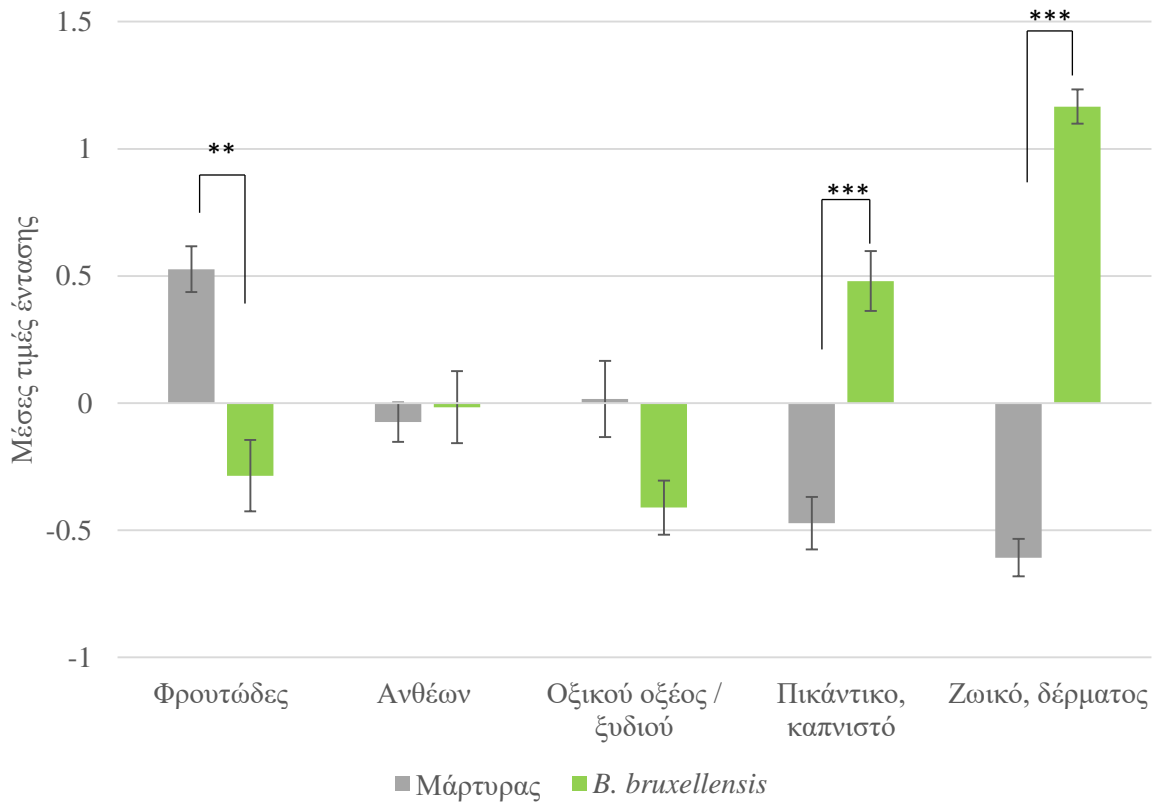
Ωρες	Βιοϋμένιο $\log_{10}$ (cfu/cm <sup>2</sup> )	Πλαγκτονικά $\log_{10}$ (cfu/ml)
0	5,16±0,38	
24	4,19±0,17	8,37±0,22
48	4,25±0,13	8,41±0,20
72	4,21±0,23	8,45±0,24
144	4,84±0,22	8,02±0,12

Από το Διάγραμμα 3.5 και τον Πίνακα 3.4, παρατηρείται ότι ο σχηματισμός του βιοϋμενίου του στελέχους *B. bruxellensis* 33.1 διαφέρει στατιστικά σημαντικά μεταξύ των διαφορετικών ωρών και διακρίνονται 2 ομάδες. Παρ' όλα αυτά οι πληθυσμοί των δύο ομάδων δεν διαφέρουν πάνω από ένα λογάριθμο. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι υπάρχει μετακίνηση τις πρώτες μέρες δημιουργίας του βιοϋμενίου μεταξύ πλαγκτονικών και προσκολλημένων κυττάρων για το συγκεκριμένο στέλεχος.

### 3.2.3. Ικανότητα αλλοίωσης του οίνου από προσκολλημένα κύτταρα

Στην τελευταία πειραματική ενότητα εξετάστηκε η ικανότητα αλλοίωσης του οίνου των προσκολλημένων κυττάρων στην επιφάνεια του κουπονιού για το στέλεχος 33.1 του μικροοργανισμού *B. bruxellensis*. Πιο συγκεκριμένα, αρχικά μονοκαλλιέργειες των κυττάρων του μικροοργανισμού προσκόλλησαν στην επιφάνεια του κουπονιού όπως περιγράφηκε προηγουμένως και στη συνέχεια κάθε κουπόνι μεταφέρθηκε ασηπτικά σε σωλήνα με φρέσκο κρασί απαλλαγμένο από μικροοργανισμούς. Η προσκόλληση των κυττάρων στην επιφάνεια του κουπονιού επιβεβαιώθηκε με εφαρμογή της μεθόδου στροβιλισμού με γυάλινα σφαιρίδια ενώ τα κουπόνια επώαστηκαν στο φρέσκο κρασί στους 25°C και μετά το διάστημα των 2 μηνών πραγματοποιήθηκε οργανοληπτικός έλεγχος των δειγμάτων. Στα Διαγράμματα 3.6 που ακολουθεί παρουσιάζονται οι μέσες τιμές των εντάσεων των διαφορετικών αρωματικών χαρακτηριστικών για τα δείγματα του οίνου. Ο μάρτυρας στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι κρασί το οποίο επώαστηκε για δύο μήνες με κουπόνια ανοξειδωτού ατσαλιού χωρίς προσκολλημένα κύτταρα.





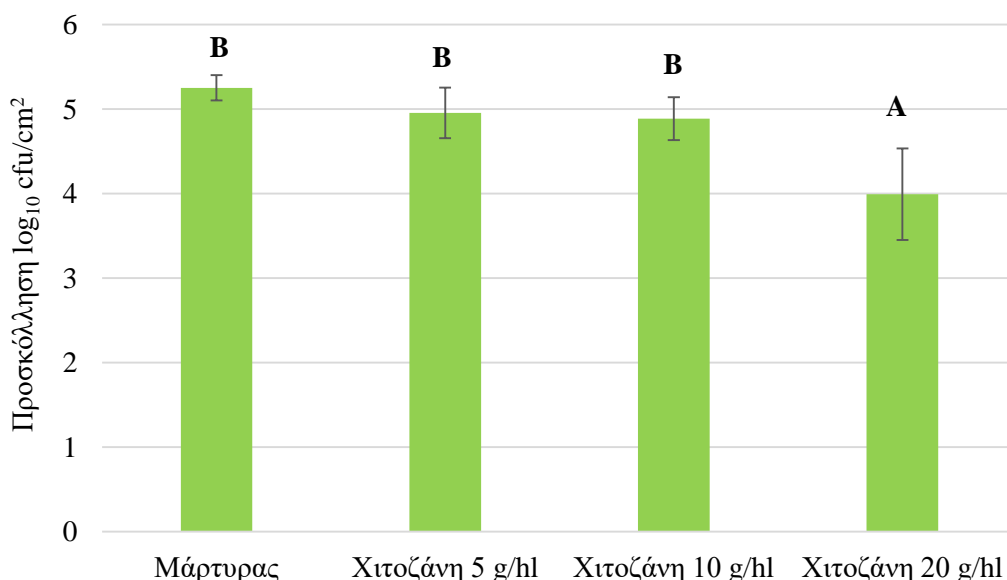
**Διάγραμμα 3.6:** Μέσες κεντραρισμένες τιμές έντασης των αρωματικών χαρακτηριστικών του κρασιού που επωάστηκε δύο μήνες με κουπόνι από ανοξειδωτο ασάλι με προσκολλημένα κύτταρα του στελέχους *B. bruxellensis* 33.1. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση μεταξύ ανεξάρτητων επαναλήψεων (n=6). Διεξήχθη στατιστική ανάλυση μεταξύ των δύο συνθηκών για κάθε χαρακτηριστικό (ANOVA, \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

Από το παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται ότι το κρασί το οποίο επωάστηκε για δύο μήνες με κουπόνια που έφεραν προσκολλημένα κύτταρα του στελέχους *B. bruxellensis* 33.1 έβγαλε έντονα αρώματα ζωικά και δέρματος αλλά και πικάντικου και καπνιστού τα οποία φαίνεται να έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά με τον μάρτυρα ( $p \leq 0,001$ ). Επιπλέον διαφέρει στατιστικά σημαντικά με τον μάρτυρα στο φρουτώδες άρωμα ( $p \leq 0,01$ ) κάτι που υποδεικνύει ότι δεν έφερε καθόλου το συγκεκριμένο χαρακτηριστικό. Στα αρώματα ανθέων και οξικού οξέος / ξυδιού δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά.

### 3.3. Τρόποι αντιμετώπισης της δημιουργίας βιοϋμενίου

Στην τελευταία ενότητα της πειραματικής διαδικασίας εξετάστηκαν διαφορετικοί τρόποι αντιμετώπισης του σχηματιζόμενου βιοϋμενίου από το στέλεχος *B. bruxellensis* 33.1, όπως η προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων χιτοζάνης και ο συν-εμβολιασμός με διαφορετικά στελέχη γαλακτικών βακτηρίων. Πιο συγκεκριμένα εξετάστηκε η προσκόλληση κυττάρων και η επιβίωση των πλαγκτονικών κυττάρων σε κουπόνια από ανοξείδωτο ατσάλι με μέσο αποστειρωμένο διάλυμα Ringer (μάρτυρας), αποστειρωμένο διάλυμα Ringer με 5 g/hl, 10 g/hl, 20 g/hl χιτοζάνης και αποστειρωμένο διάλυμα Ringer παρουσία δύο διαφορετικών εμπορικών στελεχών του βακτηρίου *O. oeni* το (B7) και το (CH11) για τρεις ώρες στους 25°C. Στο Διάγραμμα 3.7 παρουσιάζονται σε δεκαδικό λογάριθμο οι πληθυσμοί των προσκολλημένων και στον Πίνακα 3.5 παρουσιάζονται σε δεκαδικό λογάριθμο οι πληθυσμοί των προσκολλημένων πλαγκτονικών κυττάρων στις διαφορετικές συγκεντρώσεις χιτοζάνης. Στο Διάγραμμα 3.8 παρουσιάζονται σε δεκαδικό λογάριθμο οι πληθυσμοί των προσκολλημένων και στον Πίνακα 3.6 παρουσιάζονται σε δεκαδικό λογάριθμο οι πληθυσμοί των προσκολλημένων πλαγκτονικών κυττάρων παρουσία των εμπορικών στελεχών του βακτηρίου *O.oeni*.

Με δειγματοληψία επιβεβαιώθηκε ότι τα οξυγαλακτικά βακτήρια *O.oeni* (CH11) και *O.oeni* (B7) είχαν προσκολλημένα κύτταρα πάνω στην επιφάνεια των κουπονιών ανοξείδωτου ατσάλιου των οποίων ο πληθυσμός βρισκόταν στους  $2,23 \pm 0,18$  και  $3,65 \pm 0,35$  λογάριθμους ( $\log_{10}$  cfu/cm<sup>2</sup>) αντίστοιχα.

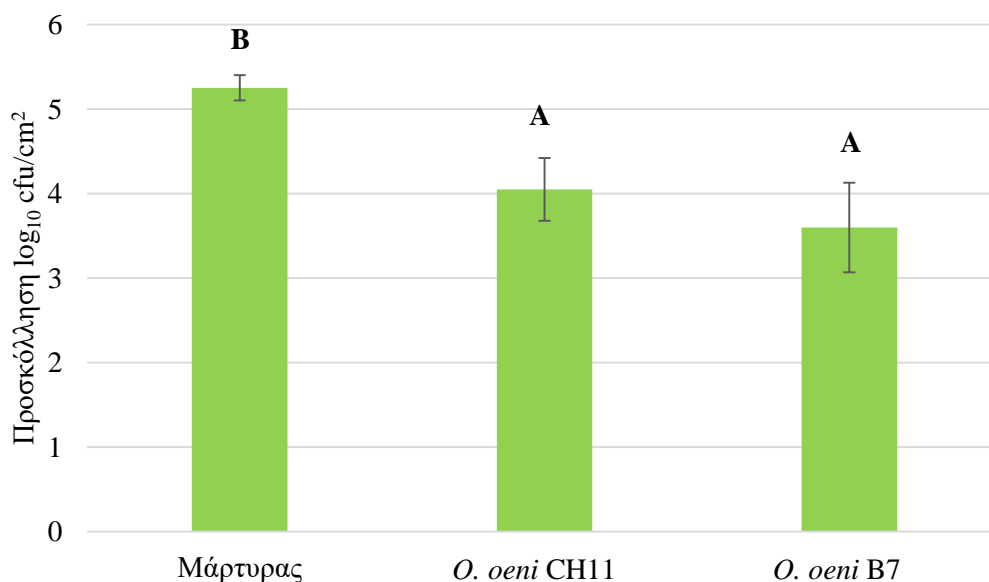


**Διάγραμμα 3.7:** Μέσος πληθυσμός των προσκολλημένων κυττάρων ( $\log_{10}$  cfu/cm<sup>2</sup>) του στελέχους *B. bruxellensis* 33.1 στην επιφάνεια κουπονιών από ανοξείδωτο ατσάλι, στον μάρτυρα και στις διαφορετικές συγκεντρώσεις χιτοζάνης. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση μεταξύ ανεξάρτητων επαναλήψεων (n=6). Οι τιμές με λατινικά κεφαλαία (A-B) γράμματα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ( $p \leq 0,05$ ) και αναφέρονται στα προσκολλημένα και κύτταρα.

**Πίνακας 3.5:** Μέσοι όροι των τιμών  $\log_{10}$  cfu/cm<sup>2</sup> ± τυπική απόκλιση για τον πληθυσμό των προσκολλημένων κυττάρων και μέσοι όροι των τιμών  $\log_{10}$  cfu/ml ± τυπική απόκλιση για τον πληθυσμό των πλαγκτονικών κυττάρων του στελέχους *B. bruxellensis* 33.1 στη χρήση χιτοζάνης ως μέσο βιοπροστασίας.

Συνθήκη	Προσκόλληση $\log_{10}$ (cfu/cm <sup>2</sup> )	Πλαγκτονικά $\log_{10}$ (cfu/ml)
<b>Μάρτυρας</b>	5,25±0,15	7,28±0,09
<b>Χιτοζάνη 5 g/hl</b>	4,95±0,30	7,03±0,20
<b>Χιτοζάνη 10 g/hl</b>	4,89±0,25	6,41±0,19
<b>Χιτοζάνη 20 g/hl</b>	3,99±0,54	5,06±0,81

Από το Διάγραμμα 3.7 και τον Πίνακα 3.5, παρατηρείται ότι η προσκόλληση των κυττάρων του στελέχους *B. bruxellensis* 33.1 διαφέρει στατιστικά σημαντικά μεταξύ των διαφορετικών συγκεντρώσεων χιτοζάνης και διακρίνονται 2 ομάδες. Πιο συγκεκριμένα, στην ομάδα με τη μεγαλύτερη προσκόλληση κυττάρων ανήκουν ο μάρτυρας ( $\log_{10}$  5,25±0,15 cfu/cm<sup>2</sup>), το Ringer με 5 g/hl χιτοζάνη ( $\log_{10}$  4,95±0,30 cfu/cm<sup>2</sup>) και το Ringer με 10 g/hl χιτοζάνη ( $\log_{10}$  4,89±0,25 cfu/cm<sup>2</sup>). Στην ομάδα με την μικρότερη προσκόλληση κυττάρων ανήκει το Ringer με 20 g/hl χιτοζάνη ( $\log_{10}$  3,99±0,54 cfu/cm<sup>2</sup>).



**Διάγραμμα 3.8:** Μέσος πληθυσμός των προσκολλημένων κυττάρων ( $\log_{10}$  cfu/cm<sup>2</sup>) του στελέχους *B. bruxellensis* 33.1 στην επιφάνεια κουπονιών από ανοξείδωτο ατσάλι, στον μάρτυρα και σε παρουσία δυο στελεχών *O. oeni*. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση μεταξύ ανεξάρτητων επαναλήψεων (n=6). Οι τιμές με λατινικά κεφαλαία (A-B) γράμματα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ( $p \leq 0,05$ ) και αναφέρονται στα προσκολλημένα και κύτταρα.

**Πίνακας 3.6:** Μέσοι όροι των τιμών  $\log_{10}$  cfu/cm<sup>2</sup> ± τυπική απόκλιση για τον πληθυσμό των προσκολλημένων κυττάρων και μέσοι όροι των τιμών  $\log_{10}$  cfu/ml ± τυπική απόκλιση για τον πληθυσμό των πλαγκτονικών κυττάρων του στελέχους *B. bruxellensis* 33.1 στη χρήση δυο στελεχών εμπορικών καλλιεργειών *O. oeni* ως μέσο βιοπροστασίας.

Συνθήκη	Προσκόλληση $\log_{10}$ (cfu/cm <sup>2</sup> )	Πλαγκτονικά $\log_{10}$ (cfu/ml)
Μάρτυρας	5,25±0,15	7,28±0,09
<i>O. oeni</i> CH11	4,05±0,37	7,41±0,05
<i>O. oeni</i> B7	3,60±0,53	5,81±0,31

Από το Διάγραμμα 3.8 και τον Πίνακα 3.6, παρατηρείται ότι η προσκόλληση των κυττάρων του στελέχους *B. bruxellensis* 33.1 διαφέρει στατιστικά σημαντικά μεταξύ του μάρτυρα και της παρουσίας των δυο εμπορικών στελεχών του βακτηρίου *O. oeni* και διακρίνονται 2 ομάδες. Πιο συγκεκριμένα, στην ομάδα με τη μεγαλύτερη προσκόλληση κυττάρων ανήκει ο μάρτυρας ( $\log_{10}$  5,25±0,15 cfu/cm<sup>2</sup>), ενώ το Ringer με το βακτήριο *O. oeni* (B7) ( $\log_{10}$  4,05±0,37 cfu/cm<sup>2</sup>) και το Ringer με το βακτήριο *O. oeni* (CH11) ( $\log_{10}$  3,60±0,53 cfu/cm<sup>2</sup>) ανήκουν στην ομάδα με την μικρότερη προσκόλληση. Επιπλέον, στα ίδια κουπόνια προσκολλήθηκαν και κύτταρα της ζύμης και κύτταρα των βακτηρίων. Ταυτόχρονα υπήρχαν πλαγκτονικά κύτταρα των βακτηρίων στο μέσο.

## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στη βιομηχανία τροφίμων και ποτών, ο σχηματισμός των βιοϋμενίων είναι μια σημαντική πηγή επιμόλυνσης με μεγάλη δυσκολία αντιμετώπισης καθώς τα προσκολλημένα κύτταρα μπορούν να παραμείνουν στις επιφάνειες ακόμα και μετά από τον καθαρισμό. Στην παραγωγή του οίνου οι μικροοργανισμοί είναι παρόντες σε όλα τα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας με πιθανή ικανότητα επιμόλυνσης του προϊόντος λόγω της δημιουργίας βιοϋμενίου στις επιφάνειες του οινοποιείου (Lebleux et al., 2020). Οι αντιμικροβιακοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται, όπως ο θειώδης ανυδρίτης δεν είναι πάντα επαρκείς για να καταστρέψουν τα κύτταρα του βιοϋμενίου και νέες αποτελεσματικότερες τεχνικές χρειάζεται να εφαρμοστούν (Taillandier et al., 2015).

Στη παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη αξιολογήθηκε η ικανότητα δημιουργίας βιοϋμενίου της ζύμης αλλοίωσης *B. bruxellensis*. Στην αρχή η έρευνα επικεντρώθηκε στην παραλλακτικότητα του είδους ως προς την ικανότητα προσκόλλησης καθώς και ως προς τη μελέτη του δακτυλικού αποτυπώματος των πλαγκτονικών έναντι των προσκολλημένων κυττάρων για τα έντεκα στελέχη του είδους. Ένα στέλεχος με υψηλό δυναμικό αλλοίωσης επιλέχθηκε στη συνέχεια για τη βαθύτερη μελέτη του σχηματισμού του βιοϋμενίου, όπως παράγοντες που επηρεάζουν την προσκόλληση, κινητική του σχηματισμού του βιοϋμενίου και πιθανή αλλοίωση του οίνου από τα προσκολλημένα κύτταρα. Τέλος εφαρμόστηκαν νέες τεχνικές αντιμετώπισης της προσκόλλησης σε αβιοτικές επιφάνειες.

### 4.1. Παραλλακτικότητα ως προς την ικανότητα προσκόλλησης εντός του είδους

Αρχικά η παρούσα μελέτη επικεντρώθηκε στη μελέτη της παραλλακτικότητας εντός του είδους *B. bruxellensis*, ως προς την ικανότητα προσκόλλησης έντεκα στελεχών. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως και τα έντεκα στελέχη προσκόλλησαν στην επιφάνεια του ανοξείδωτου ατσαλιού στις 3 ώρες και παρουσίασαν διαφορετική ικανότητα προσκόλλησης. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρονται από τους Joseph et al., 2007 όπου παρατηρήθηκε ότι το 95% των στελεχών του *B. bruxellensis* που εξετάστηκαν μπορούσαν να προσκολληθούν σε επιφάνεια πολυστυρενίου, παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης σακχάρου, χωρίς να ληφθεί υπόψη τη γενετική ποικιλομορφία του είδους. Στη παρούσα μελέτη τα στελέχη χωρίστηκαν σε 3 ομάδες με βάση την προσκόλληση των κυττάρων. Η στατιστικά σημαντική διαφορά που παρατηρήθηκε μεταξύ των ομάδων υποδεικνύει την ύπαρξη μεταβλητότητας στην ικανότητα της προσκόλλησης μεταξύ των στελεχών εντός του είδους. Παρόλο που η μεταβλητότητα

εντός του είδους δεν έχει μελετηθεί επαρκώς, έχει μελετηθεί η μεταβλητότητα των στελεχών στην ικανότητα παραγωγής βιοϋμενίου. Σε άλλες μελέτες έχουν παρατηρηθεί ανάλογα με το στέλεχος του *B. bruxellensis* (Lebleux et al., 2020; Dimoroulou et al., 2019b) και του *S. cerevisiae* (Bovo et al., 2018; Speranza et al., 2020) στατιστικά σημαντικές διαφορές στην δημιουργία βιοϋμενίου. Τα στελέχη του *B. bruxellensis* που εξετάστηκαν μελέτη των Dimoroulou et al., 2019b, διέφεραν στις ιδιότητες της κυτταρικής μεμβράνης, κάτι το οποίο μπορεί να έχει σημαντικές επιπτώσεις στην ικανότητα τους να προσκολλάνε σε επιφάνειες και στην ικανότητα τους να δημιουργούν βιοϋμένια. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν διαφορετικούς μηχανισμούς προσκόλλησης με βάση τη γενετική ομάδα που εξετάζεται. Τα ειδικά χαρακτηριστικά κάθε είδους και στελέχους που επηρεάζουν το σχηματισμό βιοϋμενίου μπορούν να δώσουν ερευνητική κατεύθυνση, στη μελέτη συγκεκριμένων αλλοιογόνων ειδών και στελεχών (Kubota et al., 2008).

Ο όρος «μεταβλητότητα στελέχους» (“strain variability”), χρησιμοποιείται για να αποδώσει τις έμφυτες διαφορές μεταξύ στελεχών ενός είδους, τα οποία έχουν μεταχειριστεί με τον ίδιο τρόπο, οι οποίες βασίζονται σε γονοτυπικά ή φαινοτυπικά χαρακτηριστικά. Η δυνατότητα σχηματισμού βιοϋμενίου ανήκει στα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά τα οποία διαφέρουν μεταξύ των στελεχών εντός του ίδιου είδους (Lianou et al., 2020). Ακόμα και βιοϋμένια που προέρχονται από ένα μόνο κύτταρο και θα έπρεπε να αποτελούνται από κλωνικούς πληθυσμούς, αποτελούνται από φαινοτυπικά διακριτούς υποπληθυσμούς. Μέσα στα βιοϋμένια διαφορετικοί τύποι κυττάρων προκύπτουν λόγω έκφρασης, και όχι σύνθεσης, γονιδίων. Η έκφραση γονιδίων εξαρτάται από τις εξωκυτταρικές συνθήκες στις οποίες εκτίθενται τα κύτταρα, στις οποίες ανταποκρίνονται μεταβάλλοντας τον φαινότυπο τους, δηλαδή τη γονιδιακή τους έκφραση (Lopez et al., 2010). Η διαφορά στη σύνθεση των πολυσακχαριτών ή άλλων συστατικών του EPS συμβάλλει στις δομικές διαφορές του βιοϋμενίου. Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε σε ποσοτικές ή ποιοτικές διαφορές των συστατικών είτε σε διαφορετικά σήματα μεταξύ των κυττάρων που εμπλέκονται στην ανάπτυξη του βιοϋμενίου (Lianou et al., 2020). Άλλοι πιθανοί λόγοι στους οποίους μπορεί να οφείλεται η διαφορά στην προσκόλληση και στον σχηματισμό βιοϋμενίου είναι η παραλλακτικότητα της κινητικότητας των κυττάρων μέσω μαστιγίων και η αποτελεσματικότητα των κυττάρων να μεταφέρουν EPS μέσω των κυτταρικών μεμβρανών και συστατικά της επιφάνειας των κυττάρων (Lianou et al., 2020).

## 4.2. Διαφορά ως προς το μεταβολικό αποτύπωμα

Στη συνέχεια η μελέτη εστίασε στη σύγκριση των φασμάτων των προσκολλημένων έναντι των πλαγκτονικών κυττάρων, με σκοπό τη βαθύτερη κατανόηση του μηχανισμού σχηματισμού των βιοϋμενίων. Για το λόγο αυτό ελήφθησαν 135 δείγματα από το πείραμα της προσκόλλησης των έντεκα στελεχών του *B. bruxellensis* και εφαρμόστηκε η φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR) για τη λήψη του μεταβολικού αποτυπώματος των κυττάρων. Με βάση τα αποτελέσματα (ανάλυση PCA), τα δεδομένα της φασματοσκοπίας, χωρίστηκαν σε 3 ομάδες τις οποίες αποτελούν ο μάρτυρας, τα προσκολλημένα κύτταρα και τα πλαγκτονικά κύτταρα. Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει ότι το δακτυλικό αποτύπωμα των προσκολλημένων έναντι των πλαγκτονικών κυττάρων διαφέρει σημαντικά, ενώ όλα τα φάσματα των προσκολλημένων κυττάρων παρουσίαζαν όμοιο προφίλ. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρονται στη μελέτη των Wang et al., 2017, όπου εξετάστηκαν στελέχη της οικογένειας *Enterobacteriaceae* με φασματοσκοπία ATR-FTIR. Τα φάσματα των κυττάρων του βιοϋμενίου εμφάνισαν αρκετές σημαντικές κορυφές, οι οποίες συσχετίστηκαν κυρίως με σύνδεση αμιδίων, πολυσακχαριτών και γλυκοσιδίων, σε αντίθεση με τα φάσματα των πλαγκτονικών κυττάρων που δεν εμφάνισαν αισθητές κορυφές στο ίδιος εύρος. Αντίστοιχα ήταν και τα αποτελέσματα των Quilès et al., 2010, όπου μελετήθηκε η αλλαγή στο δακτυλικό αποτύπωμα του βακτηρίου *Pseudomonas fluorescens* με ATR-FTIR στα στάδια του σχηματισμού βιοϋμενίου και στις διαφορετικές φάσεις ανάπτυξης των πλαγκτονικών κυττάρων. Τα φασματικά δεδομένα των πρωτεϊνών, των νουκλεϊκών οξέων και των πολυσακχαριτών που καταγράφηκαν κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του βιοϋμενίου στην μελέτη των Quilès et al., 2010, αποδείχθηκε ότι συνδέονται με αλλαγές στη φυσιολογική κατάσταση των κυττάρων, πιθανώς συνοδευόμενες από παραγωγή εξωκυτταρικών πολυμερών ουσιών (EPS).

Επιπλέον στην παρούσα μελέτη, τα προσκολλημένα κύτταρα δεν εμφάνισαν απόκλιση μεταξύ τους, παρόλο που προέρχονται από διαφορετικά στελέχη και καλλιέργειες (11 στελέχη και 6 ανεξάρτητες καλλιέργειες για κάθε στέλεχος). Αυτό σημαίνει ότι παρόλο που παρατηρήθηκαν διαφορές στην ικανότητα προσκόλλησης, παράγονται οι ίδιες ουσίες κατά την προσκόλληση από όλα τα στελέχη. Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι οι μοριακοί μηχανισμοί που ρυθμίζουν το σχηματισμό βιοϋμενίου και τα αντίστοιχα βιοχημικά μονοπάτια δεν ποικίλλουν μεταξύ των διαφορετικών στελεχών του ίδιου είδους (Lopez et al., 2010).

### 4.3. Μελέτη προσκόλλησης και ανάπτυξης βιοϋμενίου

Στην συνέχεια επιλέχθηκε ένα στέλεχος του είδους *B. bruxellensis* με υψηλό δυναμικό αλλοίωσης και μελετήθηκε η ικανότητα προσκόλλησης του σε διαφορετικές οινολογικές συνθήκες. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι η προσκόλληση των κυττάρων διαφέρει στατιστικά σημαντικά μεταξύ των συνθηκών, παρόλα αυτά, το συγκεκριμένο στέλεχος κατάφερε να προσκολληθεί τόσο στις εργαστηριακές συνθήκες όσο και στις αντίξοες συνθήκες που πλησιάζουν αυτές που επικρατούν στο οινοποιείο.

Στη μελέτη των Guzzon et al., 2018, αξιολογήθηκε η ικανότητά στελεχών του *B. bruxellensis* να αναπτυχθούν παρουσία παραγόντων που χαρακτηρίζουν το περιβάλλον του κρασιού, όπως αιθανόλη, χαμηλό pH και διοξείδιο του θείου. Συνθήκες όπως 120-150 ml/l συγκέντρωση αιθανόλης και 30 mg/l διοξειδίου του θείου, μείωσαν την ανάπτυξη όλων των στελεχών του *B. bruxellensis*, ενώ το pH στην περιοχή 3,0-3,5 δεν προκάλεσε διαφορές. Αντίθετα, τάση για αυξημένη προσκόλληση και σχηματισμό βιοϋμενίου με την αύξηση του pH αναφέρουν οι Joseph et al., 2007. Το κρασί συνδυάζει αυτούς τους ανασταλτικούς παράγοντες και αυτός είναι ένας πιθανός λόγος για τον οποίο παρατηρείται η μικρότερη προσκόλληση συγκριτικά με τον μάρτυρα. Σε άλλες μελέτες αναφέρεται η αρνητική επίδραση του κρασιού στην ανάπτυξη του συγκεκριμένου μικροοργανισμού (Ferreira et al., 2013) και στο ώριμο βιοϋμένιο (Lebleux et al., 2020). Παρόλα αυτά, σύμφωνα με τα αποτελέσματα των Dimoroulou et al., 2019, η σύνθεση του μέσου που είχε τα χαρακτηριστικά του κρασιού (45% χυμός Savignon, 50% νερό και 5% αιθανόλη) επηρέασε θετικά την ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου σε στελέχη του *B. bruxellensis*. Η σύγκριση μεταξύ διαφορετικών μελετών είναι δύσκολη όχι μόνο γιατί η βιβλιογραφία για το σχηματισμό βιοϋμενίων από τους συγκεκριμένους μικροοργανισμούς σε παρόμοιες συνθήκες είναι λίγη αλλά και επειδή οι συνθήκες διαφέρουν αρκετά και η παραμικρή αλλαγή (0.5% συγκέντρωση αιθανόλης, 0.1 μονάδα pH, 5°C θερμοκρασία) θα μπορούσε να αλλάξει όλο το αποτέλεσμα της μελέτης (Bastard et al., 2016). Η απουσία πλαγκτονικών στην συνθήκη του διοξειδίου του θείου και η θνησιμότητα των πλαγκτονικών σε όλες τις συνθήκες επιβεβαιώνει ότι τα βιοϋμένια είναι ένας τρόπος προσαρμογής στις περιβαλλοντικές δυσμενείς συνθήκες δηλαδή μια στρατηγική επιβίωσης (Speranza et al., 2020). Τα γονίδια που σχετίζονται με την προσκόλληση στις ζύμες μπορούν να ενεργοποιηθούν από κάποιες περιβαλλοντικές πιέσεις όπως περιορισμός θρεπτικών ουσιών, αλλαγές στο pH ή στα επίπεδα αιθανόλης. Ωστόσο, ο σχηματισμός του βιοϋμενίου είναι μια διαδικασία που εξαρτάται από πολλούς παράγοντες οι οποίοι πρέπει να λαμβάνονται υπόψη συνολικά. Πρόκειται για ένα σύστημα στο οποίο κάθε μεταβλητή



συνεργάζεται για να διεγείρει τη μετατροπή από πλαγκτονικά σε κύτταρα βιοϋμενίου, που βοηθούν στην επιβίωση τους στις αντίξοες συνθήκες (Speranza et al., 2020).

Για τις ζύμες τα διαθέσιμα δεδομένα στο κομμάτι των βιοϋμενίων είναι λίγα, ενώ τα βακτηριακά βιοϋμενία έχουν μελετηθεί σε βάθος. Στη μελέτη των Giaouris et al., 2005, ο σχηματισμός βιοϋμενίου στο βακτήριο *Salmonella enteritica* δεν επηρεάστηκε από την τιμή του pH αλλά σχετίστηκε αρνητικά με την υψηλή συγκέντρωση χλωριούχου νατρίου. Στο βακτήριο *Staphylococcus aureus* ο σχηματισμός βιοϋμενίου προκλήθηκε από την έκθεση σε αιθανόλη (Tango et al., 2018). Τα βιοϋμενία του *S.aureus* ήταν ισχυρότερα σε συνθήκες όπου το pH και η ενεργότητα νερού ( $a_w$ ) ήταν πιο κοντά στις βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης του μικροοργανισμού. Αντίστοιχα, σε συνθήκες που δεν επιτρέπουν την ανάπτυξη τα βιοϋμενία ήταν πιο αδύναμα (Tango et al., 2018). Μια πιθανή εξήγηση, σύμφωνα με τους Speranza et al., 2020, είναι ότι το χαμηλό pH θα μπορούσε να προκαλέσει μείωση του αρνητικού φορτίου στην επιφάνεια του κυττάρου, με αποτέλεσμα τα κύτταρα να προσκολλάνε μεταξύ τους εξαιτίας της απουσίας ηλεκτροστατικής άπωσης μεταξύ των κυττάρων.

Όσον αφορά τα υλικά των κουπονιών που χρησιμοποιήθηκαν, το στέλεχος του *B. bruxellensis* που μελετήθηκε δεν παρουσίασε σημαντικές διαφορές στην προσκόλληση. Στη βιβλιογραφία, δεν υπάρχουν μελέτες που να συγκρίνουν τα δυο υλικά στη προσκόλληση του συγκεκριμένου μικροοργανισμού. Αντίστοιχα, στην μελέτη των Dourou et al., 2011, το είδος της επιφάνειας (ανοξειδωτο ατσάλι, πολυαιθυλένιο) δεν επηρέασε την προσκόλληση κυττάρων του βακτηρίου *Escherichia coli* ούτε τον σχηματισμό βιοϋμενίων. Σε συμφωνία με τα παραπάνω βρίσκονται και άλλες μελέτες όπου ο σχηματισμός βιοϋμενίου των βακτηρίων δεν επηρεάστηκε από τα υλικά ανοξειδωτο ατσάλι και το πολυπροπυλένιο (da Silva Meira et al., 2012; Iñiguez-Moreno et al., 2019).

Επιπρόσθετα, εξετάστηκε η ανάπτυξη του βιοϋμενίου των κυττάρων της ζύμης στην πάροδο του χρόνου (0, 24, 48, 72 και 144 ώρες), στην επιφάνεια ανοξειδωτου ατσαλιού. Στο πέρασμα του χρόνου δεν παρατηρήθηκε αύξηση του βιοϋμενίου από το στέλεχος 33.1 του *B. bruxellensis*, καθώς δεν παρατηρείται διαφορά μεγαλύτερη από 1 λογάριθμο. Ωστόσο, παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση με το μέσο ανάπτυξης κάτι το οποίο γίνεται αντιληπτό από το γεγονός ότι εμφανίζονται πλαγκτονικά κύτταρα τα οποία προέρχονται από το βιοϋμενίο. Στη μελέτη των Speranza et al., 2020, ο *S. cerevisiae* εμφάνισε την υψηλότερη συγκέντρωση κυττάρων βιοϋμενίου (sessile) μετά από 3 ημέρες ( $5 \log_{10}$  cfu/cm<sup>2</sup>) ενώ αντίστοιχα στην μελέτη των Lebleux et al., 2020, οι πληθυσμοί των βιοϋμενίων των δώδεκα στελεχών του *B. bruxellensis* έφτασαν στις 14 μέρες βιομάζα ίση με  $4.1 \cdot 10^6$  cfu/cm<sup>2</sup> κατά μέσο όρο. Σύμφωνα

με τους Chorianoopoulos et al., 2010 ο σχηματισμός του βιοϋμενίου αυξάνεται προοδευτικά καθώς ο χρόνος επώασης αυξάνεται, στον μικροοργανισμό *S. enteritica*. Περαιτέρω έρευνα είναι απαραίτητη με σκοπό να μελετηθεί η δημιουργία βιοϋμενίου του *B. bruxellensis* για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η ικανότητα των προσκολλημένων κυττάρων να προκαλέσουν αλλοίωση στον οίνο. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση με το μέσο, η οποία έγινε αντιληπτή με την ύπαρξη πλαγκτονικών κυττάρων προερχόμενα από το βιοϋμένιο. Η ίδια αλληλεπίδραση θα μπορούσε να λάβει χώρα κατά την τοποθέτηση κρασιού (απαλλαγμένου από μικροοργανισμούς), σε δεξαμενή με βιοϋμένιο, στο οινοποιείο. Για το λόγο αυτό μελετήθηκε η ικανότητα αλλοίωσης του κόκκινου κρασιού με τη χρήση κυττάρων μονοκαλλιέργειας προσκολλημένων σε επιφάνεια κουπονιού από ανοξείδωτο ατσάλι και επώαση για το διάστημα των 2 μηνών στους 25°C με σκοπό οι πειραματικές συνθήκες να πλησιάζουν όσο το δυνατόν περισσότερο τις οινολογικές συνθήκες παραγωγής.

Η χρήση προσκολλημένων κυττάρων χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά ως εμβόλιο σε κρασί με σκοπό τη μελέτη πιθανής αλλοίωσης. Παρατηρήθηκε πως τα δείγματα του κρασιού που εμβολιάστηκαν με τα προσκολλημένα κύτταρα του στελέχους *B. bruxellensis* 33.1, παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τον μάρτυρα στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά που εξετάστηκαν, μετά το πέρας των 2 μηνών. Πιο συγκεκριμένα, στο «επιμολυσμένο» κρασί μειώθηκε το φρουτώδες άρωμα ενώ αυξήθηκαν οι νότες του πικάντικου χαρακτήρα και του δέρματος. Τα αποτελέσματα έρχονται να ενισχύσουν την υπάρχουσα βιβλιογραφία. Στα κόκκινα κρασιά η ανάπτυξη του *B. bruxellensis* προκαλεί «χαρακτήρα Brett», ο οποίος περιλαμβάνει ένα ευρύ φάσμα γεύσεων και αρωμάτων, όπως καπνιστό πικάντικο και δέρματος (Romano et al., 2009).

#### **4.4. Εναλλακτικοί τρόποι αντιμετώπισης προσκολλημένων κυττάρων**

Το γεγονός ότι τα προσκολλημένα κύτταρα μπορούν να προκαλέσουν αλλοίωση έστω και σε ένα δείγμα κρασιού υποδηλώνει ότι είναι μεταβολικά ενεργά και είναι σημαντικό να βρεθεί τρόπος αντιμετώπισης που να μπορεί να εφαρμοστεί στην οινοποίηση. Για το λόγο αυτό μελετήθηκαν οι τεχνικές αντιμετώπισης του βιοϋμενίου με δυναμικό εφαρμογής στην παραγωγή του οίνου, όπως χρήση χιτοζάνης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις καθώς και συνεμβολιασμός με διαφορετικά στελέχη του βακτηρίου *O. oeni*.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η χρήση 20 g/hl χιτοζάνης μείωσε στατιστικά σημαντικά την προσκόλληση σε σχέση με τον μάρτυρα. Με βάση τη βιβλιογραφία, η χρήση χιτοζάνης πραγματοποιήθηκε πρώτη φορά για να αποτραπεί η προσκόλληση της ζύμης *B. bruxellensis*. Ωστόσο υπάρχουν αναφορές για άλλους αντιμικροβιακούς παράγοντες που ήταν αποτελεσματικοί στη μείωση του πληθυσμού των κυττάρων του βιοϋμενίου της ζύμης *D. bruxellensis* (Tristezza et al., 2010). Όσον αφορά την επίδραση της χιτοζάνης σε βιοϋμένια, τόσο στις φάσεις προσκόλλησης όσο και στο ώριμο βιοϋμένιο μειώθηκαν οι μεταβολικές δραστηριότητες της ζύμης *Candida* spp. κατά περίπου 70% και 80%, αντίστοιχα (Garcia et al., 2018). Επιπρόσθετα παρατηρήθηκε ότι η αύξηση της συγκέντρωσης της χιτοζάνης, είχε ως αποτέλεσμα την προοδευτική μείωση της βιομάζας και της μεταβολικής δραστηριότητας. (Garcia et al., 2018). Παρόμοια αποτελέσματα παρουσίασαν και οι Garcia et al., 2020, όπου η χιτοζάνη, στις φάσεις προσκόλλησης και στο ώριμο βιοϋμένιο μείωσε τη βιομάζα και τη μεταβολική δραστηριότητα του παθογόνου μύκητα *Sporothrix brasiliensis*. Σε συνδυασμό με τα παραπάνω, υπάρχουν αναφορές στη βιβλιογραφία για τη χρήση της χιτοζάνης σε πειράματα ανάπτυξης του *B. bruxellensis*. Οι Ferreira et al., 2013, έδειξαν ότι η χιτοζάνη, αναστέλλει την ανάπτυξη του *Brettanomyces / Dekkera* σε κρασί και αυτό επηρεάζεται από το μοριακό βάρος της χιτοζάνης και το στέλεχος του μικροοργανισμού. Στη μελέτη των Taillandier et al., 2015, η χιτοζάνη είχε αρνητική επίδραση στη βιωσιμότητά των κυττάρων του *B. bruxellensis*. Σύμφωνα με τους Petrova et al., 2016, η χιτοζάνη θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως μέσο για τη μείωση του πληθυσμού, αλλά όχι την εξάλειψη του *B. bruxellensis* κατά την ωρίμανση των ερυθρών οίνων.

Η προσκόλληση του *B. bruxellensis* μειώθηκε στατιστικά σημαντικά σε σχέση με το μάρτυρα, με τη χρήση των δύο στελεχών του βακτηρίου *O. oeni*, CH11 και B7. Με βάση τις βιβλιογραφικές αναφορές, προτείνεται ο πρώιμος εμβολιασμός με οξυγαλακτικά βακτήρια μετά την αλκοολική ζύμωση, με σκοπό την επιτάχυνση της πρόκλησης της μηλογαλακτικής ζύμωσης ως ένας χρήσιμος τρόπος για τον έλεγχο του πολλαπλασιασμού του *B. bruxellensis* (Berbegal et al., 2018, 2017). Στην μελέτη των Berbegal et al., 2017, ο συν-εμβολιασμός *S. cerevisiae* με *O. oeni* εμπόδισε την ανάπτυξη του *B. bruxellensis*. Συμπερασματικά, η επίδραση του *O. oeni* στην ανάπτυξη του *B. bruxellensis* μπορεί να υποτεθεί ότι οφείλεται στη μικρότερη διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών. Δεδομένου ότι η βιβλιογραφία στο θέμα της βιοπροστασίας έναντι των βιοϋμενίων είναι περιορισμένη, χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση η επίδραση μεγαλύτερων συγκεντρώσεων χιτοζάνης και διαφορετικών εμπορικών στελεχών του *O. oeni* για το στέλεχος του *B. bruxellensis* 33.1 αλλά και σε άλλα στελέχη.

## 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η ζύμη *B. bruxellensis* αποτελεί τον κύριο αλλοιογόνο μικροοργανισμό του οίνου. Στην παρούσα μελέτη το ενδιαφέρον εστίασε στην αξιολόγηση της ικανότητας προσκόλλησης και δημιουργίας βιοϋμενίου στο πέρασμα του χρόνου, καθώς και στο δυναμικό αλλοίωσης των προσκολλημένων κυττάρων για τη ζύμη αλλοίωσης *B. bruxellensis* και την εφαρμογή νέων τρόπων αντιμετώπισης. Εφαρμόστηκε για πρώτη φορά η χρήση φασματοσκοπίας FTIR για τη μελέτη και σύγκριση του δακτυλικού αποτυπώματος των πλαγκτονικών έναντι των προσκολλημένων κυττάρων. Με βάση τα αποτελέσματα τα στελέχη *B. bruxellensis* που εξετάστηκαν διαφέρουν ως προς την ικανότητα προσκόλλησης όμως εμφανίζουν κοινό μεταβολικό αποτύπωμα προτείνοντας έναν πιθανό κοινό μηχανισμό εντός του είδους. Επιπρόσθετα για πρώτη φορά αποδείχθηκε ότι τα προσκολλημένα κύτταρα του *B. bruxellensis* μπορούν να προκαλέσουν αλλοίωση στον οίνο, όμως κρίνεται σημαντική περαιτέρω έρευνα ώστε να διερευνηθεί το φαινόμενο που παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη σε περισσότερα είδη κρασιών ή / και με την επιμόλυνση από περισσότερα στελέχη *B. bruxellensis* καθώς δεν έχουν όλα την ίδια δυνατότητα προσκόλλησης και αλλοίωσης. Τέλος η χρήση υψηλής συγκέντρωσης χιτοζάνης (20 g/hl) καθώς και η παρουσία γαλακτικών βακτηρίων του είδους *O. oeni* μπορούν να μειώσουν την προσκόλληση της ζύμης αλλοίωσης στην επιφάνεια του ανοξείδωτου ατσαλιού ανοίγοντας ένα νέο πεδίο έρευνας και πιθανής εφαρμογής στη βιομηχανία του οίνου.

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Agnolucci, M., Tirelli, A., Cocolin, L., Toffanin, A., 2017. *Brettanomyces bruxellensis* yeasts: impact on wine and winemaking. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 33, 180. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2345-z>
- Alvarez-Ordóñez, A., Mouwen, D.J.M., López, M., Prieto, M., 2011. Fourier transform infrared spectroscopy as a tool to characterize molecular composition and stress response in foodborne pathogenic bacteria. *J. Microbiol. Methods* 84, 369–378. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.01.009>
- Avramova, M., Cibrario, A., Peltier, E., Coton, M., Coton, E., Schacherer, J., Spano, G., Capozzi, V., Blaiotta, G., Salin, F., Dols-Lafargue, M., Grbin, P., Curtin, C., Albertin, W., Masneuf-Pomarede, I., 2018. *Brettanomyces bruxellensis* population survey reveals a diploid-triploid complex structured according to substrate of isolation and geographical distribution. *Sci. Rep.* 8, 4136. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22580-7>
- Bartowsky, E.J., 2014. WINES | Malolactic Fermentation, in: *Encyclopedia of Food Microbiology*. Elsevier, pp. 800–804. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00357-8>
- Basalekou, M., Pappas, C., Tarantilis, P.A., Kallithraka, S., 2020. Wine Authenticity and Traceability with the Use of FT-IR. *Beverages* 6, 30. <https://doi.org/10.3390/beverages6020030>
- Bastard, A., Coelho, C., Briandet, R., Canette, A., Gougeon, R., Alexandre, H., Guzzo, J., Weidmann, S., 2016. Effect of Biofilm Formation by *Oenococcus oeni* on Malolactic Fermentation and the Release of Aromatic Compounds in Wine. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00613>
- Berbegal, C., Garofalo, C., Russo, P., Pati, S., Capozzi, V., Spano, G., 2017. Use of Autochthonous Yeasts and Bacteria in Order to Control *Brettanomyces bruxellensis* in Wine. *Fermentation* 3, 65. <https://doi.org/10.3390/fermentation3040065>
- Berbegal, C., Spano, G., Fragasso, M., Grieco, F., Russo, P., Capozzi, V., 2018. Starter cultures as biocontrol strategy to prevent *Brettanomyces bruxellensis* proliferation in wine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 569–576. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8666-x>
- Bovo, B., Nadai, C., Lemos Junior, W.J.F., Carlot, M., Giacomini, A., Corich, V., 2018. The Different Physical and Chemical Composition of Grape Juice and Marc Influence *Saccharomyces cerevisiae* Strains Distribution During Fermentation: Yeasts from grape must and marc.... *J. Food Sci.* 83, 2191–2196. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14274>
- Butzke, C.E., 2010. *Winemaking Problems Solved*, A volume in Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition
- Cañete, E., Chen, J., Martín, C., Rubio, B., 2018. Smart Winery: A Real-Time Monitoring System for Structural Health and Ullage in Fino Style Wine Casks. *Sensors* 18, 803. <https://doi.org/10.3390/s18030803>
- Capozzi, V., Garofalo, C., Chiriatti, M.A., Grieco, F., Spano, G., 2015. Microbial terroir and food innovation: The case of yeast biodiversity in wine. *Microbiol. Res.* 181, 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.10.005>
- Carpentier, B., 2014. Biofilms, in: *Encyclopedia of Food Microbiology*. Elsevier, pp. 259–265. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00039-2>
- Chorianopoulos, N.G., Giaouris, E.D., Kourkoutas, Y., Nychas, G.-J.E., 2010. Inhibition of the Early Stage of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis Biofilm Development on

- Stainless Steel by Cell-Free Supernatant of a *Hafnia alvei* Culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 2018–2022. <https://doi.org/10.1128/AEM.02093-09>
- Ciani, M., Comitini, F., 2014. *Brettanomyces*, in: *Encyclopedia of Food Microbiology*. Elsevier, pp. 316–323. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00046-X>
- Cibrario, A., Miot-Sertier, C., Paulin, M., Bullier, B., Riquier, L., Perello, M.-C., de Revel, G., Albertin, W., Masneuf-Pomarède, I., Ballestra, P., Dols-Lafargue, M., 2020. *Brettanomyces bruxellensis* phenotypic diversity, tolerance to wine stress and wine spoilage ability. *Food Microbiol.* 87, 103379. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103379>
- Considine, J.A., Frankish, E., 2014. Microbiology and Methods, in: *A Complete Guide to Quality in Small-Scale Wine Making*. Elsevier, pp. 79–95. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-408081-2.00006-8>
- da Silva Meira, Q.G., de Medeiros Barbosa, I., Alves Aguiar Athayde, A.J., de Siqueira-Júnior, J.P., de Souza, E.L., 2012. Influence of temperature and surface kind on biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food-contact surfaces and sensitivity to sanitizers. *Food Control* 25, 469–475. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.11.030>
- Di Martino, P., Groupe Biofilm et Comportement Microbien aux Interfaces, Laboratoire ERRMECe-EA1391, Université de Cergy-Pontoise, rue Descartes site de Neuville-sur-Oise 95031 Cergy-Pontoise, cedex France, 2018. Extracellular polymeric substances, a key element in understanding biofilm phenotype. *AIMS Microbiol.* 4, 274–288. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.2.274>
- Dimopoulou, M., Hatzikamari, M., Masneuf-Pomarede, I., Albertin, W., 2019a. Sulfur dioxide response of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from Greek wine. *Food Microbiol.* 78, 155–163. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.10.013>
- Dimopoulou, M., Raffenne, J., Claisse, O., Miot-Sertier, C., Iturmendi, N., Moine, V., Coulon, J., Dols-Lafargue, M., 2018. *Oenococcus oeni* Exopolysaccharide Biosynthesis, a Tool to Improve Malolactic Starter Performance. *Front. Microbiol.* 9, 1276. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01276>
- Dimopoulou, M., Renault, M., Dols-Lafargue, M., Albertin-Leguay, W., Herry, J.-M., Bellon-Fontaine, M.-N., Masneuf-Pomarede, I., 2019b. Microbiological, biochemical, physicochemical surface properties and biofilm forming ability of *Brettanomyces bruxellensis* (preprint). *Microbiology*. <https://doi.org/10.1101/579144>
- Dourou, D., Beauchamp, C.S., Yoon, Y., Geornaras, I., Belk, K.E., Smith, G.C., Nychas, G.-J.E., Sofos, J.N., 2011. Attachment and biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 at different temperatures, on various food-contact surfaces encountered in beef processing. *Int. J. Food Microbiol.* 149, 262–268. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.004>
- Edwards, C.G., Oswald, T.A., 2018. Interactive effects between total SO<sub>2</sub>, ethanol and storage temperature against *Brettanomyces bruxellensis*. *Lett. Appl. Microbiol.* 66, 71–76. <https://doi.org/10.1111/lam.12816>
- Ferreira, D., Moreira, D., Costa, E.M., Silva, S., Pintado, M.M., Couto, J.A., 2013. The Antimicrobial Action of Chitosan Against the Wine Spoilage Yeast *Brettanomyces/Dekkera*. *J. Chitin Chitosan Sci.* 1, 240–245. <https://doi.org/10.1166/jcc.2013.1037>
- Fleet, G.H., 2011. Yeast Spoilage of Foods and Beverages, in: *The Yeasts*. Elsevier, pp. 53–63. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00005-7>
- Flemming, H.-C., Wingender, J., 2010. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- Frølund, B., Palmgren, R., Keiding, K., Nielsen, P.H., 1996. Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Water Res.* 30, 1749–1758. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(95\)00323-1](https://doi.org/10.1016/0043-1354(95)00323-1)

- Garcia, L.G.S., de Melo Guedes, G.M., Fonseca, X.M.Q.C., Pereira-Neto, W.A., Castelo-Branco, D.S.C.M., Sidrim, J.J.C., de Aguiar Cordeiro, R., Rocha, M.F.G., Vieira, R.S., Brilhante, R.S.N., 2020. Antifungal activity of different molecular weight chitosans against planktonic cells and biofilm of *Sporothrix brasiliensis*. *Int. J. Biol. Macromol.* 143, 341–348. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.031>
- Garcia, L.G.S., Guedes, G.M. de M., da Silva, M.L.Q., Castelo-Branco, D.S.C.M., Sidrim, J.J.C., Cordeiro, R. de A., Rocha, M.F.G., Vieira, R.S., Brilhante, R.S.N., 2018. Effect of the molecular weight of chitosan on its antifungal activity against *Candida* spp. in planktonic cells and biofilm. *Carbohydr. Polym.* 195, 662–669. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.04.091>
- Giaouris, E., Chorianopoulos, N., Doulgeraki, A., Nychas, G.-J., 2013. Co-Culture with *Listeria monocytogenes* within a Dual-Species Biofilm Community Strongly Increases Resistance of *Pseudomonas putida* to Benzalkonium Chloride. *PLoS ONE* 8, e77276. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077276>
- Giaouris, E., Chorianopoulos, N., Nychas, G.-J.E., 2005. Effect of Temperature, pH, and Water Activity on Biofilm Formation by *Salmonella enterica* Enteritidis PT4 on Stainless Steel Surfaces as Indicated by the Bead Vortexing Method and Conductance Measurements. *J. Food Prot.* 68, 2149–2154. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.10.2149>
- Gil-Sánchez, I., Bartolomé Suáldea, B., Victoria Moreno-Arribas, M., 2019. Malolactic Fermentation, in: *Red Wine Technology*. Elsevier, pp. 85–98. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814399-5.00006-2>
- Gutiérrez, P., Roldán, A., Caro, I., Pérez, L., 2010. Kinetic study of the velum formation by *Saccharomyces cerevisiae* (beticus ssp.) during the biological aging of wines. *Process Biochem.* 45, 493–499. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.11.005>
- Guzzon, R., Larcher, R., Guarcello, R., Francesca, N., Settanni, L., Moschetti, G., 2018. Spoilage potential of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from Italian wines. *Food Res. Int.* 105, 668–677. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.11.078>
- Hernández, A., Pérez-Navado, F., Ruiz-Moyano, S., Serradilla, M.J., Villalobos, M.C., Martín, A., Córdoba, M.G., 2018. Spoilage yeasts: What are the sources of contamination of foods and beverages? *Int. J. Food Microbiol.* 286, 98–110. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.07.031>
- Iñiguez-Moreno, M., Gutiérrez-Lomelí, M., Avila-Novoa, M.G., 2019. Kinetics of biofilm formation by pathogenic and spoilage microorganisms under conditions that mimic the poultry, meat, and egg processing industries. *Int. J. Food Microbiol.* 303, 32–41. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.04.012>
- Joseph, C.M.L., Kumar, G., Su, E., Bisson, L.F., 2007. Adhesion and Biofilm Production by Wine Isolates of 6.
- Korber, D.R., Mangalappalli-Illathu, A.K., Vidović, S., 2009. Biofilm formation by food spoilage microorganisms in food processing environments, in: *Biofilms in the Food and Beverage Industries*. Elsevier, pp. 169–199. <https://doi.org/10.1533/9781845697167.2.169>
- Kubota, H., Senda, S., Nomura, N., Tokuda, H., Uchiyama, H., 2008. Biofilm Formation by Lactic Acid Bacteria and Resistance to Environmental Stress. *J. Biosci. Bioeng.* 106, 381–386. <https://doi.org/10.1263/jbb.106.381>
- Lebleux, M., Abdo, H., Coelho, C., Basmaciyan, L., Albertin, W., Maupeu, J., Laurent, J., Roullier-Gall, C., Alexandre, H., Guilloux-Benatier, M., Weidmann, S., Rousseaux, S., 2020. New advances on the *Brettanomyces bruxellensis* biofilm mode of life. *Int. J. Food Microbiol.* 318, 108464. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108464>
- Lianou, A., Nychas, G.-J.E., Koutsoumanis, K.P., 2020. Strain variability in biofilm formation: A food safety and quality perspective. *Food Res. Int.* 137, 109424. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109424>

- Longin, C., Degueurce, C., Julliat, F., Guilloux-Benatier, M., Rousseaux, S., Alexandre, H., 2016. Efficiency of population-dependent sulfite against *Brettanomyces bruxellensis* in red wine. *Food Res. Int.* 89, 620–630. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.09.019>
- Lonvaud-Funel, A., 2014. Leuconostocaceae Family, in: *Encyclopedia of Food Microbiology*. Elsevier, pp. 455–465. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00185-3>
- Lopez, D., Vlamakis, H., Kolter, R., 2010. Biofilms. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a000398–a000398. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000398>
- Malfeito-Ferreira, M., 2019. Spoilage Yeasts in Red Wines, in: *Red Wine Technology*. Elsevier, pp. 219–235. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814399-5.00015-3>
- Malfeito-Ferreira, M., 2014. WINES | Wine Spoilage Yeasts and Bacteria, in: *Encyclopedia of Food Microbiology*. Elsevier, pp. 805–810. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00390-6>
- Marsit, S., Dequin, S., 2015. Diversity and adaptive evolution of *Saccharomyces* wine yeast: a review. *FEMS Yeast Res.* 15, fov067. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov067>
- Mas, A., Guillamón, J.M., Beltran, G., 2016. Editorial: Non-conventional Yeast in the Wine Industry. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01494>
- Naumann, D., 2006. Infrared Spectroscopy in Microbiology, in: Meyers, R.A. (Ed.), *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, p. a0117. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a0117>
- Oelofse, A., Pretorius, I.S., du Toit, M., 2016. Significance of *Brettanomyces* and *Dekkera* during Winemaking: A Synoptic Review. *South Afr. J. Enol. Vitic.* 29. <https://doi.org/10.21548/29-2-1445>
- Pantanella, F., Valenti, P., Natalizi, T., Passeri, D., Berlutti, F., 2013. Analytical techniques to study microbial biofilm on abiotic surfaces: pros and cons of the main techniques currently in use 12.
- Pardo, I., Ferrer, S., 2019. Yeast-Bacteria Coinoculation, in: *Red Wine Technology*. Elsevier, pp. 99–114. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814399-5.00007-4>
- Petrova, B., Cartwright, Z.M., Edwards, C.G., 2016. Effectiveness of chitosan preparations against *Brettanomyces bruxellensis* grown in culture media and red wines. *OENO One* 50, 49. <https://doi.org/10.20870/oenone.2016.50.1.54>
- Pinto, L., Baruzzi, F., Cocolin, L., Malfeito-Ferreira, M., 2020. Emerging technologies to control *Brettanomyces* spp. in wine: Recent advances and future trends. *Trends Food Sci. Technol.* 99, 88–100. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.02.013>
- Quilès, F., Humbert, F., Delille, A., 2010. Analysis of changes in attenuated total reflection FTIR fingerprints of *Pseudomonas fluorescens* from planktonic state to nascent biofilm state. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 75, 610–616. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2009.11.026>
- Rodriguez-Saona, L.E., Allendorf, M.E., 2011. Use of FTIR for Rapid Authentication and Detection of Adulteration of Food. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 2, 467–483. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022510-133750>
- Romano, A., Perello, M.C., Lonvaud-Funel, A., Sicard, G., de Revel, G., 2009. Sensory and analytical re-evaluation of “Brett character.” *Food Chem.* 114, 15–19. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.006>
- Smith, B.D., Divol, B., 2016. *Brettanomyces bruxellensis*, a survivalist prepared for the wine apocalypse and other beverages. *Food Microbiol.* 59, 161–175. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.06.008>
- Smith, M.Th., 2011. *Brettanomyces* Kufferath & van Laer (1921), in: *The Yeasts*. Elsevier, pp. 983–986. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00089-6>
- Speranza, B., Corbo, M.R., Campaniello, D., Altieri, C., Sinigaglia, M., Bevilacqua, A., 2020. Biofilm formation by potentially probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Food Microbiol.* 87, 103393. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103393>



- Steensels, J., Daenen, L., Malcorps, P., Derdelinckx, G., Verachtert, H., Verstrepen, K.J., 2015. *Brettanomyces* yeasts — From spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 206, 24–38. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.005>
- Stewart, G.G., 2014. SACCHAROMYCES | *Saccharomyces cerevisiae*, in: *Encyclopedia of Food Microbiology*. Elsevier, pp. 309–315. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00292-5>
- Taillandier, P., Joannis-Cassan, C., Jentzer, J.-B., Gautier, S., Sieczkowski, N., Granes, D., Brandam, C., 2015. Effect of a fungal chitosan preparation on *Brettanomyces bruxellensis*, a wine contaminant. *J. Appl. Microbiol.* 118, 123–131. <https://doi.org/10.1111/jam.12682>
- Tango, C.N., Akkermans, S., Hussain, M.S., Khan, I., Van Impe, J., Jin, Y.-G., Oh, D.H., 2018. Modeling the effect of pH, water activity, and ethanol concentration on biofilm formation of *Staphylococcus aureus*. *Food Microbiol.* 76, 287–295. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.06.006>
- Tristezza, M., Lourenço, A., Barata, A., Brito, L., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., 2010. Susceptibility of wine spoilage yeasts and bacteria in the planktonic state and in biofilms to disinfectants. *Ann. Microbiol.* 60, 549–556. <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0085-5>
- Tugarova, A.V., Scheludko, A.V., Dyatlova, Y.A., Filip'echeva, Y.A., Kamnev, A.A., 2017. FTIR spectroscopic study of biofilms formed by the rhizobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245 and its mutant *Azospirillum brasilense* Sp245.1610. *J. Mol. Struct.* 1140, 142–147. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2016.12.063>
- Valand, R., Tanna, S., Lawson, G., Bengtström, L., 2020. A review of Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy used in food adulteration and authenticity investigations. *Food Addit. Contam. Part A* 37, 19–38. <https://doi.org/10.1080/19440049.2019.1675909>
- Vishwakarma, V., 2020. Impact of environmental biofilms: Industrial components and its remediation. *J. Basic Microbiol.* 60, 198–206. <https://doi.org/10.1002/jobm.201900569>
- Walker, G.M., 2014. WINES | Microbiology of Winemaking, in: *Encyclopedia of Food Microbiology*. Elsevier, pp. 787–792. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00356-6>
- Wang, H., Qi, J., Dong, Y., Li, Y., Xu, X., Zhou, G., 2017. Characterization of attachment and biofilm formation by meat-borne Enterobacteriaceae strains associated with spoilage. *LWT* 86, 399–407. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.025>
- Wedral, D., Shewfelt, R., Frank, J., 2010. The challenge of *Brettanomyces* in wine. *LWT - Food Sci. Technol.* 43, 1474–1479. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.06.010>
- Wirtanen, G., Salo, S., 2016. Biofilm Risks, in: *Handbook of Hygiene Control in the Food Industry*. Elsevier, pp. 55–79. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100155-4.00005-4>