



Γενική Γραμματεία Έρευνας Τεχνολογίας

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

ΕΝΙΑΙΑ ΔΡΑΣΗ ΚΡΑΤΙΚΩΝ ΕΝΙΣΧΥΣΕΩΝ ΕΡΕΥΝΑΣ, ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ & ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑΣ

ΕΡΕΥΝΩ – ΔΗΜΙΟΥΡΓΩ – ΚΑΙΝΟΤΟΜΩ

Τίτλος έργου:

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

Oenovation

(Κωδικός Έργου: T1ΕΔΚ-04747)

Συνοπτική παρουσίαση αποτελεσμάτων

Φορείς υλοποίησης (αλφαβητικά):

Ένωση Συνεταιρισμών Θηραϊκών Προϊόντων (SANTO)

Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων Γεωπονικού Πανεπιστημίου
Αθηνών

Εργαστήριο Οινολογίας Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

Εταιρεία Αξιοποίησης Διαχείρισης Περιουσίας Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

Ινστιτούτο Τεχνολογίας Αγροτικών Προϊόντων Ελληνικού Γεωργικού Οργανισμού- ΔΗΜΗΤΡΑ



ΕΠΑνΕΚ 2014-2020
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



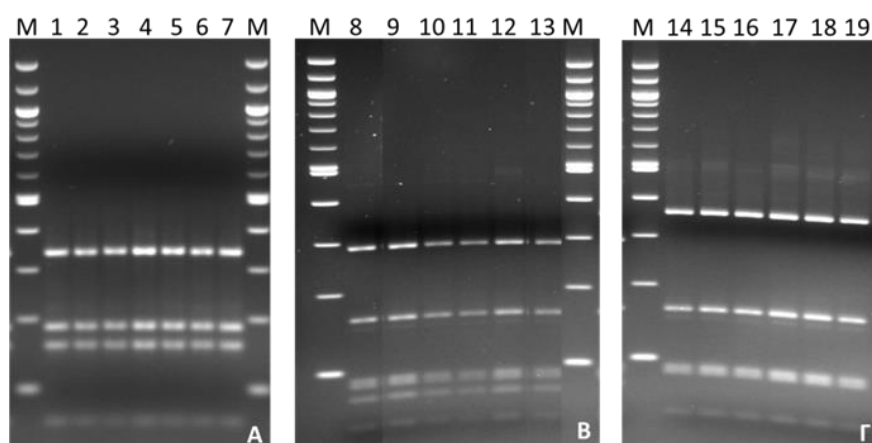
Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

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

Φορείς υλοποίησης:

Ινστιτούτο Τεχνολογίας Αγροτικών Προϊόντων Ελληνικού Γεωργικού Οργανισμού- ΔΗΜΗΤΡΑ
Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων Γεωπονικού Πανεπιστημίου
Αθηνών

Στην παρούσα δράση πραγματοποιήθηκε απομόνωση ενδογενών ζυμών από σταφύλια και γλεύκη των αμπελώνων των συμμετεχουσών εταιρειών ΕΣΘΠ-SANTO στην Σαντορίνη και ΕΑΔΠ-ΓΠΑ στην Αττική. Δείγματα σταφυλιών της ποικιλίας 'Ασύρτικο' συλλέχθηκαν από αμπελώνες των θέσεων «Θηρασία», «Βούρβουλος» και «Πύργος» στη Σαντορίνη και από τον αμπελώνα στη θέση «Γιαλός» της Αττικής. Οι νέες ζύμες απομονώθηκαν από τα σταφύλια και ζυμούμενα γλεύκη. Οι ζύμες ταυτοποιήθηκαν σε επίπεδο είδους με την εφαρμογή κατάλληλων μοριακών τεχνικών. Ακολούθως πραγματοποιήθηκε η μοριακή τυποποίηση και ο τεχνολογικός χαρακτηρισμός των νέων αλλά και υπαρχόντων στελεχών ζυμών. Οι απομονώσεις των ζυμών ταξινομήθηκαν σε 12 διαφορετικά είδη. Οι ζύμες ταυτοποιήθηκαν περαιτέρω σε επίπεδο στελέχους με την βοήθεια κατάλληλων μοριακών μεθόδων. Στους αμπελώνες της Σαντορίνης εντοπίστηκαν αρκετοί διαφορετικοί γονότυποι *Saccharomyces cerevisiae*, με κάποιους να ανευρίσκονται αποκλειστικά σε συγκεκριμένους αμπελώνες ενώ άλλοι παρουσίαζαν ευρύτερη γεωγραφική διασπορά. Η γονοτύπηση των μη-*Saccharomyces* ζυμών πραγματοποιήθηκε με διαφορετικές μοριακές μεθόδους ανάλογα με το είδος. Ειδικά για το είδος *Metschnikowia pulcherrima* αναπτύχθηκε μια νέα μέθοδος μικροδορυφορικού DNA. Τα είδη *Hanseniaspora uvarum*, *H. opuntiae* και *H. guilliermondii* ήταν τα πιο διαδεδομένα μη-*Saccharomyces* είδη τόσο στους αμπελώνες της Σαντορίνης και όσο και της Αττικής. Τα διαφορετικά στελέχη των απομονωθέντων ζυμών αξιολογήθηκαν ως προς τις τεχνολογικές τους ιδιότητες, όπως η αντίσταση στην αιθανόλη και το θειώδη ανυδρίτη, η παραγωγή υδρόθειου και β-γλυκοσιδάσης καθώς και η ικανότητα σχηματισμού βιογενών αμινών. Επίσης, αξιολογήθηκε η ικανότητα παραγωγής τοξίνης "killer".



Ταυτοποίηση είδους:
Αντιπροσωπευτικά
πρότυπα
περιορισμού της
5.8S-ITS rDNA
περιοχής των
απομονώσεων
Hanseniaspora sp. με
ένζυμα περιορισμού
HinfI (Α) και *DdeI*
(Β&Γ).



Τεστ αντοχής διαφορετικών στελεχών ζυμών *S. cerevisiae* σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αιθανόλης.

Βιοϋμένια στην βιομηχανία Οίνου

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

Για το λόγο αυτό, η ομάδα μας μελέτησε την δυνατότητα σχηματισμού του βιοϋμενίου σε 11 διαφορετικά στελέχη του *B. bruxellensis* σε επιφάνειες από ανοξείδωτο χάλυβα, για να διαπιστώσουμε αν όλα τα στελέχη ήταν ικανά να δημιουργήσουν βιοϋμένια.

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

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

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

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

Ενότητα Εργασίας 2: Μελέτη φυσιολογικών και βιο-κινητικών χαρακτηριστικών των νέων καθώς και ήδη υπαρχόντων στελεχών ζυμών

Φορέας υλοποίησης:

Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

Ενότητα Εργασίας 3: Μελέτη στελεχών ζυμών σε σχέση με τις φυτοπροστατευτικές τους δράσεις έναντι παθογόνων της αμπέλου

Φορέας υλοποίησης:

Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

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

Οι ζύμες έχουν την ικανότητα να αποικίζουν υπό ξηροφυτικές συνθήκες και για μακρό χρονικό διάστημα τη φυτική επιφάνεια και να πολλαπλασιάζονται γρήγορα λόγω ταχείας εκμετάλλευσης των θρεπτικών στοιχείων. Παράγουν εξωκυτταρικούς πολυσακχαρίτες οι οποίοι επιμηκύνουν την επιβίωσή τους και μειώνουν τα σημεία αποικισμού του φυτού καθώς παρεμποδίζεται ο αποικισμός φυτοπαθογόνων μυκήτων. Οι ζύμες έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στην βιολογική καταπολέμηση μετασυσσωρευτικών κυρίως

παθογόνων με επεμβάσεις σε προσυλλεκτικό και μετασυλλεκτικό στάδιο. Η ανακάλυψη ελληνικών-ενδημικών απομονώσεων έχει το πλεονέκτημα ότι τα στελέχη αυτά είναι ήδη εγκλιματισμένα στο τοπικό περιβάλλον και στην τοπική χλωρίδα και πανίδα και θα μπορούσαν να πάρουν πιο εύκολα μελλοντικές άδειες χρήσης τους ως βιολογικά σκευάσματα στη χώρα μας. Οι ζύμες έχουν την ικανότητα να αποικίζουν υπό ξηροφυτικές συνθήκες και για μακρό χρονικό διάστημα τη φυτική επιφάνεια και να πολλαπλασιάζονται γρήγορα λόγω ταχείας εκμετάλλευσης των θρεπτικών στοιχείων. Παράγουν εξωκυτταρικούς πολυσακχαρίτες οι οποίοι επιμηκύνουν την επιβίωσή τους και μειώνουν τα σημεία αποικισμού του φυτού καθώς παρεμποδίζεται ο αποικισμός φυτοπαθογόνων μυκήτων. Οι ζύμες έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στην βιολογική καταπολέμηση μετασυλλεκτικών κυρίως παθογόνων με επεμβάσεις σε προσυλλεκτικό και μετασυλλεκτικό στάδιο. Η ανακάλυψη ελληνικών-ενδημικών απομονώσεων έχει το πλεονέκτημα ότι τα στελέχη αυτά είναι ήδη εγκλιματισμένα στο τοπικό περιβάλλον και στην τοπική χλωρίδα και πανίδα και θα μπορούσαν να πάρουν πιο εύκολα μελλοντικές άδειες χρήσης τους ως βιολογικά σκευάσματα στη χώρα μας. Στόχοι της ενότητας ΕΕ 3 ήταν: α) η εύρεση αποτελεσματικών ζυμών ως βιολογικών παραγόντων αντιμετώπισης ασθενειών που επηρεάζουν αρνητικά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του κρασιού όπως της τεφράς και όξινης σήψης των βοτρυών που προκαλούνται από τους μύκητες *Botrytis cinerea* και *Aspergillus carbonarius* (και των καρκινογόνων ωχρατοξινών που παράγουν), β) η αξιολόγηση επιλεγμένων αποτελεσματικών ανταγωνιστικών ζυμών ως προς την ανθεκτικότητα τους σε φυτοπροστατευτικά σκευάσματα που χρησιμοποιούνται στο αμπέλι, ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά σε ένα ολοκληρωμένο πρόγραμμα διαχείρισης ασθενειών της αμπέλου.

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

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

αποτελέσουν βιολογικούς παράγοντες αντιμετώπισης της όξινης και τεφράς σήψης. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν σε διάφορα στάδια της ανάπτυξης του σταφυλιού (στάδιο του μούρου, "veraison", στάδιο ωρίμανσης) από τους αμπελώνες χρησιμοποιώντας τυποποιημένα πρωτόκολλα.

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

ΣΡ8, Ζ12, Ζ55, Υ43), για περαιτέρω διερεύνησή τους σε πειραματικούς αμπελώνες στα Σπάτα Αττικής και στη Σαντορίνη με εφαρμογή στο φύλλωμα και στους βότρες με σκοπό τη βιολογική καταπολέμηση σήψεων της αμπέλου και των ωχρατοξινών.

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

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

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

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

Κατά το έτος 2019, μείγμα των ζυμών Z31, Z8, Y1, VOL3, SP8 (Mix Yeasts) ψεκάστηκε σε δύο ποικιλίες, Μαλαγουζιά και Σαββατιανό, στον πειραματικό αμπελώνα του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, στα Σπάτα. Πραγματοποιήθηκαν δύο ψεκασμοί με τις ζύμες αυτές (η πρώτη κατά την περίοδο του γυαλίσματος των ραγών και η 2η, τρεις εβδομάδες αργότερα). Πριν τον τρύγο αξιολογήθηκε η σοβαρότητα της ασθένειας στον αμπελώνα και μετά τον τρύγο οι βότρες συλλέχθηκαν και μεταφέρθηκαν στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας, όπου μετρήθηκε και η παραγόμενη OTA. Η εφαρμογή του μίγματος Mix Yeasts, μείωσε τη σοβαρότητα της ασθένειας το 2019 κατά 34,5% στην ποικιλία Μαλαγουζιά και 4,7% στην ποικιλία Σαββατιανό. Όσον αφορά τα αποτελέσματα μείωσης της OTA, η εφαρμογή του μίγματος Mix Yeasts δε μείωσε τα επίπεδα της OTA, τα οποία κυμάνθηκαν στα ίδια επίπεδα με τον μάρτυρα.

Τα έτη 2020 και 2021 έγινε εφαρμογή με ψεκασμό μεμονωμένων ζυμών που επιλέχθηκαν: Z8 (Κωδικός ζύμης πειραμάτων αγρού: A1), Z55 (Κωδ. πειραμάτων αγρού: A2) και Y43 (Κωδ. πειραμάτων αγρού: A3) στην ποικιλία Σαββατιανό, στον πειραματικό αμπελώνα του ΓΠΑ, στα Σπάτα. Το έτος 2020, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η εφαρμογή των τριών ζυμών A1, A2 και A3 μείωσε στατιστικά σημαντικά τη σοβαρότητα της ασθένειας της όξινης σήψης που κυμάνθηκε περίπου στα ίδια επίπεδα με τα αποτελέσματα της εφαρμογής του μυκητοκτόνου Switch®. Τα αποτελέσματα της παραγωγής OTA έδειξαν ότι η εφαρμογή των ζυμών A1 (Z8) και A2 (Z55) μείωσαν στατιστικά σημαντικά την OTA (67% και 83.5% αντίστοιχα), όπως και η εφαρμογή του μυκητοκτόνου Switch®. Σχετικά με την αξιολόγηση των ζυμών ως προς την τεφρά σήψη, και οι 3 ζύμες (B1, B2 και B3) μείωσαν στατιστικά σημαντικά τη σοβαρότητα της ασθένειας στην ποικιλία Σαββατιανό. Το έτος 2021, έγινε εφαρμογή του μίγματος των ζυμών Z31, Z8, Y1, VOL3, SP8 (Mix Yeasts), των ζυμών A1 (Z8) και A2 (Z55) και ενός μίγματος 3 ζυμών *Saccharomyces cerevisiae* (Mix *Saccharomyces*) από το Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του ΓΠΑ. Οι εφαρμογές των ζυμών έγιναν με ψεκασμό (όπως τα προηγούμενα έτη) σε δύο ποικιλίες (Σαββατιανό και

Ασύρτικο), στον πειραματικό αμπελώνα του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, στα Σπάτα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλες οι εφαρμογές των ζυμών μείωσαν στατιστικά σημαντικά τη σοβαρότητα της όξινης σήψης στο Σαββατιανό και στο Ασύρτικο. Οι εφαρμογές του μείγματος των ζυμών Z31, Z8, Y1, VOL3, SP8 (Mix Yeasts) και των ζυμών A1 (Z8) και A2 (Z55) μείωσαν την OTA σε επίπεδα χαμηλότερα από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου συγκριτικά με τον μάρτυρα στην ποικιλία Σαββατιανό. Στην ποικιλία Ασύρτικο, η ζύμη A1 (Z8) και το Mix *Saccharomyces* μείωσαν στατιστικά σημαντικά την ποσότητα της OTA ενώ η ζύμη A2 δεν είχε καμία επίδραση στην OTA, γεγονός που υποδεικνύει ότι η φυτοπροστατευτική δράση των ζυμών είναι εξαρτώμενη από την ποικιλία. Σχετικά με την αξιολόγηση των ζυμών ως προς την τεφρά σήψη, οι 3 ζύμες (B1, B2 και B3) εφαρμόστηκαν το έτος 2021 σε μείγμα στις ποικιλίες Σαββατιανό και Ασύρτικο και μείωσαν στατιστικά σημαντικά τη σοβαρότητα της ασθένειας.

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

Δράση 3.3: Αξιολόγηση ανταγωνιστικών ζυμών ως προς την ανθεκτικότητά τους σε μυκητοκτόνες ουσίες.

Οι πιο αποτελεσματικές ζύμες εξετάστηκαν ως προς την ευαισθησία τους σε σειρά μυκητοκτόνων ουσιών με ευρεία χρήση στην καλλιέργεια της αμπέλου. Στόχος της μελέτης είναι η δημιουργία ενός ολοκληρωμένου συστήματος διαχείρισης των μυκήτων *A. carbonarius* και *B. cinerea*, στην καλλιέργεια της αμπέλου που θα συνδυάζει την εφαρμογή βιολογικών παραγόντων – ανταγωνιστικών ζυμών και τη χρήση χημικών φυτοπροστατευτικών προϊόντων. Ο προσδιορισμός της ευαισθησίας των στελεχών στα μυκητοκτόνα έγινε με βάση την επίδρασή τους στην παρεμπόδιση της ανάπτυξης των ζυμών σε κατάλληλα θρεπτικά υποστρώματα. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν καμπύλες συσχέτισης του τοξικού αποτελέσματος και των συγκεντρώσεων του μυκητοκτόνου. Από τις καμπύλες αυτές εκτιμήθηκαν οι τιμές EC50 (η συγκέντρωση που προκαλεί 50%

παρεμπόδιση της αύξησης) και προσδιορίστηκε η ευαισθησία των ζυμών στα διάφορα μυκητοκτόνα. Για το πείραμα αυτό επιλέχθηκαν οι 6 ζύμες: Z12, Z55, Y43 (αντιμετώπιση όξινης σήψης) και τα στελέχη Z90, Y14, Y52 (αντιμετώπιση τεφράς σήψης) που εφαρμόστηκαν στον αγρό κατά τα έτη 2020-2021.

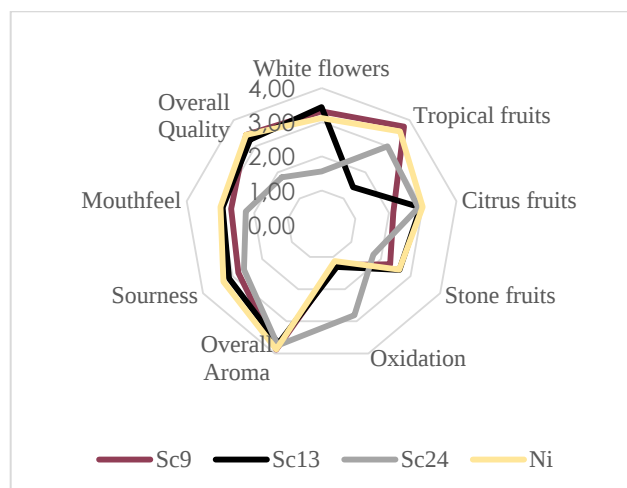
Για τις 6 απομονώσεις ζυμών που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα αγρού πραγματοποιήθηκαν πειράματα ευαισθησίας ως προς τις δραστικές ουσίες fludioxonil, cyprodinil, fenhexamid, boscalid και fluopyram που χρησιμοποιούνται ευρέως στην καλλιέργεια της αμπέλου για την καταπολέμηση διαφόρων ασθενειών. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με βάση την ανάπτυξη των ζυμών σε διαφορετικές συγκεντρώσεις των δ.ο., σε υγρή θρεπτική καλλιέργεια YM. Αναλυτικότερα, ως προς τη ζύμη Z12 (A1) οι τιμές EC50 κυμάνθηκαν κάτω από τα 0,3 g/mL. Στις δραστικές ουσίες boscalid και cyprodinil η απομόνωση Z12 παρουσίασε τις πιο ψηλές τιμές EC50. Γενικά, σε όλες τις δραστικές ουσίες, η Z12 χαρακτηρίστηκε ως ευαίσθητη. Ως προς τη ζύμη Z55 (A2) οι τιμές EC50 για όλες τις δραστικές ουσίες ήταν κάτω από τα 0,3 gr/mL, πλην της δραστικής fludioxonil, όπου η τιμή η τιμή EC50 είναι ίση με 3,9 gr/mL, γεγονός που την χαρακτηρίζει μέτρια ανθεκτική στη συγκεκριμένη δ.ο. αυτή. Η ζύμη Y43 (A3) παρουσίασε τιμές EC50 κάτω των 0,03 gr/mL και χαρακτηρίζεται ως ευαίσθητη ως προς όλες τις δ.ο., με πιο χαμηλή τιμή EC50 στη δ.ο. fenhexamid. Η ζύμη Y52 ήταν επίσης ευαίσθητη σε όλες τις δ.ο. που εξετάστηκαν με τιμές $EC_{50} < 0.7$ gr/ml. Η ζύμη Y14 παρουσίασε πιο υψηλές τιμές EC50 συγκριτικά με τις υπόλοιπες ζύμες χωρίς όμως να μπορεί να θεωρηθεί ανθεκτική στις συγκεκριμένες δ.ο. Τέλος η ζύμη Z90 παρουσίασε μια ιδιαίτερη αυξημένη EC50 (>10 gr/ml.) για την δ.ο. fludioxonil γεγονός που μπορεί να τη χαρακτηρίσει ως ανθεκτική στη συγκεκριμένη δ.ο. ενώ για τις υπόλοιπες δ.ο. οι τιμές EC50 είναι ιδιαίτερα χαμηλές.

Ενότητα Εργασίας 4: Μικροοινοποιήσεις και αξιολόγηση οίνων

Φορέας υλοποίησης: Εργαστήριο Οινολογίας Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

Στα πλαίσια της ερευνητικής ενότητας ΕΕ4 του προγράμματος, πραγματοποιήθηκαν μικροοινοποιήσεις (8L), με επιλεγμένα στελέχη που απομονώθηκαν από αυθόρμητες ζυμώσεις στη Σαντορίνη. Στόχος ήταν ο εντοπισμός αυτών με την καλύτερη ζυμωτική ικανότητα, που θα μπορούσαν να αναδείξουν τις ιδιαιτερότητες των γηγενών ποικιλιών και να συνεισφέρουν θετικά στην παραγωγή μοναδικών κρασιών 'terroir'. Πιο συγκεκριμένα,

τρία στελέχη *Saccharomyces cerevisiae* (Sc9, Sc13, Sc24) και ένα *Nakazawaea ishiwadae* (Ni), χρησιμοποιήθηκαν για παραγωγή οίνου από τις ποικιλίες Ασύρτικο και Μαυροτράγανο με ταυτόχρονη παρακολούθηση του ρυθμού των αλκοολικών ζυμώσεων. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκαν μονοκαλλιέργειες των 4 στελεχών, ενώ στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν διαδοχικοί εμβολιασμοί, πρώτα με το στέλεχος non-*Saccharomyces* ακολουθούμενο από τα *S. cerevisiae* στελέχη. Μετά το τέλος των ζυμώσεων ακολούθησε η αξιολόγηση της χημικής σύστασης των οίνων συμπεριλαμβανομένων των πτητικών ενώσεων που διαμορφώνουν το άρωμά τους. Για την αξιολόγηση της συνολικής ποιότητας των οίνων, συνεκτιμήθηκε και ο οργανοληπτικός τους χαρακτήρας ο οποίος αξιολογήθηκε από εκπαιδευμένο πάνελ δοκιμαστών (γευσιγνωσία). Από τα στελέχη που ερευνήθηκαν, το Sc24 κρίθηκε ακατάλληλο για παραγωγή ποιοτικών οίνων λόγω της αυξημένης πτητικής τους οξύτητας, των υψηλών συγκεντρώσεων εστέρων οξείδωσης, αλλά και της χαμηλής βαθμολογίας που συγκέντρωσαν κατά τον οργανοληπτικό έλεγχο (ποιότητα αρώματος και συνολική ποιότητα). Αντίθετα, το Sc13 αποδείχθηκε ιδανικό για την παραγωγή 'terroir' οίνων με ενισχυμένο ανθικό χαρακτήρα, χαμηλή πτητική οξύτητα και τονισμένη μεταλλικότητα (minerality) πιθανώς λόγω αυξημένων συγκεντρώσεων ηλεκτρικού οξέος. Επίσης, το Sc9 στέλεχος ξεχώρησε για το φρουτώδη χαρακτήρα και την καλύτερη ισορροπία που προσέδωσε στους οίνους. Τέλος, οι οίνοι που παράχθηκαν μόνο με το στέλεχος Ni (σε μονοκαλλιέργειες), χαρακτηρίστηκαν από μέτρια προς υψηλή πτητική οξύτητα ενώ οι διαδοχικοί εμβολιασμοί είχαν ως αποτέλεσμα την παραγωγή οίνων με χαμηλότερη συγκέντρωση αλκοόλης. Το γεγονός αυτό, το καθιστά εξαιρετική εναλλακτική για παραγωγή οίνων με μειωμένα επίπεδα αιθανόλης, ακολουθώντας έτσι την παγκόσμια τάση που συνοδεύει την κλιματική αλλαγή.



Αποτελέσματα γευσιγνωσίας των οίνων που παράχθηκαν μετά από εμβολιασμό με τα απομονωμένα στελέχη

Ενότητα Εργασίας 5 Μεγάλης κλίμακας οινοποίηση και έρευνα τάσεων αγοράς

Φορείς υλοποίησης:

Εργαστήριο Οινολογίας Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

Ένωση Συνεταιρισμών Θηραϊκών Προϊόντων (SANTO)

Εταιρεία Αξιοποίησης Διαχείρισης Περιουσίας Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

Στα πλαίσια αυτής της ΕΕ πραγματοποιήθηκαν μεγάλης κλίμακας οινοποιήσεις (10 και 20 τόνων) στους χώρους της συμμετέχουσας εταιρείας (Santo Wines), με σταφύλια ποικιλίας Ασύρτικο που συλλέχθηκαν από την Σαντορίνη. Μετά τη γλευκοποίηση των σταφυλιών και το μοίρασμα του γλεύκους στις διαφορετικές δεξαμενές, πραγματοποιήθηκαν εμβολιασμοί με τα διαφορετικά απομονωμένα στελέχη (Sc9, Sc13, Sc24, Ni, Y54, Merlot, Rhone, MAK-2). Οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε σταθερή θερμοκρασία (18 °C) και η πορεία τους ελέγχθηκε μέσω των μετρήσεων των σακχάρων και της παραγόμενης αλκοόλης. Στο τέλος, πραγματοποιήθηκαν κλασικές και φυσικοχημικές αναλύσεις καθώς και οργανοληπτική αξιολόγηση των παραχθέντων οίνων (γευσιγνωσία). Μεγάλης κλίμακας βιομηχανικές ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν και στην Αττική με σταφύλια (ποικιλίας Ασύρτικο και Σαββατιανό) από τον αμπελώνα του ΓΠΑ στα Σπάτα με τα ίδια θετικά οργανοληπτικά αποτελέσματα. Τα αποτελέσματα των ζυμώσεων βιομηχανικής κλίμακας είναι σε συμφωνία με αυτά των μικροοινοποιήσεων. Πιο συγκεκριμένα, διαφορετικά στελέχη παρουσίασαν διαφορετικούς ρυθμούς ζύμωσης, παραγωγή πτητικών ενώσεων & οργανοληπτικό προφίλ. Πέραν από το Sc24, που παρουσίασε αδυναμία στην ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης καθώς και υψηλές τιμές πτητικής οξύτητας, όλα τα υπόλοιπα στελέχη αξιολογήθηκαν θετικά ως προς την ζυμωτική τους συμπεριφορά. Το στέλεχος Sc9 θα μπορούσε να αποτελέσει ιδανική επιλογή καθώς χαρακτηρίστηκε από τον υψηλότερο ρυθμό ζύμωσης και οι οίνοι που παράχθηκαν χαρακτηρίστηκαν από τα θετικότερα φυσικοχημικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Επίσης, τα στελέχη Sc13 & Ni θα μπορούσαν να συμβάλλουν στην βελτίωση του σώματος των οίνων ως ισχυρότεροι παραγωγοί γλυκερόλης. Τέλος, το στέλεχος Y54 αποτέλεσε εξαιρετική εναλλακτική, με δυνατότητα ολοκλήρωσης της αλκοολικής ζύμωσης, ωστόσο απαιτείται προσοχή στη παραγόμενη πτητική οξύτητα.

Η γνώμη των οινοποιείων για τη χρήση ιθαγενών ζυμών

Ερωτηματολόγια απεστάλησαν σε οινοποιεία σε όλες τις αμπελουργικές περιοχές προκειμένου να διερευνηθεί η γνώμη των οινοποιών σχετικά με τη χρήση ιθαγενών ζυμών για την οινοποίηση. Η πλειοψηφία των ελληνικών οινοποιητικών επιχειρήσεων σε μεγάλο βαθμό αντιλαμβάνεται το ρόλο των ζυμών στην οινοποίηση και είναι ώριμη να χρησιμοποιήσει ιθαγενείς ζύμες, να συμμετέχει σε έρευνα και να τη χρηματοδοτήσει. Η χρήση ειδικού σήματος στην ετικέτα συγκεντρώνει ένα ιδιαίτερα ικανοποιητικό ποσοστό που σημαίνει ότι αξίζει η διερεύνησή του.



ΕΠΑνΕΚ 2014-2020
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης