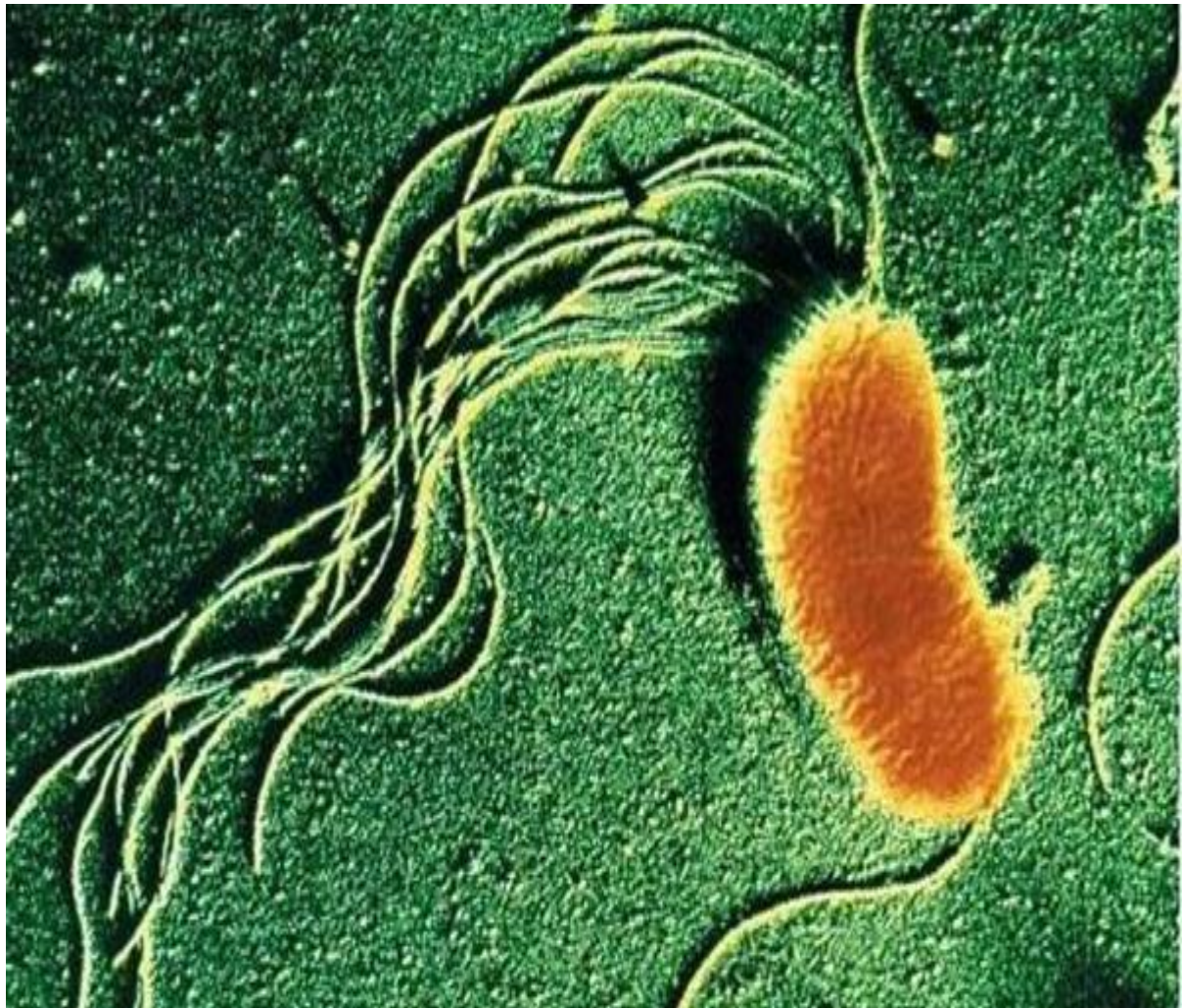


אפיון המיקרואורגניזמים המשתתפים בתהליך ייצור היין



מגישים: אורי-סטלה בולוצקי, ראם גרוס, נועה דרי, דוד זוסמנוביץ' ואור ציפוק

תאריך הגשה: 08/03/2022

מנחות: ד"ר הגר ליס וד"ר אסתר שדלצקי

תודות :

במהלך המחקר שלנו קיבלנו סיוע ממספר אנשים שתרמו לנו רבות לאורך העבודה :

ד"ר אסתר שדלצקי וד"ר הגר ליס- תודה רבה על ההנחיה וההכוונה לאורך כל הביוחקר, חוסר הפשרות והעזרה הגדולה שבזכותן הגענו לביוחקר כזה.

ד"ר ישי נצר - תודה על כך שקיבלת אותנו לתוך המחקר שלך בנדיבות רבה, שלימדת אותנו על תחום היין, עירבת אותנו בתהליך הבצירה ונתת לנו את הזכות להיות חלק ממחקר משמעותי. ההנחיה שלך עזרה וקידמה את המחקר שלנו רבות.

שאהד עבדאל רחמן - תודה על כל העזרה באיסוף הנתונים והעבודה במעבדה. תודה על ההנחיה המסורה דרך כל הניסויים במעבדה, העזרה וההכוונה, שקידמו אותנו ועזרו רבות למחקר.

מעבדות בלמונטה - תודה שאירחתם אותנו בנעם ונתתם לנו לעבוד במעבדות שלכם, תרמתם לנו רבות.

לבסוף, אנו רוצים להודות ליקב טפרברג ויקב צרעה על שיתוף הפעולה והנדיבות רחבת-הידיים שהפגינו כלפינו, על שערכו לנו סיורים מעניינים, שיתפו אותנו בדגימות מהכרמים שלהם ותרמו רבות לכל מערך המחקר.

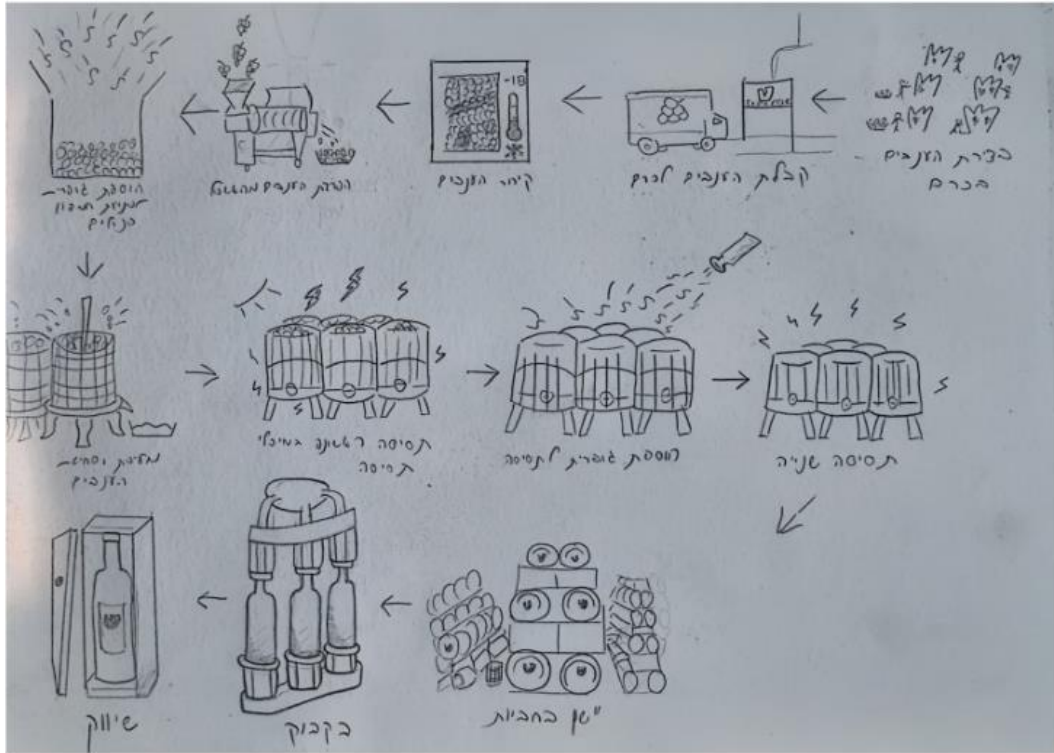
מבוא

בעבודת החקר שלנו אנו עוסקים בתהליך ייצור היין, ובפרט בתהליכי התסיסה, והאורגניזמים העיקריים המשתתפים בו. המחקר שלנו עוסק בבידוד ואפיון חיידקים ושמרים המעורבים בתסיסת היין. מחקר אודות החיידקים והשמרים המעורבים בתהליכי תסיסה חשוב כיוון שמיקרואורגניזמים אלו יוצרים גם את האלכוהול וגם את הארומות והטעמים המיוחדים לכל יין. מטרת המחקר שלנו היתה לבודד את אותם חיידקים ושמרים ולזהות אותם. בנוסף, בקשנו לאפיין את תהליך התסיסה הכהלית שנעשית על ידי אותם שמרים. המחקר שלנו הוא בעיקרו מחקר איכותי שבא לאפיין אורגניזמים המשתתפים בתהליך ייצור היין. החלק הכמותי במחקר בוצע כדי לאפיין את הפעילות של האורגניזמים השונים השותפים בתהליך ייצור היין בהשוואה בין תסיסה ספונטנית ותסיסה מבוקרת.

יין הוא משקה אלכוהולי הנוצר כתוצאה מתסיסה כהלית (ולעיתים בנוסף גם תסיסה מלולקטית) של תירוש ענבים. לפי ממצאים ארכיאולוגיים, התיעוד הכי מוקדם לייצור יין התגלה בגיאורגיה, בכדים מחרס ששימשו לשמירת יין שהתגלו בחפירה ומתוארכים כבני 8,000 שנה. כלי חרס ששימשו לשמירת יין נמצאו בהרי זגרוס, באיראן ומתוארכים כבני 7,400 שנה. לגילוי הזה משמעות רבה מכיוון שבאזור איראן לא היה גידול גפנים לכן אפשר להבין שהיה סחר ביין באותן תקופות. ליין חשיבות רבה ביהדות - הוא משמש כמשקה חגיגי המקדש ומציין מאורעות חשובים ומשמחים. לדוגמה, קידוש ביום שישי, חופה, ברית, הבדלה וחגים. יתר על כן, מייחסים ליין את הסגולה של איחוד שמחות - במישור הרוחני ובמישור הגשמי, היין מאחד את השמחה של הנפש עם הגוף.

תהליך ייצור היין:

- בצירת הענבים בכרם.
- הענבים מובלים אל היקב
- הפרדת הגרגרים מהשזרות והעלים שנשארו לאחר הבציר.
- מעיכת הענבים בעזרת מכשיר שנקרא מועך ומפריד (Crusher).
- העברת התירוש שנוצר למכלי נירוסטה שם מתרחשת תסיסה כהלית על ידי שמרים (זן שמרים מתורבתים המוסף לתירוש), שבסופה מתקבל יין.
- הוספת SO_2 לתמיסה כדי למנוע חמצון.
- תסיסה מלולקטית - לעיתים קרובות נהוג "לרכך" את טעמו של היין. לשם כך, מבצעים תסיסה שנייה, תסיסה מלולקטית, אשר מתרחשת לאחר התסיסה הכהלית במיכלים המיועדים לכך. חיידקים מלולקטיים אחראים על התסיסה השנייה. ניתן להוסיף תרבות של חיידקים רצויים או לאפשר תסיסה ספונטנית עם חיידקים מהאוויר.
- את היין המוכן מעבירים ליישון בחביות עץ, אשר נותן ארומות וטעמים נוספים ליין.
- בתום היישון מבקבקים את היין ומשווקים ללקוחות.

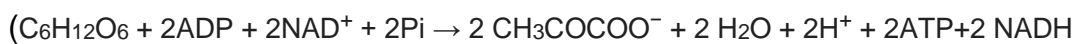


תמונה 1 - תהליך יצור היין, ראם גרוס, 2021. כל הזכויות שמורות ©

תסיסה ראשונה - תסיסה כהלית

תסיסה היא תהליך כימי - מטבולי המשמש ליצירת אנרגיה בחלק מהיצורים החיים. באופן כללי, תהליך ייצור האנרגיה מתחלק לשתי תת קטגוריות עיקריות: ייצור אנרגיית ATP בסביבה מחומצנת וייצור אנרגיית ATP בסביבה חסרת חמצן או דלה בחמצן, כשבסביבה המחומצנת נוצר יותר ATP. בשני המקרים, מתקבלת אנרגיה זמינה בצורת ATP מפירוק חד סוכרים, כגון גלוקוז. ההבדל העיקרי בין התהליכים הוא שבתהליך האווירני נדרש חמצן המשמש כקולט אלקטרונים חיצוני והכרחי לקיום הנשימה בעוד שבתהליך התסיסה קבל האלקטרונים הוא $+NAD$ אשר מתקבל במהלך תהליך התסיסה עצמו. ישנם סוגי שמרים רבים המסוגלים לבצע הן נשימה אווירנית והן תסיסה. אנחנו נתמקד בתהליך התסיסה.

במהלך תסיסה הכהלית, שנקראת גם התסיסה הראשונה, משתחררים הגז פחמן דו חמצני ואתנול שנשאר בתמיסה. את תהליך התסיסה ניתן לחלק לשני שלבים עיקריים: מגלוקוז לפירובט (גליקוליזה) ומפירובט לאתנול (שחזור קבל אלקטרונים), כפי שניתן לראות בתמונה 2. השלב הראשון בתסיסה הכהלית מתחיל בפירוק הגלוקוז ללא נוכחות חמצן על ידי עשרה אנזימים, בתום תהליך זה מתקבלות 2 מולקולות פירובט:

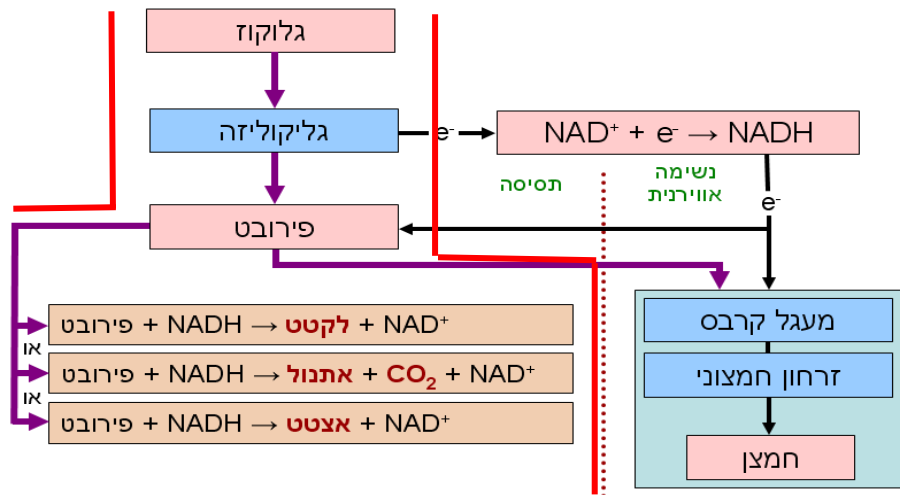


פירובט קבל אלקטרונים, מולקולת גלוקוז

לאחר מכן, מולקולת הפירובט מתפרקת לאתנול ולפחמן דו חמצני תוך כדי שחזור מולקולת ה- NAD^+ :



בתהליכי תסיסה אחרים שמבצעים מיקרואורגניזמים יכול הפירובט להתפרק לחומצה לקטית או אצטט (ראו תמונה מס' 2).



תמונה מס' 2 - תהליך נשימה אל אווירנית ואווירנית

שמרים

התסיסה הכהלית בין מתבצעת על ידי שמרים, יצורים אאוקריוטים חד תאיים המשתייכים למשפחת הפטריות ומסוגלים לבצע נשימה תאית אווירנית ואל-אווירנית. שמרים ניתן לראות רק דרך מיקרוסקופ. מקור מזונם הנפוץ ביותר של השמרים הוא סוכרים שונים. תהליך התסיסה של השמרים משמש בייצור של מאכלים ומשקאות רבים לאורך שנים במהלך ההיסטוריה. כיום משתמשים בשמרים יעודיים למטרות אפיה, להכנת יין ומשקאות אלכוהוליים אחרים, למחקר, וכתוספי מזון.

שמרי יין נפוצים בתעשייה

תסיסת היין יכולה לקרות באופן ספונטני על ידי שמרי בר המצויים באופן טבעי על קליפות הענבים ועלי וענפי הגפנים בכרמים. בעיה אחת בשימוש בשמרי בר בתהליך התסיסה היא שמיני שמרי בר רבים לא עמידים לרמות גבוהות של אלכוהול ולכן הם ימותו כשריכוז האתנול בתמיסה יעלה ולא נוכל להגיע לריכוזים הרצויים. למעשה, אי אפשר לחזות את איכות היין ואת הארומות והטעמים שיתפתחו בו. על כן, שימוש בשמרי בר עלול להשפיע על טעמי וארומות היין ולגרור לקלקולו. בעקבות כך, ייננים רבים מעדיפים לשלוט בתהליך התסיסה בעזרת הוספה של שמרים "מתורבתים", ובכך למנוע באופן מכוון את התסיסה הספונטנית.

השמרים המסחריים שמוסיפים בדרך כלל לתירוש ביקבים, עמידים לרמות אלכוהול גבוהות יותר, ולטווח pH גדול יותר. ניתן להחליט איזה זן שמרים רצוי לייצור יין מסויים. כך אפשר לבקר את הריח, הטעם, הצבע וגורמים אחרים שתורמים לטיב היין. השמר הנודע ביותר בשימוש בתעשיית הכנת היין הוא *Saccharomyces cerevisi* (ידוע גם כ"שמר האופה" או "שמר המבשל", בהתייחס למבשל בירה). ישנן סיבות רבות לשימוש הרב בתעשייה: התסיסה היעילה והצפויה שלו, יכולתו לשרוד בריכוזים יחסית גבוהים של אלכוהול ו-SO₂, והיכולת שלו להתרבות ולשגשג ב-pH הנמוך (2.8-4) של יין. כפי שניתן לראות בטבלה 1, ישנם סוגים שונים של שמרים מהזן *Saccharomyces cerevisi* המתאימים לתנאי תסיסת היין.

שם השמר	שימוש בתעשיית היין
Levuline ALS	ליינות ארומטיים כמו סוביניון בלאנק, ריזלינג וסמיליון.
Levuline Synergie	תערובת של שני סוגי שמרים, האחראים להתחלת תסיסה ביינות יבשים ורוזה
Levure Vialatte Ferm R71	שמר חזק שעוזר ליצור יינות אדומים ורוזה ארומטיים וטובים, בשל היצירה של אסטרים במהלך תהליך התסיסה.
UVAFERM 43	שמר חזק הנפוץ בתעשיית היין עקב יכולתו "להתניע" תסיסות תקועות.

טבלה 1: סוגי שמרים ושימושם בתעשיית היין

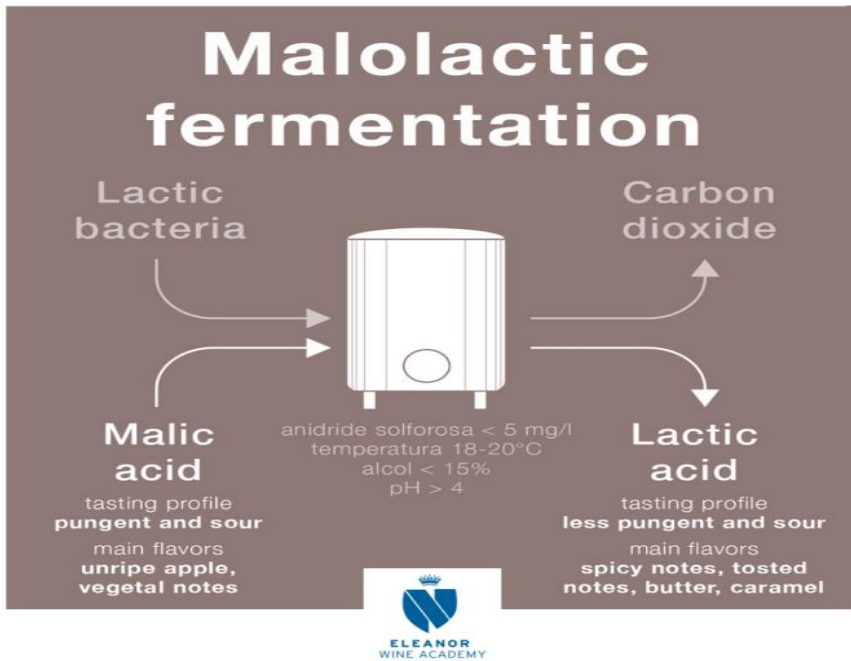
שמרי בר נפוצים בתהליך ייצור היין, המונח "שמרי בר" משמש לשמרים "מקומיים" או "טבעיים" שמגיעים אל התירוש. באופן טבעי, על הענבים ועל ענפי ועלי הגפן יש מגוון רחב של שמרי בר. לכן, כאשר הם מגיעים מהבציר ניתן להשתמש באותם השמרים לשם התססת היין. ישנם שני יתרונות עיקריים לשימוש בשמרי בר לשם התססת היין. ראשית, תהליך הייצור זול יותר, השמרים נמצאים על הענבים ואין צורך לקנות שמרים מסחריים בשביל ייצור היין. שנית, שימוש בשמרי בר הופך את היין ליותר אותנטי ומקורי, מה שעשוי להועיל בשיווק טוב יותר של היין. בנוסף, תסיסת שמרי בר נחשבת אופנתית וייחודית ונותנת ליקב מעמד גבוה וערך רב. חשוב לציין כי תסיסה כהלית על ידי שמרי בר לעיתים מביאה לתוצאות לא רצויות ולקלקול היין. אלו זני שמרי הבר הנפוצים ביותר:

- **Candida blattae**
- **Pichia kudriavzevii**
- **Meyerozyma guilliermondii**

תסיסה שנייה - תסיסה מלולקטית

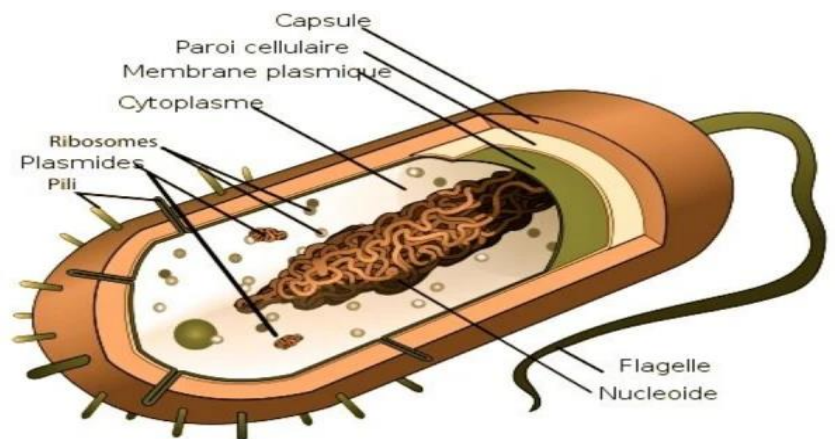
התסיסה השנייה או התסיסה המלולקטית הינו תהליך המתרחש לאחר התסיסה הכהלית, ובמהלכו מומרת חומצה מאלית (L-Malic Acid) שביין לחומצה לאקטית (L-Lactic Acid) (ראו תמונה מס' 3). תוצאת

תהליך ביולוגי זה היא הפחתת החומציות ביין (De-acidification). ייננים רבים מבצעים תהליך זה למען עידון טעמו של היין ושיפור המוצר הסופי. התסיסה המלולקטית המתבצעת על ידי קבוצת חיידקים (ראה תמונה מס' 4) מהמשפחה הלקטית (Lactic Acid Bacteria). חיידקים ממשפחה זו פעילים בסביבה אנאירובית ונמצאים באופן טבעי בכרמים, על גבי הענבים ובתירוש. החיידק הנפוץ ביותר לשימוש בתסיסה המלולקטית הוא *Oenococcus oeni*. חיידקי החומצה הלקטית ממירים חומצה מאלית לחומצה לקטית כאמצעי עקיף ליצירת אנרגיה. הם עושים זאת על ידי המרת סוכר (גלוקוז) וחומצה מאלית לחומצה לקטית, פחמן דו חמצני CO₂, חומצה אצטית, דיאצטיל, אתנול, ומרכיבי טעם וריח אחרים שמשתנים מחיידק לחיידק.



תמונה מס' 3 - תסיסה מלולקטית - באיור ניתן לראות משמאל את החומרים הנכנסים לתסיסה המלולקטית, חומצה מאלית וחיידקים לקטים. הם נכנסים למיכל התסיסה וימין רואים את התוצרים של התסיסה: חומצה לקטית ופחמן דו חמצני.

תמונה מס' 4 - חיידק ממשפחת הלקטים. מאפיינים בולטים של המשפחה - החיידקים הלקטיים כולם מבצעים תסיסה מלולקטית והם חיידקים אל אווירניים, הרוב המוחלט של המשפחה הם חיידקים שאינם מסוגלים לשרוד בסביבת חמצן בעוד שחלק קטן של משפחת החיידקים הם בעלי סבילות לסביבה בעלת חמצן אך אינם משתמשים בו בתהליך הנשימה.



המרת החומצה המאלית ללקטית תורמת מאוד לייצוב היין. היא עושה זאת בכך שהיא מרחיקה מקורות מזון זמינים לחיידקים שונים העלולים לפגוע באיכות היין ומעלה את רמת החומצות הלא רצויות ובכך גורמת לטעמים וארומות לא נעימים. החומצה המאלית נחשבת "לא יציבה" בעוד שהחומצה הלאקטית

"יציבה", כלומר נדרש מאמץ רב יותר "לקלקל" או לשנות את החומצה הלאקטית לעומת המאלית. יתר על כן, תהליך התסיסה המלולקטית מעדן את טעמו של היין ומקנה לו טעמים וארומות חלביים/חמאתיים.

חיידקי התסיסה המלולקטית

חיידקי התסיסה המלולקטית המוכרים ושימושיים ביותר הם המינים הבאים : *Leuconostoc*, *Oenococcus Lactobacillus* ו-*Pediococcus*. השימוש בתרביות מסחריות של חיידקים מלולקטים המוספות באופן יזום ליין הוא מאוד נרחב, מפני שייננים רבים מעדיפים שהתהליך יהיה מבוקר ולא טבעי. לפי הפורטל הישראלי להכנת יין ומגזין היין והקולינריה, תרביות אלו מאוד אמינות ומסוגלות לפעול בתחום רחב של חומציות SO_2 ואלכוהול. מפני שפרופיל הטעם/ריח של התרביות ידוע מראש, ניתן להתאים את התערובת לסוג היין, ובכך להגיע לתוצאת היין הרצויה. בנוסף לתרביות אלו, נמכרות גם תרכובות הזנה לחיידקים, שמטרתן ליצור סביבת גידול טובה יותר לתסיסה, שלא "תתקע". יחד עם זאת, ביקבי צרעה וטפרברג שבשיתוף איתם נעשה המחקר, לא מוסיפים תרביות מסחריות, אלא מאפשרים תסיסה מלולקטית ספונטנית על ידי חיידקים המצויים באוויר ועל קליפות הענבים. במחקר שלנו אנחנו מבקשים לזהות ולאפיין את החיידקים האלה.

שיטות

במחקר שערכנו, ניסינו לאפיין את האורגניזמים המשתתפים בתהליך תסיסת היין. עשינו זאת בדרכים

שונות הכוללות מעקב אחר תסיסה שבה הם מעורבים וזיהוי באמצעות שימוש בקיטים מתאימים. נרחיב על שיטות האפיון בהן השתמשנו :

על מנת לאפיין את השמרים המשתתפים בתהליך, עקבנו אחר תסיסה של תירוש מענבים לבנים ומענבים אדומים, עם שמרי בר בלבד וביחס לתסיסה עם תוספת שמרים מסחריים מסוג Uvaferm 43. לצורך המעקב, ערכנו ניסוי עם 4 טיפולים שונים עם 4 חזרות לכל טיפול, כפי שמפורט בטבלה 2. הגורמים שבדקנו לאורך זמן הניסוי הם: ריכוז סוכר, רמת חומציות (pH), סך כל החומצות (TA) וצילום השמרים תחת מיקרוסקופ.

על מנת למדוד את ריכוז הסוכר, השתמשנו בשני מכשירי מדידה שונים: רפרקטומטר והידרומטר. ידוע שמדידות ההידרומטר יותר אמינות ככל שריכוז האלכוהול עולה ולכן נתמקד בה. חשוב לציין שמדידות ההידרומטר (מדידת צפיפות) לא מושפעות באופיין עקב השינויים בהרכב התירוש. זאת בעוד שמדידות הרפרקטומטר נעשות פחות מדויקות ככל שעובר יותר זמן מתחילת הניסוי, כתוצאה מעליית ריכוז הכוהל בתירוש אשר משבש את קריאת שבירת האור של המכשיר. עם זאת, גם למדידות האחרונות בהידרומטר אמינות יחסית נמוכה מפני שבשלב זה צפיפות התירוש בכל הטיפולים היה קטן מ-1. זה גרם לקושי במדידה בכך ששקיעת ההידרומטר בנוזל מגיעה כמעט עד קצה המנסרה ולכן העמדתו בציפה הינו אתגר העלול לגרום לשגיאות מדידה.

בכדי למדוד את השינוי ברמת החומצות והחומציות במהלך התסיסה השתמשנו בשתי שיטות מדידה: pH, TA. TA מספק לנו מידע על סך כל החומצות במהלך התסיסה ויכול להעיד על קיומה. מד pH מספק לנו מידע על רמת החומציות במהלך התסיסה, שבסופו של דבר משפיעה על הטעם הסופי של היין. יתר על כן, הסתכלנו על השמרים באמצעות מיקרוסקופ לאורך התסיסה, ובחנו את השינוי במושבות השמרים. ניתן למצוא מידע על שיטות אלו ואופן השימוש בהן [בקובץ השיטות השיתופי](#).

תירוש	שמרי בר	תוספת שמרי Uvaferm 43
ענבים לבנים	4 חזרות	4 חזרות
ענבים אדומים	4 חזרות	4 חזרות

טבלה 2: פירוט על סוגי הטיפולים בניסוי

בכדי לאפיין את החיידקים המלולקטים והשמרים המשתתפים בתהליך תסיסת היין, זרענו דוגמאות מייין שקיבלנו מיקב צרעה (ראו תמונה 5). הדוגמאות כללו יין לבן באמצע תהליך התסיסה הכהלית ויין אדום (מרלו וקברנה) בתסיסה מלולקטית. זרענו את הדגימות מהיין על מצע גידול המיועד לכך: שמרים בצלחות עם מצע המכיל גם אנטיביוטיקה למניעת גידול חיידקים (Sabouraud Gentamicin + Chloramphenicol) ואת החיידקים במצע MRS המתאים לגידול מיוחד של חיידקים מלולקטיים. כיוון שחיידקים מלולקטיים גדלים בתנאים ללא חמצן, הכנסנו את הצלחות עם החיידקים לשקיות אטומות סופחת חמצן המכילות תערובת חומרים, הכוללים גם פחמן פעיל. את הצלחות הכנסנו לאינקובטור בטמפרטורה של 37 מעלות צלזיוס למספר ימים עד לקבלת מושבות (~ 1-2 ימים). לאחר גידול המושבות, בחנו את החיידקים והשמרים באמצעות קיטים לשם זיהוי (ראו תמונה מס' 5) ותחת המיקרוסקופ. לכל אורגניזם השתמשנו בקיט המיועד אליו.



תמונה 5- דוגמאות לזיהוי מיקרואורגניזמים שקיבלנו מיקב צרעה. יין לבן מתסיסה כהלית ויין אדום מרלו וקברנה מתסיסה מלוקטית.

בדיקה של חיידקים מלוקטיים : API 50CH

עקרון הפעולה : בקיט ישנן 50 באריות שבוחנות את התסיסה של פחמימות שונות. בזמן אינקובציה עם דוגמה (החיידקים שגדלו במושבה על הצלחת), ניתן לבחון האם מתקיימת תסיסה ע"י שינוי צבע בבארית, שנגרם מתגובה של תוצרי התסיסה (חומצות) עם אינדיקטור שנמצא בבארית. לפרטים נוספים על הרכב כל בארית, ראו נספח 2.



תמונה מספר 6 : קיטים עם תוצאות חיוביות (צד שמאל) ותוצאות שליליות (צד ימין)

קיט לזיהוי של שמרים : API 20C

עקרון פעולה : זיהוי השמרים נעשה על בסיס היכולת שלהם לנצל סובסטרטים שונים כמקור פחמן לגידול. כל בארית מכילה סובסטרט (מצע) אחר (לפירוט התכולה של כל בארית, ראו נספח 3). לאחר הוספת דוגמה (שמרים מהמושבה שגדלה בצלחת), מתקבלת התוצאה. באריות עכורות מייצגות תגובה חיובית (למעשה הגידול של השמרים גורמת לעכירות) ואילו באריות שקופות מייצגות את חוסר תגובה של השמרים.



תמונה מספר 7: זיהוי של שמרים באמצעות הקיטים.

תוצאות

המחקר שלנו עוסק באפיון ובידוד חיידקים ושמרי בר המשתתפים בתהליך ייצור היין. ראשית נתייחס לשמרים בתהליך, ולאחר מכן לחיידקים.

1. שמרים:

1.1. אפיון תסיסה

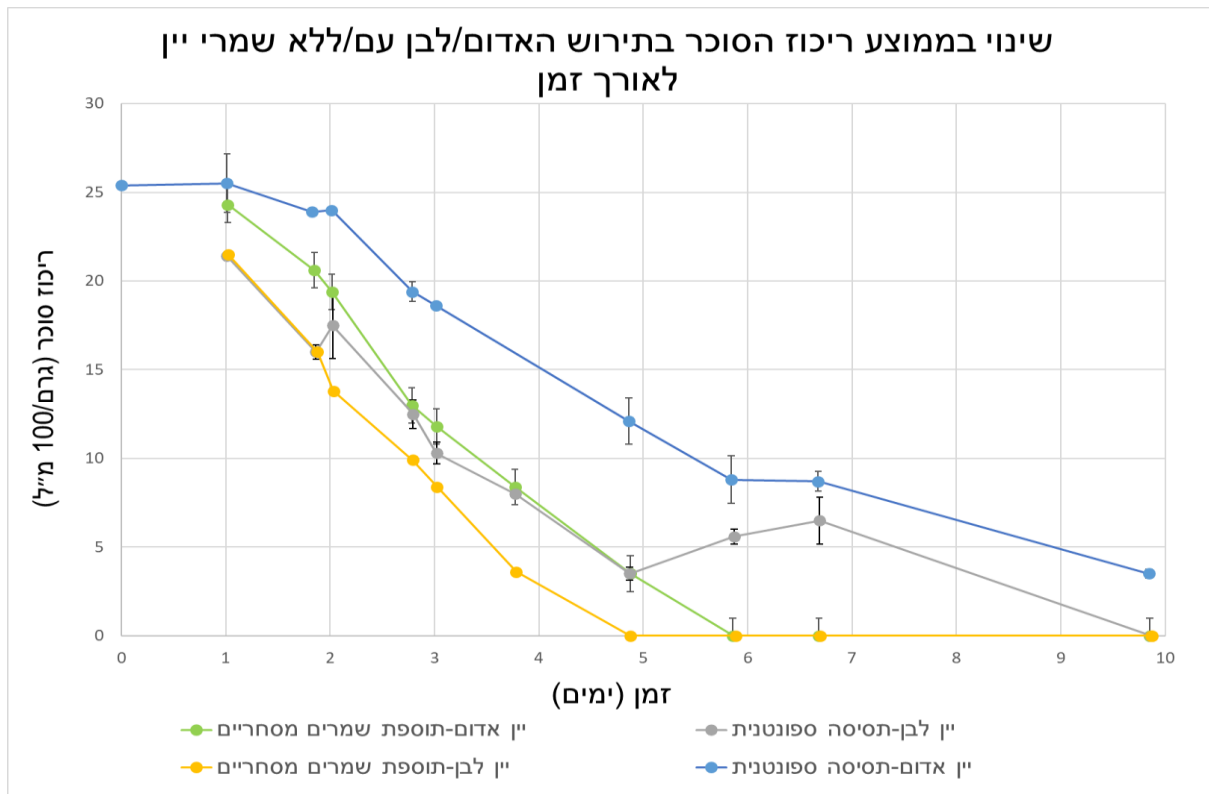
בניסוי שלנו עקבנו אחרי מדדי תסיסה ב4 טיפולים שונים (ראה טבלה 2, פרק שיטות). מגמת ירידה של ריכוז סוכר משתקפת בכל הטיפולים, לאורך כל תקופת הניסוי, כפי שמתואר במדידות הצפיפות בהידרומטר (גרף 1) והרפרקטומטר (גרף 1, נספחים).

מדידת סוכר :

ניתן לראות מספר הבדלים ונקודות דמיון בין תוצאות שתי השיטות שהשתמשנו בהן לצורך מדידת סוכר (רפרקטומטר והידרומטר). בגרפים של שתי השיטות (גרף 1 ; גרף 1, נספח) ישנה מגמת ירידה בכל הטיפולים. ריכוז הסוכר בתירוש האדום מתחיל מערכים יותר גבוהים מבתירוש הלבן. הקצב ההתחלתי של ירידת ריכוז הסוכר בטיפולים הכוללים שמרים מסחריים נראה תלול יותר בטיפולים שנעשו בתסיסה ספונטנית. לא רואים הבדל זה בבירור במדידות של הרפרקטומטר. בגרף ההידרומטר, ניתן לראות דמיון בין קצבי הטיפולים עם השמרים המסחריים (מגמת ירידה תלולה), כך גם בין קצבי הטיפולים בתסיסה הספונטנית למרות שריכוז הסוכר ההתחלתי של התירוש האדום היה יותר גבוה. ריכוז הסוכר בטיפולי השמרים המסחריים מתאפס בין יום 5 ל-6, בזמן שבטיפול היין הלבן עם התסיסה הספונטנית ההתאפסות נעשית רק לאחר 10 ימים (בתירוש האדום לא נראית התאפסות כלל, אך בהנחה שמגמת הירידה תמשיך היא אכן תהיה בקירוב).

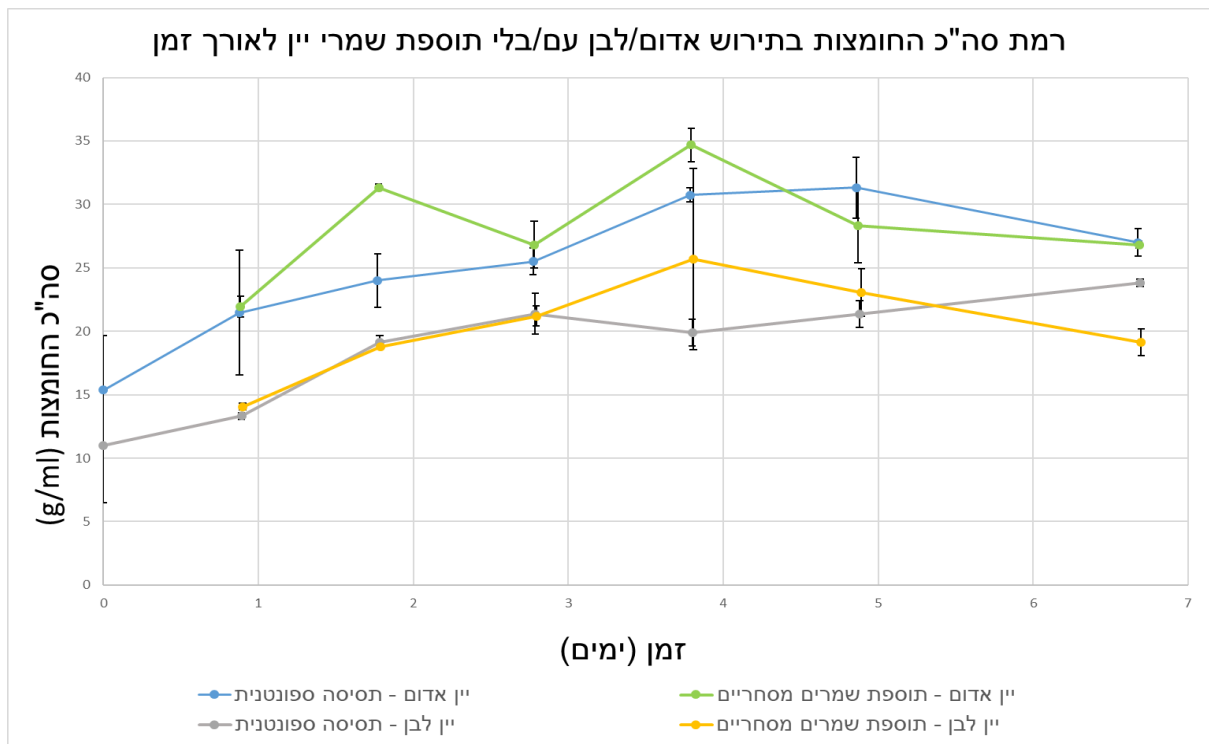
בגרף 2, המתאר את השינוי בסה"כ החומצות (TA) ניתן לראות עלייה ברורה בכל תהליכי התסיסה שנבדקו. יש דמיון בין הטיפולים בתירוש הלבן לטיפולים בתירוש האדום. מצב דומה ניתן לראות גם בגרף 2 בנספח המתאר את רמת החומציות (pH) במהלך התסיסה. בגרף זה רואים כי ישנו דמיון בין שני סוגי התסיסה בכל תירוש כאשר התירוש הלבן יותר חומצי מהאדום. זאת מפני שבתירוש ישנם חומרים המהווים בופר ושומרים על רמת החומציות לאורך זמן - לכן לא צפוי שה-pH ישתנה במהלך התסיסות. ה-pH הנמוך חשוב כדי למנוע התפתחות חיידקים מקלקלי יין שרמת החומציות הזאת לא מתאימה להתפתחותם.

גרף 1 :



גרף 1: שינוי בריכוז הסוכר בתירוש לאורך זמן. התוצאות מבוססות על המרה של נתוני צפיפות תירוש שנמדדו בהידרומטר לריכוז סוכר באמצעות [אתר להמרת יחידות. VInoLab.](http://VinoLab.com)

גרף 2:

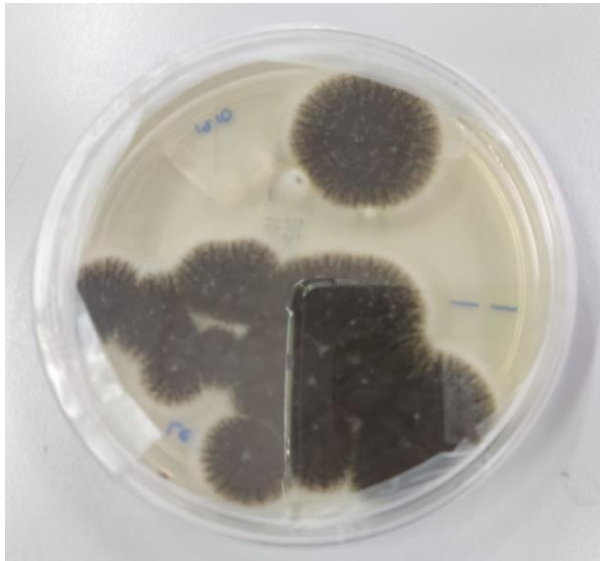


גרף 2: עלייה ברמת סה"כ החומצות (גרם למילימטר) בתירוש לאורך זמן על פי מדידות טיטרציה חומצתית. (TA)

1. בידוד וזיהוי

א. שמרי בר:

רצינו לבדוד שמרי בר מענפים ועלים של גפנים. זרענו דגימות שנלקחו מהעלים והענפים משני זנים שונים של גפנים: Oseleta ו Syrah על צלחות פטרי. בפועל, נראה כי הבידוד של שמרי הבר כשל והתפתחו בעיקר פטריות עובש.



תמונה 9: עובש מענפים ועלים של Oseleta



תמונה 8: עובש מענפים ועלים של Syrah

כפי שניתן לראות במצגת תמונות השמרים (נספח מצגת) מתוארות התמונות של שמרי הבר במהלך התסיסה. ניתן לראות כי בתסיסה הספונטנית של התירוש האדום יש שינוי במספר השמרים לאורך התסיסה.

ב. שמרים מסחריים:

לקחנו דוגמה מתסיסה אלכוהולית ששלחו מיקב צרעה בו משתמשים בשמרים מסחריים ובדדנו אותם על צלחות אגר מיועדות לגידול שמרים (המכילות אנטיביוטיקה כדי למנוע גידול חיידקים) (תמונה 10). לאחר מכן, השתמשנו בקיטים כדי לזהות את השמר (תמונה 11). לא יצאה תוצאה בניסיון זיהוי השמרים - התוצאות שהתקבלו לא תאמו אף זן בספריית התוצאות המסייעת בזיהוי.

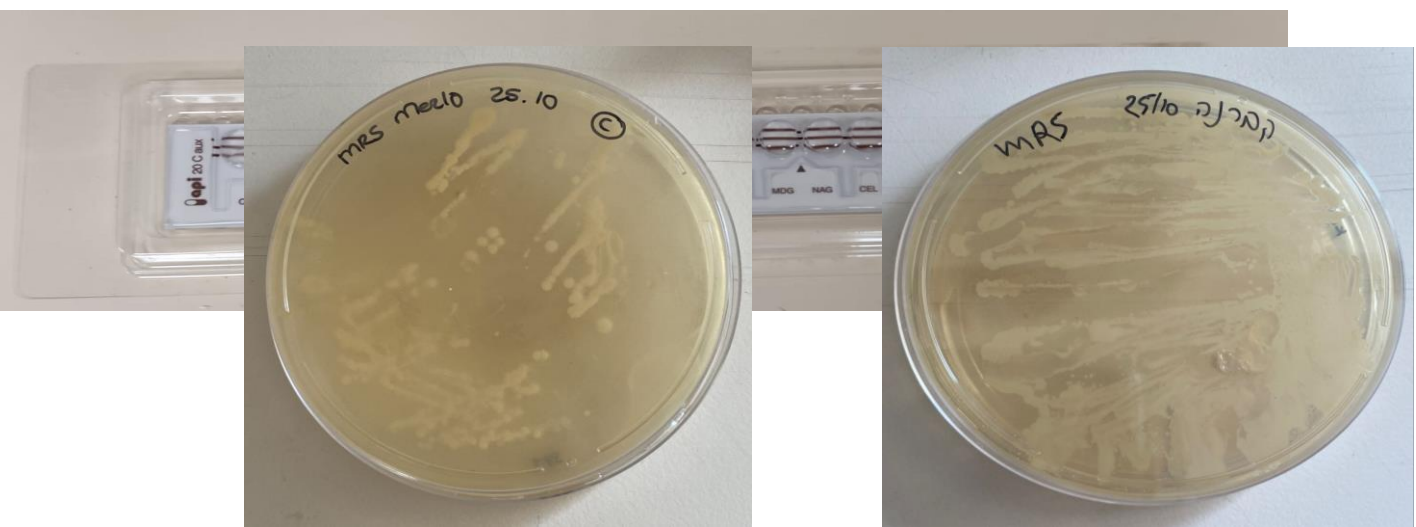


תמונה 10: מושבות של שמרים מסחריים שבדדו על צלחת פטרי

כמוצג במסמך 1 (נספחים), מתוארות התמונות של השמרים המסחריים במהלך התסיסה. ניתן להבחין כי בשני סוגי התירוש מתרחשת עלייה בכמות השמרים לאורך זמן התסיסה.

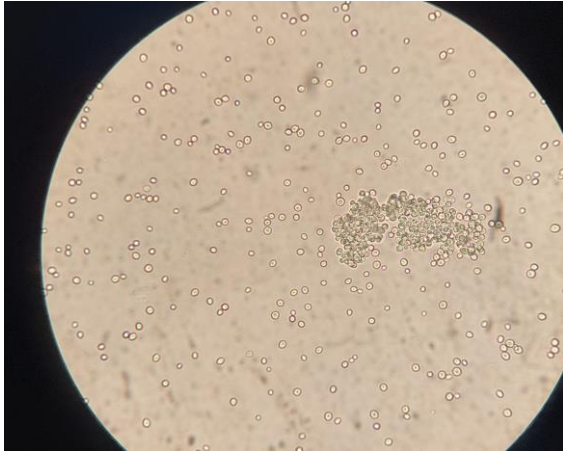
2. חיידקים מלולקטים :

קיבלנו 2 דוגמאות יין מזני ענבים שונים (קברנה ומרלו) מיקב צרעה, מהם ניסינו לבודד חיידקים מלולקטים שהיו בתהליך התסיסה השנייה על צלחות פטרי המותאמות לגידול חיידקים (תמונות 12 ו13). השתמשנו בקיטים בניסיון לזהות את החיידקים (תמונות 16 ו17). אך לא קיבלנו תוצאות חד משמעיות, כנראה בגלל שמדובר בשמרים ולא חיידקים. בדקנו את המושבות תחת מיקרוסקופ (תמונות 14 ו15). והתאים נראו כמו תאי שמרים. לכן, כדי לברר האם מדובר על חיידקים או שמרים, זרענו דוגמה מהמושבות לצלחת אגר עם מצע ייעודי לשמרים המכילה אנטיביוטיקה. ראינו כי גדלו מושבות ולכן הסקנו שאכן מדובר בשמרים. הגדילה של המושבות הייתה מהירה (תוך יומיים).



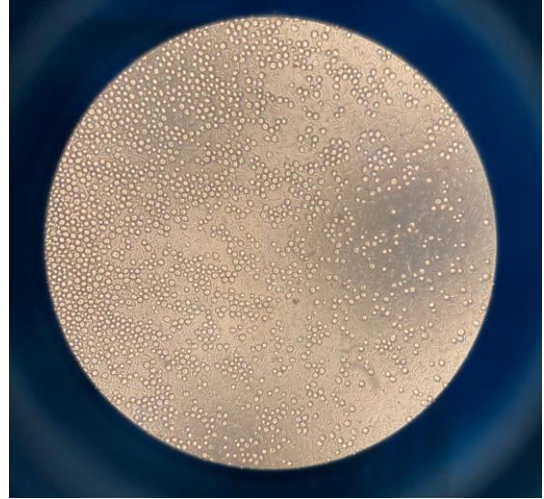
תמונה 13 : נסיון בידוד חיידקים מלולקטים מזן מרלו

תמונה 12 : נסיון בידוד חיידקים מלולקטים מזן קברנה



תמונה 15 :

תמונה 14 : הדגימות תחת מיקרוסקופ מהזן קברנה



הדגימות תחת מיקרוסקופ מהזן מרלו



תמונה 16 : התוצאות מטיפול בזן מרלו. תמונה 17 : התוצאות מטיפול בזן קברנה

בשני הטיפולים התוצאות לא תאמו אף מין של חיידק בספריית הזיהוי.

דיון

בניסוי זה, ניסינו לבדוד ולאפיין חיידקים ושמרים המעורבים בתסיסת היין. בפרק הדיון נתמקד בשמרים ולאחר מכן בחיידקים.

שמרים:

במהלך הניסוי, השווינו בין תסיסה כהלית של שמרי בר ושמרים מסחריים מסוג Uvaferm 43 בתירוש מענבים אדומים ובתירוש מענבים לבנים. עקבנו אחרי קצב התסיסה בעזרת סדרת מדידות לאורך זמן: בדיקת pH, רמת סוכר ו TA.

ניתן לראות ירידה בריכוז הסוכר בכל אחד מהטיפולים בניסוי (גרף 1, תוצאות; גרף 1, נספח). ככל שרמת הסוכר יורדת, תהליך התסיסה נמצא בשלב מתקדם יותר ואנו מניחים שריכוז האלכוהול עולה. בגרף 1, ניתן לראות קצב התסיסה דומה באותו סוג השמרים ללא קשר לסוג התירוש (אדום או לבן). זן השמרים הכתיב את קצב התסיסה גם בריכוזי סוכר התחלתיים שונים (20% בלבן ו24% באדום כפי שניתן לראות בגרף 1 בנספח). שמרים מסחריים מסיימים את כל הסוכר בתירוש בתוך כ-5-6 יום ואילו אצל שמרי בר יש שוני בין סוגי התירוש. שמרי הבר בתירוש האדום מתקרבים לסיום התסיסה (סיום הסוכר) רק לאחר יום 10 (מדידות אלו לא בוצעו, ולכן אין לדעת מתי הסתיימה התסיסה באופן מדויק). לעומת זאת, בתירוש הלבן, תסיסת שמרי הבר מסתיימת באזור יום 10. ניתן להסביר את ההבדלים בין שמרי בר לשמרים מסחריים בכך ששמרי יין תורבתו ע"י תהליך של ברירה מלאכותית לבצע תסיסה בתירוש. לכן נראה תוצאות יחסית אחידות עבור סוג זה של שמרים. לעומת זאת, שמרי הבר לא מותאמים לפעילות התסיסה באותה מידה כמו השמרים המתורבתים. ראשית, הריכוז ההתחלתי של שמרי הבר נמוך מזה של השמרים המסחריים, מה שמפיעה בצורה משמעותית על קצב ומשך התסיסה. יתר על כן, משום שאינם יוצרו במיוחד להתססת יין, רמת עמידותם לאלכוהול עלולה להיות נמוכה יותר ותפקודם ירד כתוצאה מכך. בנוסף, תסיסת שמרי בר מערבת מספר מינים שונים באותה התסיסה מה שיכול לגרום למצב בו התסיסה מתחילה על ידי זן שמרים אחד ומתחלפת באמצע על ידי זן אחר אשר יכול לפעול בסביבה בעלת ריכוז אלכוהול גבוהה יותר. מגוון שמרי הבר יכול לגרום להאטה של תהליך וקצב התסיסה.

כמו כן, ניתן לראות [בתמונות](#) המיקרוסקופיה (נספח מצגת) כי השמרים המסחריים התרבו יותר מהר משמרי הבר. הן מראות מגמה של עלייה בטיפולים. ככל שהזמן עובר, אוכלוסיית השמרים גדלה בקצב הולך וגובר (ניתן לראות זאת בתמונות בנספח הכללי ונספח המצגת). באופן כללי, מהתמונות ניתן לראות שבטיפולים עם תוספת שמרים היתה גדילה מהירה יותר מהטיפולים שהושארו לתסיסה ספונטנית. ההבדלים בגודל האוכלוסייה משפיעים בצורה ישירה על קצב ומשך תסיסת השמרים. ככל שהאוכלוסייה גדולה יותר, כך קצב התסיסה יהיה מהיר יותר ומשכה קצר יותר. את ההתאמה הזו ניתן לראות בגרף 1 (תוצאות) שכפי שצינו לפני כן, מראה כי תסיסת התירוש בעל השמר המסחרי מהירה יותר, ואילו התסיסה בתירוש בעל שמרי הבר איטית יותר, ואף לא מגיעה לסיום בחלק מהטיפולים.

מעבר לכך, בגלל האפשרות שבתירוש יש מספר סוגי שמרים שונים וביניהם נוצרת תחרות המשבשתמאטה את תסיסת היין. אפשרות נוספת היא שקיימים זנים שונים של שמרי בר בזן ענבים לבן לעומת זן האדום ולכן יש הבדלים בקצבי התסיסה.

ניתן ללמוד על התקדמות תהליך התסיסה משינוי בריכוז כלל החומצות (TA) במהלך הניסוי (גרף 2). בכל הטיפולים ה-TA עולה ומתייצב לאחר זמן מסוים. כאמור, ה-TA הוא סה"כ החומצות האורגניות בתמיסה, שכל אחד מתרכבות אלו תורמים לטעם וריח של היין. השינוי ב-TA משקף גם שינוי בריכוז החומצות וגם שינוי בהרכבם. יש דמיון בשינוי ה-TA בטיפולים עם התירוש הלבן ואלו עם התירוש האדום, ללא קשר לטיב השמרים שנמצאים בכל אחד (גרף 2 בפרק תוצאות). כלומר, אין השפעה של סוגי השמרים על החומצות במהלך התסיסה, אלא ההשפעה היא סוג התירוש. אנו משערים כי הדבר נובע מהבדל בריכוז ואולי גם בהרכב החומצות האורגניות בשני סוגי התירוש לאורך התסיסה. ניתן לראות סטיית תקן יחסית גדולה במדידות ה-TA (גרף 2). סטיית תקן זו נובעת משיטת המדידה. המדידה של כמות החומצה הכללית מתבצעת כאשר עושים טיטרציה ומטפטפים את התירוש ויש הופעה של צבע המעידה על סטירת הבסיס שנמצא בתמיסה ע"י החומצות בתירוש. כיוון שמדידה זו מבוססת על צבע היא מאוד סובייקטיבית, ניתן לפספס בקלות את הגוון המתאים של הצבע וייתכן כי נוצרו שגיאות מדידה רבות לאורך מדידה זו.

בנוסף, בעת תהליך התסיסה בדקנו גם את ארומות היין בכל אחד מהטיפולים. שמנו לב שהיין אליו הוספנו שמרים מסחריים העלה ריח נעים ופירותי, לעומת התירוש שעבר את התהליך עם שמרי בר בלבד שריחו היה מקולקל/חמוץ. שמרים מסחריים עברו תהליך של ברירה במטרה לקבלת ארומות וטעמים רצויים ביין. ניקח לדוגמה את השמר אשר שימש אותנו בביצוע התסיסה, UVAFERM 43. סוג זה מותאם לביצוע תסיסה עד ריכוז כהלי גבוהה (17%) מה שמאפשר לו לבצע תסיסה ארוכה ואיכותית יותר. יתר על כן, לזן זה טווח הטמפרטורות רחב (13-35 °C) מה שמשפר פעילות במגוון תנאים. בנוסף, זן זה אחראי לארומות וטעמים מסוימים והוא עוזר לשמר את צבע היין (אדום בגוון דובדבן). בניגוד לכך, שמרי בר לא עברו תהליך ברירה מלאכותית לבצע תסיסה בהתאם לצרכים ורצונות האדם. הם גדלים יותר לאט וגורמים לטעמים וארומות שלא תמיד רצויים.

לעומת אפיון תהליך התסיסה, בידוד שמרי הבר מן העלים והענפים לא צלח. כפי שניתן לראות בתמונות 8 ו-9 (תוצאות), במקום לבדוד שמרי בר בודדנו עובש ופטריות. ככל הנראה, העובש גדל והתפשט בעקבות הסביבה הלחה בה הושארו העלים וענפים (שקית סגורה) והוא היה הדומיננטי כך שגם אם גדלו פטריות, לא יכולנו לראות אותן.

חיידקים מלולקטיים :

הניסוי בו מטרתנו הייתה לבדוד חיידקים מלולקטים לא צלח. בסוף תהליך הזיהוי ראינו כי התוצאות (כפי שניתן לראות בתמונות 16 ו-17) אינן תואמות לאף חיידק. הסתכלות במיקרוסקופ הראתה כי מה שבודד דומה בצורתם לשמרים (תמונות 14 ו-15). על כן שיערנו כי בודדנו שמרים במקום חיידקים. בכדי לבדוק את ההשערה שלנו, לקחנו את האוכלוסייה שגדלה בצלחת הזו וגידלנו אותה על משטח ייעודי לגידול שמרים. במשטח זה יש אנטיביוטיקה בכדי למנוע מחיידקים לגדול בה. כלומר, במידה ובודדנו חיידקים, הם לא יתרבו ויגדלו בצלחת לעומת השמרים. תוצאות הניסוי היו גדילת האוכלוסייה בצלחת המיועדת לשמרים וכך איששנו את השערתנו.

הדוגמה שקיבלנו מיקב צרעה הייתה מיין שנמצא בתהליך התסיסה המלולקטית. אנו משערים כי בידוד החיידקים כשל כיוון שהיין עדיין הכיל שמרים שנותרו מתהליך התסיסה הראשונה. סילוק השמרים לאחר התסיסה הכהלית נעשית בכך שנותנים ליין לשהות בחבית והשמרים שוקעים. לאחר מכן, מעבירים את הנוזל העליון למיכל חדש. במידה וקיבלנו את היין בשלבים המוקדמים של התסיסה המלולקטית, ישנה אפשרות שנותרו תאי שמרים המסוגלים להוות תחרות לחיידקים על המצע המוצק עליו זרענו את הדוגמה. בנוסף, ייתכן שאוכלוסיית החיידקים המלולקטיים עדיין לא הייתה מספיק גדולה ומבוססת. ביקב צרעה לא מוסיפים חיידקים מלולקטיים לתסיסה, אלא עושים תסיסה מלולקטית ספונטנית (חיידקים הנמצאים באוויר). במידה ויקב צרעה היו מוסיפים חיידקים, לא היה צורך באפיונם. יתר על כן הוספת חיידקים תעלה את ריכוזם ביחס לשמרים וההסתברות שנצליח לאפיינם תעלה.

הצעות להמשך עבודה :

ישנם מספר דברים שניתן לעשות בכדי לשפר ניסוי זה. על מנת לבדוד בצורה טובה יותר את שמרי הבר, עלינו להתחיל את התהליך הבידוד מיד לאחר איסוף הדוגמאות. למשל ניתן לקחת מבחנות עם מצע מוצק לכרם עצמה, לדגום עם מטוש ולזרוע ישר. את בידוד החיידקים המלולקטים כדאי לבצע בשלבים האחרונים של התסיסה המלולקטית כדי לקבל אוכלוסייה משמעותית וחזקה של חיידקים מלולקטיים.

על מנת להמשיך וללמוד בצורה מעמיקה יותר על האורגניזמים המשתתפים בתהליך ייצור היין, ניתן להתחיל בשאלת שאלות שיקדמו את מטרה זו. לדוגמה :

האם יש יחסי גומלין או תחרותיות בין השמרים של התסיסה הכהלית והחיידקים הלקטים?

כיצד מינים שונים של שמרי בר משפיעים אחד על השני במהלך התסיסה הכהלית?

איך התסיסה מושפעת מסוגים שונים של שמרים מסחריים?

הקשר המחקר לחומר הלימודי :

1. ויסות הומאוסטזיס -

במהלך התסיסה הכהלית, ריכוזי החומרים בתמיסה משתנים לאורך הזמן. לדוגמה, כמות האתנול עולה וכמות הסוכר יורדת. האורגניזמים המבצעים את התסיסה הם שמרים, ועל מנת לבצע את התסיסה עד סופה, עליהם להיות מותאמים מבחינה פיזיולוגית ומבנית לתנאים המשתנים במהלכה. האלכוהול הורס את תאי השמר בכך שפוגע בקרום ומעלה את חדירות התא עד שאינו מסוגל לתפקד עוד. על כן, שמרים המותאמים בצורה המיטבית לביצוע התסיסה הם בעלי קרום בררני חזק ועמיד לריכוזי אתנול גבוהים. גורם משמעותי נוסף אליו השמרים מותאמים הוא השתנות ריכוז הסוכר. בתחילת תהליך התסיסה ריכוז סוכר הוא גבוהה ויורד לאורכה. על מנת לשמור על ריכוז נוזלים ומומסים מאוזן בתוך התא, השמר צריך להיות בעל מנגנון המווסת את

מעבר המים והמומסים מפנים התא, החוצה (לדוגמה, משאבות המכניסות ומוציאות מומסים בהתאם לסביבה החיצונית).

2. תאוריית האבולוציה -

תאוריית האבולוציה בייצור היין מתקשרת לתסיסת היין דרך ברירה טבעית ומלאכותית: בתהליך תסיסה כהלית ספונטנית נמצאים ביין מגוון רב של שמרים המבצעים את התסיסה בו זמנית. לקראת סופו המגוון מצטמצם משמעותית ורק חלק קטן מהשמרים מגיעים לסופו. כפי שניתן לראות, בתהליך התסיסה מתבצע מעין תהליך סלקציה בעוד שריכוז האתנול והסוכר הם הגורמים הסלקטיביים. כלומר השמרים העמידים ביותר לריכוזי אלכוהול גבוהים ומסוגלים לתפקד ולהתרבות בריכוזי סוכר נמוכים הם אלו שישארו לכל אורך התסיסה (מעין תהליך ברירה טבעית). ישנם ייננים ויקבים אשר משתמשים במנגנון זה לשם פיתוח שמרים מותאמים בצורה מיטבית לקיום תהליך תסיסת היין (מעין ברירה מלאכותית).

ביבליוגרפיה:

מקורות כלליים:

[תהליך ייצור היין WineMaking](#) - "הפורטל הישראלי להכנת יין.
[נכנס יין, יצא סוד](#) - "הספרייה והירטואלית של מטח". מחברת: תמר ארקין

רקע על היין (היסטוריה, מקורות, הקשר ליהדות וכו'):

[יין - שאלות ותשובות](#) - "סוד היין בע"מ"

[הקשר בין היין ליהדות](#) "BINYAMINA" -

[היחס בין היהדות לייין](#) "BeitChabad" -

[מקור היין scientificamerican](#) - "מחבר: ברנדן בורל.

[היסטוריית היין](#) - "ויקיפדיה"

[תגליות ארכאולוגיות ראשונות של יין](#) "nationalgeographic" -

שמרים:

[שמרי בר](#) "nourishedkitchen" - "מחברת: ג'ני מקגורפר.

[שמרים](#) - "ויקיפדיה"

שמרי יין:

[תפקיד השמרים ביין](#). "grapeworks" -

[שמרים ביין](#) "wineMaking" -

[איך שמרים מכינים את היין האהוב עליך](#) "Wine Enthusiast" - "מחברת: אנני קרביאל מ.ו.

[שמרים בייצור יין](#) - "ויקיפדיה"

[מידע על שמרים ומינים שונים שלהם](#) "Red Star" -

תסיסה מלולקטית (תסיסה שנייה) :

תסיסה שנייה (מלולקטית) - "ויקיפדיה".

חומצה לקטית - "ויקיפדיה"

המאלו המסתורי ומה הוא עושה ליון" - אנין טעם"

חיידקי התסיסה המלולקטית :

תסיסה מלולקטית - "ויקיפדיה"

עובדות על יין : תסיסה מלולקטית ויון "Eleanor" -

תהליך יישון היין (והתסיסה המלולקטית)"wineMaking -