



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Τμήμα Επιστημών Οίνου, Αμπέλου και Ποτών

Μελέτη της *Torulaspora delbrueckii* στην παραγωγή οίνου και ζύθου

Πτυχιακή εργασία:

Μπότσιου Χαρά-Ναταλία

Επιβλέπουσα καθηγήτρια:

Δρόσου Φωτεινή

ΑΘΗΝΑ 2021

Τριμελής επιτροπή αξιολόγησης

Δρόσου Φωτεινή

Κουσίση Ελισάβετ

Χατζηλαζάρου Αρχοντούλα

Δήλωση Συγγραφέα Πτυχιακής Εργασίας

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Μπότσιου Χαρά-Ναταλία του Μιχαήλ, με αριθμό μητρώου 718151063 φοιτήτρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Απτικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστημών Οίνου, Αμπέλου και Ποτών, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Η Δηλούσα



Μπότσιου Χαρά-Ναταλία

Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την Κυρία Φωτεινή Δρόσου, επιβλέπουσα της παρούσας εργασίας, όπου με την πολύτιμη βοήθειά της έφερα εις πέρας την διεξαγωγή της διπλωματικής μου εργασίας. Επίσης θα ήθελα να την ευχαριστήσω για την άψογη συνεργασία που είχαμε και την συνεχή της παρουσία όποτε χρειαζόμουν την συμβουλή και τη βοήθειά της.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια και τους φίλους μου, οι οποίοι με στήριξαν καθ' όλη τη διάρκεια διεξαγωγής της διπλωματικής μου εργασίας.

Περίληψη

Τα τελευταία χρόνια, η βιομηχανία παραγωγής οίνου και ζύθου έχει στρέψει το ενδιαφέρον της στη βελτίωση των προϊόντων της, έπειτα και από απαίτηση του καταναλωτικού κοινού για προϊόντα πιο εξελιγμένα και πολύπλοκα γευστικά και αρωματικά. Διεξάγονται αδιάκοπες έρευνες με σκοπό την εύρεση διάφορων μεθόδων οι οποίες θα αυξήσουν την πολυπλοκότητα των ποτών ζύμωσης, όπως είναι ο οίνος και ο ζύθος, και θα τα διαφοροποιήσουν από τα ήδη υπάρχοντα, αντίστοιχα προϊόντα της αγοράς.

Ένα από τα κύρια συστατικά και των δύο προϊόντων, είναι οι ζύμες, οι οποίες θεωρείται ότι διεξάγουν καθοριστικό ρόλο στην παραγωγή των οίνων και των ζύθων, λόγω της ικανότητάς τους να παράγουν, μέσω του μεταβολισμού τους, ουσίες που διαμορφώνουν και επηρεάζουν γευστικά και αρωματικά την ποιότητα του τελικού προϊόντος. Λόγω αυτής της ικανότητάς τους το ενδιαφέρον των επιστημονικών ερευνών επικεντρώνεται στις ζύμες, και πιο συγκεκριμένα στις non-*Saccharomyces* ή αλλιώς μη συμβατικές ζύμες. Οι ζύμες αυτές αναδεικνύονται αρκετά τα τελευταία χρόνια ως λύση για την παραγωγή πιο καινοτόμων και γευστικά πολύπλοκων προϊόντων στο χώρο της οινοποίησης και της ζυθοποίησης, στον οποίο η παραγωγή οίνων και ζύθων γινόταν ανέκαθεν με τον κλασικό σακχαρομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετάται βιβλιογραφικά η επίδραση της *Torulasporea delbrueckii* στην παραγωγή οίνου και ζύθου, η οποία είναι μια από τις πιο εμπορικές και περισσότερο χρησιμοποιούμενες non-*Saccharomyces* ζύμες, κυρίως στην παραγωγή οίνου. Η *T. delbrueckii* χαρακτηρίζεται από αντοχή στην αιθανόλη, καθώς και από χαμηλή παραγωγή ανεπιθύμητων προϊόντων, όπως είναι η ακεταλδεΐδη και το οξικό οξύ. Οι καθαρές καλλιέργειες ζύμωσης της *T. delbrueckii* εμφανίζουν βραδύτερο ρυθμό συγκριτικά με τις ζυμώσεις του κλασικού ζυμομύκητα *S. cerevisiae*, ενώ οι μικτές ζυμώσεις των δύο μικροοργανισμών δεν εμφανίζουν μεγάλη απόκλιση από τις καθαρές ζυμώσεις του *S. cerevisiae*. Ωστόσο, ανεξάρτητα από τον ρυθμό ζύμωσης, οι οίνοι και οι ζύθοι που παράγονται με τη συμμετοχή της *T. delbrueckii* χαρακτηρίζονται από πλούσια αρώματα φρούτων και λουλουδιών, φαίνεται να ενισχύεται η πολυπλοκότητα τους και προτιμώνται σε διαδικασίες γευσιγνωσίας από έμπειρους δοκιμαστές.

Τέλος, η παρούσα μελέτη επικεντρώνεται στα γενικά χαρακτηριστικά του συγκεκριμένου μικροοργανισμού, τον τρόπο λειτουργίας του κατά τη διάρκεια της ζύμωσης οίνων και ζύθων, καθώς και τον τρόπο με τον οποίο η *T. delbrueckii* δρά στις διάφορες παραμέτρους ζύμωσης, σε καθαρή καλλιέργεια ζύμωσης αλλά και σε συνεργασία με τον *Saccharomyces cerevisiae*. Επιπλέον εξετάζεται ο τρόπος με τον οποίο αντιδρά υπό συνθήκες οσμωτικού στρες, καθώς και η επίδρασή της στα διάφορα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των οίνων και των ζύθων.

Abstract

Nowadays, consumers require fermented alcoholic beverages with particularly enhanced flavor profiles. The wine and brewing industry have begun paying attention to finding ways to increase the quality of fermented beverages by adding more complexity in the aroma and flavor profile of the product.

The yeast is one of the main ingredients of wine and beer that plays a key role during fermentation. Through its metabolism, yeast produce substances that can influence the flavor profile of wine and beer. Due to this attribute, researchers' interest is focused on non-*Saccharomyces* yeast, which stands out in recent years for their ability to assist in the production of more innovative and flavor-complex products and differentiate them from the existing ones that are fermented with the conventional yeast (*Saccharomyces cerevisiae*).

In this study we analyze the influence of the most used and commercialized non-*Saccharomyces* yeast, especially in the wine industry, *Torulaspota delbrueckii*. This species characterized by resistance to ethanol and by low production of undesirable products, such as acetaldehyde and acetic acid. Pure cultures of *T. delbrueckii* show slower fermentation rate compared to the pure *S. cerevisiae* culture, while the mixed fermentations of both microorganisms were similar to pure *S. cerevisiae*'s fermentation. Regardless of the fermentation rate, both wines and beers produced by *T. delbrueckii* characterized by enhanced complexity and flavor, with rich aromas of fruits and flowers, and they are preferred by experienced tasters.

Last but not least, this study focuses on the general characteristics of this particular yeast and its influence on different fermentation parameters in pure and mixed or sequential inoculation with *S. cerevisiae*. In addition, the way that *T. delbrueckii* reacts under osmotic stress and its effect on wine and beer organoleptic profile has also been studied thoroughly.

Περιεχόμενα

Τριμελής επιτροπή αξιολόγησης	2
Δήλωση Συγγραφέα Πτυχιακής Εργασίας	3
Ευχαριστίες	4
Περίληψη	5
Abstract	6
Περιεχόμενα	7
Ευρετήριο εικόνων	8
Ευρετήριο πινάκων	9
Εισαγωγή	10
Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή στην παραγωγή οίνου και ζύθου	11
1.1 Ιστορική αναδρομή	11
1.2 Τα βασικά στάδια παραγωγής οίνου και ζύθου	12
1.3 Σύσταση και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά οίνου και ζύθου	14
1.3.1 Βασικά συστατικά του οίνου	14
1.3.2 Βασικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά οίνου	16
1.3.3 Βασικά συστατικά του ζύθου	17
1.3.4 Βασικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του ζύθου	18
Κεφάλαιο 2: Οι ζύμες και ο ρόλος τους στην παραγωγή οίνου και ζύθου	21
2.1 Γενικά χαρακτηριστικά των ζυμών	21
2.1.1 Οι ζυμώσεις στον οίνο και το ζύθο	21
2.1.2 Μικροβιακή ανάπτυξη	22
2.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	23
2.3 Non- <i>Saccharomyces</i> ζύμες	25
2.3.1 Η εξέλιξη των non- <i>Saccharomyces</i> ζυμών	25
2.3.2 Τα κυριότερα είδη ζυμών non- <i>Saccharomyces</i> στην οινοποίηση και τη ζυθοποίηση	26
Κεφάλαιο 3: <i>Torulaspora delbrueckii</i>	29
3.1 Γενικά χαρακτηριστικά	29
3.2 Στελέχη της <i>Torulaspora delbrueckii</i> που έχουν χρησιμοποιηθεί στην οινοποίηση και την ζυθοποίηση	31
Κεφάλαιο 4: Ζυμώσεις με την <i>Torulaspora delbrueckii</i>	34
4.1 Ανάπτυξη και ζυμωτική συμπεριφορά σε ζυμώσεις οίνου	34
4.1.1 Ζυμώσεις με εμβολιασμό καθαρής καλλιέργειας της <i>T. delbrueckii</i>	34
4.1.2 Ζυμώσεις με ταυτόχρονο ή διαδοχικό εμβολιασμό της <i>T. delbrueckii</i> και του <i>S. cerevisiae</i>	39
4.2 Ανάπτυξη και ζυμωτική συμπεριφορά σε ζυμώσεις ζύθου	46

4.2.1 Ζυμώσεις με εμβολιασμό καθαρής καλλιέργειας της <i>T. delbrueckii</i> και μικτές ζυμώσεις σε συνεργασία με τον <i>S. cerevisiae</i>	46
Κεφάλαιο 5: Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά στον οίνο και το ζύθο και η επίδραση της <i>T. delbrueckii</i> σε αυτά	53
5.1 Μεταβολικά μονοπάτια στη ζυμωτική διαδικασία	53
5.1.1 Κύριο μεταβολικό μονοπάτι.....	53
5.1.2 Μεταβολικά μονοπάτια σύνθεσης δευτερευόντων προϊόντων στον οίνο και το ζύθο	54
5.2 Η επίδραση της <i>T. delbrueckii</i> στο οργανοληπτικό προφίλ του οίνου	58
5.3 Η επίδραση της <i>T. delbrueckii</i> στο οργανοληπτικό προφίλ του ζύθου.....	65
5.4 Οργανοληπτική αξιολόγηση οίνων και ζύθων με την <i>T. delbrueckii</i>	71
Κεφάλαιο 6: Συμπεράσματα.....	72
Βιβλιογραφία.....	74

Ευρετήριο εικόνων

Εικόνα 1: Καμπύλη ανάπτυξης μικροοργανισμού (O'Connor).....	22
Εικόνα 2, 3: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> όπως φαίνεται από κλασσικό μικροσκόπιο (αριστερά) (UCDAVIS Viticulture & Enology, microscopy for the winery) και από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (δεξιά) (Akşit, 2012).....	23
Εικόνα 4, 5: Η <i>T. delbrueckii</i> όπως φαίνεται στο μικροσκόπιο (eurekabrewing.wordpress.com; fermentationstations.wordpress.com)	29
Εικόνα 6: Το στέλεχος Td28 σε καθαρή καλλιέργεια και το προφίλ ζύμωσης (Tataridis et al., 2013).	35
Εικόνα 7: <i>T. delbrueckii</i> και <i>S. cerevisiae</i> σε καθарές καλλιέργειες, και η πορεία των σακχάρων, της αιθανόλης και της ανάπτυξης (Tondini et al., 2019)	35
Εικόνα 8: Ανάπτυξη στελεχών της <i>T. delbrueckii</i> (Td-1, Ts-2) και του <i>S. cerevisiae</i> (Sc-1, Sc-2) σε τριβλύο με ποσότητες διοξειδίου του θείου (SO ₂) 125 mg/L και 250 mg/L (Ramírez & Velázquez, 2018).....	38
Εικόνα 9: Τα εναπομείναντα σάκχαρα σε ποσοστό επί τοις 100 από την αρχική συγκέντρωση σακχάρων (220 g/L) σε καθарές καλλιέργειες ζύμωσης (pure) με τον <i>S. cerevisiae</i> και την <i>T. delbrueckii</i> και σε μικτές (mix T/S) και διαδοχικές (sequ) ζυμώσεις με τις δύο αυτές ζύμες. 300 mg/L άζωτο, 20 °C. Το “L” υποδηλώνει τη χαμηλή αναλογία της <i>T. delbrueckii</i> και του <i>S. cerevisiae</i> , ενώ το “H” την υψηλή. Το βέλος υποδηλώνει τη στιγμή του εμβολιασμού του <i>S. cerevisiae</i> στην διαδοχική ζύμωση (Taillandier et al., 2014).....	41
Εικόνα 10, 11: Κινητική ανάπτυξης των βιώσιμων κυττάρων του <i>S. cerevisiae</i> (a) και της <i>T. delbrueckii</i> (b) στις καθарές (pure), μικτές (mix T/S) και διαδοχικές (sequ) καλλιέργειες ζύμωσής τους. 300 mg/L άζωτο, 20 °C. Το “L” υποδηλώνει τη χαμηλή αναλογία της <i>T. delbrueckii</i> και του <i>S. cerevisiae</i> , ενώ το “H” την υψηλή. Το βέλος υποδηλώνει τη στιγμή εμβολιασμού του <i>S. cerevisiae</i> στη διαδοχική ζύμωση (Taillandier et al., 2014).....	42
Εικόνα 12: Κινητική ανάπτυξης των βιώσιμων κυττάρων της <i>T. delbrueckii</i> σε καθарές (pure) καλλιέργειες ζύμωσης και διαδοχικές (sequ) καλλιέργειες ζύμωσης με τον <i>S. cerevisiae</i> . 170	

mg/L άζωτο, 20 °C. Το “L” υποδηλώνει τη χαμηλή αναλογία της <i>T. delbrueckii</i> και του <i>S. cerevisiae</i> . Το βέλος υποδηλώνει τη στιγμή εμβολιασμού του <i>S. cerevisiae</i> στη διαδοχική ζύμωση (Taillandier et al., 2014).....	42
Εικόνα 13: : Ζυμωτική διαδικασία στους 23° C. Παστεριωμένο γλεύκος (ανοιχτά σύμβολα) και μη παστεριωμένο (σκούρα σύμβολα) με καθαρές καλλιέργειες του <i>S. cerevisiae</i> ST (S), καθαρές καλλιέργειες της <i>T. delbrueckii</i> 31703(T) και μικτές των <i>T. delbrueckii</i> 31703/ <i>S. cerevisiae</i> ST (T/S).....	45
Εικόνα 14: Ζυμωτική διαδικασία στους 23° C, σε μη παστεριωμένο γλεύκος με) με καθαρές καλλιέργειες του <i>S. cerevisiae</i> ST (S), καθαρές καλλιέργειες της <i>T. delbrueckii</i> 31703 (T) και μικτές των <i>T. delbrueckii</i> 31703/ <i>S. cerevisiae</i> ST (T/S) με πυκνότητα στο στέλεχος της <i>T. delbrueckii</i> 31703 10 ⁷ κύτταρα/mL (Bely et al., 2008).	46
Εικόνα 15: Διάγραμμα κινητικής ζύμωσης καθαρών καλλιεργείων του <i>S. cerevisiae</i> (US-05) και της <i>T. delbrueckii</i> (TD-A01, TD-BO3) σε 100% ζυθογλεύκος και σε ζυθογλεύκος εμπλουτισμένο με γλυκόζη (60% και 40% γλυκόζη) (Tataridis et al., 2016).....	47
Εικόνα 16: Διάγραμμα κινητικής ζύμωσης καθαρών και μικτών ζυμώσεων (Canonico et al.,2017).....	48
Εικόνα 17: Διάγραμμα κατανάλωσης σακχάρων. Οι °Brix αντιστοιχούν στο ποσοστό των σακχάρων που καταναλώνεται όσο προχωράει η ζυμωτική διαδικασία, όσο πιο γρήγορα μειώνονται οι °Brix τόσο πιο γρήγορος είναι και ο ρυθμός της ζύμωσης (Toh et al., 2018)...	48
Εικόνα 18: Αποτελέσματα πληθυσμού καθαρών καλλιεργείων με διαφορετικά στελέχη της <i>T. delbrueckii</i> (αριστερά, παρουσιάζονται ως γκρι στήλες) και η βιωσιμότητα των κυττάρων τους (δεξιά, παρουσιάζονται ως μαύρες κουκίδες) (Michel et al., 2016)	49
Εικόνα 19: Διαγράμματα κινητικής ανάπτυξης των ζυμών (Canonico et al., 2017) (Canonico et al., 2016).....	50
Εικόνα 20: Διάγραμμα μεταβολής του pH σε αντίστοιχες καθαρές και μικτές ζυμώσεις των <i>S. cerevisiae</i> και <i>T. delbrueckii</i> (Toh et al., 2018).	51
Εικόνα 21: Σύνθεση κύριων προϊόντων ζύμωσης μέσω της μεταβολική οδού της γλυκόλυσης (μονοπάτι E-M-P) (Stewart, 2017b).....	54
Εικόνα 22: Η μεταβολική οδός Ehrlich (Pires et al., 2014).....	55
Εικόνα 23: Βασικές ομάδες αρωματικών ενώσεων που παράγονται από τις ζύμες κατά τη διάρκεια της ζύμωσης (Styger et al., 2011).	58

Ευρετήριο πινάκων

Πίνακας 1: Βασικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου (González-Barreiro et al., 2015)	16
Πίνακας 2: Βασικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του ζύθου	18
Πίνακας 3: Οργανοληπτική επιρροή των εμπορικών στελεχών της <i>T. delbrueckii</i> (Benito, 2018)	31
Πίνακας 4: Στελέχη της <i>T. delbrueckii</i> που έχουν χρησιμοποιηθεί πειραματικά και κάποια χαρακτηριστικά τους	32

Εισαγωγή

Κατά τη διάρκεια της ανθρώπινης ιστορίας και στις περισσότερες κοινωνίες, ο οίνος και ο ζύθος, δύο αλκοολούχα ποτά ζύμωσης, έχουν διεξάγει σημαντικό ρόλο λόγω της οικονομικής και πολιτιστικής τους σημασίας, καθώς και ως μέρος της διατροφής του ανθρώπου. Η ύπαρξη τους χρονολογείται περίπου το 6000 και 4000 π.Χ. για τον οίνο και το ζύθο αντίστοιχα. Στη σημερινή εποχή εξακολουθούν να κατέχουν σημαντική θέση στη ζωή του ανθρώπου, καθώς είναι από τα πιο διαδεδομένα αλκοολούχα ποτά. Η βιομηχανία παραγωγής τους αναπτύσσεται και εξελίσσεται συνεχώς και κατέχει επίσης ισχυρή οικονομική θέση στη διεθνή αγορά.

Υπάρχουν διάφορα είδη οίνου και ζύθου τα οποία παράγονται και ίσως αυτό το γεγονός να τα καθιστά αρκετά δημοφιλή. Βασικές κατηγορίες οίνου είναι ο ερυθρός, ο ροζέ και ο λευκός οίνος και έπειτα υπάρχουν άλλες υποκατηγορίες που διαχωρίζονται ανάλογα με την περιεκτικότητα σακχάρων και διοξειδίου του άνθρακα. Ο αρχικός διαχωρισμός εξαρτάται κυρίως από το χρώμα της ποικιλίας σταφυλιού και οι υπόλοιποι διαχωρισμοί από τη διαδικασία οινοποίησης. Ο ζύθος έχει επίσης κάποιες βασικές κατηγορίες, τους ζύθους lager (βυθοζύμες), ale (αφροζύμες) και lambic (αυθόρμητη ζύμωση με μικροοργανισμούς του περιβάλλοντος). Η διαφοροποίηση των κατηγοριών αυτών ευθύνεται στη θερμοκρασία ζύμωσης και τις ζύμες που χρησιμοποιούνται. Ωστόσο και στη διαδικασία παραγωγής ζύθου μπορούν να υπάρχουν και άλλες παραλλαγές ανάλογα με τις επεμβάσεις και τις μεθόδους παραγωγής που θα χρησιμοποιηθούν από τον εκάστοτε παραγωγό.

Η συνεχής ζήτηση του καταναλωτικού κοινού για αυτά τα προϊόντα, καθώς και η πληθώρα προϊόντων στην αγορά έχει επιστρατεύσει την ανάγκη για παραγωγή οίνων και ζύθων με μεγαλύτερη γευστική πολυπλοκότητα και ανώτερη ποιότητα. Αυτά τα χαρακτηριστικά βασίζονται στα κύρια συστατικά που εμπλέκονται στην παραγωγή των δύο προϊόντων και κυρίως στις ζύμες. Οι μικροοργανισμοί αυτοί θεωρείται ότι κατέχουν έναν από τους σημαντικότερους ρόλους στη διαδικασία παραγωγής, διότι εκτός από την παραγωγή αιθανόλης και διοξειδίου του άνθρακα, έχουν τη δυνατότητα μέσω του μεταβολισμού τους να διαφοροποιήσουν το οργανοληπτικό προφίλ του προϊόντος, παράγοντας ενώσεις που επιδρούν στο άρωμα, τη γεύση και κατ' επέκταση στην ποιότητα του οίνου και του ζύθου. Για την επίτευξη αυτού, το ενδιαφέρον στρέφεται στη μελέτη μη συμβατικών ζυμών, οι οποίες φαίνεται να μπορούν να επιφέρουν μια διαφοροποίηση στο παραδοσιακό προϊόν το οποίο κατά κύριο λόγο παράγεται με τον κλασικό και ευρέως γνωστό ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*.

Στην παρούσα εργασία μελετάται μια ζύμη non-*Saccharomyces*, η *Torulasporea delbrueckii* και ο τρόπος λειτουργίας της στις ζυμώσεις οίνου και ζύθου καθώς και η επίδραση της στα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά.

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή στην παραγωγή οίνου και ζύθου

1.1 Ιστορική αναδρομή

Στην ανθρώπινη ιστορία τα διάφορα ποτά τα οποία έχουν παραχθεί μέσω ζύμωσης έχουν διαδραματίσει σημαντικό ρόλο για τις περισσότερες κοινωνίες, κυρίως λόγω της οικονομικής αλλά και της πολιτιστικής τους σημασίας. Το πρώτο ποτό ζύμωσης χρονολογείται περίπου το 7000 π.Χ. στην Κίνα (Legras et al., 2007). Η ύπαρξη αμπέλου επίσης, χρονολογείται πριν 36 με 65 εκατομμύρια χρόνια όπως έχουν δείξει ορισμένα αρχαιολογικά στοιχεία (Munsie, 2002).

Για την παραγωγή οίνου τα αρχαιολογικά στοιχεία δείχνουν την πρώτη εμφάνιση του το 6000 π.Χ. στο Ιράν και έπειτα στην Αίγυπτο το 3000 π.Χ. (Varela, 2016), όπου φαίνεται να χρησιμοποιούταν μεταξύ 2000 και 1000 π.Χ. κυρίως σε θρησκευτικές τελετές (Munsie, 2002). Η εξάπλωση των τεχνολογιών ζύμωσης πιστεύεται ότι έγινε από την Μεσοποταμία προς τον υπόλοιπο κόσμο (Legras et al., 2007). Μέσω της θάλασσας της Μεσογείου η καλλιέργεια της αμπέλου και η παραγωγή οίνου εξαπλώθηκε στην νοτιοανατολική Ισπανία, περίπου το 2500 π.Χ., και τη δυτική Μεσόγειο και την Ελλάδα, το 2000 π.Χ. Έπειτα, τα στοιχεία δείχνουν την εξάπλωση του στην Ιταλία, το 1000 π.Χ. Κατά τη διάρκεια της Ρωμαϊκής αυτοκρατορίας υπήρχε ανάπτυξη της αμπελοργίας και της παραγωγής οίνου και επέκταση μέσω των Ρωμαίων στη Γαλατία, την σύγχρονη Γαλλία. Το 100 μ.Χ. η παραγωγή οίνου επεκτάθηκε στην Βόρεια Ευρώπη. Με την πτώση της Ρωμαϊκής αυτοκρατορίας υπήρξε μεγάλη μείωση στην καλλιέργεια της αμπέλου, και κατά συνέπεια και στην παραγωγή οίνου έως το 800 μ.Χ., όπου με την εξάπλωση του Χριστιανισμού αυξήθηκε ξανά η παραγωγή λόγω της εκκλησίας, η οποία είχε ανάγκη από οίνο κυρίως για τις διάφορες τελετές που πραγματοποιούνταν. Δεν υπάρχουν στοιχεία τα οποία να αποδεικνύουν παραγωγή οίνου στην Αμερική έως το 1490 μ.Χ., όπου ο Κολόμβος εισήγαγε το πρώτο ισπανικό κρασί στην Αμερική, το οποίο ήταν πρόδρομος του σημερινού κρασιού τύπου Sherry. Αργότερα, τον 16^ο αιώνα η παραγωγή οίνου εξαπλώθηκε και στην Λατινική Αμερική. Το 1619 μ.Χ. επεκτάθηκε στις ανατολικές ακτές των ΗΠΑ, μέσω των Ευρωπαίων και το 1700 μ.Χ. στις δυτικές ακτές από Φραγκίσκους ιεραπόστολους. Οι Άγγλοι μετέφεραν την τεχνολογία του οίνου στην Αυστραλία το 1788 μ.Χ. και στην Νέα Ζηλανδία, το 1819 μ.Χ. Έκτοτε η καλλιέργεια της αμπέλου, η παραγωγή και η τεχνολογία οίνου είναι παγκοσμίως διαδεδομένη και διεξάγει σημαντικό ρόλο τόσο στην καθημερινότητα του σύγχρονου ανθρώπου καθώς και στην επιστημονική κοινότητα εξελίσσοντας το παραδοσιακό προϊόν. Κάθε οίνος που παράγεται εξαρτάται από την ποικιλία σταφυλιών, την περιοχή που βρίσκεται ο αμπελώνας και τις κλιματικές συνθήκες που επικρατούν εκεί, καθώς και από τις παρεμβάσεις του εκάστοτε οινοπαραγωγού (Munsie, 2002).

Η ιστορία του ζύθου έχει εξίσου αξιοσημείωτο ενδιαφέρον εφόσον αποτελεί ένα προϊόν με οικονομικό και πολιτιστικό ενδιαφέρον, αν και στο μεγαλύτερο μέρος της ιστορίας του δεν είχε τόσο σημαντικό εμπορικό ενδιαφέρον, αλλά κυρίως διατροφικό για τον αγροτικό πληθυσμό (Ταταρίδης, Νεραντζής, & Κεχαγιά, 2014).

Δεν υπάρχουν σαφή στοιχεία για το πότε ακριβώς ανακαλύφθηκε ο ζύθος, αλλά τα παλαιότερα στοιχεία τα οποία αφορούν την παραγωγή ζύθου αξιολογούνται ότι είναι 6000 ετών και αναφέρονται στους Σουμέριους. Το 2000 π.Χ. μετά την καταστροφή του πολιτισμού των Σουμέριων, αναπτύσσεται ο πολιτισμός των Βαβυλώνιων, οι οποίοι παρήγαγαν 20 διαφορετικά είδη ζύθου. Ο Αρχαίος Έλληνας Ιστορικός Ηρόδοτος αναφέρθηκε στην ενασχόληση των Αιγύπτιων με τον ζύθο. Έπειτα από τους Αιγύπτιους, άρχισαν την παραγωγή ζύθου οι Έλληνες και στη συνέχεια οι Ρωμαίοι, οι οποίοι το θεωρούσαν το ποτό

των βαρβάρων και τον οίνο το ποτό των Θεών. Στις επαρχίες της Ρωμαϊκής αυτοκρατορίας γινόταν μόνο η παραγωγή ζύθου, λόγω της οικονομικής δυσκολίας να παράγουν κρασί. Επίσης οι Αρχαίοι Γερμανοί ή Τεύτονες είχαν ενδιαφέρον για την παραγωγή ζύθου, το 800 π.Χ. Η παραγωγή ζύθου έως την 1^η χιλιετία μ.Χ. ήταν δουλειά των γυναικών και μετέπειτα άρχισε η παραγωγή ζύθου και σε μοναστήρια. Αρχικά ήταν για προσωπική χρήση των μοναχών, αλλά στη συνέχεια λόγω της μεγάλης ποσότητας παραγωγής του ξεκίνησαν το εμπόριο. Ήταν ένας υψηλής ποιότητας ζύθος, ο οποίος είχε ανταπόκριση στους καταναλωτές. Το 1368 με 1437 μ.Χ. λόγω υψηλών φόρων άρχισε να μειώνεται αισθητά η παραγωγή μοναστηριακών ζύθων. Το 14^ο αιώνα, η πόλη της Βρέμης ήταν ο κύριος προμηθευτής ζύθου στην Ολλανδία, την Αγγλία και τις Σκανδιναβικές χώρες. Επίσης το Αμβούργο, το 1500μ.Χ. αναπτύχθηκε σε μεγάλο κέντρο παραγωγής ζύθου. Το 1516 μ.Χ. καθιερώθηκαν σαν κύρια συστατικά του ζύθου το κριθάρι, το νερό και ο λυκίσκος. Η χρήση ζυμών δεν ήταν ακόμη γνωστή και η ζύμωση για την παραγωγή ζύθου γινόταν με τις ζύμες του αέρα. Στην Ελλάδα το πρώτο εργοστάσιο ζύθου ιδρύθηκε το 1864 μ.Χ. από τον Ιωάννη Φίξ. Επίσης στις ΗΠΑ υπήρχαν διάφορα ζυθοποιεία, τουλάχιστον 150 από το 1800 μ.Χ. Το Λονδίνο στις αρχές του 18^{ου} αιώνα αποτέλεσε επίσης σημαντικό κέντρο με μεγάλη παραγωγή και κατανάλωση ζύθου. Στο Μεξικό, οι ιθαγενείς καλλιεργούσαν καλαμπόκι και αναφέρεται από τον Κολόμβο η κατανάλωση ενός ζυμωμένου ροφήματος που παρασκευαζόταν από καλαμπόκι, το οποίο έμοιαζε αρκετά με το ζύθο. Στις Άνδεις επίσης παραγόταν μπύρα από αραβόσιτο και άλλα δημητριακά και φρούτα από τους προϊστορικούς χρόνους. Ο ζύθος, ως βιομηχανικό προϊόν στον Νέο Κόσμο ήρθε αργότερα, όταν ιδρύθηκε η πρώτη βιομηχανία ζύθου στο Μεξικό το 1542 μ.Χ. (Ταταρίδης, Νεραντζής, & Κεχαγιά, 2014).

Ο ζύθος πλέον αποτελεί και αυτός μαζί με τον οίνο ένα παγκοσμίως διαδεδομένο προϊόν, με σημαντική αξία για τις διατροφικές συνήθειες του ανθρώπου, όπως επίσης και για την οικονομία των χωρών παραγωγής του. Επιπλέον, και ο ζύθος έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, όπως και ο οίνος με σκοπό την παραγωγή πιο εξελιγμένων, καινοτόμων και πολύπλοκων γευστικά προϊόντων σε σχέση με τα παραδοσιακά, τα οποία θα ικανοποιήσουν τις απαιτήσεις του καταναλωτικού κοινού.

1.2 Τα βασικά στάδια παραγωγής οίνου και ζύθου

Στάδια οινοποίησης

Ο οίνος μπορεί να χαρακτηριστεί ως ένα προϊόν βιολογικής και βιοχημικής αλληλεπίδρασης μεταξύ των σταφυλιών και των μικροοργανισμών που τα απαρτίζουν. Μπορούν να παραχθούν πολλά διαφορετικά είδη οίνου, με ιδιαίτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, από τις διάφορες ποικιλίες που καλλιεργούνται ανά τον κόσμο, καθώς και μέσω των τεχνολογιών που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή του οίνου από τους οινοπαραγωγούς. Ένας κύριος διαχωρισμός που υπάρχει στην παραγωγή οίνου είναι η λευκή και η ερυθρή οινοποίηση. Υπάρχουν κάποια βασικά στάδια στην διαδικασία παραγωγής οίνου, τα οποία μπορεί βέβαια να διαφοροποιηθούν σε κάποια σημεία ανάλογα με το είδος του οίνου που είναι επιθυμητό να παραχθεί. Τα βασικά αυτά στάδια είναι τα παρακάτω:

- I. Η διαδικασία της οινοποίησης ξεκινάει με την ασφαλή μεταφορά των σταφυλιών από τον αμπελώνα στο οινοποιείο.
- II. Τα σταφύλια, μαζί με τα κοτσάνια ρίχνονται στο εκραγιστήριο, όπου συνθλίβονται και παραλαμβάνεται ο χυμός που περιέχουν στο εσωτερικό τους οι ράγες. Ο χυμός αυτός, μαζί με τα εκραγισμένα σταφύλια μεταφέρεται μέσω βοηθητικής αντλίας στο

πιεστήριο, αν πρόκειται για λευκή οينوποίηση. Εάν πρόκειται για ερυθρή οينوποίηση ο σταφυλοπολτός μεταφέρεται με τον ίδιο τρόπο κατευθείαν στις δεξαμενές ζύμωσης.

- III. Στη λευκή οينوποίηση, αφού παραλαμβάνεται από το πιεστήριο το γλεύκος, το οποίο είναι απαλλαγμένο από σταφύλια, οδηγείται στις δεξαμενές, όπου θα ακολουθήσει η διαδικασία της απολάσπωσης, με σκοπό την καθίζηση αιωρούμενων σωματιδίων και την μεταφορά έπειτα του διαυγούς γλεύκους σε καθαρές δεξαμενές ζύμωσης. Για την ερυθρή οينوποίηση, όπου δεν υφίστανται το στάδιο του πιεστηρίου και της απολάσπωσης, αφού ο σταφυλοπολτός μεταφερθεί στις δεξαμενές ζύμωσης, ξεκινάει η ζύμωση παρουσία στέμφυλων και βοστρύχων και μέσω της διαδικασίας της διαβροχής επιτυγχάνεται η εκχύλιση. Η εκχύλιση είναι ένα φαινόμενο κατά το οποίο εμπλουτίζεται ο χυμός των σταφυλιών με ανθοκυάνες (υπεύθυνες για το χρώμα) και τανίνες (υπεύθυνες για την στυφότητα των ερυθρών κυρίως οίνων), ενώσεις οι οποίες είναι σημαντικές για τους ερυθρούς οίνους.
- IV. Έπειτα ακολουθεί το στάδιο της ζύμωσης, η παραγωγή δηλαδή των κύριων προϊόντων αυτής, της αιθανόλης και του διοξειδίου του άνθρακα, καθώς και των δευτερευόντων προϊόντων του μεταβολισμού των ζυμών, προϊόντα εξαιρετικής σημασίας για την ποιότητα του οίνου. Η διαδικασία της ζύμωσης υφίσταται και στις δύο οينوποιήσεις (λευκή και ερυθρή). Ωστόσο η ερυθρή οينوποίηση γίνεται παρουσία στέμφυλων, ώστε να παραχθεί το ερυθρό χρώμα που είναι επιθυμητό, καθώς και οι τανίνες, δηλαδή να γίνει η εκχύλιση που αναφέρθηκε στο III. στάδιο, μετά το πέρας της οποίας και γίνεται ο διαχωρισμός από τα στέμφυλα, όταν υπάρχει το επιθυμητό αποτέλεσμα στο χρώμα και στις τανίνες όσο το γλεύκος ζυμώνει.
- V. Για την ερυθρή οينوποίηση, συνήθως ακολουθεί μια δεύτερη ζύμωση, η μηλογαλακτική, όπου συμβάλλει στην μείωση της οξύτητας, η οποία δεν είναι επιθυμητή σε υψηλές τιμές σε έναν ερυθρό οίνο. Στην λευκή οينوποίηση, το V. στάδιο είναι η παραμονή στις δεξαμενές ζύμωσης ώστε να επιτευχθεί η ωρίμανση.
- VI. Η ωρίμανση για την ερυθρή οينوποίηση αποτελεί το VI. στάδιο.
- VII. Το επόμενο στάδιο και στις 2 οينوποιήσεις (VI. και VII. αντίστοιχα), είναι οι φυσικοχημικές και βιολογικές κατεργασίες, οι οποίες διεξάγονται με σκοπό την σταθεροποίηση του οίνου.
- VIII. Ακολουθεί στη συνέχεια η διήθηση, διαδικασία με σκοπό να επιτευχθεί η διαύγεια του οίνου.
- IX. Τελικό στάδιο στην οينوποίηση είναι η εμφιάλωση του οίνου.

Τα στάδια που αναφέρθηκαν μετά την διαδικασία παραμονής στις δεξαμενές ζύμωσης, αφορούν οίνους που προορίζονται για άμεση κατανάλωση και συνήθως αυτό συμβαίνει με λευκούς και σπανιότερα με ερυθρούς οίνους. Διαφορετικά, σε περίπτωση που είναι επιθυμητό να υποβληθεί ο οίνος στη διαδικασία παλαίωσης, από τις δεξαμενές ζύμωσης γίνεται μεταφορά του σε δρύινα (συνήθως) βαρέλια. Εκεί παραμένει όσο επιθυμεί ο εκάστοτε παραγωγός για το τελικό προϊόν που θέλει να παραχθεί. Όταν ολοκληρωθεί η παλαίωση ακολουθούν τα ίδια στάδια που αναφέρθηκαν, δηλαδή οι κατεργασίες που είναι απαραίτητες σε κάθε περίπτωση, η διήθηση και τελικά η εμφιάλωση του οίνου.

Στάδια ζυθοποίησης

Στη ζυθοποίηση χρησιμοποιείται κυρίως ως πρώτη ύλη το δίστοιχο κριθάρι, το οποίο έχει οργανοληπτική υπεροχή στο τελικό προϊόν σε σχέση με άλλα δημητριακά που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή ζύθου. Το κριθάρι βυνοποιείται (παραλαμβάνεται,

καθαρίζεται, γίνεται η ταξινόμηση των κόκκων του, ακολουθεί η διαβροχή του, η βλάστηση και τέλος η ξήρανση αυτού) για να μπορεί να ξεκινήσει η διαδικασία της ζυθοποίησης.

- I. Το πρώτο στάδιο είναι η άλεση της βύνης, όπου επιτυγχάνεται η αύξηση της επιφάνειας της, και μέσω αυτού δίνεται στα ένζυμα η δυνατότητα να δράσουν και να αποικοδομήσουν τις ουσίες που βρίσκονται σε αυτή.
- II. Ακολουθεί η πολτοποίηση, διαδικασία κατά την οποία τα ένζυμα δρούν και μετατρέπουν τις αδιάλυτες ουσίες που περιέχονται στη βύνη σε διαλυτές (πχ άμυλο, πρωτεΐνες), ώστε να δημιουργηθεί το ζυμώσιμο και το μη ζυμώσιμο εκχύλισμα.
- III. Το III. στάδιο αποτελεί η διήθηση, η διαδικασία απομάκρυνσης των υπολειμμάτων της βύνης. Παράλληλα γίνεται η έκπλυση αυτών ώστε να συγκεντρωθεί και το υπόλοιπο εκχύλισμα που έχουν συγκρατήσει τα βυνοϋπολείμματα. Παραλαμβάνεται το βυνογλεύκος, το οποίο είναι το εκχύλισμα που έχει προκύψει μετά και από αυτό το στάδιο, το οποίο περιέχει τις ζυμώσιμες και μη ουσίες.
- IV. Ακολουθεί ο βρασμός του βυνογλεύκους, κατά τον οποίο γίνεται και η προσθήκη συγκεκριμένου λυκίσκου. Στο στάδιο αυτό επιτυγχάνεται η αποστείρωση του βυνογλεύκους, η καταστροφή των ενζύμων, η δημιουργία αρωμάτων, η συμπύκνωση στην αρχική πυκνότητα που είναι επιθυμητή, η κροκίδωση των πρωτεϊνών και η απομάκρυνσή τους ως θερμό ίζημα.
- V. Στη συνέχεια, στο V στάδιο γίνεται η ψύξη του ζυθογλεύκους στη θερμοκρασία που θα γίνει και ο εμβολιασμός της ζύμης, επίσης γίνεται προσθήκη αέρα και απομακρύνεται και το ψυχρό θόλωμα μερικώς.
- VI. Ακολουθεί το στάδιο της ζύμωσης, αφού έχει γίνει ο εμβολιασμός με το επιθυμητό στέλεχος ζύμης, και ξεκινάει η παραγωγή αιθυλικής αλκοόλης και διοξειδίου του άνθρακα με την κατανάλωση του ζυμώσιμου εκχυλίσματος από τη ζύμη. Επίσης, στο στάδιο αυτό παράγονται και τα δευτερεύοντα προϊόντα από τον μεταβολισμό των ζυμών, τα οποία είναι καθοριστικής σημασίας για τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του ζύθου που θα παραχθεί. Στην πορεία γίνεται ελεγχόμενη διακοπή της ζύμωσης.
- VII. Η ωρίμανση της μπίρας αποτελεί το VII. στάδιο, και γίνεται παρουσία των ζυμών, έως ότου να γίνει πλήρης ζύμωση του ζυμώσιμου εκχυλίσματος που απέμεινε και φυσικός κορεσμός του ζύθου με διοξείδιο του άνθρακα. Δημιουργούνται επίσης επιθυμητές αρωματικές ενώσεις και γίνεται η αποικοδόμηση των ανεπιθύμητων.
- VIII. Ακολουθούν κάποιες κατεργασίες, με σκοπό την βιολογική σταθεροποίηση του ζύθου.
- IX. Το τελικό στάδιο της ζυθοποίησης αποτελεί η εμφιάλωσή της μπίρας που παράχθηκε.

1.3 Σύσταση και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά οίνου και ζύθου

1.3.1 Βασικά συστατικά του οίνου

Τα συστατικά του οίνου προέρχονται κυρίως από το σταφύλι, το οποίο αποτελεί και την πρώτη ύλη για την παραγωγή του. Συστατικά που έπειτα θα βρεθούνε στο γλεύκος

συναντώνται στη σάρκα της ράγας, στο κουκούτσι που υπάρχει στο κέντρο αυτής, αλλά και στο φλοιό. Υπάρχουν επίσης ουσίες, οι οποίες μπορεί να προστεθούν στην πορεία της ζύμωσης ή μετά το πέρας αυτής και αφορούν τις διάφορες κατεργασίες, οι οποίες συμβάλλουν στην καλύτερη ποιότητα του προϊόντος.

- Σάκχαρα

Τα σάκχαρα είναι υδατάνθρακες, ενώσεις οι οποίες θα μετατραπούν μέσω της κατανάλωσης τους από την κατάλληλη ζύμη, σε αλκοόλη και διοξειδίο του άνθρακα. Ανάλογα με τον τύπο κρασιού, αλλά και την ποσότητα της αλκοόλης στο τελικό προϊόν, που επιθυμεί ο εκάστοτε οιοπαγωγός να παραχθεί, επιλέγει και την περίοδο που θα γίνει ο τρύγος, εφόσον τα σάκχαρα διαμορφώνονται στις ράγες των σταφυλιών ανάλογα με το κλίμα και το έδαφος της κάθε περιοχής, καθώς και με τις ανθρώπινες παρεμβάσεις στο αμπέλι.

- Οξέα

Τα οξέα του κρασιού είναι κυρίως το τρυγικό, το μηλικό και το κιτρικό. Είναι ουσίες που διαμορφώνουν την οξύτητα του κρασιού και είναι επιθυμητά σε αντίστοιχες ποσότητες ανάλογα με το κρασί που είναι επιθυμητό να παραχθεί. Τα οξέα έχουν σημασία για την επιλογή της ζύμης, αλλά και για τις διάφορες παρεμβάσεις που θα γίνουν κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Επιπλέον, συμβάλλουν σημαντικά και στην οργανοληπτική αξία του οίνου που θα παραχθεί.

- Νερό

Το νερό βρίσκεται στο σταφύλι, αλλά και μετέπειτα στο γλεύκος και στο τελικό προϊόν. Είναι διαλύτης όλων των συστατικών του γλεύκους και επίσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί στις διάφορες κατεργασίες που θα γίνουν σε όλη την πορεία της ζύμωσης.

- Αζωτούχες ενώσεις

Το άζωτο είναι ένα στοιχείο απαραίτητο για την ανάπτυξη των ζυμών. Υπάρχει στο σταφύλι αλλά μπορεί να προστεθεί και στην πορεία πριν την ζύμωση ή κατά τη διάρκειά της, με σκοπό να δημιουργηθεί το κατάλληλο περιβάλλον για τους μικροοργανισμούς, ώστε να αναπτυχθούν και να μεταβολίσουν τα σάκχαρα και παράλληλα να παράγουν εκτός από τα κύρια και τα δευτερεύοντα προϊόντα μέσω του μεταβολισμού τους.

- Ζύμη

Διάφορα είδη ζυμών βρίσκονται στο σταφύλι, τα οποία μπορούν να εκτελέσουν την αλκοολική ζύμωση. Ωστόσο μπορεί το γλεύκος να εμβολιαστεί με επιλεγμένο είδος/είδη ζύμης, πριν την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης, ή και κατά τη διάρκειά της σε περίπτωση που δημιουργηθεί κάποιο πρόβλημα, π.χ διακοπή της ζύμωσης. Η επιλογή της ζύμης είναι καθοριστικής σημασίας για την ποιότητα του οίνου που θα παραχθεί, εφόσον μέσω του μεταβολισμού των ζυμών παράγεται η απαιτούμενη αλκοολική ποσότητα, καθώς και άλλα προϊόντα, τα λεγόμενα δευτερεύοντα, τα οποία είναι και αυτά που θα διαμορφώσουν το οργανοληπτικό προφίλ του οίνου.

1.3.2 Βασικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου

Πίνακας 1: Βασικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου (González-Barreiro et al., 2015)

Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά	Πως απαντώνται	Προέλευση και αντίκτυπο στον οίνο
Πυραζίνες		Προέρχονται από τα σταφύλια, αποτελούν μαζί με άλλες ενώσεις το πρωτογενές άρωμα και προσδίδουν φυτικά αρώματα στον οίνο, όπως αρώματα καρότου, πατάτας, τσίλι, φυστικιού κ.α
Τερπένια: -συνθέτονται από μονάδες ισοπρενίου	Μονοτερπένια: - Υδρογονάνθρακες -Αλκοόλες -Αλδεΐδες -Κετόνες -Εστέρες Ανώτερα τερπένια: Περιλαμβάνει παράγωγα της ναφθαλίνης	Γενική προέλευση από τα σταφύλια. Μπορεί να παραχθεί και από μερικές ζύμες, όχι από <i>Saccharomyces</i> . Μόνο τα ελεύθερα τερπένια μπορούν να ανιχνευθούν με την αίσθηση. Δίνουν φρουτώδες άρωμα και άρωμα λουλουδιών.
Εστέρες	-Αιθυλικοί -Οξικοί	Ανάλογα με το μέγεθος της αλυσίδας και τη συγκέντρωσή τους δίνουν αρώματα φρούτων, λουλουδιών αλλά και σαπουνιού. Μερικά παραδείγματα είναι ο οξικός αιθυλεστέρας, με άρωμα λουλουδιών, ο οξικός ισοαμυλεστέρας, με άρωμα μπανάνας, ο οξικός φαινυλαιθυλεστέρας με άρωμα τριαντάφυλλο.
Ανώτερες αλκοόλες	Κάποιες που συναντώνται στους οίνους είναι: η βουτανόλη-1 με οσμή παρόμοια της αιθανόλης, η 2-βουτανόλη, η ίσοβουτανόλη και κάποιες αμυλικές αλκοόλες. Επίσης μπορούν να βρεθεί η εξανόλη, η επτανόλη, η οκτανόλη κ.α. Σημαντική επίσης είναι και η γλυκερόλη. Οι ανώτερες αλκοόλες βρίσκονται σε συγκέντρωση < των 450mg/L	Μπορούν να σχηματιστούν από τον μεταβολισμό των ζυμών ως δευτερεύοντα προϊόντα ή από τα αμινοξέα μετά από απαμίνωση ή αποκαρβοξυλίωση.
Οξέα		Προέρχονται από τα σταφύλια ή τους μικροοργανισμούς. Ο χαρακτήρας τους είναι συνήθως όξινος. Επίσης μπορεί να δώσουν την αίσθηση τραγανού (βουτυρικό οξύ) ή πικάντικου (οξικό οξύ).

Φαινόλες	Φλαβονοειδή και μη	Προέρχονται από το σταφύλι. Μπορούν να μετατραπούν από μικροοργανισμούς σε βινυλοφαινόλες (ένδειξη αλλοίωσης). Αίσθηση στυφού, πικρού.
Θειούχες ενώσεις	Σουλφίδια Θειόλες Σουλφοξειδία Θειούχες αλκοόλες	Μερικά παραδείγματα: -Υδρόθειο: σάπιο αυγό -Διμεθυλοσουλφίδιο: καλαμπόκι κονσέρβας, λάχανο -Μεθανοθειόλη: καουτσούκ -Διμεθυλοσουλφοξειδίο: πλαστικό -θειομεθυλοβουτανόλη: σκόρδο, φρέσκο κρεμμύδι
Θόλωμα		Μπορεί να προκύψει από καταβύθιση διαφόρων χημικών ενώσεων όπως πρωτεϊνών και φαινολών ή σύμπλοκων αυτών, τα οποία δημιουργούνται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Είναι ανεπιθύμητο χαρακτηριστικό και γίνονται κατεργασίες ώστε να αποφεύγεται.
Χρώμα		Οφείλεται σε φαινολικές ενώσεις, κυρίως τις ανθοκυάνες και τις τανίνες. Εξαρτάται επίσης από την ποικιλία, τον τρόπο οινοποίησης και συντήρησης του οίνου, καθώς και την ωρίμανσή του.

1.3.3 Βασικά συστατικά του ζύθου

- Βύνη

Η βύνη προέρχεται μετά από κατεργασία στην πρώτη ύλη, η οποία συνήθως είναι το κριθάρι. Αποτελεί το σώμα της μπίρας και επηρεάζει τον χαρακτήρα της γευστικά και χρωματικά. Μέσω της αξιολόγησης της βύνης, δίνεται στον ζυθοποιό μία εικόνα για την πορεία της παραγωγικής διαδικασίας του ζύθου και κρίνει επίσης αν είναι απαραίτητο να επέμβει σε κάποιο στάδιο, ώστε να παραχθεί το καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα. Η βύνη περιέχει τα βασικά ζυμώσιμα σάκχαρα, τα οποία είναι η γλυκόζη, η φρουκτόζη, η μαλτόζη και η μαλτοτριόζη καθώς και τις δεξτρίνες που είναι μη ζυμώσιμοι ολιγοσακχαρίτες. Περιέχει επίσης και πρωτεϊνικά συστατικά τα οποία συμβάλλουν στην σταθερότητα του αφρού της μπίρας.

- Νερό

Αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος της παραγωγής της μπίρας. Το νερό που θα χρησιμοποιηθεί σε όλη την παραγωγική διαδικασία κατέχει έναν σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση του τελικού προϊόντος. Το διάφορα νερά που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν αξιολογούνται

ως προς τα ιχνοστοιχεία που περιέχουν, τη σκληρότητά τους καθώς και ως προς άλλα χαρακτηριστικά ώστε να επιλεγθεί το καταλληλότερο για την διαδικασία ζυθοποίησης.

- Λυκίσκος

Είναι το συστατικό που προσδίδει στην μπίρα πικρικά αλλά και αρωματικά χαρακτηριστικά, μέσω των α- και β- οξέων που προσδίδουν την βασική πικράδα στη μπίρα και μέσω των μονοτερπενίων, τα οποία προσδίδουν το άρωμα λουλουδιών. Σημαντική είναι η επιλογή του κατάλληλου λυκίσκου, ο οποίος, μαζί με άλλα συστατικά θα συμβάλλει ενεργά στη διαμόρφωση του τελικού οργανοληπτικού χαρακτήρα της μπίρας που θα παραχθεί.

- Ζύμη

Κύριο συστατικό και καθοριστικής σημασίας για την ζυθοποίηση, όπως και για την οينوποίηση, ώστε να παραχθεί η κατάλληλη ποσότητα αλκοόλης που είναι επιθυμητή, καθώς και τα δευτερεύοντα προϊόντα του μεταβολισμού της ζύμης, τα οποία θα διαμορφώσουν σε μεγάλο ποσοστό τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της μπίρας. Η επιλογή του κατάλληλου είδους ζύμης και στελέχους αυτής είναι μία κρίσιμη επιλογή για τον ζυθοποιό, διότι η ζύμη καθορίζει σημαντικά το τελικό προϊόν που θα παραχθεί.

1.3.4 Βασικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του ζύθου

Πίνακας 2: Βασικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του ζύθου

Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά	Ενώσεις που απαντώνται	Προέλευση και αντίκτυπο στο ζύθο
Θειούχες ενώσεις	- SO ₂ -Υδρόθειο	Παράγονται από τις ζύμες κυρίως. Το SO ₂ λειτουργεί ως αντιοξειδωτικό και μπορεί να αυξήσει τη ζωή της μπίρας. Το υδρόθειο είναι ανεπιθύμητο συστατικό με αυξημένο δυναμικό αντίληψης και οσμή σάπιου αυγού.
Καρβονυλικές ενώσεις	-Ακεταλδεύδη -vicinal δικετόνες	Προσδίδουν ανεπιθύμητα χαρακτηριστικά στη μπίρα. Συγκεκριμένα η ακεταλδεύδη έχει οσμή άγουρου, χορτώδη. Επίσης το διακετύλιο, έχει γεύση βουτύρου σε συγκεντρώσεις > 0,1-0,15 mg/L.
Φαινόλες	Σημαντικότερες φαινολικές ενώσεις: -4- βινυλ-γυαιακόλη -4- βινυλ-φαινόλη -4- αιθυλ-γυαιακόλη -4- αιθυλ-φαινόλη	Επιθυμητές γεύσεις σε κάποια είδη μπίρας. Η παρουσία τους εξαρτάται από το είδος ζύμης. Κοινές οσμές από τις φαινόλες είναι η οσμή γαρύφαλλου, πικάντικου, καμένου και φαρμακευτική οσμή.
Οργανικά οξέα	Πτητικά: οξικό, προπανικό, βουτυρικό, ισοβουτυρικό,	Τα περισσότερα είναι προϊόντα του κύκλου του Krebs και μεταβολικά

	καπρυλικό, λαυρικό, καπρικό, βαλερικό κ.α	προϊόντα αμινοξέων και λιπαρών οξέων. Εξαρτάται η ποσότητα τους και από το στέλεχος ζύμης.
	Μη πτητικά: οξαλικό, κιτρικό, ηλεκτρικό, μηλικό, γαλακτικό, πυρροβικό κ.α	Συμβάλλουν στην τελική οξύτητα της μπίρας. Κοινές οσμές από κάποιες ενώσεις είναι τυριού, σαπουνιού και ζωοτροφής. Γεύσεις αλμυρό και ξινό.
Ανώτερες αλκοόλες	Μερικές σημαντικές ανώτερες αλκοόλες: -n προπανόλη (γλύκα αιθανόλης) -ισοβουτανόλη (διαλύτη) -αμυλική αλκοόλη (διαλύτη) -ισοαμυλική αλκοόλη (μπανάνα) - 2- φαινυλαιθανόλη (τριαντάφυλλο)	Παράγονται από τις ζύμες ως υποπροϊόν του μεταβολισμού τους και επίσης από τον καταβολισμό των αμινοξέων. Φρουτώδη και αρώματα άνθων κυρίως, αλλά εξαρτάται και από τη συνεργική τους δράση με άλλες δραστικές αρωματικές ενώσεις.
Εστέρες	-οξικοί -αιθυλεστέρες λιπαρών οξέων μεσαίας αλυσίδας	Γενικά προσδίδουν φρουτώδες άρωμα. Μερικοί σημαντικοί εστέρες είναι:οξικός ισοαμυλεστέρας (μπανάνα), οξικό ισοβουτύλιο (φρουτώδες), φαινυλοξικός αιθυλεστέρας (μήλο, τριαντάφυλλο, μέλι), εξανοϊκός αιθυλεστέρας (μήλο, γλυκάνισος), οξικός αιθυλεστέρας (άρωμα διαλύτη).
Μονοτερπενικές αλκοόλες	Σε αισθητές συγκεντρώσεις στη μπίρα βρίσκονται: -λιναλοόλη (λεβάντα) -α-τερπινεόλη (liliah) -κιτρονελόλη (λεμόνι, ασβέστης) -γερανιόλη (τριαντάφυλλο) -νερόλη (εσπεριδοειδή)	Παράγονται από φυτά. Στη μπίρα προέρχονται από τον λυκίσκο. Συμβάλλουν στο άρωμα λουλουδιών.
Θόλωμα		Μπορεί να προκληθεί κυρίως από συσσωμάτωση πρωτεϊνών και πολυφαινολών, καθώς και από τα σύμπλοκα αυτών που δημιουργούνται κυρίως παρουσία οξυγόνου. Είναι ανεπιθύμητο χαρακτηριστικό και αποφεύγεται μέσω της εφαρμογής διάφορων τεχνικών ζυθοποίησης.
Χρώμα		Προέρχεται από τη βύνη και επηρεάζεται από το είδος της, αλλά και από τον βαθμό άλεσης της. Κατά το στάδιο του βρασμού η ένταση του χρώματος μπορεί να αυξηθεί λόγω χημικών αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια του.
Αφρός		Η ποιότητα του αφρού χαρακτηρίζεται από την προσκόλληση του στο γυαλί,

την σταθερότητα του και την υφή του. Η σταθερότητα του αφρού εξαρτάται κυρίως από την ποσότητα πρωτεϊνών και ισο-α-οξέων, τα οποία προέρχονται από την βύνη και τον λυκίσκο αντίστοιχα. Επίσης, εξαρτάται και από την ποσότητα σακχάρων και το είδος ζύμης που τα καταναλώνει εφόσον μπορεί να παραχθούν λιπίδια, ενώσεις αρνητικές για τη σταθερότητα του αφρού σε αυξημένες ποσότητες.

Κεφάλαιο 2: Οι ζύμες και ο ρόλος τους στην παραγωγή οίνου και ζύθου

2.1 Γενικά χαρακτηριστικά των ζυμών

Οι ζύμες κατέχουν ίσως τον σημαντικότερο ρόλο στην παραγωγή των αλκοολούχων ποτών, τα οποία προέρχονται από ζύμωση, όπως είναι ο οίνος και ο ζύθος. Είναι οι μικροοργανισμοί, οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την διεξαγωγή της ζύμωσης και είναι καθοριστικής σημασίας, διότι διεξάγουν την βασική αντίδραση που είναι η μετατροπή των σακχάρων σε αιθυλική αλκοόλη και διοξείδιο του άνθρακα, αλλά παράλληλα μέσω του μεταβολισμού τους παράγουν ουσίες, τα λεγόμενα δευτερεύοντα προϊόντα της ζύμωσης, τα οποία διαμορφώνουν κατά κύριο λόγο τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου και του ζύθου και κατά συνέπεια επηρεάζουν άμεσα την ποιότητα τους (Varela, 2016).

Οι ζύμες ή ζυμομύκητες ανήκουν στην ομάδα των μονοκύτταρων μυκήτων, και ταξινομούνται σε δύο φύλα, τους ασκομύκητες και τους βασιδιομύκητες (Kurtzman C. P., 1994). Είναι ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί και πολλαπλασιάζονται με εκβλαστηση ή σχάση. Οι μικροοργανισμοί αυτοί, έχουν σχήμα συνήθως σφαιρικό, ελλειψοειδές ή ραβδοειδές. Έχουν αναγνωριστεί 100 γένη ζυμών, με 700 είδη, από τα οποία τα 20 έχουν σχέση με την παραγωγή κρασιού (Jolly et al., 2017). Ο ζυμομύκητας, συχνά καλείται και ως σακχαρομύκητας, διότι χρησιμοποιεί τους υδατάνθρακες (σάκχαρα) ως πηγή θρέψης και τους μετατρέπει σε αιθυλική αλκοόλη και διοξείδιο του άνθρακα. Οι ζύμες οι οποίες μπορούν να βρεθούν σε πολλά, διαφορετικά περιβάλλοντα χαρακτηρίζονται ως γενικευμένοι, ενώ όταν βρίσκονται σε συγκεκριμένα περιβάλλοντα, χαρακτηρίζονται ως ειδικευμένοι, όπως είναι οι ζύμες του κρασιού οι οποίες μπορούν να βρεθούν στην επιφάνεια των σταφυλιών, στις επιφάνειες του οινολογικού εξοπλισμού ή/και στο γλεύκος, και να δημιουργήσουν σε κάθε περιβάλλον αποικίες. Οι ζύμες που σχετίζονται με την παραγωγή αλκοολούχων ποτών, μπορούν να κατηγοριοποιηθούν στις *Saccharomyces* και non-*Saccharomyces* ζύμες, οι οποίες αντίστοιχα περιλαμβάνουν αρκετά διαφορετικά είδη ζυμών. Η περίπλοκη βιοχημική διαδικασία της ζύμωσης που εκτελείται από τις ζύμες διευκρινίστηκε από τον Louis Pasteur το 1866 (Jolly et al., 2017).

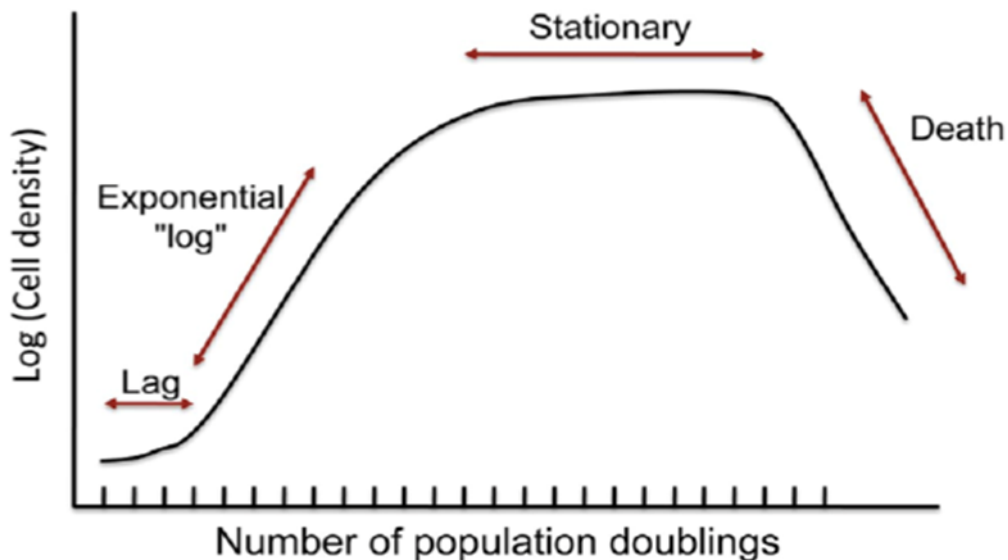
2.1.1 Οι ζυμώσεις στον οίνο και το ζύθο

Τα διάφορα είδη ζυμών έχουν την ικανότητα να μετατρέπουν τα σάκχαρα σε αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα, όπως αναφέρθηκε, και η διαδικασία αυτή μπορεί να χαρακτηριστεί είτε ως αυθόρμητη είτε ως ελεγχόμενη ζύμωση. Αυθόρμητη καλείται η ζύμωση κατά την οποία το γλεύκος, το οποίο προέρχεται από τα σταφύλια για την παραγωγή οίνου ή αντίστοιχα το ζυθογλεύκος για την παραγωγή ζύθου, αφήνεται να ζυμώσει με τους μικροοργανισμούς που υπάρχουν σε αυτό. Εναλλακτική επιλογή είναι η ελεγχόμενη ζύμωση, στην οποία το γλεύκος σε κάθε περίπτωση εμβολιάζεται με καλλιέργεια συγκεκριμένου είδους ή ειδών ζύμης. Στην οινοποίηση οι αυθόρμητες ζυμώσεις εκτελούνται από μικροοργανισμούς που βρίσκονταν στην επιφάνεια των σταφυλιών στο αμπέλι, και έχουν βρεθεί στο γλεύκος μέσω του εκραγισμού των σταφυλιών. Επίσης, μικροοργανισμοί περνούν στο γλεύκος και μέσω των μηχανημάτων, οι οποίοι συμβάλλουν στην διαδικασία της οινοποίησης (Jolly et al., 2017). Στη ζυθοποίηση, οι πιο διαδεδομένες μπύρες σε αυθόρμητες ζυμώσεις είναι οι Lambics του Βελγίου και οι απόγονοι αυτών, οι λεγόμενες «coolship ales»

από τις ΗΠΑ. Η παραγωγή της lambic μπύρας είναι μια ανεξέλεγκτη ζυμωτική διαδικασία, η οποία εκτελείται από τους μικροοργανισμούς που βρίσκονται στη ζυθοποιία, οι οποίοι μεταδίδονται στο γλεύκος κατά τη διάρκεια της νυχτερινής ψύξης σε λεπτές δεξαμενές και έπειτα το γλεύκος μεταγγίζεται σε ξύλινα βαρέλια όπου και υποβάλλεται σε ζύμωση και ωρίμανση (Carrese et al., 2018). Οι ελεγχόμενες ζυμώσεις εκτελούνται από ζύμες, κυρίως του γένους *Saccharomyces*, οι οποίες επιλέγονται από τον εκάστοτε οινοπαραγωγό ή ζυθοποιό. Η επιλογή συγκεκριμένου είδους και έπειτα στελέχους με το οποίο θα εμβολιαστεί το γλεύκος είναι καθοριστική. Η επιλογή αυτή θα διαμορφώσει, στο μεγαλύτερο μέρος του, το τελικό προϊόν εφόσον εκτός της συγκέντρωσης της αλκοόλης, θα διαμορφωθεί από τον μεταβολισμό της ζύμης και το οργανοληπτικό προφίλ του αντίστοιχου οίνου ή ζύθου. Οι αυθόρμητες ζυμώσεις είναι τεχνική που έβρισκε εφαρμογή κυρίως παλαιότερα. Στη σύγχρονη οινοποίηση και ζυθοποίηση οι ζυμώσεις στο μεγαλύτερο μέρος τους είναι ελεγχόμενες. Ο λόγος που πλέον οι ζυμώσεις είναι ελεγχόμενες είναι κυρίως λόγω του υψηλού ρίσκου που κρύβουν οι αυθόρμητες ζυμώσεις, όσον αφορά τη διεξαγωγή όλης της διαδικασίας αλλά και της αξιοπιστίας του τελικού προϊόντος (Varela, 2016).

2.1.2 Μικροβιακή ανάπτυξη

Η ανάπτυξη των ζυμών, ανεξάρτητα από την επιλογή αυθόρμητης ή ελεγχόμενης ζύμωσης, αποτελείται από τέσσερις φάσεις, την λανθάνουσα φάση, την εκθετική, την στατική και τη φάση θανάτου. Η διαφορά αυθόρμητης και ελεγχόμενης ζύμωσης σε αυτό το σημείο, εντοπίζεται στο χρόνο διάρκειας της κάθε φάσης και αν θα καταφέρουν να διεξαχθούν και τα τέσσερα στάδια στην περίπτωση της αυθόρμητης ζύμωσης. Αυτή η διαφορά οφείλεται κυρίως στην αντοχή στην αιθυλική αλκοόλη που θα έχουν ή όχι τα διάφορα είδη ζυμών που βρίσκονται στο γλεύκος, και έχουν προέλθει από το σταφύλι, στην ποσότητα των θρεπτικών συστατικών που υπάρχουν στο γλεύκος και στον ανταγωνισμό που εμφανίζουν μεταξύ τους τα είδη ζυμών.



Εικόνα 1: Καμπύλη ανάπτυξης μικροοργανισμού (O'Connor)

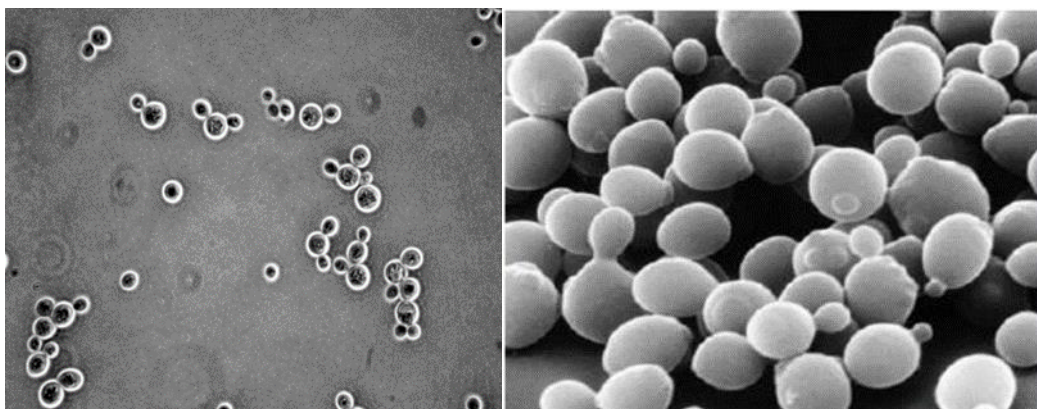
- Λανθάνουσα φάση (Lag phase) : Οι ζύμες προσαρμόζονται στο περιβάλλον, αυτό περιλαμβάνει τη θερμοκρασία, το pH και τη διαθεσιμότητα των θρεπτικών

συστατικών. Υπάρχει μια αρκετά μικρή άνοδος, καθώς η ζύμη δεν έχει εγκλιματιστεί ακόμη.

- Εκθετική φάση (Exponential log phase) : Υπάρχει εκθετική ανάπτυξη των ζυμών, εφόσον έχουν προσαρμοστεί στο περιβάλλον και αυτό με τη σειρά του έχει τις ιδανικές συνθήκες ανάπτυξης των ζυμών.
- Στατική φάση (Stationary phase) : Σε αυτή τη φάση ο ρυθμός ανάπτυξης επιβραδύνεται λόγω πολλών παραγόντων, όπως η κατανάλωση όλων των θρεπτικών συστατικών από τους μικροοργανισμούς, τα οποία είναι απαραίτητα για την αναπνοή και την ανάπτυξή τους, καθώς και η συσσώρευση τοξικών ουσιών από τον μεταβολισμό των ζυμών.
- Φάση θανάτου (Death phase) : Στη φάση αυτή τα κύτταρα πεθαίνουν και συγχρόνως λύνονται (φαινόμενο το οποίο συμβαίνει όταν τα κύτταρα σταματούν να μεταβολίζουν) (Νεραντζής, 2009).

Η ανάπτυξη των ζυμών εξαρτάται από διάφορους παράγοντες. Ένας από αυτούς είναι η θερμοκρασία, η οποία πρέπει να ρυθμίζεται στη βέλτιστη για τον μικροοργανισμό θερμοκρασία ανάπτυξης, αλλά και το εμβόλιο με τον αντίστοιχο πληθυσμό κυττάρων που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ελεγχόμενη ζύμωση, είναι επιθυμητό να έχει την ίδια θερμοκρασία. Οι ζύμες μπορούν να αναπτυχθούν από 0 έως 50° C, με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης από 20° έως 30° C. Ωστόσο οι θερμοκρασίες ζύμωσης μεταβάλλονται ανάλογα με το είδος ζύμης που έχει επιλεγεί και σε συνάρτηση με τις υπόλοιπες συνθήκες ανάπτυξης. Το pH είναι ένας εξίσου σημαντικός παράγοντας και συνήθως οι επιθυμητές τιμές του είναι 4 με 4,5. Σημαντικός επίσης είναι ο εμπλουτισμός του γλεύκους, αν κρίνεται απαραίτητο, με θρεπτικά συστατικά, όπως άζωτο, φώσφορος και άλλα ιχνοστοιχεία, τα οποία είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των ζυμών και για την διεξαγωγή της ζύμωσης. Ανάλογα με την ζύμη που θα χρησιμοποιηθεί και τις συνθήκες ανάπτυξής της, μπορεί να χρειαστεί και παροχή οξυγόνου. Η αλκοολική ζύμωση στον οίνο και το ζύθο γίνεται απουσία οξυγόνου, αλλά ένας ήπιος αερισμός μετά την έναρξη της ζύμωσης ευνοεί τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, χωρίς να προκληθεί οξείδωση και παράλληλα παράγονται στερόλες και λιπαρά οξέα, όπου βοηθούν τα κύτταρα στην αντοχή της αλκοόλης (Νεραντζής, 2009).

2.2 *Saccharomyces cerevisiae*



Εικόνα 2, 3: *Saccharomyces cerevisiae* όπως φαίνεται από κλασικό μικροσκόπιο (αριστερά) (UCDAVIS Viticulture & Eonology, microscopy for the winery) και από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (δεξιά) (Akşit, 2012)

Ο *Saccharomyces cerevisiae* είναι ο πιο διαδεδομένος ζυμομύκητας, ο οποίος χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων και ποτών (παραγωγή άρτου, οίνου και ζύθου και άλλων αλκοολούχων ποτών), στην βιομηχανία παραγωγής βιοκαυσίμων αλλά και στην φαρμακοβιομηχανία. Είναι ένας μονοκύτταρος ευκαριωτικός μικροοργανισμός, ο οποίος ανήκει στο φύλο των ασκομυκήτων. Τα κύτταρα του έχουν σχήμα σφαιρικό και σχετικά μεγάλο (διάμετρος 5-10μm). Ο *Saccharomyces cerevisiae* είναι από τους πιο καλά μελετημένους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και αυτό οφείλεται στο ότι είναι μονοκύτταρος μικροοργανισμός (απλοποιεί τη μελέτη του), αλλά και στο γεγονός ότι έχει βρεθεί η αλληλουχία του γονιδιώματός του, το οποίο καθιστά την επιστημονική κοινότητα ικανή να γνωρίζει τον ακριβή τρόπο λειτουργίας του και ταυτόχρονα να γίνονται κατανοητές οι βιολογικές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Το γονιδίωμα του είναι περίπου 12kb, οργανωμένο σε 16 χρωμοσώματα (Maria Pararouli, 2020). Ο *Saccharomyces cerevisiae* μπορεί να βρεθεί στο έδαφος, στην επιφάνεια των φρούτων και των φυτών (Leu).

Όπως αναφέρθηκε, ο *Saccharomyces cerevisiae* χρησιμοποιείται ευρέως στην βιομηχανία των ποτών, λόγω των βιολογικών του χαρακτηριστικών όπως είναι η ικανότητα του να ζυμώνει τα υπάρχοντα σάκχαρα και να τα μετατρέπει σε αιθυλική αλκοόλη και διοξείδιο του άνθρακα. Ένα επίσης σημαντικό του χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι μέσω του μεταβολισμού του μπορούν να παραχθούν ουσίες, οι οποίες θα διαμορφώσουν στο τελικό προϊόν τα διάφορα οργανοληπτικά το χαρακτηριστικά, με τα περισσότερα να είναι θετικά και επιθυμητά. Ο *Saccharomyces cerevisiae* εμφανίζει ως χαρακτηριστικό του υψηλή αντοχή σε αυξημένες συγκεντρώσεις αιθανόλης και έχει επίσης μεγάλη ζυμωτική ικανότητα αφήνοντας μικρό ποσοστό αζύμωντων σακχάρων (Rainieri & Pretorius, 2000). Η πρώτη απομόνωσή σε καθαρή καλλιέργεια στελέχους *Saccharomyces carlsbergensis* έγινε από Dr. Emile Christian Hansen περίπου το 1888 στο ζυθοποιείο Carlsberg στην Κοπεγχάγη, από το οποίο πήρε το όνομά του και το στέλεχος. Έχει χρησιμοποιηθεί στην παραγωγή διαφόρων τύπων ζύθου όπως οι lagers, με ζύμωση πυθμένα (οι ζύμες καθιζάνουν στο δοχείο παρασκευής) αλλά και για την παραγωγή ζύθου τύπου ale όπου οι ζύμες ανεβαίνουν στην επιφάνεια του δοχείου παρασκευής (κατακόρυφη ζύμωση) (Capece et al., 2018). Πλέον, ο χαρακτηρισμός *carlsbergensis* δεν χρησιμοποιείται και έναντι αυτού χρησιμοποιείται ο *Saccharomyces cerevisiae*. (Schneiter, 2004). Ο *Saccharomyces cerevisiae* χρησιμοποιείται επίσης ως κύριος ζυμομύκητας και στην παραγωγή οίνου και η πρώτη επαφή του ζυμομύκητα με τον οίνο χρονολογείται περίπου το 3000 π.Χ όπως αποδείχτηκε από την παρουσία ριβοσωμικού DNA από τον *Saccharomyces cerevisiae* σε ένα βάζο οίνου από την Αίγυπτο. Ωστόσο, αυτό αποκαλύφθηκε πολλά χρόνια αργότερα, περίπου το 1860 όταν ο Louis Pasteur για πρώτη φορά καθιέρωσε τον ρόλο της δραστηριότητας της ζύμης στη ζύμωση οίνου και το 1890 όταν ο Müller-Thurgau πρότεινε την ελεγχόμενη ζύμωση με καλλιέργειες που θα χρησιμοποιούνταν για την έναρξή της. Περίπου από το 1970 και μετά αυτή η πρακτική εφαρμόστηκε ευρέως και ήταν μια καινοτομία για την βιομηχανία οίνου, η οποία βελτίωσε αισθητά την ποιότητά του αλλά και την σταθερότητα του τελικού προϊόντος (Maria Pararouli, 2020). Λόγω όλων των θετικών χαρακτηριστικών που εμφανίζει ο *S. cerevisiae* στην παραγωγή αλκοολούχων ποτών μέσω ζύμωσης έχει μελετηθεί εκτενώς και χρησιμοποιείται επίσης ευρέως από τη βιομηχανία. Ωστόσο, τα προϊόντα που παράγονται δεν διαφοροποιούνται εξαιρετικά μεταξύ τους με αποτέλεσμα οι καταναλωτές να αναζητούν μεγαλύτερη πολυπλοκότητα σε αυτά και το γεγονός αυτό έχει στρέψει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας στη μελέτη των non-*Saccharomyces* ζυμών και την αξιολόγησή τους ως προς την ικανότητα τους να χρησιμοποιηθούν στην παραγωγή οίνων και ζύθων ή άλλων αλκοολούχων ποτών με μεγαλύτερη καινοτομία.

2.3 Non-Saccharomyces ζύμες

Οι non-Saccharomyces ζύμες, είναι όλες οι ζύμες οι οποίες δεν ανήκουν στο γένος *Saccharomyces*. Απαντώνται στην επιφάνεια των σταφυλιών, καθώς και στον μηχανικό εξοπλισμό που χρησιμοποιείται στην οινοποίηση και την ζυθοποίηση. Οι ζύμες αυτές είναι κυρίως υπεύθυνες για τις αυθόρμητες ζυμώσεις, σε συνεργασία βέβαια με τον *Saccharomyces cerevisiae*, ο οποίος βρίσκεται και εκείνος στις ίδιες επιφάνειες. Ανάλογα με την περιοχή που βρίσκεται το αμπέλι, την χρήση διάφορων παρασιτοκτόνων και μυκητοκτόνων σε αυτό και την υγιεινή των σταφυλιών, η ποσότητα τους αλλά και τα είδη αυτών διαφέρουν. Η παρουσία τους είναι πιο έντονη στην επιφάνεια των σταφυλιών και πολύ μικρότερη στον μηχανικό εξοπλισμό. Λόγω αυτού οι non-Saccharomyces ζύμες βρίσκονται σε όλες τις ζυμώσεις οίνου ανεξάρτητα αν η ζύμωση είναι αυθόρμητη ή ελεγχόμενη (Jolly et al., 2017).

2.3.1 Η εξέλιξη των non-Saccharomyces ζυμών

Η παρουσία των non-Saccharomyces ζυμών θεωρούνταν παλαιότερα ανεπιθύμητη από τους οινοποιούς και τους ζυθοποιούς, διότι θεωρούσαν ότι είναι πηγή αλλοίωσης του τελικού προϊόντος. Υπήρχε η εντύπωση ότι οι ζύμες αυτές μπορεί να προκαλέσουν κάποιου είδους επιμόλυνση και ταυτόχρονα μέσω του μεταβολισμού τους να παραχθούν ανεπιθύμητα προϊόντα τα οποία θα επηρεάσουν αρνητικά τον οργανοληπτικό χαρακτήρα και κατ'επέκταση την ποιότητα του τελικού προϊόντος (Jolly et al., 2017). Τα τελευταία χρόνια όμως η ζήτηση του καταναλωτικού κοινού για καινοτομία και πολυπλοκότητα στα προϊόντα οίνου και ζύθου, αλλά και η ζήτηση αλκοολούχων ποτών με χαμηλότερη θερμιδική αξία καθώς και χαμηλότερης ή μηδενικής αλκοόλης με εξίσου ενδιαφέροντα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, έστρεψε το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας σε περαιτέρω έρευνα των non-Saccharomyces ζυμών. Συγκεκριμένα για τον ζύθο, οι ζυθοποιοί προσπάθησαν αρχικά να διαφοροποιήσουν τα προϊόντα τους με χρήση διαφορετικών λυκίσκων ή βύνης, αλλά το ενδιαφέρον τους εντάθηκε προς τις non-Saccharomyces ζύμες εφόσον και οι διάφορες επιστημονικές έρευνες ανέδειξαν τα θετικά τους χαρακτηριστικά, τα οποία δείχνουν την ικανότητα τους να βελτιώσουν το σώμα και το άρωμα του ζύθου (Carpace et al., 2018). Όσο για τον οίνο, ένας λόγος που στράφηκε το ενδιαφέρον στις ζύμες αυτές, ήταν ότι είχαν καθοριστικό ρόλο στις αυθόρμητες ζυμώσεις και οι οίνοι που παράγονταν παλαιότερα με αυτόν τον τρόπο είχαν μεγαλύτερη πολυπλοκότητα και μοναδικότητα σε σχέση με τους οίνους που ζυμώνονταν με τον *S. cerevisiae*. Οι έρευνες βέβαια έχουν αναδείξει επίσης την θετική επίδραση που μπορεί να έχουν στην παραγωγή αλκοολούχων ποτών με ζύμωση, ωστόσο δεν έχουν επεκταθεί τόσο ώστε να είναι γνωστός επακριβώς ο τρόπος λειτουργίας τους, όπως συμβαίνει με τον συμβατικό ζυμομύκητα *S. cerevisiae*. Μερικά γενικά χαρακτηριστικά τους όμως δείχνουν ότι έχουν ευαισθησία στην αιθανόλη, μικρότερη ζυμωτική ικανότητα σε σχέση με τον *S. cerevisiae*, ευαισθησία στην αυξημένη ωσμωτική πίεση και επίσης ευαισθησία σε μεγάλη συγκέντρωση SO₂ (Jolly et al., 2017). Ωστόσο, μέσω του μεταβολισμού τους παράγουν προϊόντα τα οποία προσδίδουν στον οίνο και τον ζύθο μεγαλύτερο βαθμό πολυπλοκότητας στη γεύση και το άρωμα τους. Τα χαρακτηριστικά αυτά θετικά και μη διαφοροποιούνται ανάμεσα στα διάφορα είδη non-Saccharomyces ζυμών, αλλά και στα στελέχη του ίδιου είδους. Για την καλύτερη αξιοποίηση των χαρακτηριστικών τους αλλά και αποφυγή ανεπιθύμητων γεγονότων (π.χ διακοπή της αλκοολικής ζύμωσης) προτείνεται συνήθως από τους ερευνητές η τεχνική του διαδοχικού εμβολιασμού, δηλαδή έναρξη της ζύμωσης με καλλιέργειες non-Saccharomyces και μετέπειτα εμβολιασμό με τον *S. cerevisiae* ή ταυτόχρονος εμβολιασμός με δύο ή περισσότερες ζύμες (Varela, 2016). Σε

κάθε περίπτωση γίνεται αξιολόγηση των χαρακτηριστικών του κάθε είδους ή/και στελέχους *non-Saccharomyces* και γίνεται η καταλληλότερη επιλογή ανάλογα με το προϊόν που είναι επιθυμητό να παραχθεί.

2.3.2 Τα κυριότερα είδη ζυμών *non-Saccharomyces* στην οινοποίηση και τη ζυθοποιία

Οι *non-Saccharomyces* ζύμες περιέχουν πάρα πολλά διαφορετικά είδη ζυμών, τα οποία λαμβάνουν μέρος κυρίως στις αυθόρμητες ζυμώσεις του οίνου και του ζύθου. Μικρότερος αριθμός αυτών έχει απομονωθεί και έχει ερευνηθεί εκτενέστερα και πιο μικρός αριθμός έχει χρησιμοποιηθεί σε βιομηχανική κλίμακα για την παραγωγή ζύθου και οίνου (Varela, 2016). Ο κύριος λόγος αυτού, είναι πως το ενδιαφέρον για τις *non-Saccharomyces* ζύμες έχει ενταθεί τα τελευταία χρόνια λόγω απαίτησης των καταναλωτών για παραγωγή πιο καινοτόμων προϊόντων, ενώ παλαιότερα οι ζύμες αυτές θεωρούνταν πηγές μόλυνσης και αλλοίωσης των προϊόντων.

Μερικές *non-Saccharomyces* ζύμες που σχετίζονται με την παραγωγή οίνου και ζύθου συμπεριλαμβάνουν τα παρακάτω γένη και είδη:

- *Brettanomyces*: Είναι το πιο διαδεδομένο γένος *non-Saccharomyces* στη ζυθοποιία. Οι μικροοργανισμοί που ανήκουν σε αυτό το γένος μπορούν να μεταβολίσουν τη μαλτόζη και είναι γνωστοί για την συμβολή τους σε μικτές καλλιέργειες των ζύθων lambic και geuze (Michel et al., 2016). Επίσης έχουν τη δυνατότητα να μεταβολίσουν δεξτρίνες, κύρια συστατικά των υπολειπόμενων σακχάρων σε ζυμώσεις από τον *S. cerevisiae*, μέσω ενός ενζύμου που ονομάζεται β-γλυκοσιδάση και παράγεται από το γένος αυτό. Επιπλέον, μέσω του μεταβολισμού τους οι μικροοργανισμοί του γένους *Brettanomyces* παράγουν υψηλές ποσότητες εστέρων, αυξάνοντας τον άνηθο αρωματικό χαρακτήρα, χρήσιμο χαρακτηριστικό για την παραγωγή ζύθου. Συγκεκριμένα το είδος *B. Bruxellensis* οδηγεί σε ζύθους που περιέχουν μεγάλη ποικιλία εστέρων, όπως οξικό αιθυλεστέρα, καπρυλικό αιθυλεστέρα κ.α, ενώσεις επιθυμητές σε μέτρια επίπεδα που συμβάλλουν στην αύξηση της πολυπλοκότητας του ζύθου. Επίσης λόγω του ενζύμου β-γλυκοσιδάση είναι δυνατή η διαφοροποίηση και η αύξηση του αρώματος που προέρχεται από τον λυκίσκο. Εξίσου διαφορετικά είδη και στελέχη του γένους αυτού μπορούν να προσδώσουν το καθένα κάποια θετικά χαρακτηριστικά για την οργανοληπτική αξία του ζύθου (Capece et al., 2018). Για τον οίνο το συγκεκριμένο γένος θεωρείται ως η κύρια ζύμη επιμόλυνσης (Michel et al., 2016). Σχηματίζει ενώσεις που δίνουν κτηνοτροφικό άρωμα και επίσης κάποια στελέχη αυτού μπορούν να σχηματίσουν βιογενείς αμίνες, ενώσεις που μπορεί να έχουν αρνητική επίδραση σε ορισμένους ανθρώπους. Ωστόσο μπορεί να συμβάλλει και θετικά στο άρωμα του οίνου, με νότες καπνιστού και πικάντικου. Δεν έχει βέβαια αναφερθεί εμπορική χρήση του συγκεκριμένου γένους σε ζυμώσεις οίνου, ωστόσο ορισμένοι οινοποιοί οι οποίοι εργάστηκαν με τους ιθαγενείς πληθυσμούς του γένους *Brettanomyces* στα κελάρια τους, παρατήρησαν μεγαλύτερη πολυπλοκότητα σε κάποιους από τους οίνους τους (Jolly et al., 2017).
- *Wickerhamomyces anomalus*: Ένα είδος σημαντικό στην παραγωγή ζύθου, λόγω της χαμηλής παραγωγής ανεπιθύμητων αρωματικών ενώσεων. Παράγει ικανοποιητικές ποσότητες οξικού αιθυλεστέρα, προπανικού αιθυλεστέρα, φαινυλαιθανόλης και 2-φαινυλοξικού. Συμβάλλει σημαντικά στα αρώματα φρούτων του ζύθου (Capece et al., 2018).

- Candida stellata*: Το γένος *Candida* μπορεί να βρεθεί φυσικά στα σταφύλια και στο φρέσκο γλεύκος. Έχει μεγάλη αντοχή στην αιθανόλη, μπορεί να αντέξει σε περιεκτικότητα αιθανόλης > 12%, χαρακτηριστικό το οποίο εξηγεί και την διαρκή παρουσία της στην ζύμωση (αυθόρμητες ζυμώσεις). Ωστόσο σαν γένος δεν έχει μεγάλη ζυμωτική ικανότητα, με αποτέλεσμα να χρειάζεται ο *S. cerevisiae* για να ολοκληρωθεί η ζύμωση. Η ζύμη *C. stellata* εμφανίζει αυξημένη παραγωγή εξωκυτταρικών ενζύμων, τα οποία μπορούν, για παράδειγμα, να συμβάλλουν στην μείωση των επιπέδων πρωτεΐνης και να αυξήσουν την πρωτεϊνική σταθερότητα, γεγονός όμως που δεν αποκλείει απαραίτητα τον σχηματισμό θολώματος. Παράγει επίσης ικανοποιητικές ποσότητες γλυκερόλης, αλκοόλη, η οποία σε χαμηλές συγκεντρώσεις συμβάλλει στην αίσθηση και την πολυπλοκότητα των αρωμάτων. Συνήθως προτείνεται η χρήση της ζύμης αυτής για την έναρξη της ζύμωσης, ώστε να παραχθεί η ποσότητα γλυκερόλης. Ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός μπορεί να συμβάλλει θετικά στην ποιότητα του οίνου. (Jolly et al., 2017). Κάποια στελέχη του είδους *C. stellata* μπορούν να ζυμώνουν και σε αερόβιες συνθήκες και να παραχθούν οίνοι με χαμηλότερη περιεκτικότητα αιθανόλης (Varela, 2016).
- Candida pulcherrima/Metschnikowia pulcherrima*: Ο μικροοργανισμός αυτός μπορεί να παράγει μεγάλες ποσότητες εστέρων, κυρίως καπρυλικού εστέρα με άρωμα αχλαδιού. Σύμφωνα με τους Zohre & Erten (2002), όταν χρησιμοποιείται μικτή καλλιέργεια *C. pulcherrima* και *S. cerevisiae* δεν πραγματοποιείται η παραγωγή ανεπιθύμητων πτητικών συστατικών. Επίσης μπορεί να παράγει εξωκυτταρικά ένζυμα, τα οποία, όπως αναφέρθηκε, μπορούν να συμβάλλουν στην μείωση πρωτεϊνικών επιπέδων. Γενικά, μπορεί να προσδώσει θετικά χαρακτηριστικά στο οργανοληπτικό προφίλ του οίνου. (Jolly et al., 2017). Κάποια στελέχη του είδους αυτού, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για παραγωγή οίνου χαμηλότερου αλκοολικού τίτλου, όταν γίνεται εμβολιασμός σε ακολουθία με τον *S. cerevisiae*. Αποτελέσματα τέτοιων ζυμώσεων δεν έδειξαν συστατικά σε συγκεντρώσεις που να επηρεάζουν αρνητικά την ποιότητα του οίνου. Επιπλέον είναι ένα είδος που έχει την δυνατότητα παραγωγής ενζύμων πηκτινάσης, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην διήθηση των οίνων και ταυτόχρονα είναι δυνατό να απελευθερώσουν χρώμα και αρωματικές ενώσεις, οι οποίες βρίσκονται στη σάρκα των σταφυλιών. Την ίδια δυνατότητα έχουν και τα είδη *Cryptococcus saitoi*, *Rhodotorula dairenensis* και *Aureobasidium pullulans* (Varela, 2016).
- Kloeckera apiculata/Hanseniaspora uvarum*: Είναι μια ζύμη ωφέλιμη για την παραγωγή οίνου με συμβολή στην ποιότητα του, μέσω παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών, όπως γλυκερόλης, οξικού αιθυλεστέρα και ακεταλδεϋδης, αν και σύμφωνα με τους Romano et al. (1992) and Ciani & Maccarelli (1998) εξαρτάται και από το στέλεχος που έχει επιλεγεί. Σαν είδος δεν έχει την δυνατότητα να παράγει μεγάλες ποσότητες αλκοόλης, με αποτέλεσμα να χρειάζεται συνήθως τον *S. cerevisiae* για να ολοκληρωθεί η ζύμωση. Ωστόσο, η συμβολή της είναι σημαντική διότι έχει καταγραφεί διαφορά ανάμεσα στους οίνους που έχουν παραχθεί μόνο από τον *S. cerevisiae* και στους οίνους που συμμετέχει και η *Kloeckera apiculata/Hanseniaspora uvarum* (Jolly et al., 2017). Επίσης λόγω της χαμηλής παραγωγής αιθανόλης, μπορούν να παραχθούν με το συγκεκριμένο είδος οίνοι χαμηλότερης αλκοολικής περιεκτικότητας (Varela, 2016).
- Zygosaccharomyces rouxii*: Είδος το οποίο μπορεί να αξιοποιηθεί στην παραγωγή ζύθου αλλά και οίνου, αν και μπορεί να προκαλέσει προβλήματα μόλυνσης σε γλυκούς και αφρώδεις οίνους. Έχει χαμηλή ζυμωτική ικανότητα και συνήθως χρειάζεται η προσθήκη του *S. cerevisiae* για την ολοκλήρωση της ζύμωσης (Jolly et al., 2017). Εμφανίζει επίσης ολική ή μερική ανικανότητα ζύμωσης της μαλτόζης

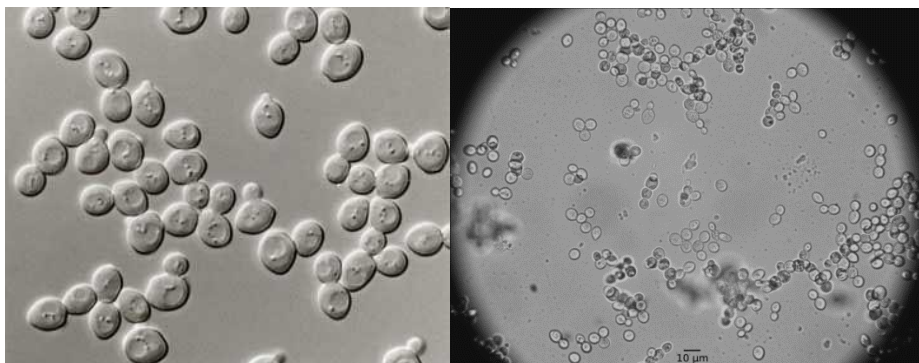
(Carpece et al., 2018) . Παράγει εστέρες και ανώτερες αλκοόλες, ενώσεις που μπορούν να συμβάλλουν θετικά στην ποιότητα του τελικού προϊόντος, ωστόσο παράγεται από τον μεταβολισμό του και διακετύλιο, το οποίο σε μεγάλες συγκεντρώσεις δίνει μία ανεπιθύμητη αίσθηση βουτύρου (Varela, 2016). Λόγω της χαμηλής ζυμωτικής του ικανότητας μπορεί να χρησιμοποιηθεί για παραγωγή ζύθου ή οίνου με χαμηλό αλκοολικό τίτλο. Επίσης έχει τη δυνατότητα να καταναλώνει αιθανόλη και να παράγει επιθυμητά αρωματικά συστατικά στους ζύθους, χαρακτηριστικό το οποίο ενισχύει τη χρήση του για παραγωγή ζύθου χαμηλότερης αλκοόλης (Michel et al., 2016). Ωστόσο, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για παραγωγή ζύθου χωρίς αλκοόλ, διότι εμφανίζει υψηλές συγκεντρώσεις αλκοόλης στους τελικούς ζύθους (Carpece et al., 2018).

- *Zygosaccharomyces Bailii*: Είδος με μεγάλη αντοχή στην αιθανόλη, μπορεί να βρεθεί ακόμη και σε εμφιαλωμένους οίνους, περιβάλλον με αντίξοες συνθήκες για τις περισσότερες ζύμες. Είναι φρουκτοφιλική ζύμη και μπορεί να αξιοποιηθεί σε γλεύκος που προήλθε από ώριμα σταφύλια, τα οποία περιέχουν αυξημένες ποσότητες φρουκτόζης (Jolly et al., 2017).
- *Saccharomycodes ludwigii*: Εμφανίζει μεγάλη αντοχή στην αιθανόλη και το SO₂. Παράγει μεγάλες ποσότητες οξικού αιθυλεστέρα, ισοβουτανόλης αλλά και ακεταλδεϋδης που μπορεί να επηρεάσει αρνητικά το τελικό προϊόν (Jolly et al., 2017). Μπορεί να ζυμώσει τη γλυκόζη, τη φρουκτόζη και τη σακχαρόζη, αλλά δεν έχει ζυμωτική ικανότητα στην μαλτόζη και την μαλτοτριόζη και λόγω αυτού μπορεί να χρησιμοποιηθεί για παραγωγή ζύθου με χαμηλή περιεκτικότητα αλκοόλης, αλλά με επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (Michel et al., 2016). Βέβαια, καθοριστικό ρόλο διεξάγει το στέλεχος που θα χρησιμοποιηθεί, διότι μερικά στελέχη μπορεί να έχουν και αρνητική επίδραση στο τελικό προϊόν (Varela, 2016).
- *Lachancea thermotolerans*: Μία μικτή καλλιέργεια με τον *S. cerevisiae* (εμπορική ενεργή ξηρή ζύμη) με ταυτόχρονο εμβολιασμό στο γλεύκος, μπορεί να οδηγήσει στη βελτίωση των τροπικών φρουτώδων και ανθικών αρωμάτων με αποτέλεσμα να προσδίδεται μεγαλύτερη πολυπλοκότητα και στρογγυλότητα σε λευκούς και ερυθρούς οίνους εξίσου (Carpece et al., 2018).
- *Pichia kluyveri*: Έχει περιορισμένη ικανότητα να ζυμώνει τη γλυκόζη, αν και είναι το μόνο σάκχαρο που μπορεί να ζυμώσει στο ζυθογλεύκος (Carpece et al., 2018). Παράγει ικανοποιητικές ποσότητες επιθυμητών χαρακτηριστικών για τον οργανοληπτικό χαρακτήρα του ζύθου (Michel et al., 2016). Τα τελευταία χρόνια έχει ανακαλυφθεί ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ζύθους χαμηλότερης ή και μηδενικής αλκοολικής περιεκτικότητας. Ωστόσο δεν έχει χρησιμοποιηθεί στη βιομηχανία ζύθου (Carpece et al., 2018)

Τα παραπάνω γένη *non-Saccharomyces* ζυμών και τα είδη αυτών είναι κάποια που έχουν ερευνηθεί περισσότερο σχετικά με την συμβολή τους στην παραγωγή οίνου και ζύθου. Όλα τα χαρακτηριστικά θετικά και μη εξαρτώνται και από την επιλογή του στελέχους που θα χρησιμοποιηθεί, διότι ανάμεσα στα διάφορα στελέχη ενός είδους μπορεί να εμφανιστούν αξιοσημείωτες διαφορές. Επίσης είναι σημαντικό να αναφερθεί πως τα διάφορα είδη μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε διαδοχικά είτε ταυτόχρονα σε μικτές καλλιέργειες και να αξιοποιηθεί η θετική τους επίδραση στην ποιότητα του τελικού προϊόντος. Ένα ακόμη είδος με εξαιρετική δυναμική για χρήση σε παραγωγή οίνου και ζύθου είναι το είδος *Torulaspora delbrueckii*, το οποίο θα αξιολογηθεί εκτενώς στα επόμενα κεφάλαια.

Κεφάλαιο 3: *Torulaspora delbrueckii*

3.1 Γενικά χαρακτηριστικά



Εικόνα 4, 5: Η *T. delbrueckii* όπως φαίνεται στο μικροσκόπιο (eurekabrewing.wordpress.com; fermentationstations.wordpress.com)

Οι non-*Saccharomyces* ζύμες, όπως αναφέρθηκε, έχουν κεντρίσει τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, λόγω της ανάγκης της βιομηχανίας να προσφέρει στο καταναλωτικό κοινό πιο πολύπλοκα γευστικά και καινοτόμα προϊόντα έπειτα από τις απαιτήσεις του. Λόγω αυτού αρκετές μελέτες έχουν διεξαχθεί για τις ζύμες αυτές, καθώς και για τα διάφορα είδη που τις απαρτίζουν. Ένα είδος στο οποίο έχει στραφεί ιδιαίτερος το ενδιαφέρον και έχει μελετηθεί αρκετά, ειδικά τα τελευταία χρόνια, όπως είχε γίνει και με τον *S. cerevisiae* στην αρχή της μικροβιολογίας του οίνου (Benito, 2018), είναι η *Torulaspora delbrueckii* (anamorph *Candida colliculosa*). Το είδος αυτό ανήκει στο γένος *Torulaspora*, το οποίο ανήκει στους ασκομήκυτες (Jolly et al., 2017). Εκτός της *T. delbrueckii*, στο γένος αυτό ο Kurtzman (2011) έχει αναγνωρίσει ότι ανήκουν και άλλα 5 είδη, τα οποία είναι η *T. Franciscae*, *T. Globosa*, *T. maleeae*, *T. Microellipsoides* και η *T. pretoriensis*, ωστόσο μόνο η *T. delbrueckii* σχετίζεται με τα αλκοολούχα ποτά ζύμωσης.

Τα κύτταρα που ανήκουν στο γένος *Torulaspora* έχουν σφαιρικά έως ελλειψοειδή κύτταρα, τα οποία είναι ελαφρώς μικρότερα από εκείνα του *S. cerevisiae*, με διαστάσεις 2-4 x 3-5 μm περίπου. Το γένος αυτό έχει τη δυνατότητα να αναπαράγεται αφυλετικά με κυτταρική διαίρεση (μίτωση), όπως επίσης μπορεί να παράγει και ψευδούφες. Η φυλετική αναπαραγωγή του μπορεί να γίνει μέσω του ασκού, όπου περιέχονται από ένα έως τέσσερα σφαιρικά ασκοσπόρια (με διάμετρο 2-4 μm (Ramírez & Velázquez, 2018)) (Benito, 2018). Ο ασκός μπορεί να προέλθει από ετερογαμική σύζευξη μεταξύ ενός κυτάρου και του θυγατρικού (bud) του ή μεταξύ δύο ανεξάρτητων κυττάρων.

Παλαιότερα το είδος *T. delbrueckii* ήταν γνωστό ως *Saccharomyces rosei* ή *Saccharomyces delbrueckii*, τα οποία πλέον αναφέρονται ως συνώνυμά της (van Breda et al., 2013), καθώς και ως *T. rosei*, *T. fermentati*, and *T. vafer*, τα οποία αποκαλύφθηκε επίσης ότι είναι συνώνυμά της μέσω της αλληλουχίας γονιδίων D1/D2 LSU rRNA (Benito, 2018). Μια πρωτότυπη εργασία με σκοπό την καθιέρωση της γονιδιακής της αλληλουχίας, έγινε το 2002, η οποία περιέγραφε την απομόνωση των γονιδίων της *Torulaspora* και την επακόλουθη ετεροτροφική τους έκφραση χρησιμοποιώντας τον *S. cerevisiae*. Από αυτή την εργασία προέκυψε η πρώτη βιβλιοθήκη γονιδίων για την *T. delbrueckii*, PYCC532. Στη συνέχεια, το 2011 δημοσιεύτηκε, σαν ένα μέρος μιας μελέτης μοριακής εξέλιξης, ένα σχέδιο αλληλουχίας

γονιδίων του στελέχους CBS 1146 της *T. delbrueckii*, το οποίο όμως διατηρούταν από το 1970 υπό εργαστηριακές συνθήκες και γεννήθηκε το ερώτημα σχετικά με τις διαφορές που μπορεί να έχει το συγκεκριμένο στέλεχος με ένα στέλεχος απομονωμένο από ενεργή αλκοολική ζύμωση. Το 2015 μια συμπληρωματική μελέτη που δημοσιεύτηκε, στην οποία χρησιμοποιήθηκε στέλεχος το οποίο είχε απομονωθεί από ενεργή αλκοολική ζύμωση, έθεσε μια ομάδα διαφορετικών γονιδίων τα οποία ταυτοποιήθηκαν με τα προηγούμενα και το ερώτημα απαντήθηκε. Το 2016, δημοσιεύτηκε ο πρώτος ολοκληρωμένος χάρτης γονιδιώματος, ο οποίος αφορούσε το στέλεχος COFT1, το οποίο είχε απομονωθεί από αυθόρμητη ζύμωση οίνου στη Αυστραλία και αποκαλύφθηκε ότι κάθε γονιδίωμα περιείχε 8 χρωμοσώματα και 1 μιτοχονδριακό χρωμόσωμα επίσης (Kerkeni et al., 2016). Μια νεότερη μελέτη το 2018, έδειξε ότι το συνολικό μήκος του γονιδιώματός του είναι 9,356,826 bp και περιέχει 4,831 γονίδια (Tondini et al., 2018).

Η *T. delbrueckii* έχει αναφερθεί ότι μπορεί να βρεθεί στο χώμα, σε χυμούς μούρων, χυμό αγαύης και στον φλοιό δέντρων (Benito, 2018). Είναι επίσης τυπικός εκπρόσωπος της φυσικής χλωρίδας στην επιφάνεια των σταφυλιών, όπως και ο *S. cerevisiae* (van Breda et al., 2013). Επιπλέον μπορεί να βρεθεί σε διαφορετικών αλκοολούχων ποτών αυθόρμητες ζυμώσεις, όπως στον οίνο, την τεκίλα και το mezcal (Varela, 2016). Στελέχη της έχουν θεωρηθεί παλαιότερα ως μικροοργανισμοί επιμόλυνσης, αλλά πλέον μέσω διαφόρων ερευνών, έχουν αναδειχθεί τα πλεονεκτήματα αυτού του μικροοργανισμού, συγκριτικά με κάποια στελέχη του *S. cerevisiae*, αλλά και η θετική επίδραση που μπορεί να έχει στην ποιότητα των αλκοολούχων ποτών ζύμωσης όταν συμμετέχει. Ωστόσο έχει αναφερθεί ότι η παρουσία της μπορεί να λειτουργήσει αρνητικά, ως ζύμη αλλοίωσης σε αναψυκτικά, γεγονός το οποίο αντιμετωπίστηκε εύκολα με τη χρήση συντηρητικών, αλλά θεωρείται ακόμη ως μικροοργανισμός αλλοίωσης σε τρόφιμα, όπως σαλάτες, λαχανικά, κρέατα και γαλακτοκομικά προϊόντα (Benito, 2018).

Η *T. delbrueckii* είναι η non-*Saccharomyces* ζύμη που έχει χρησιμοποιηθεί περισσότερο, ακόμη και σε βιομηχανικό επίπεδο, κυρίως στην παραγωγή οίνου (Benito, 2018). Έχει προταθεί για οινοποίηση γλευκών, τα οποία είναι χαμηλά σε σάκχαρα και οξύτητα, ενώ έχει χρησιμοποιηθεί και στην παραγωγή ερυθρών και ροζέ οίνων στην Ιταλία και στην παραγωγή οίνου Sauvignon Blanc στη Νότια Αφρική (van Breda et al., 2013). Επίσης έχει χρησιμοποιηθεί και σε μικτές καλλιέργειες για την παραγωγή αφρώδων οίνων (Michel et al., 2016). Στον οίνο έχει την δυνατότητα να βελτιώνει την γευστική και αρωματική πολυπλοκότητά του και μπορεί να επιδράσει θετικά και στην παραγωγή αλλά και στο τελικό προϊόν. Η *T. delbrueckii* έχει δοκιμαστεί και στην παραγωγή ζύθου με χαμηλό αλκοολικό τίτλο αλλά και με σκοπό να εμπλουτίσει το αρωματικό προφίλ του. Οι ζύθοι που παράχθηκαν είτε με καθαρές είτε με μικτές καλλιέργειες και στις οποίες συμμετείχε η *T. delbrueckii*, χαρακτηρίστηκαν από νότες φρούτων, είχαν πιο ολοκληρωμένο σώμα καθώς και καλύτερη δομή και σύσταση στον αφρό του ζύθου (Varela, 2016). Η εν λόγω ζύμη προτάθηκε πρώτη φορά για χρήση της στην παραγωγή ζύθου από τους King και Dickinson το 2000, οι οποίοι βρήκαν ότι το στέλεχος της *Torulaspora*, το οποίο προέρχεται από τη βιομηχανία οίνου, έχει τη δυνατότητα να μετατρέπει τα αρώματα του λυκίσκου με σημαντικά αποτελέσματα όσον αφορά τις μονοτερπενικές αλκοόλες (Michel et al., 2016). Επίσης η *T. delbrueckii* είτε μόνη της, είτε σε συν-καλλιέργεια με τον *S. cerevisiae* σε διαδοχικές ή ταυτόχρονες ζυμώσεις έχει χρησιμοποιηθεί στην παραγωγή οίνων τύπου Cherry, οίνων lychee, οίνων από durian και από μάνγκο αλλά και στην παραγωγή τεκίλας και mezcal. Σε όλες τις περιπτώσεις τα αλκοολούχα ποτά όπου συμμετείχε η *T. delbrueckii* είχαν πιο έντονα τα αρώματα φρούτων ή/και λουλουδιών και ήταν πιο ολοκληρωμένα και ευχάριστα οργανοληπτικά σε σύγκριση με αντίστοιχα ποτά που είχαν παραχθεί μόνο από τον *S. cerevisiae*. Επιπλέον έχει μελετηθεί και από τη βιομηχανία άρτου και λόγω των θετικών χαρακτηριστικών της, κυρίως της αντοχής της σε συνθήκες στρες, έχει θεωρηθεί ως novel ζύμη άρτου (Varela, 2016). Η *T. delbrueckii*,

θεωρείται επίσης ως μοντέλο έρευνας για την επιστημονική κοινότητα, λόγω κάποιων βιολογικών χαρακτηριστικών της, όπως ο μεταβολισμός των σακχάρων, ο οποίος διαφέρει από εκείνον του *S. cerevisiae* και αυτές οι διαφορές μπορούν να παρέχουν πολλά πλεονεκτήματα βιοτεχνολογικής σημασίας για τις διάφορες διεργασίες ζύμωσης (Kerkeni et al., 2016).

3.2 Στελέχη της *Torulasporea delbrueckii* που έχουν χρησιμοποιηθεί στην οινοποίηση και την ζυθοποίηση

Η *T. delbrueckii* συμπεριλαμβάνει στο είδος της αρκετά στελέχη, ωστόσο μόνο κάποια από αυτά έχουν ερευνηθεί περαιτέρω και τα περισσότερα σε εργαστηριακή κλίμακα. Ωστόσο μετά από πειραματικές έρευνες πλέον στις βιομηχανικές αγορές υπάρχουν πέντε στελέχη της, τα οποία είναι διαθέσιμα στους παραγωγούς. Το πρώτο εμπορικό στέλεχος της *T. delbrueckii*, το οποίο εισάχθηκε στην αγορά ενεργής ξηρής ζύμης ήταν το Prelude™ το 2009, όπου μετά από αυτό ακολούθησαν τα Biodiva™, Zymaflore® Alpha, Vinifer NS TD και Primaflora® VB BIO.

Πίνακας 3: Οργανοληπτική επιρροή των εμπορικών στελεχών της *T. delbrueckii* (Benito, 2018)

Στέλεχος <i>Torulasporea delbrueckii</i>	Οργανοληπτική επιρροή στο προϊόν
Prelude™	↓ πτητικής οξύτητας, ↑ μεσαίας αλυσίδας λιπαρών οξικών εστέρων (βελτιώνει την πολυπλοκότητα), ↓ τοξικών λιπαρών οξέων μεσαίας αλυσίδας (ενισχύει την μηλογαλακτική ζύμωση με αποτέλεσμα μεγαλύτερη στρογγυλότητα στο προϊόν), ↑ μαννοπρωτεϊνών
Zymaflore® Alpha	↑ έντασης και διάρκειας στον ουρανίσκο, ↑ αρωματικής ποικιλίας και έντασης, ↓ πτητική οξύτητα όπως και την ακεταλδεΐδη, την ακετόνη, το διακετύλιο και το H ₂ S, ↑ 3SH και 3SHA
Biodiva™	↑ αρωματικής και γευστικής πολυπλοκότητας, ↑ αρωματικών εστέρων, ↓ πτητικής οξύτητας, ↑ την αντοχή σε ωσμωτικό σοκ
Viniform NS TD	↑ την πολυπλοκότητα του κρασιού, ↑ β-φαινυλ-αιθανόλης, ↑ τη δραστηριότητα της β-λυάσης και ↑ μαννοπρωτεϊνών
Primaflora® VB BIO	Προσφέρει βιο-προστασία

Όπως αναφέρθηκε, υπάρχουν και κάποια στελέχη τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί σε διάφορες έρευνες πειραματικά και έχουν αξιολογηθεί τα αποτελέσματά τους. Τα περισσότερα είχαν θετική επίδραση στο τελικό προϊόν. Επίσης τα αλκοολούχα ποτά τα οποία παράχθηκαν με κάποια από τα στελέχη της *T. delbrueckii* είτε με καθαρές καλλιέργειες είτε σε συνεργασία με τον *S. cerevisiae*, προτιμήθηκαν και βαθμολογήθηκαν υψηλότερα σε σύγκριση με τα προϊόντα που είχαν παραχθεί μόνο από τον *S. cerevisiae*, όταν υποβλήθηκαν σε οργανοληπτική δοκιμή από έμπειρους δοκιμαστές. Παρακάτω αναφέρονται ενδεικτικά κάποια στελέχη, τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί πειραματικά σε διάφορες ερευνητικές μελέτες και τα αξιοσημείωτα χαρακτηριστικά τους.

Πίνακας 4: Στελέχη της *T. delbrueckii* που έχουν χρησιμοποιηθεί πειραματικά και κάποια χαρακτηριστικά τους

Στέλεχος <i>delbrueckii</i>	<i>Torulaspora</i>	Σημαντικά χαρακτηριστικά	Αναφορές
Td28		<p>Για τον οίνο: Ικανότητα να παράγει υψηλές συγκεντρώσεις οργανικών οξέων, όπως και 2-φαινυλαιθανόλης. Αποδεκτές ποσότητες οξικού οξέος και γλυκερόλης. Το τελικό προϊόν είχε αυξημένη οξύτητα, φρεσκάδα και πολυπλοκότητα.</p> <p>Για το ζύθο: αυξημένες νότες εστέρων, με αρώματα μπανάνας, τριαντάφυλλου και τσιχλόφουσκας. Χαμηλός φαινολικός χαρακτήρας. Το τελικό προϊόν είχε περισσότερη ένταση και πολυπλοκότητα.</p>	(Tataridis et al., 2013)
COFT1, CBS 3085		<p>Για τον οίνο: Και στα δύο αυτά στελέχη παρατηρήθηκε μια μείωση στη στατική φάση όταν χρησιμοποιήθηκαν με τον <i>S. cerevisiae</i>, ο οποίος είχε πιο καλό ρυθμό ζύμωσης. Το COF51 είχε παρόμοιες συγκεντρώσεις γλυκερόλης συγκρινόμενο με τον <i>S. cerevisiae</i> και χαμηλότερες συγκεντρώσεις οξικού οξέος. Το CBS 3085, σε καθαρή καλλιέργεια είχε μεγαλύτερη συγκέντρωση αιθανόλης σε σχέση με την μικτή καλλιέργεια που χρησιμοποιήθηκε, όπου ο <i>S. cerevisiae</i> ανέστειλε την ανάπτυξη του.</p>	(Tondini et al., 2019) (Nissen et al., 2003)
T.D 27828, T.D 31703		<p>Για τον οίνο: Έχουν χρησιμοποιηθεί σε αυξημένες περιεκτικότητες σακχάρων (360 g/L). Οι ζυμώσεις τους ήταν πιο αργές σε σύγκριση με αντίστοιχες με τον ρυθμό ζύμωσης του <i>S. cerevisiae</i>. Οι ποσότητες πτητικής οξύτητας ήταν χαμηλές και για τα δύο στελέχη. Μεταξύ των δύο στελεχών το T.D 31703 είχε καλύτερες συγκεντρώσεις γλυκερόλης. Επίσης χρησιμοποιήθηκε και σε μικτές καλλιέργειες με τον <i>S. cerevisiae</i>, με θετικά αποτελέσματα, κυρίως για την πτητική οξύτητα όπου ήταν σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις, σε σχέση με καθαρές καλλιέργειες</p>	(Bely et al., 2008)

	του <i>S. cerevisiae</i> .	
DiSVA 254	Για το ζύθο: αυξημένη συγκέντρωση ακεταλδεϋδης. Χαμηλά επίπεδα αιθανόλης. Οργανοληπτικά, το προϊόν χαρακτηρίστηκε φρουτώδες, με ολοκληρωμένο σώμα. Προτάθηκε για μπύρες με χαμηλό αλκοολικό τίτλο.	(Canonico et al., 2016)
TD-A01 TD-B03	Για το ζύθο: TD-A01, είχε αυξημένες ποσότητες οξικού ισοαμυλίου και 2-φαιλυλαιθυλίου και χαμηλότερη πτητική οξύτητα σε σχέση με το TD-B03, το οποίο παράγαγε χαμηλότερη ποσότητα εστέρων και μεγαλύτερη ισοβουτυρικού οξέος. Οι μπύρες που παράχθηκαν είχαν αυξημένο άρωμα φρούτων και ολοκληρωμένο σώμα.	(Tataridis et al., 2016)

Κεφάλαιο 4: Ζυμώσεις με την *Torulaspota delbrueckii*

Η *Torulaspota delbrueckii* έχει χρησιμοποιηθεί σε εργαστηριακή αλλά και σε βιομηχανική κλίμακα και είναι ένας μικροοργανισμός με αρκετά θετική επίδραση στο τελικό προϊόν. Από τα πειράματα που έχουν διεξαχθεί στις διάφορες μελέτες υπάρχουν κάποια χαρακτηριστικά που έχουν προκύψει και βοηθούν στην καλύτερη κατανόηση και αξιοποίηση της *T. delbrueckii* από την βιομηχανία τροφίμων και ποτών. Κάποια αξιοσημείωτα χαρακτηριστικά που ξεχωρίζουν τη συγκεκριμένη ζύμη, είναι η αντοχή της στην αιθανόλη, ένα χαρακτηριστικό όχι και τόσο σύνηθες για μία ζύμη non-*Saccharomyces*, η αντοχή της στο ωσμωτικό στρες καθώς και σε συνθήκες πάγου, όπως και η ικανότητα της να παράγει χαμηλές συγκεντρώσεις ανεπιθύμητων προϊόντων που προκύπτουν από το μεταβολισμό των ζυμών κατά τη διαδικασία της ζύμωσης, όπως είναι η ακεταλδεΐδη, η ακετόνη και το οξικό οξύ (Kerkeni et al., 2016). Ο τρόπος με τον οποίο λειτουργεί στις ζυμώσεις οίνου και ζύθου θα αναλυθεί εκτενέστερα παρακάτω.

4.1 Ανάπτυξη και ζυμωτική συμπεριφορά σε ζυμώσεις οίνου

Η ζύμωση για την παραγωγή οίνου είναι μια περίπλοκη βιοχημική διαδικασία, κατά την οποία το γλεύκος, το οποίο προέρχεται από τα σταφύλια μετατρέπεται σε αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα μέσω του μεταβολισμού των ζυμών, από τον οποίο παράγονται επίσης κάποια δευτερεύοντα προϊόντα τα οποία επηρεάζουν το οργανοληπτικό προφίλ του οίνου που παράγεται. Η διαδικασία της ζύμωσης απαιτεί συγκεκριμένες συνθήκες περιβάλλοντος στη δεξαμενή, με σκοπό αρχικά την ανάπτυξη της ζύμης και έπειτα την παραγωγή του επιθυμητού προϊόντος. Οι συνθήκες ανάπτυξης και ζύμωσης, οι οποίες μπορούν να επηρεάσουν την εκάστοτε ζύμη που χρησιμοποιείται, συμπεριλαμβάνουν τη θερμοκρασία, το pH, τα επίπεδα οξυγόνου, τα επίπεδα σακχάρων του γλεύκους καθώς και τα θρεπτικά συστατικά, όπως το άζωτο κ.α. Επίσης, η ανάπτυξη και η ζυμωτική ικανότητα της ζύμης μπορεί να επηρεαστεί και από ουσίες οι οποίες χρειάζεται να προστεθούν από τον εκάστοτε οινοπαραγωγό, όπως το SO₂, με σκοπό κυρίως την προστασία από επιμολύνσεις και οξειδώσεις του οίνου. Επιπλέον, η ανάπτυξη και ο μεταβολισμός μίας ζύμης μπορεί να επηρεαστεί και από άλλες ζύμες που βρίσκονται στο γλεύκος, είτε λόγω εμβολιασμού, ταυτόχρονα ή διαδοχικά (με κάποιο άλλο είδος ζύμης), είτε λόγω αλληλεπίδρασης με άλλες ζύμες που βρίσκονταν ήδη στην επιφάνεια των σταφυλιών και έχουν επιβιώσει (ιθαγενείς ζύμες).

4.1.1 Ζυμώσεις με εμβολιασμό καθαρής καλλιέργειας της *T. delbrueckii*

- Ζυμωτική ικανότητα σακχάρων και κινητική της ζύμωσης

Τα σάκχαρα αποτελούν την κύρια πηγή θρέψης για την ανάπτυξη των ζυμών και η κινητική της ζύμωσης αφορά τον ρυθμό κατανάλωσης των σακχάρων από τις ζύμες με σκοπό κυρίως την παραγωγή της αιθανόλης και του διοξειδίου του άνθρακα. Συγκεκριμένα, η *T. delbrueckii* έχει την δυνατότητα να ζυμώνει τη γλυκόζη, η οποία είναι και το βασικό σάκχαρο στο γλεύκος που προέρχεται από τα σταφύλια. Ωστόσο, έχει αποδειχτεί ότι μπορεί να ζυμώνει και άλλα σάκχαρα όπως είναι η γαλακτόζη, η ραφινόζη, η τρεχαλόζη και η σακχαρόζη και είναι

αμφιλεγόμενες οι μελέτες σχετικά με την ικανότητά της να ζυμώνει τη μαλτόζη και τη μαλτοτριόζη (Carrese et al., 2018). Βέβαια η ζυμωτική ικανότητα των σακχάρων, σε κάθε περίπτωση, στηρίζεται εξ ολοκλήρου στο στέλεχος και δεν ισχύουν επακριβώς τα ίδια χαρακτηριστικά για όλα τα στελέχη της *T. delbrueckii*. Δεν έχει βρεθεί ωστόσο κανένα στέλεχος ικανό να ζυμώνει τη λακτόζη (Michel et al., 2016). Αποτελέσματα πειράματος έχουν δείξει ότι στελέχη του συγκεκριμένου μικροοργανισμού μπορούν να ζυμώσουν μέχρι 240 g/L σάκχαρα, εφόσον υπάρχουν επαρκείς συγκεντρώσεις αζώτου στο γλεύκος, με τη βιωσιμότητα των κυττάρων της ζύμης στο συγκεκριμένο πείραμα να είναι στο 90% και η διάρκεια της ζύμωσης να είναι περίπου 11 με 12 ημέρες. Ωστόσο διαφορετικά πειράματα με αντίστοιχες συνθήκες έδειξαν ότι 21 στελέχη της ζύμης αυτής δεν κατάφεραν να καταναλώσουν τις αντίστοιχες ποσότητες σακχάρων (Renault et al., 2009), καθώς επίσης και μεγαλύτερες ποσότητες σακχάρων δεν κατάφεραν να καταναλωθούν από αυτά τα στελέχη αφήνοντας αζύμωτο το 50% των αρχικών σακχάρων (Ciani et al., 2006). Γενικά, φαίνεται πως στα περισσότερα πειράματα που έχουν διεξαχθεί τα στελέχη της *T. delbrueckii* έχουν πιο αργό ρυθμό ζύμωσης συγκριτικά με τον κλασικό σακχαρομύκητα, *S. cerevisiae*, ωστόσο ο ρυθμός κατανάλωσης των σακχάρων είναι άμεσα εξαρτώμενος από το στέλεχος της *T. delbrueckii* που έχει επιλεγεί (Taillandier et al., 2014).

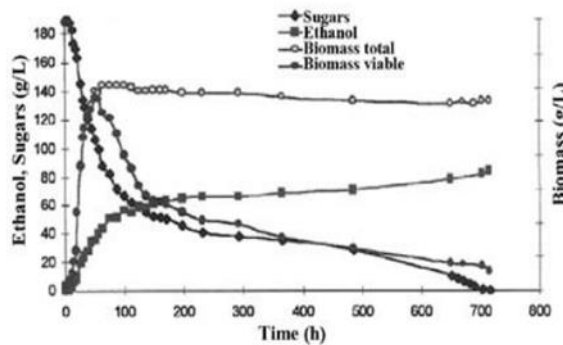
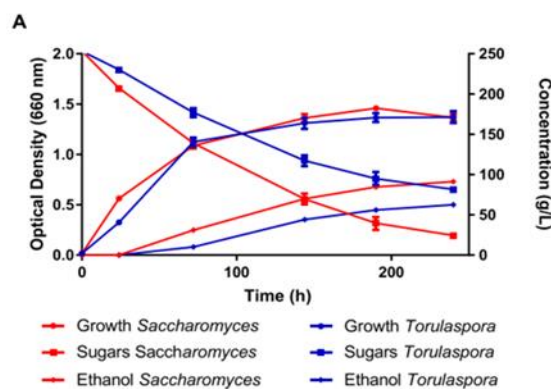


Fig. 3. – Fermentation kinetics of Td28 at 20 °C.

Εικόνα 6: Το στέλεχος Td28 σε καθαρή καλλιέργεια και το προφίλ ζύμωσης (Tataridis et al., 2013).



Εικόνα 7: *T. delbrueckii* και *S. cerevisiae* σε καθαρές καλλιέργειες, και η πορεία των σακχάρων, της αιθανόλης και της ανάπτυξης (Tondini et al., 2019).

➤ Αιθανόλη και βιωσιμότητα

Η αιθανόλη είναι ένα από τα κύρια προϊόντα του μεταβολισμού των ζυμών που παράγεται κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης. Η συγκεκριμένη αλκοόλη μπορεί να είναι τοξική κάποιες φορές για τα κύτταρα των ζυμών, οδηγώντας τα σε θανάτωση. Η βιωσιμότητα λοιπόν των κυττάρων της ζύμης εξαρτάται κάποιες φορές από την συγκέντρωση της αιθανόλης καθώς επίσης και από την παρουσία άλλων ζυμών στο γλεύκος. Επίσης η βιωσιμότητα μπορεί να επηρεαστεί και από την έλλειψη κάποιου θρεπτικού συστατικού ή κάποιας ουσίας που επιδρά αναστέλλοντας την ανάπτυξη των ζυμών. Σε αρκετές μελέτες που έχουν διεξαχθεί αναφέρεται ότι η *T. delbrueckii* σε καθαρή καλλιέργεια ζύμωσης είναι ικανή να ζυμώσει μέχρι η περιεκτικότητα της αιθανόλης να φτάσει σε επίπεδα έως 9% v/v (Benito, 2018). Έχει αναφερθεί ακόμη και μέσος όρος αιθανόλης 9,35% v/v σε πείραμα με 90 στελέχη της *T. delbrueckii* (Ciani & Maccarelli, 1997). Πιο πρόσφατα έχει αναφερθεί από τους Renault et al. το 2019 ότι υπάρχουν σημαντικές διαφορές στην παραγωγή αιθανόλης ανάμεσα στα στελέχη της *T. delbrueckii*, οι οποίες κυμαίνονται από 7% έως 10% v/v. Όσον αφορά την κινητική του πληθυσμού αποτελέσματα πειραμάτων από διαδοχικές διαδικασίες ζύμωσης, έχουν δείξει σημαντικές μειώσεις στα βιώσιμα κύτταρά της, όταν η συγκέντρωση της αιθανόλης υπερβεί το 8%, αν και ορισμένα κύτταρα παραμένουν βιώσιμα έως το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης. Βέβαια ανάμεσα στους non-*Saccharomyces* η *T. delbrueckii* θεωρείται ζύμη με σημαντική αντοχή στην αιθανόλη, λαμβάνοντας υπόψιν ότι οι περισσότερες ζύμες non-*Saccharomyces* αντέχουν σε συγκεντρώσεις αιθανόλης έως 4% v/v. Έχει αναφερθεί επίσης η δυνατότητα του συγκεκριμένου μικροοργανισμού να παράγει κρασιά με χαμηλότερη συγκέντρωση αιθανόλης συγκριτικά με τις κλασσικές ζυμώσεις με τον *S. cerevisiae* και αυτή η δυνατότητα μπορεί να αξιοποιηθεί ώστε να αποφευχθούν προβλήματα, τα οποία ακμάζουν με την κλιματική αλλαγή, όπως είναι οι οίνοι με αυξημένη περιεκτικότητα αιθανόλης, λόγω υψηλών συγκεντρώσεων σακχάρων στα γλεύκη (Benito, 2018; Varela, 2016)

➤ Επίπεδα οξυγόνου

Η αλκοολική ζύμωση είναι μια διαδικασία που λαμβάνει χώρα κυρίως υπό αναερόβιες συνθήκες. Ένας ήπιος αερισμός ευνοεί την διαδικασία, αλλά μεγάλες ποσότητες οξυγόνου μπορεί να δημιουργήσουν πρόβλημα στη ζύμωση μέσω οξειδωσης του προϊόντος, επιμόλυνσης από μικροοργανισμούς του αέρα και σύνθεσης μεγαλύτερης ποσότητας ακεταλδεϋδης, η οποία σε μεγάλες ποσότητες επηρεάζει αρνητικά το οργανοληπτικό προφίλ του οίνου. Όσον αφορά την *T. delbrueckii*, μελέτες έχουν αναφέρει ότι δεν παρουσιάζει υψηλή αντοχή σε χαμηλά επίπεδα οξυγόνου και αυτό το χαρακτηριστικό μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξή της στο γλεύκος, καθώς και να προκαλέσει θάνατο των κυττάρων της κατά τη διάρκεια της ζύμωσης (Jolly et al., 2017). Ωστόσο παλαιότερα είχαν διεξαχθεί πειράματα, με τη συγκέντρωση του οξυγόνου να βρίσκεται σε περιορισμένα επίπεδα και η ανάπτυξη καθώς και η ζυμωτική ικανότητα του στελέχους (CBS 3085) της *T. delbrueckii* δεν επηρεάστηκαν σε αξιοσημείωτο βαθμό (Nissen et al., 2003). Κάποιες άλλες μελέτες έχουν δείξει επίσης ότι η παροχή οξυγόνου σε ζυμώσεις με διαδοχικούς εμβολιασμούς μπορεί να βοηθήσει στη μείωση της συγκέντρωσης της αιθανόλης περίπου στο 1,5% v/v, χαρακτηριστικό το οποίο μπορεί να είναι χρήσιμο σε ζυμώσεις όπου είναι επιθυμητό ένα τελικό προϊόν με χαμηλότερες συγκεντρώσεις αιθανόλης. Ωστόσο επιπρόσθετη αξιολόγηση των συγκεκριμένων στελεχών είναι απαραίτητη, με σκοπό την αποσαφήνιση της επίδρασης του αερισμού στο στέλεχος ζύμης, καθώς και στο οργανοληπτικό προφίλ των οίνων (Varela, 2016).

➤ Θερμοκρασία και pH

Η θερμοκρασία και το pH είναι δύο σημαντικοί παράμετροι της αλκοολικής ζύμωσης, καθώς μπορούν να επηρεάσουν τις ζύμες και την όλη διαδικασία. Σε τιμές >30 °C η ανάπτυξη των περισσότερων ζυμών αναστέλλεται όπως και σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες. Επίσης ακραίες τιμές μπορεί να οδηγήσουν σε θερμικό στρες τους μικροοργανισμούς. Αντίστοιχα και σε τιμές pH, οι οποίες αποκλίνουν από τις βέλτιστες για την εκάστοτε ζύμη, μπορεί να

δημιουργηθούν προβλήματα στη ζυμωτική διαδικασία. Στα περισσότερα πειράματα που έχουν διεξαχθεί με στελέχη της *T. delbrueckii* οι τιμές της θερμοκρασίας κυμαίνονται από 20 °C έως 26 °C και δεν έχει αναφερθεί κάποιο πρόβλημα που να σχετίζεται με την τιμή της θερμοκρασίας. Αντίστοιχα για τις τιμές pH, τα περισσότερα πειράματα διεξάγονται σε τιμές από 3.2 έως 4.5 ως ανώτερη τιμή και επίσης δεν έχει αναφερθεί κάποιο πρόβλημα σχετιζόμενο με το pH. Σε άλλο πείραμα όπου διεξάχθηκαν ζυμώσεις σε διαφορετικές θερμοκρασίες, 15 °C και 22 °C, τα αποτελέσματα έδειξαν πως και στις δύο περιπτώσεις υπήρχαν στελέχη που ζύμωναν ταχύτερα και άλλα πιο αργά. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι διαφορετικές ταχύτητες ζύμωσης στηρίζονται στο στέλεχος που χρησιμοποιείται και ότι διαφορετικά στελέχη της *T. delbrueckii* είναι κατάλληλα για συγκεκριμένα στυλ οίνων, με κάποια από αυτά να προτάσσονται και για εμβολιασμό χωρίς τον *S. cerevisiae* σε βιομηχανικές ζυμώσεις (van Breda et al., 2013).

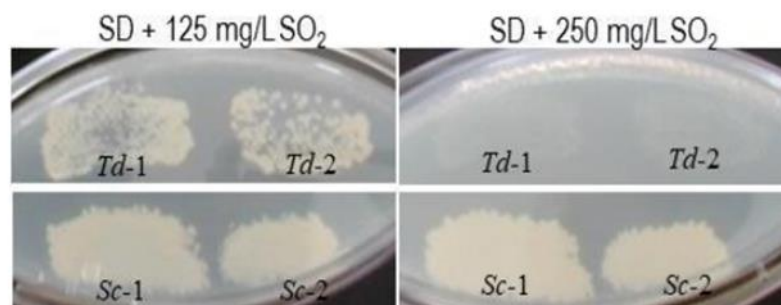
➤ Άζωτο

Το άζωτο είναι ένα σημαντικό θρεπτικό συστατικό για την ανάπτυξη των ζυμών καθώς και για την πορεία της ζύμωσης διότι η έλλειψη του μπορεί να οδηγήσει στη διακοπή της αλκοολικής ζύμωσης ή σε μειωμένο ρυθμό αυτής. Επίσης ο καταβολισμός των πηγών αζώτου, σε συνδυασμό με τον καταβολισμό των σακχάρων συμμετέχουν στη σύνθεση των πρόδρομων αρωμάτων από τις ζύμες. Το γλεύκος περιέχει διάφορες πηγές αφομοιώσιμου αζώτου, όχι μόνο αμινοξέα και αμμώνιο, αλλά και ουρία, κιτρουλίνη, ορνιθίνη και μικρά πεπτιδία. Οι ζύμες εμφανίζουν διαφορές ανάμεσα στην προτίμηση πλούσιων και φτωχών πηγών αζώτου αλλά και στη σειρά με την οποία καταναλώνονται. Συγκεκριμένα η *T. delbrueckii* εμφάνισε καλύτερο ρυθμό ανάπτυξης σε πιο φτωχές πηγές αζώτου (π.χ λυσίνη) συγκριτικά με τις πιο πλούσιες σε άζωτο πηγές, όπου ο *S. cerevisiae* φαίνεται να αναπτύσσεται καλύτερα (Su et al., 2020). Οι Bely et al. (2008) είχαν αναφέρει ότι υπήρχαν υψηλότερα επίπεδα υπολειμματικού αζώτου, περίπου 115 mg/L, σε καθαρές ζυμώσεις με την *T. delbrueckii*, συγκριτικά με τις ζυμώσεις με τον *S. cerevisiae*. Τα υψηλά επίπεδα υπολειμματικού αζώτου μπορούν να εξηγηθούν είτε διότι ένα είδος έχει χαμηλότερες απαιτήσεις σε αυτή την ουσία, είτε λόγω υψηλής απελευθέρωσης αμινοξέων. Σε κάθε περίπτωση, δείχνει ότι η διαχείριση των θρεπτικών ουσιών αζώτου από την *T. delbrueckii* διαφέρει συγκριτικά με τον *S. cerevisiae*. Επιπλέον, αποτελέσματα πειραμάτων από καθαρή καλλιέργεια ζύμωσης με την *T. delbrueckii*, η οποία περιείχε ποσότητα αζώτου 170 mg/L βελτιώθηκε κατά 37 ώρες συγκρινόμενη με αντίστοιχη καθαρή καλλιέργεια με ποσότητα αζώτου 300 mg/L, το οποίο πιθανότητα οφείλεται στη χαμηλότερη συγκέντρωση βιώσιμων κυττάρων στη στατική φάση, αν και ο ρυθμός ανάπτυξης ήταν ίδιος και για τις δύο καλλιέργειες τις πρώτες 48 ώρες. Τα αποτελέσματα έδειξαν επίσης ότι συγκριτικά με τα στελέχη του *S. cerevisiae*, η *T. delbrueckii* καταναλώνει λιγότερη ποσότητα αζώτου (Taillandier et al., 2014). Επίσης ένα κύριο πρόβλημα που θα πρέπει να εξεταστεί αφορά τη φύση των απελευθερούμενων αμινοξέων, διότι ορισμένες ζύμες non-*Saccharomyces* έχει αναφερθεί ότι απελευθερώνουν υψηλότερες ποσότητες πρόδρομων ουσιών των βιογενών αμινών, όπως ιστιδίνης, κατά τη διάρκεια διαδοχικών ζυμώσεων σε σύγκριση με τον *S. cerevisiae*. Έχει αναφερθεί αύξηση στην απελευθέρωση ιστιδίνης περίπου 50% σε σχέση με τον *S. cerevisiae*. Αν και δεν υπάρχει άμεση σχέση μεταξύ των προδρόμων αμινοξέων της βιογονικής αμίνης και του σχηματισμού των βιογενών αμινών, η δημιουργία προδρόμων πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν, διότι οι βιογενής αμίνες παραμένουν ένα από τα κυριότερα προβλήματα ζύμωσης όσον αφορά την ασφάλεια των τροφίμων και την υγεία του ανθρώπου (Benito, 2018).

➤ SO₂

Το SO₂ είναι μία ουσία η οποία χρησιμοποιείται κατά τη διαδικασία παραγωγής οίνου με σκοπό την προστασία του από μικροβιακές επιμολύνσεις αλλά και οξειδώσεις που μπορεί να συμβούν. Τα επιτρεπτά όρια στην Ευρωπαϊκή Ένωση είναι έως 150 mg/L ή έως 200 mg/L με εναπομείναντα σάκχαρα < 5 g/L ή ≥ 5 g/L αντίστοιχα, για τους ερυθρούς οίνους, και 200 mg/L ή 250 mg/L για σάκχαρα < 5 g/L ή ≥ 5 g/L αντίστοιχα, για τους λευκούς/ροζέ οίνους,

ενώ στους γλυκούς οίνους μπορεί να είναι έως και 400 mg/L (Collective & Document, 2021). Η παρουσία του SO₂ μπορεί να επηρεάσει την ζύμωση, ειδικά όταν προστίθεται σε υψηλές συγκεντρώσεις, >190 mg/L, όπου φαίνεται πως συγκεκριμένα η *T. delbrueckii* δεν μπορεί να ανταπεξέλθει και να αναπτυχθεί και η ζύμωση είναι πιθανό πως θα διακοπεί. Αυτό επιβεβαιώνεται και από άλλο πείραμα που διεξάχθηκε, όπου η *T. delbrueckii* χρησιμοποιήθηκε σε καθαρή καλλιέργεια ζύμωσης, σε αυξημένη ποσότητα σακχάρων και η ζύμωση διακόπηκε όταν προστέθηκε ποσότητα SO₂ 250 mg/L (Bely et al., 2008).



Εικόνα 8: Ανάπτυξη στελεχών της *T. delbrueckii* (Td-1, Ts-2) και του *S. cerevisiae* (Sc-1, Sc-2) σε τριβλύο με ποσότητες διοξειδίου του θείου (SO₂) 125 mg/L και 250 mg/L (Ramírez & Velázquez, 2018)

➤ Ιδιότητα killer

Οι ζύμες non-*Saccharomyces* μπορεί να λειτουργήσουν αρνητικά στην ζύμωση του οίνου, ως μικροοργανισμοί επιμόλυνσης, όπως συμβαίνει και με τον *B. Bruxellensis*, ο οποίος μπορεί να βάλει σε κίνδυνο την ποιότητα του οίνου. Κάποιες ζύμες *Saccharomyces* και μη, έχουν την δυνατότητα να παράγουν κάποιες ουσίες, οι οποίες εμποδίζουν την ανάπτυξη άλλων ζυμών, και λόγω αυτού χαρακτηρίζονται ως ζύμες killer. Αρκετά στελέχη της *T. delbrueckii* έχει αναφερθεί ότι παράγουν μια πρωτεΐνη, η οποία λειτουργεί παρεμποδίζοντας την ανάπτυξη διαφόρων ζυμών επιμόλυνσης στο γλεύκος, συμπεριλαμβανομένων των *B. bruxellensis*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia manshurica* και *Pichia membranifaciens* (Varela, 2016). Σε μία ακόμη έρευνα που διεξάχθηκε αναλύθηκε με περισσότερη λεπτομέρεια μια τοξίνη που παράγεται από την *T. delbrueckii* και μπορεί να χρησιμοποιηθεί με σκοπό τον έλεγχο της ανάπτυξης μικροοργανισμών επιμόλυνσης όπως αναφέρθηκε ήδη. Η συγκεκριμένη τοξίνη ονομάζεται TdKT και το στέλεχος που βρέθηκε πειραματικά ως εκείνο με το μεγαλύτερο εύρος παρεμπόδισης έναντι των ζυμών επιμόλυνσης ήταν το NPCC 1033. Εξετάστηκε σε θερμοκρασία 20 °C και pH 4.5. Αξιολογήθηκε η δραστηριότητα της τοξίνης σε διαφορετικές φυσικοχημικές συνθήκες όπου απαντώνται πολύ συχνά στις ζυμώσεις οίνου. Παρατηρήθηκε ότι δεν επηρεάστηκε από υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων, ήταν σταθερή σε παρουσία SO₂, δεν επηρεάστηκε από την παρουσία αιθανόλης (έως 12% v/v), αλλά η δραστηριότητα της φαίνεται ότι αναστέλλεται σε θερμοκρασίες άνω των 37 °C και σε τιμές pH άνω του 4.5. Αναφέρεται ότι μόνο το κλάσμα πρωτεΐνης, το οποίο έδειξε να είναι μεγαλύτερο από 30 kDa έδειξε την συγκεκριμένη δραστηριότητα killer, υποδηλώνοντας ότι η μοριακή μάζα αυτής της πρωτεΐνης killer ήταν άνω των 30 kDa. Παρατηρήθηκε επίσης δραστηριότητα της β-γλυκανάσης και της χιτινάσης στο υπόστρωμα και αυτό οδήγησε στο συμπέρασμα ότι υπάρχει άμεση σχέση αυτών με τις ιδιότητες killer που παρατηρήθηκαν για αυτή την τοξίνη (TdKT) (Villalba et al., 2016). Ωστόσο απαιτείται εκτενέστερη έρευνα για αποσαφήνιση της συγκεκριμένης ιδιότητας και της επιρροής της στο τελικό προϊόν.

➤ Ανταπόκριση σε συνθήκες στρες

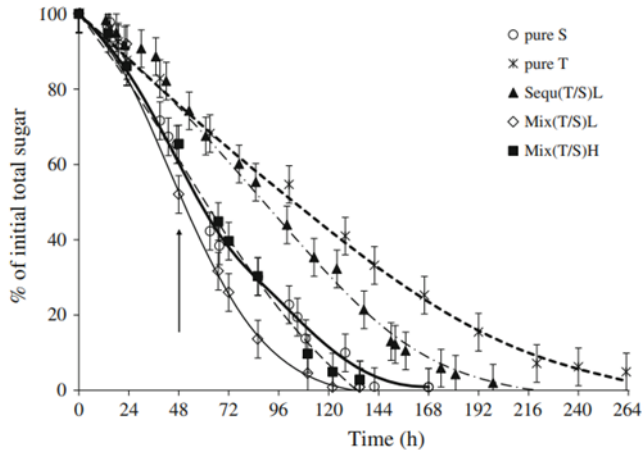
Κάποιες φορές οι ζύμες μπορεί να βρεθούν σε αντίξοες συνθήκες κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, οι οποίες μπορεί να αφορούν αυξημένη συγκέντρωση σακχάρων συνήθως, ή έλλειψη θρεπτικών συστατικών ή ακραίες τιμές θερμοκρασίας και pH. Το

συγκεκριμένο είδος non-*Saccharomyces* έχει αναφερθεί ότι εμφανίζει αντοχή σε συνθήκες στρες και πιο συγκεκριμένα μπορεί να αντέξει σε υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων και σακχάρων. Επιπλέον έχει αναφερθεί ότι είναι ικανό να αντέξει σε συνθήκες πάγου, εφόσον έχει δείξει υψηλή ζωτικότητα κυττάρων έπειτα από συντήρηση σε κατάψυξη (Michel et al., 2016). Κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης τα κύτταρα των ζυμών χρησιμοποιούν διάφορα μεταβολικά μονοπάτια, με κάποια από αυτά να επηρεάζουν την οργανοληπτική σύνθεση του οίνου, όπως είναι το Ehrlich pathway και το μονοπάτι αιθυλικών και οξικών εστέρων. Τα μονοπάτια αυτά χρησιμοποιούνται και ως ανταπόκριση στα διάφορα στρες από τα κύτταρα των ζυμών ώστε να διατηρήσουν την εσωτερική τους redox ισορροπία καθώς και να ρυθμίσουν την ομάδα των βασικών συμπαραγόντων και αμινοξέων (Tonadini et al., 2019). Πιο συγκεκριμένα οι ζύμες ανταποκρίνονται στην αυξημένη εξωτερική ωσμωτικότητα με βελτιωμένη παραγωγή και ενδοκυτταρική συσσώρευση γλυκερόλης για την εξισορρόπηση της ωσμωτικής πίεσης. Στον *S. cerevisiae* αυτή η ρύθμιση γίνεται μέσω της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων που απαντούν στο ωσμωτικό στρες, συμπεριλαμβανομένων της γλυκερόλης 3-φωσφορικής αφυδρογονάσης (glycerol 3-phosphate dehydrogenase) που κωδικοποιείται από το γονίδιο GPD1, όπως και δύο τύπους αλδεϋδικής αφυδρογονάσης (aldehyde dehydrogenase) που κωδικοποιούνται από τα γονίδια ALD2 και ALD3. Με σκοπό να διατηρήσουν την εσωτερική redox ισορροπία, τα κύτταρα των ζυμών αναγεννούν μια ισομοριακή ποσότητα από κυτοπλασματική NADH. Αυτή η ανάγκη φαίνεται να αντιμετωπίζεται εν μέρει από μείωση της ακεταλδεϋδης σε αιθανόλη αφενός, και αυξημένη οξείδωση σε οξικό, από την άλλη. Αυτός ο τρόπος ανταπόκρισης σε ωσμωτικό στρες δείχνει ότι είναι αναπόφευκτη η υπερπαραγωγή γλυκερόλης και οξικού οξέος σε ζύμωση με τον *S. cerevisiae*. Αντιθέτως, η χαμηλή παραγωγή πτητικής οξύτητας και η μη αμελητέα ποσότητα γλυκερόλης που παράγεται από την *T. delbrueckii* δείχνει ότι αυτό το είδος δεν παράγει οξικό οξύ σαν παραπροϊόν του υπερωσμωτικού στρες και συνεπώς λειτουργεί με διαφορετικό τρόπο υπό αυτές τις συνθήκες. Η άμεση συνέπεια είναι η μείωση της πτητικής οξύτητας σε ζυμώσεις με την *T. delbrueckii* όπου η συγκέντρωση σακχάρων είναι αυξημένη, χαρακτηριστικό αξιοσημείωτο, διότι το οξικό οξύ μπορεί να δημιουργήσει πρόβλημα στο οργανοληπτικό προφίλ του τελικού οίνου όταν βρίσκεται σε υψηλά επίπεδα. Επιπλέον, κάποια στελέχη της *T. delbrueckii* έχουν χρησιμοποιηθεί σε αυξημένες περιεκτικότητες σακχάρων, όπως σε γλεύκος από σταφύλια με *botrytis cinerea*, με συγκέντρωση σακχάρων 360 g/L, συγκεντρώσεις που οδηγούν τα κύτταρα των ζυμών σε ωσμωτικό στρες διότι δεν αποτελούν τις κλασσικές οινολογικές συνθήκες. Στις συγκεκριμένες ζυμώσεις τα στελέχη της *T. delbrueckii* δεν ήταν σε θέση να φτάσουν την απαιτούμενη αιθανόλη (14% v/v) και ο ρυθμός ζύμωσης ήταν πιο αργός σε σύγκριση με τον ρυθμό ζύμωσης του *S. cerevisiae* στις ίδιες συνθήκες, με αποτέλεσμα η ζύμωση για τα στελέχη της *T. delbrueckii* να ολοκληρωθεί έπειτα από 20 και 26 ημέρες για το κάθε στέλεχος που εξετάστηκε (*T. delbrueckii* 27828 και *T. delbrueckii* 31703), σε αντίθεση με τον *S. cerevisiae*, ο οποίος ολοκλήρωσε τη ζύμωση σε 11 ημέρες. Επίσης αναφέρεται ότι οι συγκεντρώσεις των κυττάρων ήταν υψηλότερες για τον *S. cerevisiae* μετά από 3 ημέρες, σε αντίθεση με τα στελέχη της *T. delbrueckii* όπου η ανάπτυξη των κυττάρων της σταμάτησε έπειτα από 4 ημέρες, σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαιώνονται και από άλλες έρευνες (Mauricio et al., 1991; Ciani and Picciotti, 1995; Ciani, 1997), οι οποίες αναφέρουν εξίσου χαμηλές ταχύτητες ανάπτυξης για την *T. delbrueckii* σε σύγκριση με τον *S. cerevisiae* (Bely et al., 2008).

4.1.2 Ζυμώσεις με ταυτόχρονο ή διαδοχικό εμβολιασμό της *T. delbrueckii* και του *S. cerevisiae*

- Κατανάλωση σακχάρων και κινητική ζύμωσης

Σε πειράματα που έχουν διεξαχθεί τα αποτελέσματα έδειξαν ότι σε μικτές καλλιέργειες φαίνεται πως οι δύο μικροοργανισμοί, *T. delbrueckii* και *S. cerevisiae*, είχαν παρόμοιους ειδικούς ρυθμούς ανάπτυξης στην εκθετική φάση. Ωστόσο η ανάπτυξη της *T. delbrueckii* διακόπηκε νωρίτερα (30 ώρες) σε σχέση με τον *S. cerevisiae* (42 ώρες) και ως εκ τούτου είχε χαμηλότερες συγκεντρώσεις κυττάρων στην στατική φάση (Nissen et al., 2003). Πείραμα των Taillandier et al. (2014) επιβεβαιώνει τις διαφορές στην ανάπτυξη των δύο μικροοργανισμών εφόσον τα αποτελέσματα έδειξαν ότι σε μικτή καλλιέργεια ο *S. cerevisiae* μπορούσε να αναπτυχθεί με τον ίδιο τρόπο όπως και σε καθαρή καλλιέργεια, με παρόμοια κινητική ζύμωσης, ενώ αντίθετα η ανάπτυξη της *T. delbrueckii* μειώθηκε σε μικτή καλλιέργεια ζύμωσης. Ο *S. cerevisiae* κυριάρχησε έπειτα από 24 ώρες από τον εμβολιασμό του και παρατηρήθηκε μειωμένη ποσότητα κυττάρων της *T. delbrueckii* στη στατική φάση. Η ίδια μείωση του πληθυσμού της *T. delbrueckii* στη στατική φάση παρατηρήθηκε και όταν το στέλεχος της ήταν κυρίαρχο στην αρχή. Οι διαδοχικές ζυμώσεις που διεξάχθηκαν με τους δύο αυτούς μικροοργανισμούς ήταν πιο αργές, ακόμη και με διαφορετικές ποσότητες αζώτου στο υπόστρωμα, που θα μπορούσαν να επηρεάσουν την ανάπτυξη τους και τη ζυμωτική τους ικανότητα, και ίσως μία εξήγηση για την μεγαλύτερη διάρκεια ζύμωσης να είναι η μείωση της βιωσιμότητας της *T. delbrueckii* στη στατική φάση αφότου εμβολιάστηκε και ο *S. cerevisiae* (Taillandier et al., 2014). Σε πιο πρόσφατες μελέτες, αποτελέσματα άλλων πειραμάτων με μικτές και διαδοχικές ζυμώσεις έδειξαν ότι ο *S. cerevisiae* κατανάλωσε 25% περισσότερα σάκχαρα και πιο γρήγορα, παράγοντας και μεγαλύτερη ποσότητα αιθανόλης (Tondini et al., 2019). Οι δύο μικροοργανισμοί εμφάνισαν διαφορετικούς ρυθμούς ζύμωσης. Στη συγκεκριμένη μελέτη διευκρινίστηκαν οι διαφορές μεταξύ της κατανάλωσης σακχάρων και της παραγωγής αιθανόλης από τον *S. cerevisiae* σε σχέση με την χαμηλότερη δραστηριότητα της *T. delbrueckii*, συγκρίνοντας τις εκφράσεις των γονιδίων που εμπλέκονται στον καταβολισμό των σακχάρων. Οι εκφράσεις του μεταφορέα γλυκόζης χαμηλής συγγένειας (HXT1) και μεταφορέων γλυκόζης υψηλής συγγένειας (HXT2 για *T. delbrueckii* και HXT6 για *S. cerevisiae*) ήταν παρόμοιες. Και τα δύο είδη μετέγραψαν αρχικά το HXT1 αλλά με την πρόοδο της ζύμωσης άλλαξαν σε μεταφορείς γλυκόζης υψηλής συγγένειας HXT2/HXT6. Η γλυκολυτική οδός της *T. delbrueckii* έχει όλα τα απαραίτητα βήματα για την μετατροπή της γλυκόζης σε πυροσταφυλικό. Ωστόσο σε σύγκριση με τον *S. cerevisiae* παρατηρήθηκε ότι λείπουν κάποια γονίδια (paralog genes), τα οποία κωδικοποιούν την αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης, την ενολάση και την πυροσταφυλική κινάση. Επιπλέον, το αντίγραφο των PGI1, TPI1, ENO2 στην *T. delbrueckii* ήταν παρόμοιο με αυτό της *Candida glabrata*, ενώ το PYK2 ήταν παρόμοιο με αυτό της *Lachancea thermotolerans*. Στο μεταβολικό μονοπάτι της ζύμωσης, η *T. delbrueckii* εξέφρασε μόνο ένα γονίδιο πυροσταφυλικής αποκαρβοξυλάσης (PDC1), ενώ ο *S. cerevisiae* εξέφρασε και τα τρία (PDC 1, 5 και 6). Επιπλέον, η ακολουθία του γονιδίου της *T. delbrueckii*, PDC1 ήταν περισσότερο παρόμοια με αυτή του *Kluyveromyces* και όχι με του *S. cerevisiae*. Και οι επτά αφυδρογονάσες αλκοόλης (ADH1-7), οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη μετατροπή της ακεταλδεϋδης σε αιθανόλη, βρέθηκαν στον *S. cerevisiae*, αλλά μόνο τέσσερις ανιχνεύθηκαν στην *T. delbrueckii* (ADH1, ADH3, ADH4 και ADH6). Οι διαφορές αυτές στην έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στον καταβολισμό των σακχάρων και κατά συνέπεια στην παραγωγή αιθανόλης και άλλων ενώσεων, μπορούν να εξηγήσουν τις διαφορές μεταξύ των δύο ειδών στη ζυμωτική διαδικασία (Tondini et al., 2019).



Εικόνα 9: Τα εναπομείναντα σάκχαρα σε ποσοστό επί τοις 100 από την αρχική συγκέντρωση σακχάρων (220 g/L) σε καθαρές καλλιέργειες ζύμωσης (pure) με τον *S. cerevisiae* και την *T. delbrueckii* και σε μικτές (mix T/S) και διαδοχικές (sequ) ζυμώσεις με τις δύο αυτές ζύμες. 300 mg/L άζωτο, 20 °C. Το “L” υποδηλώνει τη χαμηλή αναλογία της *T. delbrueckii* και του *S. cerevisiae*, ενώ το “H” την υψηλή. Το βέλος υποδηλώνει τη στιγμή του εμβολιασμού του *S. cerevisiae* στην διαδοχική ζύμωση (Taillandier et al., 2014).

➤ Αιθανόλη και βιωσιμότητα κυττάρων

Μελέτες που αφορούν διαδοχικές ζυμώσεις με τους μικροοργανισμούς *T. delbrueckii* και *S. cerevisiae*, έδειξαν μια μικρή μείωση στην παραγωγή της αιθανόλης, της τάξης του 0.15 - 0.5% v/v, σε σχέση με τις ζυμώσεις που διεξάγονται αποκλειστικά από τον *S. cerevisiae*. Έχουν αναφερθεί επίσης και μεγαλύτερες μειώσεις στην παραγωγή αιθανόλης, έως και 2% v/v. Ωστόσο διαφορετικές μελέτες δεν έχουν αναφέρει σημαντικές διαφορές σε σχέση με ζύμωση καθαρής καλλιέργειας *S. cerevisiae*. Έχει αναφερθεί επίσης ότι σε διαδοχικές ζυμώσεις με τους δύο αυτούς μικροοργανισμούς, τα βιώσιμα κύτταρα της *T. delbrueckii* μειώνονται σε συγκεντρώσεις αιθανόλης άνω του 8%, αν και ορισμένα κύτταρα έχουν την δυνατότητα να παραμένουν βιώσιμα έως το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης (Ciani & Maccarelli, 1997). Σε μελέτες πιο πρόσφατες, τα αποτελέσματα των πειραμάτων που διεξάχθηκαν έδειξαν ότι η βιωσιμότητα των κυττάρων της *T. delbrueckii* μειώνεται αρκετά γρήγορα από την στιγμή που θα εμβολιαστεί στο υπόστρωμα ο *S. cerevisiae*. Αυτό συμβαίνει ακόμη και σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις εμβολίου της *T. delbrueckii* σε μικτές καλλιέργειες με τον *S. cerevisiae*, σε αναλογία 20:1. Άλλες έρευνες έχουν δείξει ότι ο διαδοχικός εμβολιασμός επιτρέπει την ανάπτυξη της *T. delbrueckii* και μόνο σε περίπτωση που το υπόστρωμα διαθέτει αρκετό αφομοιώσιμο άζωτο μπορεί να αναπτυχθεί πλήρως και ο *S. cerevisiae* και να υπάρχει ένα καλό ποσοστό ζύμωσης και κατ' επέκταση καλύτερες συγκεντρώσεις αιθανόλης (Taillandier et al., 2014).

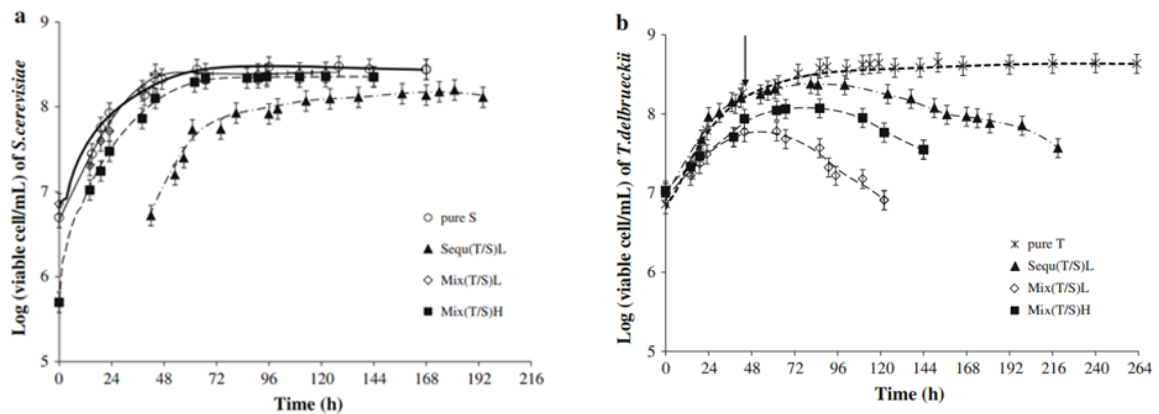
➤ Θερμοκρασία, pH, οξυγόνο και SO₂

Οι τιμές θερμοκρασίας και pH στην πλειονότητα των πειραμάτων είναι αντίστοιχες με εκείνες που αναφέρθηκαν και για τις καθαρές καλλιέργειες της *T. delbrueckii*. Το οξυγόνο βρίσκεται σε περιορισμένα επίπεδα και όσον αφορά το SO₂, από τα αποτελέσματα πειράματος αναφέρεται ότι οι μικτές και διαδοχικές ζυμώσεις διακόπηκαν όταν προστέθηκε ποσότητα 250 mg/L SO₂ (Bely et al., 2008).

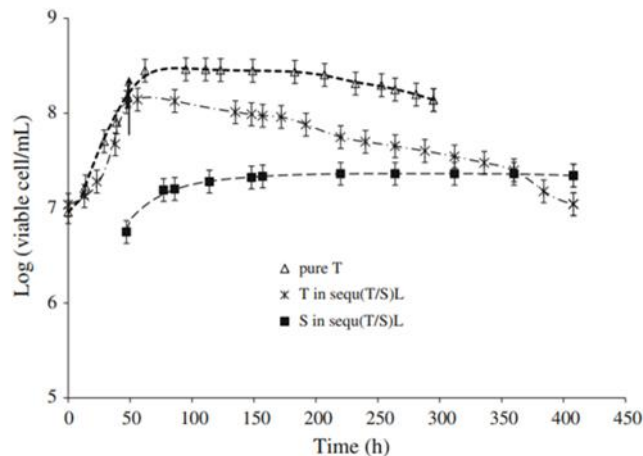
➤ Άζωτο

Σε διαδοχική ζύμωση με συγκέντρωση αζώτου 300 mg/L, η ανάπτυξη του *S. cerevisiae*, ήταν χαμηλότερη σε σχέση με την ανάπτυξή του σε καθαρή καλλιέργεια ζύμωσης. Μία υποθετική εξήγηση για αυτό είναι ότι όταν ο *S. cerevisiae* εμβολιάστηκε έπειτα από 48 ώρες από την *T.*

delbrueckii, η ποσότητα αζώτου δεν ήταν επαρκής για την φυσιολογική ανάπτυξη του *S. cerevisiae*. Αντίστοιχα, μια διαδοχική ζύμωση με χαμηλότερη ποσότητα αζώτου (170 mg/L) αποδείχθηκε δυο φορές σχεδόν πιο αργή. Πάλι ο εμβολιασμός του *S. cerevisiae* έγινε μετά από 48 ώρες και η ποσότητα αφομοιώσιμου αζώτου είχε σχεδόν εξαντληθεί. Ο πληθυσμός ήταν χαμηλότερος σε σχέση με τη ζύμωση με μεγαλύτερη συγκέντρωση αζώτου, ωστόσο η βιωσιμότητα του *S. cerevisiae* δεν μειώθηκε. Ωστόσο σε υψηλότερες συγκεντρώσεις αζώτου (324 mg/L), η ανάπτυξη του *S. cerevisiae* δεν επηρεάστηκε από την *T. delbrueckii*. Αντίστοιχα στις μικτές καλλιέργειες η ανάπτυξη του *S. cerevisiae* ήταν αντίστοιχη με την ανάπτυξη του σε καθαρή καλλιέργεια ζύμωσης, όμως η ανάπτυξη της *T. delbrueckii* μειώθηκε. Παρατηρήθηκε επίσης διαφορετικός ρυθμός ζύμωσης για τους δύο μικροοργανισμούς, με τον *S. cerevisiae* να αναπτύσσεται ταχύτερα, το οποίο υποδηλώνει κάποιου είδους ανταγωνισμό όσον αφορά στις θρεπτικές ουσίες του υποστρώματος ή κάποια άλλη αλληλεπίδραση μεταξύ των ειδών (Taillandier et al., 2014).



Εικόνα 10, 11: Κινητική ανάπτυξης των βιώσιμων κυττάρων του *S. cerevisiae* (a) και της *T. delbrueckii* (b) στις καθαρές (pure), μικτές (mix T/S) και διαδοχικές (sequ) καλλιέργειες ζύμωσής τους. 300 mg/L άζωτο, 20 °C. Το “L” υποδηλώνει τη χαμηλή αναλογία της *T. delbrueckii* και του *S. cerevisiae*, ενώ το “H” την υψηλή. Το βέλος υποδηλώνει τη στιγμή εμβολιασμού του *S. cerevisiae* στη διαδοχική ζύμωση (Taillandier et al., 2014).



Εικόνα 12: Κινητική ανάπτυξης των βιώσιμων κυττάρων της *T. delbrueckii* σε καθαρές (pure) καλλιέργειες ζύμωσης και διαδοχικές (sequ) καλλιέργειες ζύμωσης με τον *S. cerevisiae*. 170 mg/L άζωτο, 20 °C. Το “L” υποδηλώνει τη χαμηλή αναλογία της *T. delbrueckii* και του *S. cerevisiae*. Το βέλος υποδηλώνει τη στιγμή εμβολιασμού του *S. cerevisiae* στη διαδοχική ζύμωση (Taillandier et al., 2014)

➤ Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ζυμών

Μέσω πειραμάτων που έχουν διεξαχθεί φαίνεται πως ο *S. cerevisiae* επηρεάζει την *T. delbrueckii* σε ζυμώσεις που συμμετέχουν και οι δύο μικροοργανισμοί. Αυτές οι ζυμώσεις με ταυτόχρονο ή διαδοχικό εμβολιασμό στελεχών των παραπάνω ειδών έχουν χαμηλότερο ρυθμό ζύμωσης συνήθως. Σε αυτές τις ζυμώσεις φαίνεται να αναπτύσσεται κάποιος ανταγωνισμός μεταξύ των δύο ειδών, για διάφορες ουσίες του υποστρώματος ανάπτυξης, όπως τα σάκχαρα, το άζωτο και το οξυγόνο. Επίσης αναφέρεται ότι ο *S. cerevisiae* αναπτύσσεται ταχύτερα σε σχέση με την *T. delbrueckii*, η οποία δεν έχει τον απαραίτητο χρόνο να αυξήσει τον πληθυσμό της (Taillandier et al., 2014). Από τους Mauricio et al. (1998) and Hansen et al. (2001) αναφέρθηκε ότι η έλλειψη οξυγόνου μπορεί να προκαλέσει τον θάνατο των κυττάρων της *T. delbrueckii* σε μικτές καλλιέργειες. Ωστόσο σε άλλα πειράματα δεν φαίνεται αυτό να επιβεβαιώνεται, εφόσον εκτελέστηκαν σε αναερόβιες συνθήκες και η βιωσιμότητα της *T. delbrueckii* παρέμενε σε υψηλό επίπεδο είτε σε διαδοχική είτε σε μικτή καλλιέργεια (Taillandier et al., 2014). Μια άλλη εξήγηση για την μείωση της βιωσιμότητας της *T. delbrueckii*, θα μπορούσε να είναι η παραγωγή κάποιου άγνωστου μεταβολίτη από τον *S. cerevisiae*. Αποτελέσματα από πείραμα των Taillandier et al. (2014) υποδεικνύουν ένα φαινόμενο amensalism το οποίο ασκήθηκε από τον *S. cerevisiae* προς την *T. delbrueckii*. Αυτό το είδος αλληλεπίδρασης μεταξύ των ζυμών έχει επίσης αναφερθεί και από τους Farkas et al. (2005). Ακόμη είχε αναφερθεί από τους Ciani et al. το 2010 ότι κάποιες αρνητικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του *S. cerevisiae* και ζυμών non-*Saccharomyces* μπορεί να οφείλονται στην παραγωγή ακεταλδεΐδης ή ακετόνης. Επιπλέον, άλλοι συγγραφείς έχουν προτείνει ότι οι τοξίνες killer μπορεί να ευθύνονται για το φαινόμενο amensalism έναντι των non-*Saccharomyces* ζυμών. Ωστόσο, σε άλλα πειράματα δεν φαίνονται οι K2 τοξίνες, προερχόμενες από τον *S. cerevisiae* να εμποδίζουν συγκεκριμένα την ανάπτυξη της *T. delbrueckii*, εφόσον έχουν εξεταστεί 17 στελέχη της για το συγκεκριμένο λόγο, και κανένα από αυτά δεν έδειξε να επηρεάζεται (Renault et al., 2009). Το 2010, οι Albergaria et al, βρήκαν επίσης κάποια 2-10 kDa πεπτιδία τα οποία παράγονται από τον *S. cerevisiae*, και μπορούν να προκαλέσουν αναστολή στην ανάπτυξη των στελεχών της *T. delbrueckii*, ωστόσο το φαινόμενο αυτό απαιτεί εκτενέστερη έρευνα (Taillandier et al., 2014). Κάποιες άλλες πιθανές εξηγήσεις που δόθηκαν σχετικά με την αναστολή της ανάπτυξης της *T. delbrueckii*, οι οποίες μπορεί να ισχύουν και για άλλες non-*Saccharomyces* ζύμες που συμμετέχουν σε μικτές καλλιέργειες με τον *S. cerevisiae* δόθηκαν από τους Nissen et al. το 2003 μέσω πειραμάτων που διεξάχθηκαν και είναι οι παρακάτω:

- Παρόμοια συμπεριφορά ανάπτυξης της ζύμης και σε καθαρή καλλιέργεια

Θα μπορούσε να είναι μία εξήγηση αν η ζύμη non-*Saccharomyces* που χρησιμοποιείται έχει παρόμοια συμπεριφορά ανάπτυξης και σε καθαρή καλλιέργεια ζύμωσης. Ωστόσο, στο συγκεκριμένο πείραμα η *T. delbrueckii* σε καθαρή καλλιέργεια ζύμωσης σταμάτησε την ανάπτυξή της σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις κυττάρων και σε μεγαλύτερη συγκέντρωση αιθανόλης.

- Παρουσία ουσιών οι οποίες λειτουργούν ανασταλικά στην ανάπτυξη των ζυμών

Η παρουσία της αιθανόλης μπορεί να αποβεί τοξική για τα κύτταρα των ζυμών και λόγω αυτού να προκληθεί αναστολή της ανάπτυξης τους. Το ίδιο μπορεί να συμβεί και με τις τοξίνες killer, οι οποίες έχει βρεθεί ότι παράγονται από τον μεταβολισμό του *S. cerevisiae*, όπως επίσης και με την παραγωγή λιπαρών οξέων μεσαίας αλυσίδας που παράγονται από τις ζύμες. Η *T. delbrueckii* εξετάστηκε στις συγκεκριμένες ουσίες και δεν βρέθηκε κάποια από αυτές να είναι υπεύθυνη για την αναστολή της ανάπτυξης της.

- Παρουσία κυττάρων του *S. cerevisiae*

Έχει παρατηρηθεί ότι οι υψηλές συγκεντρώσεις κυττάρων του *S. cerevisiae* μπορεί να προκαλέσουν αναστολή στην ανάπτυξη άλλων ζυμών. Εξετάστηκε το συγκεκριμένο φαινόμενο με παρουσία μεγαλύτερης ποσότητας κυττάρων του *S. cerevisiae* στην εκθετική φάση σε καθαρή καλλιέργεια της *T. delbrueckii*. Προστέθηκαν ενεργώς μεταβολικά κύτταρα του *S. cerevisiae* στις 30 ώρες ανάπτυξης και στις 15 ώρες και παρατηρήθηκε αναστολή της ανάπτυξης της *T. delbrueckii*. Επίσης εξετάστηκε και η προσθήκη μεταβολικώς ανενεργών αλλά ενζυμικώς ενεργών κυττάρων του *S. cerevisiae* και η ανάπτυξη συνεχίστηκε για 24 ώρες. Αυτό υποδηλώνει ότι η παρουσία μεταβολικώς ενεργών κυττάρων του *S. cerevisiae* μπορεί να προκαλέσει την αναστολή της ανάπτυξης της *T. delbrueckii*.

- Μηχανισμός επαφής κυττάρου-κυττάρου (cell-cell contact)

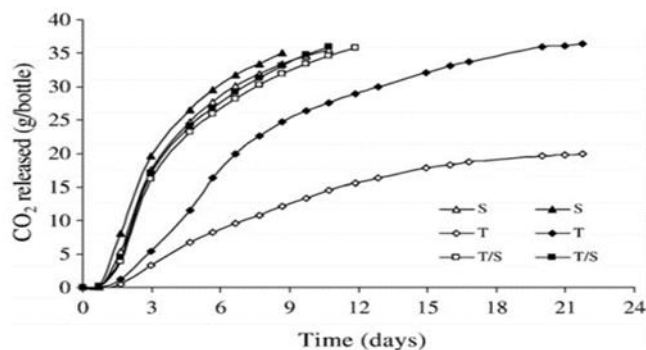
Στα κύτταρα, είναι γνωστός ο μηχανισμός επαφής κυττάρου-κυττάρου με σκοπό την αναστολή ανάπτυξης σε υψηλές συγκεντρώσεις κυττάρων, όπως συμβαίνει και στα βακτήρια. Στο συγκεκριμένο πείραμα των Nissen et al. (2003) εξετάστηκε το συγκεκριμένο φαινόμενο χρησιμοποιώντας στις μικτές καλλιέργειες της *T. delbrueckii* και του *S. cerevisiae* έναν σωλήνα διάλυσης (dialysis tube), ο οποίος χώριζε την καλλιέργεια σε δύο διαμερίσματα, μεταξύ των οποίων υπήρχε διέλευση διαλυτών (solutes), αλλά όχι κυττάρων. Και οι δύο ζύμες αναπτύχθηκαν εντός και εκτός του σωλήνα διάλυσης. Η *T. delbrueckii* έφτασε στη στατική φάση σε αντίστοιχες συγκεντρώσεις κυττάρων με αυτές που είχε σε καθαρή καλλιέργεια ζύμωσης. Λαμβάνοντας υπόψιν το γεγονός ότι μπορούσε να αναπτυχθεί στη μικτή καλλιέργεια, αποκλείοντας την πιθανότητα επίδρασης μιας ένωσης που λειτουργεί ανασταλτικά για την ανάπτυξή της με μοριακό βάρος υψηλότερο από την τιμή για την αποκοπή της μεμβράνης του σωλήνα διάλυσης, το συμπέρασμα ήταν ότι η συγκεκριμένη ζύμη χρησιμοποιεί κάποιον μηχανισμό επαφής κυττάρου-κυττάρου, ο οποίος ρυθμίζει την ανάπτυξη των κυττάρων της όταν βρίσκονται σε μικτές καλλιέργειες.

Στο συγκεκριμένο πείραμα τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο συνδυασμός της παρουσίας ενεργών μεταβολικά κυττάρων και ο μηχανισμός επαφής κυττάρου-κυττάρου μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη της *T. delbrueckii* και να την αναστείλει (Nissen et al., 2003).

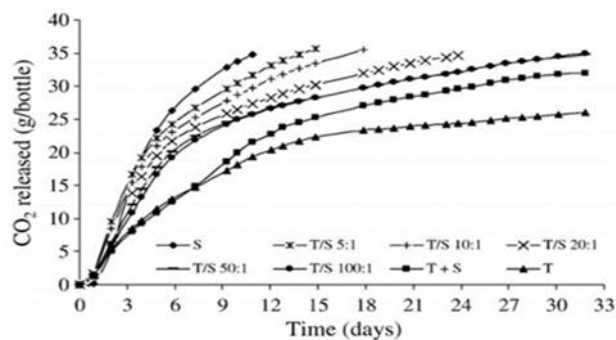
- Ανταπόκριση σε συνθήκες στρες

Όπως αναφέρθηκε οι ζύμες μπορεί να βρεθούν σε συνθήκες οι οποίες προκαλούν στρες στα κύτταρα τους. Η πιο πιθανή αιτία στρες είναι η αυξημένη συγκέντρωση των σακχάρων στο υπόστρωμα. Η *T. delbrueckii* και ο *S. cerevisiae* εξετάστηκαν σε συνθήκες με αυξημένες συγκεντρώσεις σακχάρων όταν εμβολιάστηκαν ταυτόχρονα, σε αναλογία εμβολίου 5:1, και διαδοχικά, όπου ο *S. cerevisiae* εμβολιάστηκε έπειτα από 5 ημέρες, σε γλεύκος από σταφύλια με *botrytis cinerea* με περιεκτικότητα σακχάρων 360 g/L. Το στέλεχος της *T. delbrueckii* που χρησιμοποιήθηκε ήταν το *T. delbrueckii* 31703. Οι ζυμώσεις διεξάχθηκαν σε παστεριωμένο και μη παστεριωμένο γλεύκος και τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με τις μονές καλλιέργειες του *S. cerevisiae* και της *T. delbrueckii*. Στις μικτές ζυμώσεις η παραγωγή αιθανόλης έφτασε την απαιτούμενη συγκέντρωση, 14% v/v, ενώ αντίθετα στις ζυμώσεις με διαδοχικό εμβολιασμό, ο οποίος έλαβε χώρα σε μη παστεριωμένο γλεύκος, όταν η συγκέντρωση της αιθανόλης βρισκόταν στο 5% v/v, η ζύμωση διακόπηκε όταν η περιεκτικότητα της αιθανόλης έφτασε στο 13.15% v/v. Οι μικτές ζυμώσεις σε μη παστεριωμένο γλεύκος ήταν ταχύτερες από εκείνες όπου το γλεύκος ήταν παστεριωμένο, το οποίο υποδηλώνει ότι οι non-*Saccharomyces* ζύμες που βρίσκονταν στην επιφάνεια των σταφυλιών και έπειτα στο γλεύκος ευνόησαν την ταχύτητα της ζύμωσης. Ωστόσο και οι δύο μικτές ζυμώσεις ήταν πιο αργές συγκριτικά με τις ζυμώσεις που διεξάχθηκαν μόνο από τον *S. cerevisiae*. Στις μικτές καλλιέργειες ζύμωσης σε μη παστεριωμένο γλεύκος παρατηρήθηκε επίσης η ανάπτυξη διαφορετικών πληθυσμών, γεγονός το οποίο υποδηλώνει πιθανό ανταγωνισμό μεταξύ των non-*Saccharomyces* και *Saccharomyces* μικροοργανισμών, σε κρίσιμες συγκεντρώσεις αζώτου, οι οποίες περιόρισαν την ανάπτυξη των κυττάρων του *Saccharomyces*. Οι συγκεντρώσεις των κυττάρων των non-*Saccharomyces* και

Saccharomyces ζυμών ήταν σε παρόμοια επίπεδα έπειτα από την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης. Στις μικτές ζυμώσεις παρατηρήθηκε μείωση στην ανάπτυξη του *S. cerevisiae*, το οποίο ήταν ένα αξιοσημείωτο γεγονός. Ωστόσο, αυτή η παρατήρηση διαφέρει από τις παρατηρήσεις άλλης έρευνας, όπου οι Nissen et al. (2004); Nissen και Arneborg (2003) παρατήρησαν ότι στις μικτές καλλιέργειες των δύο αυτών μικροοργανισμών, η ανάπτυξη της *T. delbrueckii* αναστέλλεται νωρίτερα συγκριτικά με την ανάπτυξη του *S. cerevisiae*. Αυτές οι αποκλίσεις στα αποτελέσματα των πειραμάτων πιθανότατα οφείλονται στις διαφορές διεξαγωγής της αλκοολικής ζύμωσης, όσον αφορά την περιεκτικότητα των θρεπτικών συστατικών, την αναλογία εμβολίου και την περιεκτικότητα σακχάρων. Στο συγκεκριμένο πείραμα η ποσότητα σακχάρων ήταν αυξημένη και όπως έχει αναφερθεί ήδη, ο *S. cerevisiae* ανταποκρίνεται στην εξωτερική αυξημένη ωσμωτική πίεση με αύξηση της πτητικής οξύτητας που παράγεται από το μεταβολισμό του. Στις μικτές ζυμώσεις με την *T. delbrueckii*, παρατηρήθηκε μείωση στην παραγωγή της πτητικής οξύτητας και συγκεκριμένα στα πρώτα στάδια της ζύμωσης. Αυτό επιβεβαιώνει ότι η *T. delbrueckii* δεν ανταποκρίνεται στο ωσμωτικό στρες με τον ίδιο τρόπο με τον *S. cerevisiae* και αυτό το χαρακτηριστικό της διατηρείται και στις μικτές αλλά και στις διαδοχικές ζυμώσεις. Επιπλέον στη συγκεκριμένη μελέτη εξετάστηκαν και διαφορετικές αναλογίες εμβολίου της *T. delbrueckii* και του *S. cerevisiae* σε μη παστεριωμένο γλεύκος, με αυτές να ποικίλουν από 5:1 έως 100:1. Σε όλες τις αναλογίες, οι μικτές ζυμώσεις είχαν μεγαλύτερη διάρκεια ζύμωσης, η οποία διαφέρει από 15 έως 32 ημέρες, συγκριτικά με τις ζυμώσεις μόνο με τον *S. cerevisiae*, οι οποίες ολοκληρώθηκαν στις 11 ημέρες. Η υψηλότερη συγκέντρωση κυττάρων στο τέλος της ζύμωσης παρατηρήθηκε στην μικτή καλλιέργεια με αναλογία εμβολίου 5:1 (*T. delbrueckii*/*S. cerevisiae*), συγκέντρωση κυττάρων η οποία ήταν παρόμοια με την καθαρή καλλιέργεια με τον *S. cerevisiae*. Οργανοληπτικά, η περιεκτικότητα της γλυκερόλης στις μικτές ζυμώσεις δεν εμφάνισε αξιοσημείωτες διαφορές συγκριτικά με τις ζυμώσεις μόνο με τον *S. cerevisiae*. Η πτητική οξύτητα ήταν χαμηλότερη και σε διαφορετικές αναλογίες εμβολίου στις μικτές καλλιέργειες, σε σύγκριση με τις ζυμώσεις του *S. cerevisiae*, με αξιοσημείωτη διαφορά ίσως μέχρι και 95%. Εξετάστηκε επίσης και το στέλεχος *T. delbrueckii* 27828, στις ίδιες συνθήκες και παρατηρήθηκαν παρόμοια αποτελέσματα. Τα αποτελέσματα από τις μικτές καλλιέργειες έδειξαν ότι σε αντίθεση με την καθαρή καλλιέργεια της *T. delbrueckii* που αναφέρθηκε παραπάνω, η ζύμωση ολοκληρώθηκε και με την απαιτούμενη περιεκτικότητα αιθανόλης αλλά και με τη μείωση της πτητικής οξύτητας που αποτελεί πρόβλημα στις ζυμώσεις με αυξημένη ποσότητα σακχάρων που διεξάγονται μόνο από τον *S. cerevisiae*. Οι διαδοχικές ζυμώσεις παρατηρήθηκε ότι δεν έχουν ιδιαίτερα θετικά αποτελέσματα, εξαιρώντας το οργανοληπτικό κομμάτι που ήταν παρόμοιο με τις μικτές καλλιέργειες. Συμπερασματικά εκ των αποτελεσμάτων του συγκεκριμένου πειράματος, προτείνεται ότι η καλύτερη αναλογία εμβολίου για τα συγκεκριμένα στελέχη σε μικτή καλλιέργεια ζύμωσης, είναι η αναλογία 20:1 (Bely et al., 2008).



Εικόνα 13: Ζυμωτική διαδικασία στους 23° C. Παστεριωμένο γλεύκος (ανοιχτά σύμβολα) και μη παστεριωμένο (σκούρα σύμβολα) με καθαρές καλλιέργειες του *S. cerevisiae* ST (S), καθαρές καλλιέργειες της *T. delbrueckii* 31703(T) και μικτές των *T. delbrueckii* 31703/*S. cerevisiae* ST (T/S).



Εικόνα 14: Ζυμωτική διαδικασία στους 23° C, σε μη παστεριωμένο γλεύκος με) με καθαρές καλλιέργειες του *S. cerevisiae* ST (S), καθαρές καλλιέργειες της *T. delbrueckii* 31703 (T) και μικτές των *T. delbrueckii* 31703/*S. cerevisiae* ST (T/S) με πυκνότητα στο στέλεχος της *T. delbrueckii* 31703 10^7 κύτταρα/mL (Bely et al., 2008).

4.2 Ανάπτυξη και ζυμωτική συμπεριφορά σε ζυμώσεις ζύθου

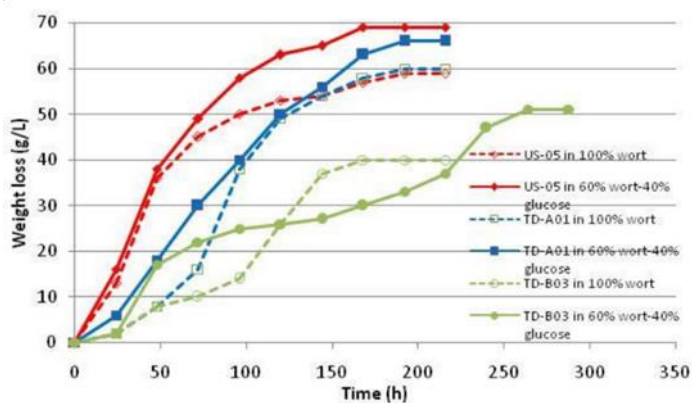
Η διαδικασία παραγωγής ζύθου είναι μία εξίσου πολύπλοκη βιοχημική διαδικασία όπως είναι και η διαδικασία παραγωγής οίνου. Για την παραγωγή ζύθου εμβολιάζεται το στέλεχος ή τα στελέχη ζύμης που έχουν επιλεγεί, στο ζυθογλεύκος, το οποίο έχει προέλθει από την πολτοποίηση και το βρασμό της βύνης, με σκοπό την παραγωγή αιθανόλης και διοξειδίου του άνθρακα, αλλά και της παραγωγής δευτερευόντων προϊόντων που προέρχονται από το μεταβολισμό των ζυμών και συμβάλλουν στην δομή και την ανάδειξη των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του ζύθου. Κατά τη διάρκεια της ζυμωτικής διαδικασίας, υπάρχουν κάποιοι παράμετροι οι οποίοι παρακολουθούνται και αξιολογούνται, διότι κάποιοι από αυτούς μπορούν να επηρεάσουν τη ζύμη και κατ' επέκταση όλη τη διαδικασία. Τέτοιοι παράμετροι είναι το pH, η θερμοκρασία, η συγκέντρωση των σακχάρων (υψηλοί °Plato ή °Brix δείχνουν υψηλή συγκέντρωση σακχάρων και το αντίστροφο), η κινητική ανάπτυξης των ζυμών, η παραγωγή αιθανόλης, η αντοχή των ζυμών στην παρουσία του λυκίσκου καθώς και η ποσότητα των θρεπτικών συστατικών που υπάρχουν σε αυτό. Ο τρόπος με τον οποίο λειτουργεί η *T. delbrueckii* στη ζυμωτική διαδικασία παραγωγής ζύθου και στις διάφορες παραμέτρους που αναφέρθηκαν θα αναλυθεί παρακάτω.

4.2.1 Ζυμώσεις με εμβολιασμό καθαρής καλλιέργειας της *T. delbrueckii* και μικτές ζυμώσεις σε συνεργασία με τον *S. cerevisiae*

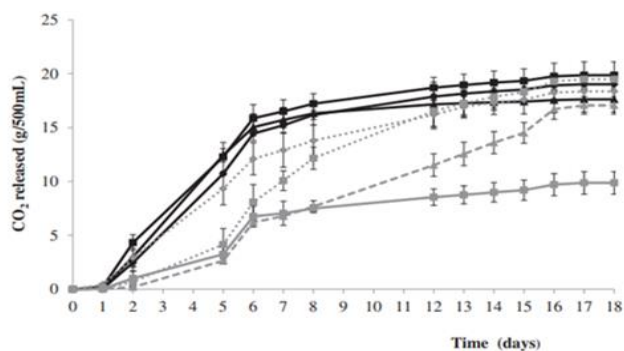
➤ Κατανάλωση σακχάρων και κινητική ζύμωσης

Όπως έχει ήδη αναφερθεί το ζυθογλεύκος αποτελείται από διάφορα σάκχαρα, όπως είναι η γλυκόζη, η φρουκτόζη, η σακχαρόζη, η μαλτοτριόζη και η μαλτόζη, η οποία συνήθως βρίσκεται και σε μεγαλύτερη ποσότητα και η ικανότητα των ζυμών να την καταναλώνουν αποτελεί κεντρικό ενδιαφέρον στη διαδικασία παραγωγής ζύθου. Από πειράματα που έχουν διεξαχθεί σε διάφορες μελέτες φαίνεται πως υπάρχει ποικιλομορφία ως προς την κατανάλωση των σακχάρων από τα στελέχη της *T. delbrueckii*, τα οποία φαίνεται να μπορούν να ζυμώσουν τη γλυκόζη, τη φρουκτόζη και τη σακχαρόζη, ωστόσο μόνο ελάχιστα στελέχη είναι ικανά να ζυμώσουν τη μαλτόζη. Πιο συγκεκριμένα, στο πείραμα των Canonic et al., 2016, μελετήθηκαν 28 στελέχη της *T. delbrueckii*, εκ των οποίων μόνο τα 8 βρέθηκαν ικανά

ως προς την κατανάλωση της μαλτόζης, αλλά μόνο 1 (DiSVA 254) έδειξε καλή ζυμωτική ικανότητα, αντίστοιχη με εκείνη του *S. cerevisiae*. Αντίστοιχα αποτελέσματα είχαν και οι Michel et al., 2016, όπου στο δικό τους πείραμα εξετάστηκαν 10 στελέχη της *T. delbrueckii* ως προς τη ζυμωτική ικανότητα των διάφορων σακχάρων και μόνο 1 βρέθηκε ικανό ως προς την κατανάλωση της μαλτόζης. Επίσης και σε άλλη πιο πρόσφατη μελέτη, οι Toh et al., 2020 χρησιμοποίησαν δύο εμπορικά στελέχη της *T. delbrueckii*, το Biodiva και το Prelude, εκ των οποίων το ένα (Biodiva) ήταν ανίκανο ως προς την κατανάλωση της μαλτόζης. Έχει αποδειχθεί ότι για την κατανάλωση κάποιων σακχάρων είναι απαραίτητο κάποιο ένζυμο, όπως είναι το ένζυμο της ινβερτάσης, το οποίο απαιτείται για τη μετατροπή της σακχαρόζης σε γλυκόζη και φρουκτόζη, το οποίο φαίνεται να διαθέτουν τα στελέχη της *T. delbrueckii*. Ωστόσο, για τη κατανάλωση της μαλτόζης απαιτείται ένας μεταφορέας αυτής και το ένζυμο της μαλτάσης, τα οποία φαίνεται ότι διαθέτουν μόνο λίγα στελέχη αυτού του μικροοργανισμού (Michel et al., 2016). Οι ζυμώσεις για παραγωγή ζύθου με καθαρή καλλιέργεια της *T. delbrueckii* χαρακτηρίζονται ως εκείνες με τον πιο αργό ρυθμό ζύμωσης συγκριτικά με τις μικτές ζυμώσεις όπου συμμετέχει και ο *S. cerevisiae*, οι οποίες έχουν έναν ελαφρώς πιο επιβραδυνόμενο ρυθμό από τις καθαρές καλλιέργειες του *S. cerevisiae*, χωρίς όμως να υπάρχουν σημαντικά αξιοσημείωτες διαφορές, αν και ο ρυθμός κατανάλωσης σακχάρων για τις μικτές ζυμώσεις εξαρτάται από την επιλογή των στελεχών των δύο μικροοργανισμών αλλά και από την αναλογία που έχει επιλεγεί για τον εμβολιασμό. Η διάρκεια των ζυμώσεων είτε με καθαρή καλλιέργεια της *T. delbrueckii*, είτε σε συνεργασία με τον *S. cerevisiae* κυμαίνονται περίπου από 9 έως 14 ημέρες, ωστόσο υπάρχουν ζυμώσεις που έχουν διαρκέσει έως και 18 με 19 ημέρες (Canonico et al., 2016, 2017; Drosou et al., 2018; Tataridis et al., 2013, 2016; Toh et al., 2018).

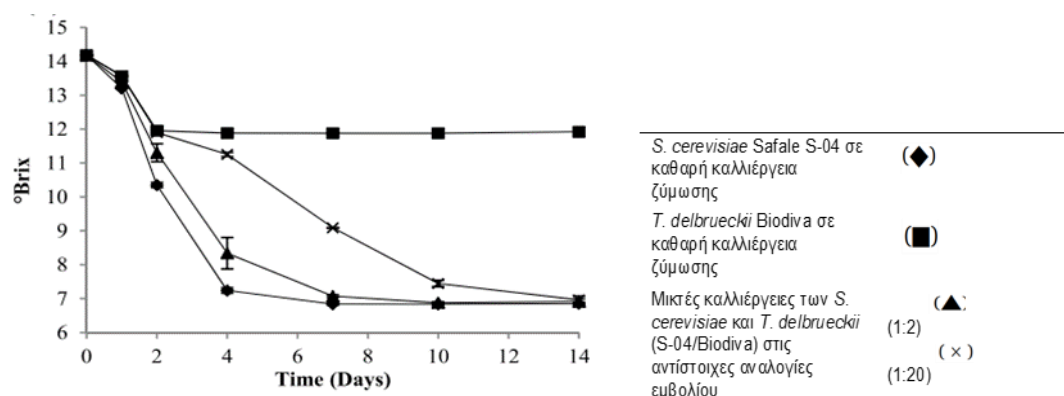


Εικόνα 15: Διάγραμμα κινητικής ζύμωσης καθαρών καλλιεργειών του *S. cerevisiae* (US-05) και της *T. delbrueckii* (TD-A01, TD-B03) σε 100% ζυθογλεύκος και σε ζυθογλεύκος εμπλουτισμένο με γλυκόζη (60% και 40% γλυκόζη) (Tataridis et al., 2016).



Καθαρές καλλιέργειες του <i>S. cerevisiae</i>	US-05 (—●—); WB-06 (—■—); Belgian wheat (—▲—)
Καθαρή καλλιέργεια της <i>T. delbrueckii</i>	(—■—)
Μικτές ζυμώσεις των δύο μικροοργανισμών	US-05 + <i>T. delbrueckii</i> (—+—); WB-06 + <i>T. delbrueckii</i> (—■+—); Belgian wheat + <i>T. delbrueckii</i> (—▲+—)

Εικόνα 16: Διάγραμμα κινητικής ζύμωσης καθαρών και μικτών ζυμώσεων (Canonico et al., 2017)

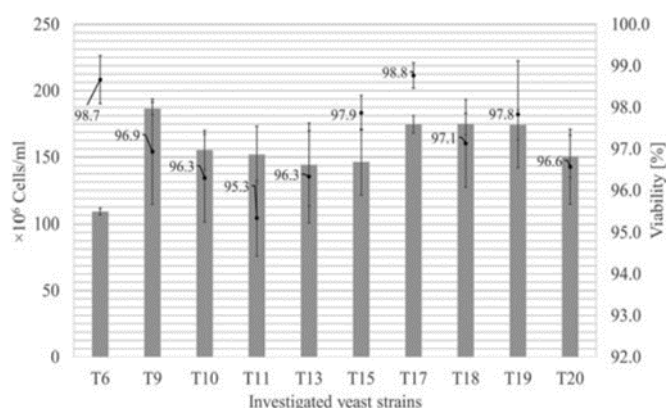


Εικόνα 17: Διάγραμμα κατανάλωσης σακχάρων. Οι °Brix αντιστοιχούν στο ποσοστό των σακχάρων που καταναλώνεται όσο προχωράει η ζυμωτική διαδικασία, όσο πιο γρήγορα μειώνονται οι °Brix τόσο πιο γρήγορος είναι και ο ρυθμός της ζύμωσης (Toh et al., 2018).

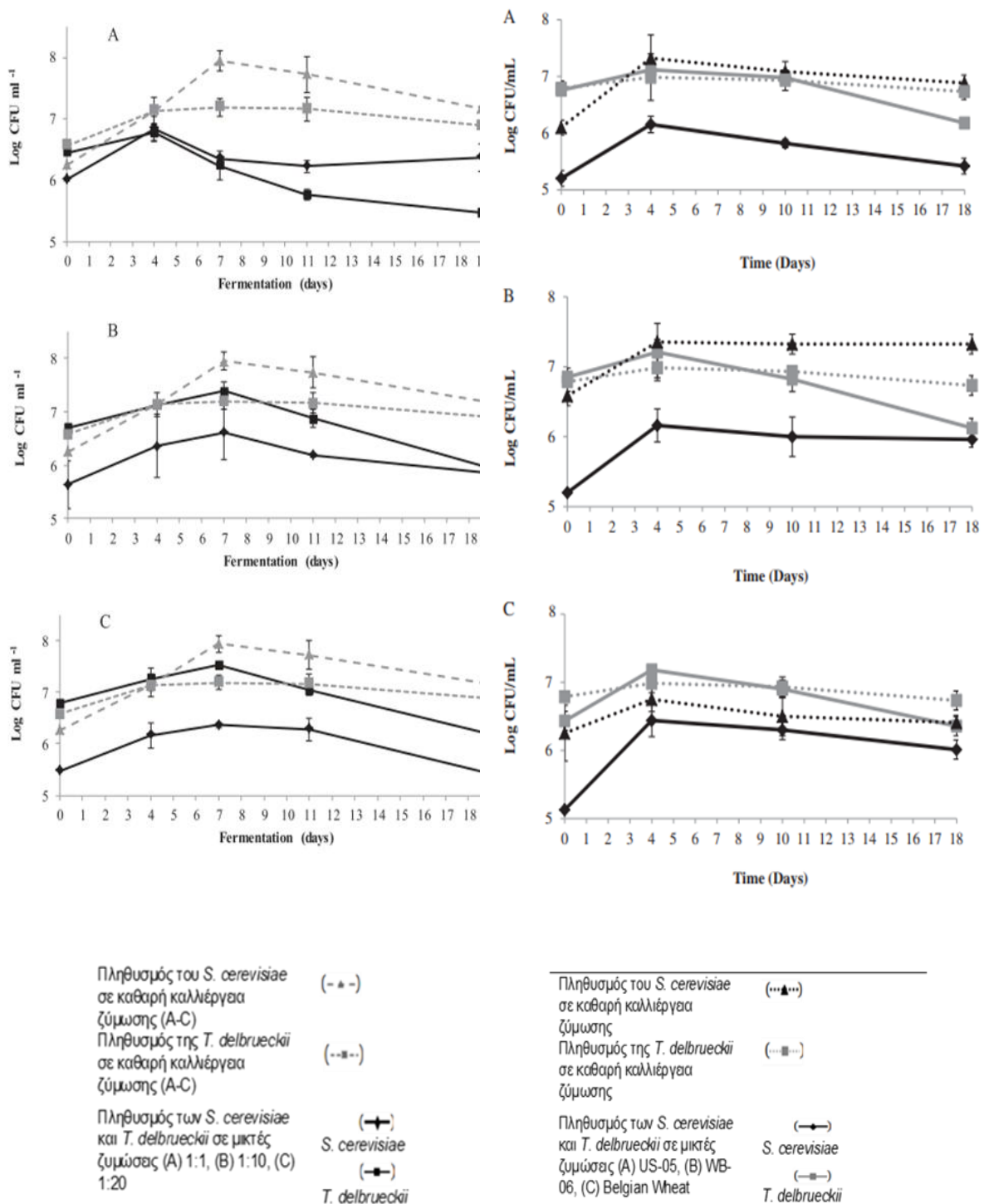
➤ Κινητική ανάπτυξης και βιωσιμότητα

Η *T. delbrueckii* στις καθαρές καλλιέργειες ζύμωσης φαίνεται ότι διατηρεί ένα καλό ποσοστό βιωσιμότητας των κυττάρων της στο τέλος της ζυμωτικής διαδικασίας, όπως δείχνουν τα αποτελέσματα πειράματος, στο οποίο εξετάστηκαν διάφορα στελέχη, και τα ποσοστά βιωσιμότητας κυμάνθηκαν από 98.8% έως 95.3% (Michel et al., 2016). Εξίσου σε άλλη πιο πρόσφατη έρευνα που εξετάστηκαν δύο εμπορικά στελέχη της *T. delbrueckii* αναφέρθηκαν αποτελέσματα καλής κινητικής ανάπτυξης και βιωσιμότητας (Toh et al., 2020). Στις μικτές ζυμώσεις με τον *S. cerevisiae* φαίνεται να υπάρχει κάποιου είδους ανταγωνισμός μεταξύ των δύο ειδών ζύμης, με την *T. delbrueckii* να κυριαρχεί σε κάποιες περιπτώσεις και τον *S. cerevisiae* να επηρεάζει την ανάπτυξη της *T. delbrueckii* σε κάποιες άλλες. Ωστόσο φαίνεται πως ο βαθμός αυτού του ανταγωνισμού εξαρτάται από την αναλογία του εμβολίου που έχει επιλεγεί αλλά και από το στέλεχος του *S. cerevisiae* που χρησιμοποιείται. Πιο συγκεκριμένα, σε αναλογία εμβολίου 1:20 (*S. cerevisiae*/*T. delbrueckii*) με τα στελέχη US-05/DiSVA 254 φαίνεται η *T. delbrueckii* να κυριαρχεί στη διαδικασία, εφόσον τα αποτελέσματα του πειράματος δείχνουν ότι ο *S. cerevisiae* σημείωσε χαμηλότερες τιμές βιομάζας (περίπου 10^6 CFU/mL έως την 4^η ημέρα ζύμωσης, με ελαφριά πτώση στο τέλος)

συγκριτικά με τις καθαρές καλλιέργειες ζύμωσής του ($>10^7$ CFU/mL), ενώ το στέλεχος της *T. delbrueckii* είχε παρόμοιες τιμές με αυτές της καθαρής καλλιέργειας ζύμωσής του (Canonico et al., 2016, 2017, 2020). Αυτό επιβεβαιώνεται και από άλλη έρευνα, όπου σε αναλογία 1:20 (*S. cerevisiae* Safale S-04/*T. delbrueckii* Biodiva) το στέλεχος του *S. cerevisiae* παρουσίασε επιβράδυνση στο ρυθμό ανάπτυξης αλλά και στον πληθυσμό (Toh et al., 2018). Αντίστοιχη κυριαρχία από την *T. delbrueckii* σε μικτή ζύμωση με τον *S. cerevisiae* παρατηρήθηκε και σε αναλογία εμβολίου 1:10 με τα ίδια στελέχη, *S. cerevisiae* US-05/*T. delbrueckii* DiSVA 254, που είχαν επιλεχθεί και για την ζύμωση με αναλογία εμβολίου 1:20 (Canonico et al., 2016). Ωστόσο σε αναλογία εμβολίου 1:20, με διαφορετικό στέλεχος για τον *S. cerevisiae* (WB-06), παρατηρήθηκε ότι η βιωσιμότητα των κυττάρων ήταν περίπου στο 10^6 CFU/mL, όπως και σε προηγούμενη περίπτωση τέτοιας αναλογίας, αλλά σε αυτόν τον συνδυασμό ίσχυε και για τους δύο μικροοργανισμούς, το οποίο υποδηλώνει ότι το στέλεχος WB-06 επηρέασε την ανάπτυξη του στελέχους της *T. delbrueckii*. Σε άλλη περίπτωση μικτής ζύμωσης, σε αναλογία επίσης 1:20 (Belgian Wheat/DiSVA 254), φαίνεται πως το στέλεχος Belgian Wheat είχε παρόμοια αποτελέσματα με την καθρή καλλιέργειά του, γεγονός που δείχνει ότι η *T. delbrueckii* δεν το επηρέασε. Ο ανταγωνισμός μεταξύ των δυο μικροοργανισμών μπορεί να επιβεβαιωθεί και από τα χαμηλά βιώσιμα κύτταρα της *T. delbrueckii* στο τέλος της διαδικασίας (Canonico et al., 2017). Έχει αναφερθεί επίσης και σε αναλογία εμβολίου 1:1 των δύο μικροοργανισμών (US-05/DiSVA 254) ότι το στέλεχος του *S. cerevisiae* σημείωσε χαμηλότερα επίπεδα βιομάζας συγκριτικά με την καθρή καλλιέργεια ζύμωσής του, γεγονός το οποίο επιβεβαιώνει επίσης τον ανταγωνισμό μεταξύ των δύο ειδών και όπως αναφέρεται στην αντίστοιχη έρευνα, οι μικροοργανισμοί «υποφέρουν» ο ένας από την παρουσία του άλλου (Canonico et al., 2016). Ωστόσο σε διαφορετική έρευνα των Toh et al. (2018) σε αναλογία 1:2 (*S. cerevisiae* Safale S-04/*T. delbrueckii* Biodiva), το στέλεχος της *T. delbrueckii* ήταν εκείνο όπου παρουσίασε πρόωρο θάνατο, ενώ το στέλεχος του *S. cerevisiae* είχε παρόμοια συμπεριφορά με αυτήν στην καθρή καλλιέργεια ζύμωσης του. Και αυτό το γεγονός υπογραμμίζει τον ανταγωνισμό που υπάρχει μεταξύ των δύο ζυμών και την επιρροή που μπορεί να ασκηθεί ως προς την ανάπτυξη, όπου στη συγκεκριμένη περίπτωση θα μπορούσε να οφείλεται στη δραστηριότητα killer του *S. cerevisiae*, ή σε κάποια απελευθέρωση μεταβολιτών από αυτόν τον μικροοργανισμό ή στον μηχανισμό επαφής κυττάρου-κυττάρου. Τέτοιες αλληλεπιδράσεις σημειώνονται μεταξύ των μικροοργανισμών αυτών και στις ζυμώσεις παραγωγής οίνου, όπως έχει ήδη αναφερθεί (Toh et al., 2018).



Εικόνα 18: Αποτελέσματα πληθυσμού καθαρών καλλιιεργειών με διαφορετικά στελέχη της *T. delbrueckii* (αριστερά, παρουσιάζονται ως γκρι στήλες) και η βιωσιμότητα των κυττάρων τους (δεξιά, παρουσιάζονται ως μαύρες κουκίδες) (Michel et al., 2016)



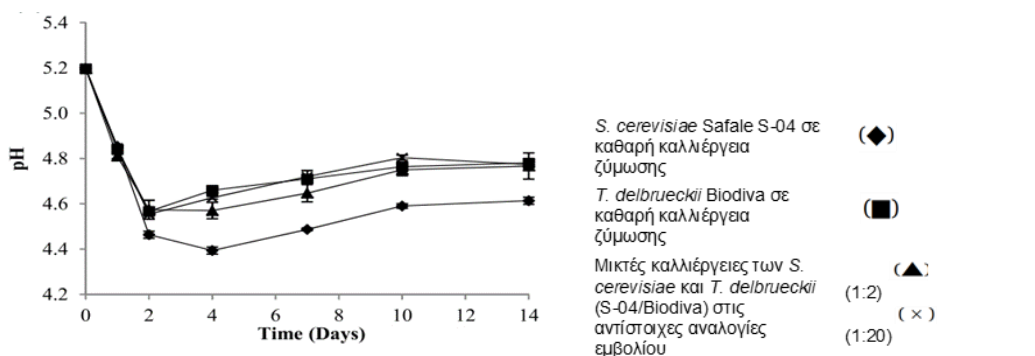
Εικόνα 19: Διαγράμματα κινητικής ανάπτυξης των ζυμών (Canonico et al., 2016, 2017)

➤ Αιθανόλη

Η ποσότητα της αιθανόλης που παράγεται στις ζυμώσεις με καθαρή καλλιέργεια της *T. delbrueckii* παρουσιάζει ποικιλομορφία. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι δεν είναι όλα τα στελέχη του συγκεκριμένου μικροοργανισμού ικανά να ζυμώσουν τη μαλτόζη, η οποία βρίσκεται και στο μεγαλύτερο ποσοστό στο ζυθογλεύκος. Η περιεκτικότητα της αιθανόλης σε πειραματικές ζυμώσεις με στελέχη που δεν ζυμώνουν την μαλτόζη είναι κοντά στο 0.94 v/v (Michel et al., 2016), ενώ έχει αναφερθεί και λίγο μεγαλύτερη συγκέντρωση, 1,33% v/v, σε καθαρή καλλιέργεια ζύμωσης με το εμπορικό στέλεχος της *T. delbrueckii*, Biodiva (Toh et al., 2020). Επίσης, έχει αναφερθεί σε άλλο πείραμα όπου το στέλεχος της *T. delbrueckii* που χρησιμοποιήθηκε μπορούσε να ζυμώσει μόνο το 60% των σακχάρων, η συγκέντρωση της αιθανόλης έφτασε το 2,3% v/v (Tataridis et al., 2016). Σε άλλο βέβαια πείραμα το ποσοστό της αιθανόλης ήταν στο 2,62% v/v από στέλεχος (DiSVA 254) το οποίο ήταν ικανό να ζυμώσει τη μαλτόζη (Canonico et al., 2017). Στις μικτές ζυμώσεις με τον *S. cerevisiae* βέβαια, οι συγκεντρώσεις της αιθανόλης είναι χαμηλότερες συγκριτικά με τις καθαρές καλλιέργειες ζύμωσης του *S. cerevisiae*, ωστόσο οι τιμές δεν απέχουν υπερβολικά και κάποιες είναι αρκετά κοντά. Οι τιμές αυτές κυμαίνονται από 4.0% έως 4.89% v/v, σε ορισμένες περιπτώσεις ίσως είναι ελαφρώς υψηλότερες ή χαμηλότερες (Canonico et al., 2016, 2017, 2020; Drosou et al., 2018; Tataridis et al., 2016), λαμβάνοντας υπόψιν και τις διαφορετικές συνθήκες ζύμωσης που επικρατούν αλλά και τα στελέχη που έχουν επιλεγεί για την διεξαγωγή της ζυμωτικής διαδικασίας.

➤ Θερμοκρασία και pH

Η θερμοκρασία ζύμωσης στα πειράματα που έχουν διεξαχθεί στις περισσότερες μελέτες βρίσκεται στους 20° C χωρίς να αναφέρεται κάποιο πρόβλημα σχετικά με τη θερμοκρασία το οποίο θα μπορούσε να επηρεάσει τη ζυμωτική διαδικασία (Canonico et al., 2016, 2020; Drosou et al., 2018; Michel et al., 2016; Tataridis et al., 2013, 2016; Toh et al., 2018, 2020). Οι τιμές για το pH κυμαίνονται από 4.95 έως 5.47 (Michel et al., 2016), ίσως και υψηλότερο σε κάποιες περιπτώσεις (Canonico et al., 2020; Drosou et al., 2018). Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης έχουν αναφερθεί επίσης κάποιες πτώσεις στην τιμή του pH, κυρίως τις πρώτες ημέρες και έπειτα έχουν σημειωθεί κάποιες αυξήσεις (Drosou et al., 2018; Toh et al., 2018, 2020; Michel et al., 2016). Πτώσεις στην τιμή του pH αναφέρεται ότι μπορεί να οφείλονται στο ανθρακικό οξύ, το οποίο παράγεται από την απελευθέρωση του διοξειδίου του άνθρακα και ρυθμίζεται η εκροή πρωτονίων από ένα κανάλι H⁺ / K⁺ κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, λαμβάνοντας υπόψιν και τη χαμηλή παραγωγή των οργανικών οξέων που συμβαίνει τις πρώτες μέρες της διαδικασίας (Toh et al., 2020). Αυτές οι πτώσεις όμως, οι οποίες μπορεί να είναι και χαμηλότερες του 4.2, αναφέρεται ότι είναι απαραίτητες διότι το χαμηλό pH, σε συνδυασμό με την παραγωγή αιθανόλης, τις αντί-μικροβιακές ουσίες που προέρχονται από το λυκίσκο και το διοξείδιο του άνθρακα δημιουργούν ένα εχθρικό περιβάλλον για διάφορα βακτήρια, κυρίως τα Gram-αρνητικά, τα οποία θα μπορούσαν να δημιουργήσουν κάποιου είδους μόλυνση στο ζύθο προς παραγωγή (Michel et al., 2016).



Εικόνα 20: Διάγραμμα μεταβολής του pH σε αντίστοιχες καθαρές και μικτές ζυμώσεις των *S. cerevisiae* και *T. delbrueckii* (Toh et al., 2018).

➤ Αζωτο

Η ποσότητα του ελεύθερου αμμωνιακού αζώτου (FAN) στις διάφορες ζυμώσεις για την παραγωγή ζύθου κυμαίνεται από 200mg/L έως 263mg/L όπως φαίνεται από τα διάφορα πειράματα που έχουν διεξαχθεί (Canonico et al., 2016; Drosou et al., 2018; Michel et al., 2016). Επίσης αναφέρεται ότι η *T. delbrueckii* σε καθαρή καλλιέργεια ζύμωσης καταναλώνει σε πιο αργό ρυθμό το ελεύθερο αμμωνιακό άζωτο και αφήνει και μεγαλύτερη ποσότητα αυτού χωρίς να την έχει χρησιμοποιήσει συγκριτικά με τις καθαρές καλλιέργειες του *S. cerevisiae*, αλλά και τις μικτές όπου συμμετέχουν και οι δύο μικροοργανισμοί (Drosou et al., 2018), στις οποίες έχει αναφερθεί μεγαλύτερη κατανάλωση από τα δύο είδη ζυμών σε σύγκριση με τις καθαρές καλλιέργειες του *S. cerevisiae*, γεγονός το οποίο υποδηλώνει και επιβεβαιώνει ανταγωνισμό μεταξύ των μικροοργανισμών. (Canonico et al., 2016; Toh et al., 2018). Έχει αναφερθεί επίσης ότι ανάμεσα στα στελέχη της *T. delbrueckii* υπάρχει παρόμοια συμπεριφορά ως προς τον αναβολισμό και τον καταβολισμό των αμινοξέων σε πείραμα όπου εξετάστηκαν 10 διαφορετικά στελέχη αυτού του μικροοργανισμού (Michel et al., 2016). Ωστόσο σε πείραμα όπου αξιολογήθηκαν δύο εμπορικά στελέχη της *T. delbrueckii*, το Prelude και το Biodiva, τα αποτελέσματα του πειράματος έδειξαν διαφορά ως προς την κατανάλωση δύο αμινοξέων, αυτό της προλίνης και του γλουταμινικού οξέος για το στέλεχος της Biodiva. Στο ίδιο πείραμα αναφέρεται επίσης ότι αυτό το στέλεχος είχε χαμηλότερη κατανάλωση αμινοξέων συγκριτικά με το άλλο εμπορικό στέλεχος της *T. delbrueckii*. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ακόμη ότι η κατανάλωση της προλίνης στις ζυμώσεις παραγωγής ζύθου εμφανίζεται πιο φτωχή συνήθως συγκριτικά με την κατανάλωση άλλων αμινοξέων, ωστόσο σημαντική μείωση που έχει παρατηρηθεί σε κάποιες ζυμώσεις ζύθου μπορεί να έχει προκληθεί από την παρουσία οξυγόνου στη ζυμωτική διαδικασία, γεγονός το οποίο διευκολύνει το μεταβολισμό της προλίνης και την οξειδωσή της προς γλουταμινικό οξύ (Toh et al., 2020).

➤ Ανάπτυξη παρουσία λυκίσκου και ικανότητα μετά-ζύμωσης παρουσία λυκίσκου και αιθανόλης

Ο λυκίσκος είναι ένα συστατικό το οποίο προστίθεται στο ζυθογλεύκος και ενισχύει την πικράδα και τα αρώματα των ζύθων που παράγονται. Έχει επίσης και αντί-μικροβιακές ιδιότητες. Η μονάδα μέτρησής του είναι το IBU (διεθνείς μονάδες πικράδας) και αντιστοιχεί σε ποσότητα ίσο-α-οξέων. Ενδεικτικές τιμές για τους διαφορετικούς ζύθους είναι 15-20 IBU που αντιστοιχούν σε 15-20 mg/L ίσο-α-οξέων για τον ζύθο σίτου (wheat beer), 30-38 IBU για ζύθους Pils και για ζύθους IPAs (Indian Pale Ales, ζύθοι που έχουν πολλά αρωματικά χαρακτηριστικά, αρώματα φρούτων κυρίως, συνήθως με υψηλότερες συγκεντρώσεις αιθανόλης και πικράδας) έχουν υψηλότερες τιμές έως και 100 IBU. Η παρουσία του λυκίσκου στο ζυθογλεύκος σε κάποιες περιεκτικότητες θα μπορούσε να επηρεάσει την κινητική ανάπτυξης της ζύμης. Σε πείραμα στο οποίο εξετάστηκαν 10 στελέχη της *T. delbrueckii*, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλα τα στελέχη ήταν ικανά να αναπτυχθούν σε IBU των 50 και 90. Ωστόσο στην τιμή των 90 IBU παρατηρήθηκε μεγαλύτερη εκθετική φάση όπως και χαμηλότερη κλίση στη φάση αυτή συγκριτικά με τις τιμές IBU 50 και 0. Βραδύτερη ανάπτυξη παρατηρήθηκε επίσης σε μεγαλύτερες ποσότητες ίσο-α-οξέων (Michel et al., 2016). Επίσης στο ίδιο πείραμα εξετάστηκαν τα στελέχη της *T. delbrueckii* ως προς την ικανότητά τους να ζυμώσουν παρουσία λυκίσκου αλλά και συγκέντρωσης αιθανόλης 5% v/v και 10% v/v. Σε συγκέντρωση αιθανόλης 10% v/v δεν κατάφερε κανένα στέλεχος να αναπτυχθεί και η συγκέντρωση αιθανόλης της τάξης του 5% v/v ήταν θανατηφόρα μόνο για ένα στέλεχος, ενώ τα υπόλοιπα ήταν ικανά να ζυμώσουν τον 'πράσινο ζύθο' σε αυτή τη συγκέντρωση με σκοπό την ανάδειξη των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών. Από τα 10 στελέχη, τα 6 ήταν ικανά ως προς τη μετά-ζυμωτική διαδικασία παρουσία μεγάλης ποσότητα λυκίσκου και αιθανόλης 5% v/v (Michel et al., 2016).

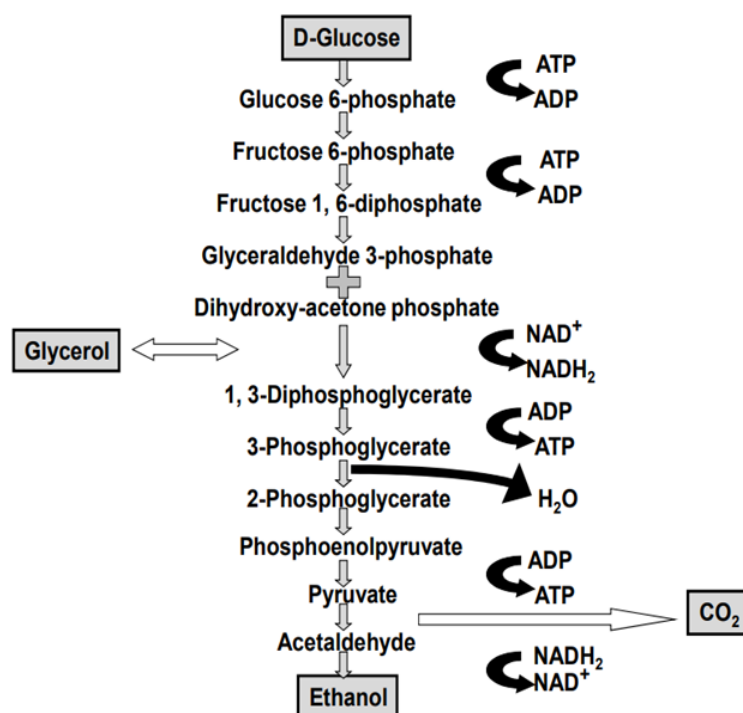
Κεφάλαιο 5: Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά στον οίνο και το ζύθο και η επίδραση της *T. delbrueckii* σε αυτά

5.1 Μεταβολικά μονοπάτια στη ζυμωτική διαδικασία

Η αλκοολική ζύμωση είναι μία περίπλοκη βιοχημική διαδικασία η οποία διεξάγεται από τους ζυμομύκητες, οι οποίοι είτε προϋπάρχουν στο υπόστρωμα, είτε εμβολιάζονται από τον εκάστοτε παραγωγό, και χρησιμοποιούν τα διαθέσιμα ζυμώσιμα σάκχαρα του υποστρώματος ως πηγή ενέργειας (ATP), με σκοπό την ανάπτυξή τους και την παραγωγή αιθανόλης, διοξειδίου του άνθρακα και άλλων παραπροϊόντων, υπεύθυνων για το άρωμα και τη γεύση των αλκοολούχων ποτών που προέρχονται από ζύμωση, όπως είναι ο οίνος και ο ζύθος. Τα προϊόντα που προκύπτουν από τη διαδικασία ζύμωσης είναι προϊόντα του μεταβολισμού των ζυμών και μπορούν να διαχωριστούν στα κύρια (αιθανόλη, διοξείδιο του άνθρακα, γλυκερόλη, ακεταλδεύδη) και τα δευτερεύοντα (ανώτερες αλκοόλες, εστέρες, θειούχες ενώσεις, οξέα κ.α).

5.1.1 Κύριο μεταβολικό μονοπάτι

Το κύριο μεταβολικό μονοπάτι των ζυμομυκήτων είναι η διάσπαση της γλυκόζης προς δύο μόρια πυροσταφυλικού οξέος, με την ταυτόχρονη παραγωγή δύο μορίων ATP (ενέργειας). Η διαδικασία αυτή ονομάζεται γλυκόλυση ή αλλιώς μονοπάτι E-M-P (Embden-Meyerhof-Parnas) και είναι κοινή μεταβολική διαδικασία είτε οι συνθήκες που επικρατούν είναι αερόβιες είτε αναερόβιες. Είναι γνωστό όμως, ότι η διαδικασία παραγωγής οίνου και ζύθου τελείται κυρίως υπό αναερόβιες συνθήκες και η απουσία του οξυγόνου είναι εκείνη που καθορίζει την πορεία του πυροσταφυλικού σε συνεργασία με τα ένζυμα. Η μεταβολική οδός της γλυκόλυσης είναι ο δρόμος που ακολουθείται από τις ζύμες του οίνου και του ζύθου για την παραγωγή των κύριων προϊόντων, όπως είναι η αιθανόλη, το διοξείδιο του άνθρακα και η γλυκερόλη. Κύριο ρόλο σε αυτή τη διαδικασία διεξάγουν η αντίδραση οξειδωσης και φωσφορυλίωσης της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεύδης, η οποία αποτελεί πρόδρομο για την σύνθεση της γλυκερόλης και η ταυτόχρονη αναγωγή ενός σημαντικού μεταβολίτη, του NAD⁺ σε NADH, ο οποίος είναι απαραίτητο να οξειδωθεί ξανά ώστε να υπάρχει συνεχής παροχή του στο κύτταρο και να μην σταματήσει η διαδικασία της γλυκόλυσης. Η επανοξείδωση του μεταβολίτη αυτού λαμβάνει χώρα μέσω της παραγωγής της αιθανόλης από το πυροσταφυλικό οξύ, με ενδιάμεσο προϊόν την ακεταλδεύδη. Η παραπάνω μεταβολική διαδικασία που λαμβάνει χώρα υπό αναερόβιες συνθήκες ονομάζεται αλκοολική ζύμωση και απεικονίζεται με όλα τα στάδια στην εικόνα 21.



Εικόνα 21: Σύνθεση κύριων προϊόντων ζύμωσης μέσω της μεταβολικής οδού της γλυκόλυσης (μονοπάτι E-M-P) (Stewart, 2017b)

5.1.2 Μεταβολικά μονοπάτια σύνθεσης δευτερευόντων προϊόντων στον οίνο και το ζύθο

Τα δευτερεύοντα προϊόντα της αλκοολικής ζύμωσης σχηματίζονται μέσω διαφόρων μεταβολικών μονοπατιών που ακολουθούν οι ζύμες και είναι ενώσεις οι οποίες συμβάλλουν στο άρωμα και τη γεύση του τελικού προϊόντος. Κατά γενική ομολογία, το άρωμα και η γεύση (flavour) στον οίνο και το ζύθο είναι καθοριστικά χαρακτηριστικά για την ποιότητα του προϊόντος που παράγεται, αλλά και χαρακτηριστικά τα οποία μπορούν να κάνουν ένα προϊόν να ξεχωρίσει από το σύνολο του. Υπάρχουν διάφοροι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν το οργανοληπτικό προφίλ του τελικού προϊόντος, όπως είναι οι διάφορες πρακτικές που ακολουθούνται αλλά και οι συνθήκες της γενικής διαδικασίας παραγωγής. Έναν από τους πιο σημαντικούς ρόλους διεξάγουν οι ζύμες, αφού μέσω του μεταβολισμού τους λαμβάνει χώρα η μεγαλύτερη παραγωγή τέτοιων ενώσεων, όποτε η επιλογή συγκεκριμένου είδους και στελέχους ζύμης είναι καθοριστική.

Για τον οίνο το άρωμα χωρίζεται σε τρεις κατηγορίες, το πρωτογενές, το οποίο προέρχεται από την πρώτη ύλη, το δευτερογενές, το οποίο δημιουργείται από το μεταβολισμό των ζυμών κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και το τριτογενές, το οποίο σχηματίζεται κατά τη διάρκεια της παλαίωσης/ωρίμανσης. Και οι τρεις κατηγορίες διεξάγουν σημαντικό ρόλο για το τελικό αποτέλεσμα που θα δημιουργηθεί και αντίστοιχα κάθε κατηγορία αρώματος εξαρτάται από κάποιους παράγοντες, όπως είναι η ποικιλία σταφυλιού, οι γενικές κλιματολογικές συνθήκες της περιοχής αλλά και οι καλλιεργητικές πρακτικές που ακολουθούνται όσον αφορά το πρωτογενές άρωμα, η επιλογή του είδους αλλά και του στελέχους κατά κύριο λόγο που θα χρησιμοποιηθεί και οι συνθήκες ζύμωσης για το δευτερογενές άρωμα, αλλά και η επιλογή του δοχείου που θα φιλοξενήσει το αντίστοιχο προϊόν για την ωρίμανσή του καθώς και οι συνθήκες και πρακτικές που θα χρησιμοποιηθούν σε αυτό το στάδιο, όσον αφορά το

τριτογενές άρωμα. Το δευτερογενές άρωμα, δηλαδή οι ενώσεις που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της ζυμωτικής διαδικασίας με τη συμμετοχή της εκάστοτε ζύμης που χρησιμοποιείται, είναι και το πιο σημαντικό για την παραγωγή οίνου, αφού οι ενώσεις αυτές αποτελούν και το μεγαλύτερο ποσοστό των ενώσεων που συνθέτουν το οργανοληπτικό προφίλ ενός οίνου (Belda et al., 2017).

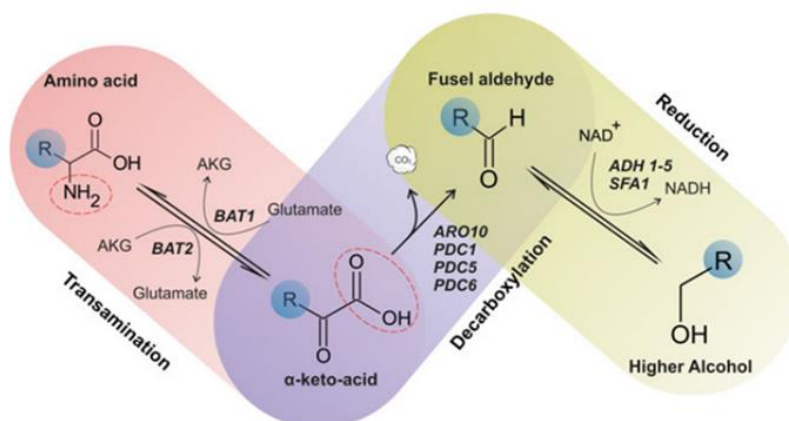
Για τον ζύθο το τελικό άρωμα-γεύση που διαμορφώνεται είναι σύνολο πολλών ενώσεων που παράγονται επίσης από τις ζύμες κατά κύριο λόγο στη ζυμωτική διαδικασία. Ο λυκίσκος ο οποίος προστίθεται στο ζυθογλεύκος κατά το βρασμό επηρεάζει επίσης το τελικό οργανοληπτικό προφίλ του ζύθου, εφόσον απελευθερώνονται από αυτόν ουσίες που επηρεάζουν και βελτιώνουν το γευστικό και αρωματικό σύνολο του τελικού προϊόντος. Τη σύνθεση των ενώσεων αυτών επηρεάζει το στέλεχος της ζύμης η ποικιλία της βύνης και του λυκίσκου που χρησιμοποιείται καθώς και όλες οι συνθήκες της ζυμωτικής διαδικασίας, όπως είναι το pH, η θερμοκρασία, το πρόγραμμα πολτοποίησης κ.α. (Stewart, 2017a).

Στη συνέχεια αναφέρονται βασικές ενώσεις στον οίνο και το ζύθο και ο τρόπος που σχηματίζονται κατά την αλκοολική ζύμωση.

- Ανώτερες αλκοόλες

Οι ανώτερες αλκοόλες είναι ποσοτικά η μεγαλύτερη ομάδα αρωματικών ενώσεων στον οίνο. Μπορούν να προσδώσουν αρώματα φρούτων, λουλουδιών και γενικώς φυτικά αρώματα και στον οίνο και τον ζύθο. Αποτελούνται από δύο κατηγορίες αλκοολών, τις αλειφατικές αλκοόλες, με πιο σημαντικές σε αυτή την κατηγορία την προπανόλη, την ίσο-αμυλική αλκοόλη και την ίσο-βουτανόλη, και τις αρωματικές αλκοόλες, με πιο σημαντικές την 2-φαινυλ-αιθυλική αλκοόλη και την τυροσόλη. Όταν βρίσκονται σε συγκεντρώσεις χαμηλότερα των 300 mg/L έχουν θετική επίδραση στον οίνο και συμβάλλουν στην πολυπλοκότητα του. Ωστόσο όταν τα επίπεδά τους ξεπερνούν τα 400 mg/L θεωρείται ότι λειτουργούν αρνητικά για την ποιότητα του προϊόντος.

Οι ανώτερες αλκοόλες παράγονται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης μέσω της μεταβολικής οδού Ehrlich, μια μεταβολική διαδικασία όπου γίνεται ο καταβολισμός των αμινοξέων από τις ζύμες. Τα αμινοξέα τα οποία αφομοιώνονται μέσω αυτής της οδού είναι η βαλίνη, η ισολευκίνη και η λευκίνη. Πρώτο βήμα αυτής της οδού είναι μια αντίδραση τρανσαμίνωσης ενός αμινοξέος, όπου οδηγεί σε ένα α-κετο οξύ, το οποίο στη συνέχεια αποκαρβοξυλιώνεται σε μία αλδεΐδη. Τελικώς, η αλδεΐδη μπορεί είτε να αναχθεί στην αντίστοιχη ανώτερη αλκοόλη ή να οξειδωθεί σε ένα πτητικό καρβοξυλικό οξύ. Οι τελικές αυτές αντιδράσεις εξαρτώνται από την ισορροπία οξειδοαναγωγής που επικρατεί στο κύτταρο, δηλαδή αν ο μεταβολίτης NADH/NAD⁺ χρειάζεται να οξειδωθεί ή να αναχθεί (Styger et al., 2011) (Michel et al., 2016).



Εικόνα 22: Η μεταβολική οδός Ehrlich (Pires et al., 2014)

- Οξέα

Τα οργανικά οξέα παράλληλα με τα ανόργανα, συμβάλλουν στην τελική συνολική οξύτητα του οίνου και του ζύθου. Μπορούν να είναι πτητικά ή μη πτητικά. Τα πτητικά οξέα περιλαμβάνουν το οξικό, το βουτυρικό, το καπρικό, το καπριλικό οξύ κ.α. Σε υψηλές συγκεντρώσεις μπορούν να χαρακτηριστούν ως ανεπιθύμητες ενώσεις. Το οξικό οξύ είναι από τα πιο σημαντικά, με χαρακτηριστική οσμή ξυδιού. Το οξικό οξύ για τον οίνο αποτελεί συνήθως το 90% της ολικής πτητικής οξύτητας και γίνεται αντιληπτό σε συγκεντρώσεις 0.7 έως 1.1 mg/L, αλλά οι τιμές από 0.2 έως και 0.7 mg/L θεωρούνται ιδανικές. Η συγκεκριμένη ένωση σχετίζεται με παρέμβαση βακτηρίων και υψηλές συγκεντρώσεις αυτής μπορούν να έχουν αξιοσημείωτες επιπτώσεις στην ποιότητα του τελικού προϊόντος. Το οξικό οξύ παράγεται μέσω της οξειδωσης της ακεταλδεϋδης στη μεταβολική οδό κατά την οποία το πυροσταφυλικό οξύ μετατρέπεται σε ακέτυλο συνένζυμο A, μέσω του οποίου μπορούν να παραχθούν και άλλα οργανικά οξέα όπως και μέσω άλλων ενζυμικών συστημάτων (Elizabeth & Whitener, 2016). Μη πτητικά οξέα τα οποία παράγονται από τις ζύμες και επιδρούν στο άρωμα και τη γεύση του οίνου και του ζύθου, είναι το κιτρικό, το μηλικό, το ηλεκτρικό κ.α. Αυτά είναι παραπροϊόντα του της γλυκόλυσης, του κύκλου του κιτρικού οξέος, των αμινοξέων και του μεταβολισμού των λιπαρών οξέων και η παραγωγή τους εξαρτάται από το στέλεχος της ζύμης που διεξάγει την αλκοολική ζύμωση (Michel et al., 2016).

- Εστέρες

Οι εστέρες μαζί με τις ανώτερες αλκοόλες είναι ενώσεις με αξιοσημείωτη επίδραση στο άρωμα του οίνου και του ζύθου, αν και βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Προσδίδουν αρώματα φρούτων και λουλουδιών και χαρακτηρίζονται ως κύριοι εκπρόσωποι τέτοιων χαρακτήρων στους οίνους και τους ζύθους. Σε υψηλές συγκεντρώσεις μπορούν να μειώσουν την ποιότητα του οίνου και να καλύψουν τα αρώματα που προέρχονται από την εκάστοτε ποικιλία.

Υπάρχουν δύο βασικές κατηγορίες εστέρων στον οίνο και τον ζύθο, οι αιθυλικοί εστέρες των λιπαρών οξέων μεσαίας αλυσίδας και οι οξικοί εστέρες των ανώτερων αλκοολών. Οι αιθυλικοί εστέρες σχηματίζονται από την αντίδραση της αιθανόλης με κάποιο από τα λιπαρά οξέα μεσαίας αλυσίδας. Στον ζύθο σημαντικοί αιθυλικοί εστέρες είναι ο καπρικός αιθυλεστέρας, προσδίδοντας αρώματα φρούτων και ο οκτανοϊκός αιθυλεστέρας, προσδίδοντας ξινά αρώματα, όπως άρωμα ξινόμηλου (Michel et al., 2016). Στον οίνο σημαντικοί αιθυλεστέρες είναι ο βουτανικός αιθυλεστέρας, προσδίδοντας αρώματα λουλουδιών και ο εξανοϊκός αιθυλεστέρας, ο οποίος προσδίδει αρώματα φρούτων/πράσινου μήλου. Η δεύτερη κατηγορία, των οξικών εστέρων, με πιο σημαντικούς τον οξικό αιθυλεστέρα (βρίσκεται στην υψηλότερη συγκέντρωση), τον οξικό ισοαμυλικό εστέρα και τον οξικό 2-φαινυλ-αιθυλικό εστέρα, σχηματίζονται μέσω μιας αντίδρασης μεταξύ μιας εκ' των ανώτερων αλκοολών ή της αιθανόλης με το οξικό οξύ. Οι οξικοί εστέρες έχουν την υψηλότερη συγκέντρωση από τις δραστικές αρωματικές ενώσεις στο ζύθο (Michel et al., 2016). Ο σχηματισμός των εστέρων είναι άμεσα εξαρτώμενος από το είδος και το στέλεχος που διεξάγει την αλκοολική ζύμωση (Belda et al., 2017).

- Τερπενικές ενώσεις

Οι ενώσεις αυτές προέρχονται από τα φυτά και συμβάλλουν στα αρώματα λουλουδιών στο οργανοληπτικό προφίλ του οίνου και του ζύθου. Στον οίνο, οι τερπενικές ενώσεις προέρχονται από το σταφύλι, δεν βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις αλλά έχουν μεγάλη αρωματική-γευστική δραστικότητα. Αντίστοιχα στον ζύθο, οι ενώσεις αυτές προέρχονται από το λυκίσκο. Τέτοιες ενώσεις είναι τα ισο-πρενοειδή μονοτερπένια, με σημαντικότερες σε αυτή την ομάδα ενώσεων τις λιναλοόλη, γερανιόλη, νερόλη και κιτρονελόλη. Οι μονοτερπενικές ενώσεις μπορούν να βρεθούν στο σταφύλι ή τον λυκίσκο σε ελεύθερη ή δεσμευμένη μορφή. Οι ζύμες έχουν τη δυνατότητα απελευθέρωσης γλυκοσιδασών, ένζυμα τα οποία υδρολύουν γλυκοζιτικούς δεσμούς, σαν αυτούς που περιέχονται στη δεσμευμένη μορφή των

μονοτερπενίων και με αυτό τον τρόπο σχηματίζονται ενώσεις οι οποίες συμβάλλουν στο αρωματικό προφίλ του οίνου και του ζύθου (Styger et al., 2011) (Michel et al., 2016). Επίσης έχει αναφερθεί ότι κάποιες μονοτερπενικές ενώσεις μπορούν να σχηματιστούν στον οίνο και χωρίς την παρουσία των προδρόμων που προέρχονται από το σταφύλι, αλλά μόνο με τη συμβολή του μεταβολισμού των ζυμών (Styger et al., 2011). Άλλες σημαντικές τερπενικές ενώσεις στον οίνο είναι οι καρατονοϊδής τετρατερπενικές ενώσεις, οι οποίες όταν οξειδωθούν μπορούν να σχηματιστούν πτητικές ενώσεις, γνωστές ως C13-νορισοπρενοειδής, που μπορούν να προσδώσουν στον οίνο αρώματα εξωτικών φρούτων, αλλά και γενικά φρούτων και λουλουδιών.

- ο Φαινόλες

Οι φαινολικές ενώσεις μπορούν να είναι σημαντικές ενώσεις όσον αφορά το χρώμα, τη γεύση και το άρωμα του οίνου. Για τον ζύθο οι φαινολικές ενώσεις δεν είναι επιθυμητές σε όλους τους τύπους ζύθου. Οι ενώσεις αυτές χαρακτηρίζονται από αρώματα πικάντικα, άρωμα καπνιστού και φαρμακευτικά αρώματα. Στον οίνο παράγονται μέσω κάποιων οξικών εστέρων, όπως ο οξικός κουμαρικός εστέρας και ο οξικός φερουλικός εστέρας, οι οποίοι μπορούν να μετατραπούν σε πτητικές φαινόλες κατά τη διαδικασία της ζύμωσης. Κάποιες σημαντικές φαινόλες για τον οίνο είναι η 4-βινυλ-γουακόλη και η 4-βινυλ-φαινόλη, κυρίως για τους λευκούς οίνους και η 4-αιθυλ-γουακόλη και η 4-αιθυλ-φαινόλη, για τους ερυθρούς. Εμφανίζονται σε συγκεντρώσεις από 0 έως 6047 μg/L και σε επίπεδα υψηλότερα από το κατώφλι αντίληψης τους μπορούν να δημιουργήσουν αρνητικό χαρακτήρα στον οίνο (Elizabeth & Whitener, 2016). Η σύνθεση τους στον ζύθο αναφέρεται ότι εξαρτάται από το στέλεχος της ζύμης αλλά και από τους προδρόμους αυτών των ενώσεων που υπάρχουν στο ζυθογλεύκος, οι οποίοι είναι κάποια φαινολικά οξέα με υψηλή ένταση γεύσης, όπως το φερουλικό, το κουμαρικό και το κινναμινικό οξύ. Οι πιο συνηθισμένες ενώσεις αυτής της κατηγορίας για το ζύθο είναι η 4-βινυλ-γουακόλη, η 4-βινυλ-φαινόλη, η 4-αιθυλ-γουακόλη, η 4-αιθυλ-φαινόλη, η ευγενόλη και η βανιλίνη (Michel et al., 2016).

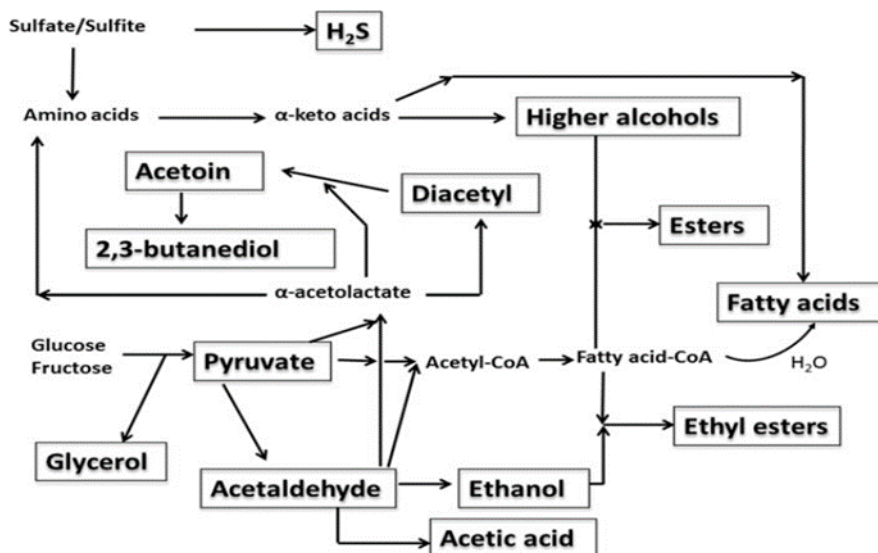
- ο Θειούχες ενώσεις

Οι ενώσεις θείου μπορούν να συμβάλλουν πολύ θετικά στο άρωμα και τη γεύση του οίνου, ωστόσο σε κάποιες περιπτώσεις είναι υπεύθυνες για ανεπιθύμητες οσμές. Πολλές θειούχες ενώσεις έχουν χαμηλό κατώφλι αντίληψης, χαμηλότερο από 0.002 ppb. Τέτοιες ενώσεις, οι οποίες υπάρχουν στο σταφύλι σε δεσμευμένη μορφή αλλά απελευθερώνονται κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης είναι οι πτητικές θειόλες, με πιο χαρακτηριστικές την 4-μεθυλ-4-μερκαπτοπενταν-2-όνη και την 3-μερκαπτο-1-εξανόλη. Οι ενώσεις αυτές δεν έχουν δραστική μορφή στο σταφύλι, ενώ στο γλεύκος βρίσκονται ως μη πτητικές ενώσεις δεσμευμένες με κυστεΐνη και ο ρόλος της ζύμης είναι η απελευθέρωση της αντίστοιχης θειόλης από τον πρόδρομό της κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Η 4-μεθυλ-4-μερκαπτοπενταν-2-όνη και η 3-μερκαπτο-1-εξανόλη είναι υπεύθυνες για τον τροπικό χαρακτήρα που μπορούν να δώσουν στον οίνο, ωστόσο είναι εξαρτώμενες από το στέλεχος που διεξάγει τη ζύμωση και την ικανότητα του να διασπά τους προδρόμους κυστεΐνης μέσω ενός ανθρακικού/θειικού ενζύμου λυάσης (Styger et al., 2011). Μια άλλη χαρακτηριστική ένωση θείου αλλά όχι επιθυμητή, είναι το υδρόθειο (H₂S), το οποίο έχει χαμηλό αισθητήριο κατώφλι, με τιμές να κυμαίνονται από 10 έως 100 μg/L, και αυξημένες συγκεντρώσεις αυτού δημιουργούν αρώματα κλούβιου αυγού στον οίνο, ένα εξαιρετικά ανεπιθύμητο χαρακτηριστικό. Επίσης η συγκεκριμένη ένωση μπορεί να οδηγήσει και στο σχηματισμό άλλων ενώσεων θείου (Belda et al., 2017). Στον ζύθο το υδρόθειο είναι επίσης μια ανεπιθύμητη ένωση θείου, η οποία μπορεί να καλύψει θετικά και επιθυμητά αρώματα του ζύθου. Έχει όπως αναφέρθηκε χαρακτηριστική οσμή κλούβιου αυγού και πολύ χαμηλό κατώφλι αντίληψης (0.005 mg/L) (Michel et al., 2016). Το υδρόθειο και στα δύο αλκοολούχα ποτά παράγεται ως παραπροϊόν της σύνθεσης αμινοξέων που περιέχουν θειικά μόρια, όπως είναι η κυστεΐνη και η μεθειονίνη (Stewart, 2017a). Σαν παραπροϊόν αυτής της σύνθεσης

παράγεται και το διοξείδιο του θείου, το οποίο όμως μπορεί να βελτιώσει τη σταθερότητα του ζύθου, κυρίως μέσω της αντιοξειδωτικής και αντιμικροβιακής του δράσης (Michel et al., 2016).

- ο Ανεπιθύμητες καρβονυλικές ενώσεις

Όπως ήδη αναφέρθηκε μια ένωση που προκύπτει από το κύριο μεταβολικό μονοπάτι της αλκοολικής ζύμωσης στον οίνο και το ζύθο είναι η ακεταλδεύδη, ένωση που χαρακτηρίζεται ως πρόδρομος για τη δημιουργία του κύριου προϊόντος, της αιθανόλης αλλά και άλλων ενώσεων (π.χ. ακετόνης). Σαν ένωση έχει έναν αρκετά ανεπιθύμητο χαρακτήρα, με οσμή σάπιου μήλου ή αρώματα χορταριού. Επίσης είναι μια εξαιρετικά αντιδραστική ένωση και συνδέεται εύκολα με πρωτεΐνες ή αμινοξέα για τον σχηματισμό διάφορων ενώσεων με χαρακτηριστική οσμή και γεύση, όπως είναι το διακετύλιο (Styger et al., 2011). Το διακετύλιο, ανήκει στις γειτονικές δικετόνες και δίνει βουτυρώδη αρώματα όταν βρίσκεται σε συγκεντρώσεις άνω του 0.1-0.15 mg/L. Παράγεται μέσω του αναβολισμού του αμινοξέος της βαλίνης ως παραπροϊόν. Από το διακετύλιο, παράγεται και η 2-3-βουτανδιόλη, μέσω της ζύμης, η οποία όμως δεν είναι ανεπιθύμητη ένωση και έχει χαμηλό κατώφλι αντίληψης (Styger et al., 2011) (Michel et al., 2016). Μία άλλη ένωση στον ζύθο η οποία είναι ανεπιθύμητη είναι η 2,3-πεντανεδιόνη, η οποία έχει παρόμοια οσμή με το διακετύλιο και παράγεται σαν παραπροϊόν κατά τη σύνθεση της ισολευκίνης (Michel et al., 2016).



Εικόνα 23: Βασικές ομάδες αρωματικών ενώσεων που παράγονται από τις ζύμες κατά τη διάρκεια της ζύμωσης (Styger et al., 2011).

5.2 Η επίδραση της *T. delbrueckii* στο οργανοληπτικό προφίλ του οίνου

Όπως αναφέρθηκε οι ζύμες μέσω του μεταβολισμού τους παράγουν ενώσεις οι οποίες διαμορφώνουν τον τελικό οργανοληπτικό χαρακτήρα του οίνου παράλληλα με άλλους παράγοντες. Διαφορές που μπορεί να υπάρχουν στον τρόπο που χρησιμοποιεί η κάθε ζύμη τις μεταβολικές οδούς για τη σύνθεση των ενώσεων, οι οποίες είναι υπεύθυνες για το άρωμα και τη γεύση του οίνου, μπορούν να διαμορφώσουν ένα διαφορετικό οργανοληπτικό προφίλ (Tondini et al., 2019). Η *T. delbrueckii* έχει χαρακτηριστεί ως μία non-*Saccharomyces* ζύμη, η οποία έχει χαμηλή παραγωγή ανεπιθύμητων ενώσεων για τον οίνο, όπως είναι το οξικό οξύ, η ακεταλδεύδη κ.α. Επίσης έχει αναφερθεί όπως και για άλλες non-*Saccharomyces* ζύμες ότι μπορεί να συμβάλλει θετικά στην ποιότητα του τελικού προϊόντος, προσδίδοντας ένταση και

πολυπλοκότητα στον οίνο μέσω ενώσεων που παράγονται από τον μεταβολισμό της (Renault et al., 2009). Στη συνέχεια αναφέρονται μερικές σημαντικές ενώσεις του οίνου και πως η παρουσία της *T. delbrueckii* τις επηρεάζει και κατ' επέκταση επηρεάζει και την ποιότητα του οίνου που παράγεται.

- ο Γλυκερόλη

Η γλυκερόλη είναι μια ένωση η οποία συμβάλλει στη ρευστότητα του οίνου και στην αίσθηση που αφήνεται στο στόμα. γενικότερα, έχει θετική επίδραση στο οργανοληπτικό προφίλ του οίνου. Έχει αναφερθεί από διάφορους συγγραφείς (González-Royo et al. 2015; Belda et al. 2017; Medina-Trujillo et al. 2017; Puertas et al. 2017) αύξηση στη συγκέντρωση της γλυκερόλης σε διαδοχικές ζυμώσεις όπου εμπλέκεται η *T. delbrueckii*, με τις τιμές των αυξήσεων να κυμαίνονται από 0.1 έως 1 g/L, συγκριτικά με τις καθαρές ζυμώσεις του *S. cerevisiae*. Κάποιες από αυτές τις αυξήσεις στη γλυκερόλη αναφέρεται ότι σχετίζονταν με μειώσεις στη συγκέντρωση της αιθανόλης, ενώ σε μικτές ζυμώσεις (Belda et al. 2015; Lu et al. 2016) τέτοιες αυξήσεις στη γλυκερόλη σχετίζονταν με αυξήσεις στη συγκέντρωση του πυροσταφυλικού οξέος (0.1 g/L) συγκριτικά με τις ζυμώσεις με τον *S. cerevisiae* (Benito, 2018). Ωστόσο από τους Loira et al., 2014, παρατηρήθηκε χαμηλή παραγωγή γλυκερόλης σε διαδοχικές ζυμώσεις με τους δύο μικροοργανισμούς. Στην ίδια έρευνα παρόμοια αποτελέσματα στην παραγωγή γλυκερόλης παρατηρήθηκαν και σε καθαρή καλλιέργεια της *T. delbrueckii*, συγκριτικά με την παραγωγή γλυκερόλης από τον *S. cerevisiae*, γεγονός το οποίο είχε παρατηρηθεί και από τους Tataridis et al., 2013. Επίσης, σε ζυμώσεις με αυξημένες ποσότητες σακχάρων αναφέρεται ότι η *T. delbrueckii* παράγει χαμηλότερη ποσότητα γλυκερόλης συγκριτικά με τον *S. cerevisiae*, αν και οι μικτές ζυμώσεις των δύο μικροοργανισμών στις ίδιες συνθήκες δεν διέφεραν κατά πολύ με τις καθαρές ζυμώσεις του *S. cerevisiae* (Bely et al., 2008). Χαμηλή παραγωγή γλυκερόλης από την *T. delbrueckii* αναφέρεται επίσης και σε άλλη έρευνα με την συγκέντρωση των αρχικών σακχάρων να επηρεάζει την τελική της συγκέντρωση. Όσο η συγκέντρωση των σακχάρων αυξανόταν η *T. delbrueckii* είχε χαμηλότερη παραγωγή γλυκερόλης συγκριτικά με τον *S. cerevisiae*, ενώ σε χαμηλές συγκεντρώσεις σακχάρων ήταν παρόμοια η συμπεριφορά των δύο μικροοργανισμών (Renault et al., 2009). Σε άλλη έρευνα παρατηρήθηκε επίσης ότι οι δύο μικροοργανισμοί είχαν παρόμοια συμπεριφορά ως προς την παραγωγή γλυκερόλης σε τυπικές οινολογικές συνθήκες. Ωστόσο, αναφέρθηκε ότι παρόλο που είχαν παρόμοιες ποσότητες αναλογικά με την κατανάλωση σακχάρων, είχαν διαφορές ως προς τα γονίδια που εμπλέκονται στην παραγωγή γλυκερόλης. Στην *T. delbrueckii* λείπουν τα γονίδια GPD2, GPP2, και εξέφρασε περισσότερο GPP1, GPD1, αν και για τους 2 μικροοργανισμούς η υψηλότερη έκφραση συνέβη στην εκθετική φάση ανάπτυξης, τις πρώτες 24 ώρες (Tondini et al., 2019).

- ο Ανώτερες αλκοόλες

Η παραγωγή των ανώτερων αλκοολών παρουσιάζει ποικιλομορφία για την *T. delbrueckii*, γεγονός το οποίο μπορεί να οφείλεται στην πολυπλοκότητα της μεταβολικής οδού Ehrlich από την οποία παράγονται οι ανώτερες αλκοόλες και είναι πιθανό να παρουσιάζονται διαφορές ανάμεσα στα στελέχη. Η ποικιλομορφία αυτή επιβεβαιώνεται από έρευνα, των Loira et al. (2014), όπου ορισμένα στελέχη της *T. delbrueckii* έφτασαν την παραγωγή ανώτερων αλκοολών στα 80 mg/L, τιμή που είναι υψηλότερη από τις συγκεντρώσεις που παράγονται από τον *S. cerevisiae*, ενώ άλλα στελέχη της *T. delbrueckii* σημείωσαν τιμές έως 40 mg/L και χαμηλότερα. Επίσης σε άλλη έρευνα όπου εξετάστηκαν διαφορετικά στελέχη της *T. delbrueckii* αναφέρεται ότι η ολική συγκέντρωση των ανώτερων αλκοολών κυμαίνεται από 56 έως 133 mg/L, με μεγάλη ποικιλομορφία ανάμεσα στα στελέχη. Αξιοσημείωτες διαφορές παρατηρήθηκαν για την ισοαμυλική αλκοόλη, την 1-βουτανόλη και την 2-3-βουτανοδιόλη. Οι ανώτερες αλκοόλες που βρέθηκαν σε μεγαλύτερη ποσότητα ήταν η ισοαμυλική αλκοόλη και

η 2-φαινυλ-αιθανόλη (Renault et al., 2009). Μελέτη για τον οίνο Amarone έδειξε αύξηση ορισμένων ανώτερων αλκοολών, όπως η βενζυλική αλκοόλη και η φαινυλ-αιθανόλη. Και οι δύο αυξήσεις φαίνεται να σχετίζονται με ενζυμική δραστικότητα από την *T. delbrueckii* και συγκεκριμένα όσον αφορά την φαινυλ-αιθανόλη φαίνεται πως η *T. delbrueckii* παρουσιάζει αυξημένη δραστικότητα της β-γλυκοσιδάσης, η οποία ήταν και υψηλότερη από του *S. cerevisiae* (Tufariello et al., 2021). Αύξηση της 2-φαινυλ-αιθανόλης περίπου 5 mg/L και 40%, έχει αναφερθεί και από τους Belda et al. (2017); Azzolini et al. (2015), αντίστοιχα. Ωστόσο στην έρευνα των Azzolini et al. (2015) αναφέρθηκε αύξηση περίπου 19-38% γενικότερα στις ανώτερες αλκοόλες σε διαδοχικές ζυμώσεις από δύο διαφορετικά στελέχη της *T. delbrueckii*, ενώ στην έρευνα των Belda et al. (2017) αναφέρεται μείωση περίπου 70-90 mg/L συγκριτικά με τον *S. cerevisiae*, αποτελέσματα που ήταν παρόμοια με των Sadoudi et al. (2012) (Benito, 2018). Χαμηλότερες συγκεντρώσεις ανώτερων αλκοολών από την *T. delbrueckii* συγκριτικά με τον *S. cerevisiae* έχουν αναφέρει και οι Tondini et al. (2019), οι οποίοι παρατήρησαν κάποιες διαφορές στα γονίδια (BAT1, BAT2 και BAP2) που εμπλέκονται στην μεταβολική οδό Ehrlich. Στον *S. cerevisiae* εκφράζονται και τα 3, ενώ από την *T. delbrueckii* απουσιάζει το BAP2 και BAT2. Αυτό το γεγονός θα μπορούσε να υποδηλώνει μειωμένη πρόσληψη αμινοξέων στο μονοπάτι Ehrlich για την *T. delbrueckii* με συνέπεια ίσως τη χαμηλότερη παραγωγή ανώτερων αλκοολών (Tondini et al., 2019). Σε άλλη έρευνα των Whitener et al. (2017) δεν αναφέρθηκαν αξιοσημείωτες διαφορές σε διαδοχικές ζυμώσεις σε σύγκριση με τον *S. cerevisiae*, εκτός της 3-οκτανόλης. Ενώ οι Tataridis et al., 2013 ανέφεραν υψηλότερη συγκέντρωση μόνο για την 1-προπανόλη από την *T. delbrueckii* σε σύγκριση με δύο στελέχη του *S. cerevisiae*. Αύξηση της 1-προπανόλης αναφέρεται και σε άλλη έρευνα σε διαδοχικές ζυμώσεις με την *T. delbrueckii* και τον *S. cerevisiae* (Loira et al., 2014).

- ο Εστέρες

Η παραγωγή των εστέρων σε ζυμώσεις στις οποίες συμμετέχει η *T. delbrueckii*, φαίνεται να παρουσιάζει ποικιλομορφία όπως και με τις ανώτερες αλκοόλες. Έχει αναφερθεί από τους Renault et al. (2015) ότι η *T. delbrueckii* σε διαδοχικές ζυμώσεις με τον *S. cerevisiae* μπορεί να αυξήσει την συγκέντρωση κάποιων εστέρων, όπως είναι ο προπανοϊκός αιθυλεστέρας, ο ισοβουτανικός αιθυλεστέρας και ο διϋδροκινναμικός αιθυλεστέρας, με τις αυξήσεις να είναι περίπου στα 200, 30 και 1 μg/L, αντίστοιχα. Επίσης παρατηρήθηκαν αυξήσεις και στον οξικό ισοβουτυλικό εστέρα και στον οξικό ισοαμυλικό εστέρα, με τιμές αύξησης περίπου στα 50 μg/L και 2 mg/L, αντίστοιχα. Σε άλλη έρευνα των Belda et al. (2017) παρατηρήθηκαν επίσης αυξήσεις αυτών, της τάξης του 15 και 20 mg/L περίπου, σε διαδοχικές επίσης ζυμώσεις με την *T. delbrueckii*. Επίσης ανέφεραν αύξηση στη συγκέντρωση του οξικού 2-φαινυλ-αιθυλεστέρα περίπου στο 1 mg/L. Αύξηση στην παραγωγή εστέρων από την *T. delbrueckii* παρατηρήθηκε και σε άλλη έρευνα, όπου η *T. delbrueckii* είχε υψηλότερη παραγωγή συγκριτικά με τον *S. cerevisiae*, όσον αφορά τον οξικό αιθυλεστέρα, τον γαλακτικό αιθυλεστέρα (άρωμα φράουλας) και τον ισοαμυλικό αιθυλεστέρα (άρωμα μπανάνας, αχλαδιού). Ωστόσο, είχε χαμηλότερη παραγωγή οκταονικού και δεκαονικού αιθυλεστέρα. Η συγκέντρωση του βουτυρικού αιθυλεστέρα και του εξαονικού αιθυλ-εστέρα, δεν παρουσίασαν αξιοσημείωτες διαφορές για τους 2 μικροοργανισμούς. Στην ίδια έρευνα, η συγκέντρωση του ισοαμυλικού αιθυλ-εστέρα και του δεκαονικού αιθυλ-εστέρα ήταν υψηλότερη στις διαδοχικές ζυμώσεις, συγκριτικά με τις μικτές. Ωστόσο, η συγκέντρωση του οξικού αιθυλ-εστέρα είχε τη χαμηλότερη συγκέντρωση, αλλά άλλες διαφορές δεν ήταν αξιοσημείωτες. Η παραγωγή του οξικού ισοαμυλικού εστέρα φαίνεται να είναι ανάλογη με την παρουσία της *T. delbrueckii*. Η συγκέντρωση του οξικού αιθυλ-εστέρα ήταν σε όλες τις ζυμώσεις αυτού του πειράματος σε αποδεκτά επίπεδα. Επίσης φαίνεται σε αυτό το πείραμα η *T. delbrueckii* να έχει επίδραση στην παραγωγή εστέρων, κυρίως στις διαδοχικές ζυμώσεις συγκριτικά με τις μικτές (Taillandier et al., 2014). Σε άλλη έρευνα όπου εξετάστηκαν 5 στελέχη της *T. delbrueckii* σε διαδοχικές επίσης ζυμώσεις με τον *S. cerevisiae*, τα

αποτελέσματα έδειξαν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις γαλακτικού αιθυλεστέρα και οξικού 2-φαινυλ-αιθυλ-εστέρα συγκριτικά με τις καθαρές ζυμώσεις του *S. cerevisiae*. Η παραγωγή του οξικού αιθυλεστέρα στις διαδοχικές ζυμώσεις ήταν ελαφρώς υψηλότερη συγκριτικά με την καθαρή καλλιέργεια του *S. cerevisiae* (Loira et al., 2014). Επίσης οι Zhang et al. μελέτησαν την διαδοχική και ταυτόχρονη ζύμωση των *T. delbrueckii* και *S. cerevisiae* για την ποικιλία Cabernet Sauvignon. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στις μικτές ζυμώσεις υπήρχε υψηλότερη παραγωγή βουτανικού αιθυλεστέρα και δεκαονικού αιθυλεστέρα, ωστόσο στις διαδοχικές ζυμώσεις η αύξηση των εστέρων ήταν σημαντικότερη (Tufariello et al., 2021). Αντιθέτως, άλλοι συγγραφείς έχουν αναφέρει μειώσεις στην παραγωγή εστέρων στις διαδοχικές ζυμώσεις περίπου από 10 έως 30 mg/L. Οι Azzolini et al. (2015) ανέφεραν μια γενική μείωση στο σύνολο των εστέρων στις περισσότερες ζυμώσεις όπου εμπλέκεται η *T. delbrueckii*, κυρίως στους οξικούς εστέρες, με την συγκέντρωση του οξικού ισοαμυλεστέρα να μειώνεται στο 50-70% στις διαδοχικές ζυμώσεις (Benito, 2018). Έχει αναφερθεί από τους Sadoudi et al., 2012 ότι παραγωγή του οξικού φαινυλ-αιθυλ-εστέρα σε μικτή ζύμωση των δύο μικροοργανισμών ήταν σχεδόν δύο φορές χαμηλότερη συγκριτικά με την καθαρή ζύμωση του *S. cerevisiae*. Επιπλέον σε έρευνα όπου εξετάστηκαν 12 στελέχη της *T. delbrueckii*, όταν είχε καταναλωθεί το 50% των σακχάρων, η παραγωγή των εστέρων ήταν χαμηλή με μέσο όρο συγκέντρωσης την τιμή των 3.29 mg/L. Δεν σχηματίστηκε καθόλου οξικός ισοαμυλεστέρας ή αιθυλικό εστέρες των λιπαρών οξέων όπως έχει παρατηρηθεί και από τους Hernández-Orte et al. (2008), σε αντίστοιχες συνθήκες. Επίσης παρατηρήθηκαν διαφορές ανάμεσα στα στελέχη όσον αφορά την παραγωγή οξικού φαινυλ-αιθυλ-εστέρα, γαλακτικού αιθυλεστέρα και 3-υδροξυβουτυρικού αιθυλεστέρα. Η χαμηλή παραγωγή εστέρων έρχεται σε συμφωνία και με άλλες έρευνες των Viana et al. (2008), Plata et al. (2003) και Hernández-Orte et al. (2008) (Renault et al., 2009). Μια πιο πρόσφατη έρευνα αναφέρει ότι η *T. delbrueckii* διαφέρει ως προς την παραγωγή οξικών και αιθυλικών εστέρων με τον *S. cerevisiae*. Ο *S. cerevisiae* είχε μεγαλύτερο εύρος παραγωγής οξικών και αιθυλικών εστέρων, ενώ η *T. delbrueckii* είχε μεγαλύτερη παραγωγή προπανικού αιθυλ-εστέρα, όπως έχει αναφερθεί ξανά από τους Ramírez et al., 2016; Renault et al., 2015; Velázquez et al., 2015. Στη συγκεκριμένη έρευνα παρατηρήθηκε ότι από την *T. delbrueckii* απουσιάζουν βασικά γονίδια, ATF1-2, τα οποία είναι υπεύθυνα για την παραγωγή οξικών εστέρων. Μικρή παραγωγή αυτών των εστέρων που έχει παρατηρηθεί, είναι πιθανό να οφείλεται στην έκφραση μιας μη αναγνωρισμένης πρωτεΐνης, YPL272C και του γονιδίου SLI1. Όσον αφορά τους αιθυλικούς εστέρες, τα γονίδια EEB1 και EHT1, εκφράζονται στην *T. delbrueckii* όπως και στον *S. cerevisiae*, με τη διαφορά ότι η *T. delbrueckii* εκφράζει κυρίως το EHT1, ενώ ο *S. cerevisiae* το EEB1 σε μεγαλύτερο βαθμό. Σε κάθε περίπτωση η σύνθεση των αιθυλικών εστέρων βασίζεται στην διαθεσιμότητα των προδρόμων τους (μεσαίας αλυσίδας λιπαρά οξέα), καθώς και στα ένζυμα καρβοξυλάση του ακέτυλο-συνένζυμο-A (ACC1) και του συμπλέγματος της συνθετάσης των λιπαρών οξέων (FAS). Η *T. delbrueckii* εκφράζει το γονίδιο FAS2 κατά την αρχή της ζύμωσης, ενώ ο *S. cerevisiae* καθ' όλη τη διάρκεια και αυτό οδηγεί στη μεγαλύτερη συσσώρευση λιπαρών οξέων μεσαίας αλυσίδας και έπειτα στη σύνθεση αιθυλικών εστέρων (Tondini et al., 2019).

- Οξικό οξύ

Στις συνήθειες συνθήκες παραγωγής οίνου, η *T. delbrueckii* φαίνεται να παράγει μέσω του μεταβολισμού της χαμηλές ποσότητες οξικού οξέος (περίπου 0.2 g/L) συγκριτικά με τον *S. cerevisiae*, αν και υπάρχει άμεση σχέση με το στέλεχος, εφόσον έχει παρατηρηθεί φαινοτυπική ποικιλομορφία (Tondini et al., 2019). Στο πείραμα που διεξάχθηκε από τους Tondini et al. (2019), τα αποτελέσματα έδειξαν χαμηλότερη παραγωγή οξικού οξέος περίπου 10-20 φορές συγκριτικά με την παραγωγή από τον *S. cerevisiae*. Αυτό ίσως οφείλεται στο γεγονός ότι οι δύο μικροοργανισμοί φαίνεται να εκφράζουν διαφορετικά γονίδια τα οποία εμπλέκονται στο μεταβολικό μονοπάτι σύνθεσης του οξικού οξέος. Στην *T. delbrueckii* απουσιάζει η έκφραση του ALD3. Επίσης υπάρχει μεγαλύτερη έκφραση των ADHs, έναντι

των ALDs, όπου στον *S. cerevisiae* ήταν κυρίαρχα και ακόμη η *T. delbrueckii* έχει την τάση να εκφράζει περισσότερα ACSs συγκριτικά με ACH1, ενώ στον *S. cerevisiae* η έκφραση των δύο ήταν παρόμοια (Tondini et al., 2019). Χαμηλή παραγωγή οξικού οξέος για την *T. delbrueckii* έχει παρατηρηθεί και παλαιότερα σε πείραμα όπου εξετάστηκαν 90 στελέχη του συγκεκριμένου μικροοργανισμού (Ciani & Maccarelli, 1997). Επίσης σε άλλη έρευνα τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η τελική συγκέντρωση του οξικού οξέος ήταν χαμηλότερη στη ζύμωση της *T. delbrueckii* (0.1 g/L) συγκριτικά με την ζύμωση με τον *S. cerevisiae* (0.58 g/L). Στην ίδια έρευνα, χαμηλή συγκέντρωση οξικού οξέος παρουσίασαν και οι διαδοχικές ζυμώσεις με τους δύο μικροοργανισμούς, στις οποίες η συγκέντρωση οξικού οξέος ήταν χαμηλότερη συγκριτικά με τις μικτές ζυμώσεις (Taillandier et al., 2014). Αξιοσημείωτες μειώσεις του οξικού οξέος της τάξης του 0.63 mg/L, 0.27 mg/L, 0.16 mg/L σε διαδοχικές ζυμώσεις με την *T. delbrueckii*, σε σύγκριση με τις καθαρές ζυμώσεις του *S. cerevisiae* αναφέρονται στις περισσότερες έρευνες. Οι Contreras et al. (2014) ανέφεραν μειώσεις στην παραγωγή του οξικού οξέος σε διαδοχικές ζυμώσεις με την *T. delbrueckii* στις περισσότερες περιπτώσεις συγκριτικά με τις καθαρές καλλιέργειες του *S. cerevisiae*, αν και υπάρχει εξάρτηση και από την ποσότητα οξυγόνου (Benito, 2018). Οι Azzolini et al. (2015) βέβαια παρατήρησαν ποικιλομορφία στην παραγωγή του οξικού οξέος σε διαδοχικές ζυμώσεις με την *T. delbrueckii*, στηριζόμενη στην ποικιλία σταφυλιών που μελετούσαν, με μειώσεις οξικού οξέος σε τιμές που κυμαίνονταν από 0.1 έως 0.17 g/L, κυρίως στην ποικιλία Chardonnay, αλλά αυξήσεις περίπου στο 0.08 g/L για την ποικιλία Soave. Αυτό δείχνει ότι εκτός από το στέλεχος της ζύμης, το οποίο επηρεάζει την τελική συγκέντρωση οξικού οξέος στον οίνο, άλλοι παράγοντες επηρεάζουν επίσης αυτή την ένωση. Αύξηση στη συγκέντρωση του οξικού οξέος με τιμές που κυμαίνονται από 0.2 έως 0.4, στηριζόμενοι στο στέλεχος το οποίο ήταν υπό μελέτη, συγκριτικά πάντα με τον κλασσικό σακχαρομύκητα παρατηρήθηκε και από τους Loira et al. 2014. Έχει αναφερθεί επίσης ότι η συγκέντρωση του οξικού οξέος ήταν υψηλότερη για την *T. delbrueckii*, όπως και η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος (Tataridis et al., 2013). Παρόμοια αποτελέσματα παρουσιάστηκαν και σε άλλη έρευνα, με τη συγκέντρωση του οξικού οξέος για την *T. delbrueckii* να είναι στα 0.65 g/L (Sadoudi et al., 2012). Ωστόσο, άλλοι συγγραφείς δεν έχουν αναφέρει αξιοσημείωτες διαφορές συγκριτικά με τις ζυμώσεις με τον *S. cerevisiae* (Benito, 2018). Σε άλλη έρευνα όπου εξετάστηκε η *T. delbrueckii* σε γλεύκος με αυξημένη ποσότητα σακχάρων είτε σε καθαρή καλλιέργεια ζύμωσης είτε σε μικτή με τον *S. cerevisiae*, παρατηρήθηκε ότι παράγεται χαμηλή ποσότητα οξικού οξέος, συγκριτικά με τις καθαρές καλλιέργειες του *S. cerevisiae*, γεγονός το οποίο υποδηλώνει ότι οι δύο μικροοργανισμοί έχουν διαφορετικό τρόπο ανταπόκρισης σε συνθήκες στρες (Bely et al., 2008). Αυτό επιβεβαιώνεται και από άλλο πείραμα όπου εξετάστηκαν διαφορετικά στελέχη της *T. delbrueckii* σε διαφορετικές ποσότητες σακχάρων και παρατηρήθηκε ότι στη χαμηλότερη ποσότητα σακχάρων (120 g/L) οι τιμές του οξικού οξέος ήταν παρόμοιες και για την *T. delbrueckii* και για τον *S. cerevisiae*. Ωστόσο, σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σακχάρων (240 g/L και 350 g/L), η *T. delbrueckii* είχε χαμηλότερες τιμές συγκριτικά με τον *S. cerevisiae* (Renault et al., 2009).

- Μηλικό οξύ

Σε κάποιες μελέτες εντοπίστηκε ελαφριά μείωση στη συγκέντρωση του μηλικού οξέος, σε διαδοχικές ζυμώσεις με την *T. delbrueckii*, της τάξης του 20% (Belda et al. 2015) ή 25% (Chen et al. 2018) περίπου, ενώ σε άλλες μελέτες δεν αναφέρθηκε κάτι αντίστοιχο (Loira et al. 2014). Σε μελέτη (Du Plessis et al. 2017) για την μείωση του μηλικού οξέος εξετάστηκαν 8 στελέχη της *T. delbrueckii* και η μείωση ήταν περίπου στο 0.7 g/L, και εμφανίστηκε ποικιλομορφία ανάμεσα στα στελέχη, προτείνοντας ότι αυτή η δραστηριότητα εξαρτάται από το στέλεχος του μικροοργανισμού, όπως συμβαίνει και με τον *S. cerevisiae*. Ωστόσο υπάρχουν και αναφορές (Bañuelos et al. 2016), για αύξηση του μηλικού οξέος της τάξης του 0.83 g/L σε διαδοχικές ζυμώσεις, συγκριτικά με τον *S. cerevisiae* (Benito, 2018).

- Ηλεκτρικό οξύ

Έχει αναφερθεί από τους Ciani and Maccarelli (1998), ότι η *T. delbrueckii* είναι μια ζύμη η οποία παράγει αυξημένη ποσότητα ηλεκτρικού οξέος συγκριτικά με τον *S. cerevisiae* σε καθαρή καλλιέργεια ζύμωσης, με αυξήσεις να κυμαίνονται από 0.11 έως 0.32 g/L. Πρόσφατη έρευνα (Puertas et al. 2017) ανέφερε επίσης σημαντική αύξηση στο ηλεκτρικό οξύ περίπου στα 0.46 g/L σε διαδοχικές ζυμώσεις συγκριτικά με την παραγωγή του *S. cerevisiae* όσον αφορά την συγκεκριμένη ένωση. Έχει αναφερθεί από τους Contreras et al. (2014) ότι αυξήσεις ακόμη και υψηλότερες του 1 g/L είναι πιθανές ανάλογα με την παρουσία οξυγόνου. Η παρουσία του ηλεκτρικού οξέος αυξάνει την πικράδα στον οίνο και δίνει μια αλμυρή αίσθηση, χαρακτηριστικά τα οποία έχουν γίνει αντιληπτά σε οίνους που έχουν παραχθεί από κάποια στελέχη την *T. delbrueckii* (Benito, 2018).

- Τερπενικές ενώσεις

Κάποια στελέχη της *T. delbrueckii* αναφέρεται ότι έχουν την δυνατότητα απελευθέρωσης υψηλότερης ποσότητας τερπενικών ενώσεων, όπως είναι η α-τερπινόλη και η λιναλοόλη, ενώσεις οι οποίες έχουν την δυνατότητα να βελτιώνουν την ποιότητα του οίνου, ειδικότερα σε ποικιλίες με αυξημένες τερπενικές ενώσεις όπως είναι η Gewürztraminer (Benito, 2018). Οι King & Dickinson, 2000, έχουν αναφέρει σημαντική παραγωγή λιναλοόλης (άρωμα λουλουδιών) σε οίνο από την ποικιλία Μοσχάτο, γεγονός το οποίο αναφέρεται ότι οφείλεται στην ενζυμική δραστηριότητα της *T. delbrueckii* (Tufariello et al., 2021). Έχουν αναφερθεί επίσης αυξήσεις σε τερπενικές ενώσεις σε ζυμώσεις συνδυαστικές με τον *S. cerevisiae* και την *T. delbrueckii* από τους Cus και Jenko το 2013. Επιπλέον έχει παρατηρηθεί και από τους Whitener et al. το 2017 παρόμοια επίδραση όσον αναφορά τέτοιες ενώσεις όπως η γερανιόλη, η τρανς-β-οκιμίνη, η σις-α-οκιμίνη, η λιναλοόλη και η α-τερπινίνη σε διαδοχικές ζυμώσεις με την *T. delbrueckii* (Benito, 2018). Σε άλλη έρευνα, όπου το γλεύκος προερχόταν από την ποικιλία Sauvignon Blanc το στέλεχος της *T. delbrueckii* που χρησιμοποιήθηκε αναφέρεται ότι είχε υψηλή παραγωγή τερπενολών (γερανιόλης κ.α.) όταν συνεργάστηκε με τον *S. cerevisiae*, αλλά και σε καθαρή καλλιέργεια ζύμωσης, αποτελέσματα τα οποία διέφεραν από την καθαρή καλλιέργεια του *S. cerevisiae* (Sadoudi et al., 2012).

- Ανθοκυανίνες

Οι Chen et al. (2018), παρατήρησαν αύξηση στη συνολική συγκέντρωση των ανθοκυανινών, περίπου στα 46 mg/L, σε διαδοχική ζύμωση όπου συμμετείχε η *T. delbrueckii*. Η αυξημένη συγκέντρωση όσον αφορά τις ανθοκυανίνες, θα μπορούσε να εξηγηθεί από το γεγονός ότι όπως και άλλες non-*Saccharomyces* ζύμες αφομοιώνουν χαμηλότερη ποσότητα ανθοκυανινών από τα σταφύλια, σε σύγκριση με τον *S. cerevisiae*. Έχει παρατηρηθεί επίσης παρόμοια επίδραση σε οίνο προερχόμενο από την ποικιλία Pinotage, όπου τα επίπεδα των ανθοκυανινών από το σταφύλι παρέμεναν σε υψηλές συγκεντρώσεις. Αναφέρεται ότι αυτό το φαινόμενο σχετίζεται και με την ποικιλία σταφυλιού μιας και ήταν πιο εμφανές στην ποικιλία που αναφέρθηκε, συγκριτικά με την ποικιλία Cabernet Franc. Οι ιδιότητες απορρόφησης ανθοκυανινών μπορούν να εξηγήσουν την ελαφρώς υψηλότερη ένταση στο χρώμα του οίνου που έχει παρατηρηθεί σε διαδοχικές ζυμώσεις της *T. delbrueckii* με τον *S. cerevisiae* (Benito, 2018). Σε έρευνα όπου εξετάζονταν 5 στελέχη της *T. delbrueckii* σε διαδοχικές ζυμώσεις με τον *S. cerevisiae*, παρατηρήθηκε ότι η παραγωγή vitisin A και B, ήταν χαμηλότερη συγκριτικά με την καθαρή καλλιέργεια του *S. cerevisiae*. Οι δύο αυτές ουσίες λειτουργούν ως σταθεροποιητές χρώματος στον οίνο, σχηματίζονται στο γλεύκος και είναι αποτέλεσμα της συμπήκνωσης των ανθοκυανινών των σταφυλιών (κυρίως της μαλβιδίν-3-ο-γλυκοζίτη) και δύο προϊόντων του μεταβολισμού της ζύμης, της ακεταλδεύδης (σύνθεση vitisin B) και του πυροσταφυλικού οξέος (σύνθεση vitisin A). Ο λόγος για τη χαμηλότερη παραγωγή αυτών των ενώσεων από την *T. delbrueckii*, συγκριτικά με την παραγωγή από τον *S. cerevisiae*,

ίσως είναι η χαμηλή παραγωγή κυρίως ακεταλδεύδης αλλά και πυροσταφυλικού, αν και όσον αφορά τη vitisin A, η παραγωγή της δεν ήταν ιδιαίτερα χαμηλή, αλλά παρέμενε πάλι χαμηλότερη από εκείνη του *S. cerevisiae*. Χαμηλή παραγωγή της vitisin B σε διαδοχική ζύμωση με την *T. delbrueckii* αναφέρεται και από τους Chen et al. (2018). Επίσης οι βινυλ-φαινολικές πυροανθοκυανίνες, είναι ενώσεις που επίσης σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, μέσω της συμπύκνωσης των βινυλ-φαινολών, οι οποίες παράγονται από τις ζύμες μέσω της δράσης της HCDC, και των ανθοκυανινών που προέρχονται από τα σταφύλια. Αυτές οι ενώσεις που σχηματίζονται έχουν αντίστοιχες ιδιότητες όσον αφορά τη σταθερότητα του χρώματος του οίνου. Στις διαδοχικές ζυμώσεις, η παραγωγή τέτοιων ενώσεων ήταν χαμηλότερη από τη μονή καλλιέργεια ενός στελέχους του *S. cerevisiae*, και η παραγωγή τους ξεκίνησε αφότου ο *S. cerevisiae* εμβολιάστηκε στο μέσο. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η δράση της HCDC ίσως απουσιάζει από την *T. delbrueckii*, αν και αυτό δεν μπορεί να χαρακτηριστεί ως καθολικό χαρακτηριστικό μιας και μόνο 5 στελέχη αυτής της ζύμης εξετάστηκαν στο συγκεκριμένο πείραμα (Loira et al., 2014).

- ο Μαννοπρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες

Η παρουσία των μαννοπρωτεϊνών και των πολυσακχαριτών αυξάνει την ποιότητα του οίνου και κυρίως την αίσθηση αυτού στο στόμα. Κάποιες έρευνες έχουν αναφέρει ότι η *T. delbrueckii* είναι μια ζύμη η οποία μπορεί να συμβάλλει στην παραγωγή τέτοιων ουσιών κατά την αλκοολική ζύμωση ή την παλαίωση. Έχει αναφερθεί ότι η *T. delbrueckii* παράγει περισσότερο από 25% μαννοπρωτεϊνών σε διαδοχικές ζυμώσεις συγκριτικά με τον *S. cerevisiae* (Belda et al. 2015) και αυτές οι αυξήσεις προσδίδουν μια βελτίωση της αίσθησης της δομής του οίνου στο στόμα και της συνολικής του εντύπωσης. Παρόμοια αύξηση έχει αναφερθεί και από τους Garcia et al. (2017). Επίσης έχει αναφερθεί από τους Domizio et al. (2014) παραγωγή μεγαλύτερη από 50% σε πολυσακχαρίτες σε καθαρή καλλιέργεια από την *T. delbrueckii*, σε σύγκριση με καθαρή καλλιέργεια του *S. cerevisiae* (Benito, 2018).

- ο Φαινόλες

Μελέτη στην οποία εξετάστηκαν 21 στελέχη της *T. delbrueckii* ως προς την παραγωγή πτητικών φαινολικών ενώσεων, όπως οι 4-βινυλ-φαινόλη, 4-βινυλ-γουακόλη, 4-αιθυλο-φαινόλη και 4-αιθυλο-γουακόλη, συγκρίθηκαν με τις ποσότητες που παράγονται από τον *S. cerevisiae*, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα στελέχη της *T. delbrueckii* παράγουν πολύ χαμηλές ποσότητες αυτών των ενώσεων, με μέσο όρο 2.1 ± 0.8 mg/L, χαμηλότερα από το στέλεχος του *S. cerevisiae* που επιλέχθηκε. Αυτό είναι σε συμφωνία και με άλλη έρευνα, όπου οι Shinohara et al. (2000), χαρακτήρισαν τον συγκεκριμένο μικροοργανισμό αδύναμο ως προς την παραγωγή πτητικών φαινολών (Renault et al., 2009). Σε διαδοχικές ζυμώσεις με την *T. delbrueckii*, έχει αναφερθεί ελαφριά αύξηση στην 4-αιθυλ-φαινόλη, συγκριτικά με τις καθαρές ζυμώσεις του *S. cerevisiae*, ωστόσο τα επίπεδα αυτά ήταν κάτω από το κατώφλι αντίληψης (0.6 mg/L) (González-Royo et al. 2015). Αυτό είναι σύμφωνο και με άλλη έρευνα, των Azzolini et al. (2015), οι οποίοι εντόπισαν ελαφριά αύξηση στην 4-αιθυλ-φαινόλη για την ποικιλία σταφυλιών Soave, αλλά όχι για την ποικιλία Chardonnay (Benito, 2018). Σε άλλη έρευνα αναφέρεται μείωση για τις βινυλ-φαινόλες σε διαδοχική ζύμωση για οίνους προερχόμενους από τις ποικιλίες Chardonnay και Soave (Tufariello et al., 2021).

- ο Θειούχες ενώσεις

Οι τροπικές θειόλες είναι τα πιο αξιοσημείωτα θειικά μόρια για την ενίσχυση του ποικιλιακού χαρακτήρα κάποιων ποικιλιών, όπως είναι το Sauvignon blanc, το μοσχάτο κ.α. Κύριες ενώσεις με θετική επίδραση στον οίνο είναι η 4-μερκαπτο-4-μεθυλοπενταν-2-όνη (4-MMP) και 3-μερκαπτοεξαν-1-όλη (3-MH) και η 3-MHA, η οποία προέρχεται από την ακετυλίωση της 3MH μέσω της ζύμης, κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης. Βρίσκονται σε πολύ

χαμηλές συγκεντρώσεις στον οίνο, αλλά έχουν πολύ χαμηλό κατώφλι αντίληψης. Κάποια στελέχη της *T. delbrueckii* έχει αναφερθεί ότι έχουν υψηλή δραστικότητα απελευθέρωσης θειολών. Οι Belda et al. (2017), ανέφεραν αυξήσεις περίπου στα 100 ng/L για την 3-MH και 70 ng/L για την 4-MMP σε διαδοχικές ζυμώσεις. Ωστόσο δεν παρατηρήθηκε κάποια αξιοσημείωτη διαφορά για την 3-MHA. Οι Renault et al. (2016) ανέφεραν επίσης αύξηση στη συγκέντρωση της 3-MH, περίπου στα 300 ng/L σε διαδοχικές ζυμώσεις που συμμετείχε η *T. delbrueckii* (Benito, 2018). Οι Sadoudi et al., 2012, ανέφεραν ότι όλα τα στελέχη της *T. delbrueckii* που εξετάστηκαν είχαν την δυνατότητα απελευθέρωσης 3-MH, αλλά η συγκέντρωση της ήταν χαμηλότερη από εκείνη από τον *S. cerevisiae*. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία και με έρευνα των Zott et al. (2011). Επίσης και στις δύο έρευνες που αναφέρθηκαν παρατηρήθηκε ότι η *T. delbrueckii* είχε τη χαμηλότερη παραγωγή 4-MMP συγκριτικά με άλλες καθαρές καλλιέργειες του *S. cerevisiae* και άλλων non-*Saccharomyces* ζυμών. Χαμηλές ποσότητες των κύριων θειολών αναφέρονται και για τις μικτές ζυμώσεις. Στις θειούχες ενώσεις ανήκει και η ένωση του υδρόθειου (H₂S), η οποία είναι ένωση με αρνητική επίδραση στο οργανοληπτικό προφίλ του οίνου, προσδίδοντας αρώματα χαλασμένου αυγού κυρίως. Σε έρευνα όπου εξετάστηκαν διάφορα στελέχη της *T. delbrueckii* τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπάρχει διαφορά ανάμεσα στα στελέχη ως προς την δραστικότητα της αναγωγής του θειώδους για την παραγωγή υδρόθειου, ωστόσο εκτός από ένα στέλεχος (επίπεδο 4), τα υπόλοιπα ήταν στο επίπεδο 3 στην κλιμακα BIGGY (Renault et al., 2009).

- ο Ακεταλδεύδη

Όπως αναφέρθηκε η ακεταλδεύδη είναι ένα προϊόν που παράγεται από το πυροσταφυλικό οξύ. Διάφορες έρευνες έχουν αναφέρει ότι η *T. delbrueckii* παράγει χαμηλές ποσότητες αυτής της ένωσης, κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, συγκριτικά με τις ποσότητες που παράγει ο κλασικός σακχαρομύκητας *S. cerevisiae* (Tataridis et al., 2013; Tondini et al., 2019). Σε πείραμα όπου εξετάστηκαν 21 στελέχη της *T. delbrueckii*, αναφέρθηκε επίσης ότι όλα τα στελέχη είχαν παραγωγή πολύ χαμηλών ποσοτήτων αυτής της ένωσης (Renault et al., 2009). Άλλες μελέτες έχουν αναφέρει μειώσεις στη συγκέντρωση αυτής της ένωσης περίπου στα 40, 17, 30 και 20 mg/L (Ciani and Maccarelli 1998; Bañuelos et al. 2016; Belda et al. 2017; Puertas et al. 2017). Χαμηλές έως μέτριες μειώσεις, της τάξης του 4 έως 14 mg/L έχουν αναφερθεί επίσης (Benito, 2018). Σε μελέτη όπου εξετάστηκαν δύο στελέχη της *T. delbrueckii* σε γλεύκος με υψηλή συγκέντρωση σακχάρων η παραγωγή της ακεταλδεύδης ήταν και πάλι χαμηλότερη συγκριτικά με καθαρές καλλιέργειες του *S. cerevisiae*, όπου στη συγκεκριμένη περίπτωση το στέλεχος του *S. cerevisiae* είχε επιλεγεί λόγω της χαμηλής παραγωγής του σε ακεταλδεύδη. Στο ίδιο πείραμα οι συγκεντρώσεις στις μονές καλλιέργειες και της *T. delbrueckii* και του *S. cerevisiae* ήταν υψηλότερες συγκριτικά με τις μικτές καλλιέργειες με τους δύο μικροοργανισμούς, αν και στις μικτές σημαντικό ρόλο διεξάγει η αναλογία του *S. cerevisiae* στο εμβόλιο (Bely et al., 2008).

5.3 Η επίδραση της *T. delbrueckii* στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του ζύθου

Η *T. delbrueckii* φαίνεται να είναι μια πολλά υποσχόμενη non-*Saccharomyces* ζύμη για την παραγωγή ζύθου (Basso et al., 2016). Κάποιοι συγγραφείς έχουν αναφέρει την εμπλοκή της στην ζύμωση του ζύθου Bavarian wheat (Michel et al., 2016; Tataridis et al., 2013). Επίσης έχει κερδίσει το ενδιαφέρον διότι έχει αναφερθεί η ικανότητά της να μετατρέπει τα τερπενοειδή αρωματικά συστατικά του λυκίσκου (King and Dickinson 2000, 2003) και γενικώς ότι έχει την δυνατότητα να επηρεάζει θετικά το οργανοληπτικό προφίλ του τελικού

ζύθου (Canonico et al., 2020). Ωστόσο δεν έχουν διεξαχθεί πολλές έρευνες για την εμπλοκή της στην παραγωγή ζύθου, όπως έχει συμβεί για την παραγωγή οίνου. Στη συνέχεια θα αναφερθούν κάποια βασικά οργανοληπτικά συστατικά του ζύθου και η επιρροή της *T. delbrueckii* σε αυτά.

- Ανώτερες αλκοόλες

Όπως έχει ήδη αναφερθεί οι ανώτερες αλκοόλες είναι μια ομάδα ενώσεων οι οποίες βρίσκονται σε αφθονία στο ζύθο, προφέροντας πολυπλοκότητα, ευχάριστα και φρέσκα αρώματα, όπως και αρώματα λουλουδιών, φυσικά όταν βρίσκονται σε επιτρεπτές συγκεντρώσεις, κάτω από 300 mg/L (Callejo et al., 2019). Σε έρευνα όπου εξετάστηκαν διαφορετικά στελέχη της *T. delbrueckii*, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ένα από τα στελέχη (T9) σχημάτισε τη μεγαλύτερη συγκέντρωση ανώτερων αλκοολών, σε σύγκριση με τα υπόλοιπα. Πιο συγκεκριμένα, η συγκέντρωση της 2-φαινυλ-αιθανόλης από αυτό το στέλεχος (T9) ήταν σχεδόν δύο φορές υψηλότερη συγκριτικά με όλα τα υπόλοιπα υπό μελέτη στελέχη. Άλλα 4 στελέχη επίσης σημείωσαν τιμές υψηλότερες από το κατώφλι αντίληψης (10 mg/L). Επιπλέον το στέλεχος T9 σημείωσε υψηλότερες τιμές και ως προς την n-προπανόλη, την 1-βουτανόλη και η συγκέντρωση της αμυλικής αλκοόλης ήταν 3 φορές υψηλότερη επίσης. Τα υπόλοιπα στελέχη ως προς την αμυλική αλκοόλη σημείωσαν τιμές στο μισό από το κατώφλι αντίληψης, το οποίο είναι από 50 έως 70 mg/L (Michel et al., 2016b). Σε πιο πρόσφατη έρευνα, όπου υπό μελέτη ήταν δύο εμπορικά στελέχη της *T. delbrueckii* (Biodiva και Prelude), τα αποτελέσματα έδειξαν πως τα δύο στελέχη είχαν παρόμοιες συγκεντρώσεις όσον αφορά την 2-φαινυλ-αιθανόλη, ωστόσο το ένα (Biodiva) από τα δύο σημείωσε σημαντικότερη παραγωγή ισοαμυλικής αλκοόλης. (Toh et al., 2020). Οι Canonico et al. (2016) σε έρευνά τους ανέφεραν ότι στις μικτές ζυμώσεις των *S. cerevisiae/T. delbrueckii*, με αναλογίες εμβολίου 1:20 και 1:10, η παρουσία της *T. delbrueckii* προκάλεσε μείωση της συγκέντρωσης της 2-φαινυλ-αιθανόλης, ωστόσο η συγκέντρωσή της παρέμενε υψηλότερη στις μικτές ζυμώσεις συγκριτικά με την καθαρή καλλιέργεια της *T. delbrueckii*, αλλά χαμηλότερη από την συγκέντρωσή της στην μονοκαλλιέργεια του *S. cerevisiae*. Επίσης παρατηρήθηκε ότι σε όλες τις μικτές ζυμώσεις (1:1, 1:10, 1:20) η n-προπανόλη είχε χαμηλότερη συγκέντρωση συγκριτικά με την καθαρή καλλιέργεια του *S. cerevisiae*. Άλλες ανώτερες αλκοόλες όπως η ισοβουτανόλη, η ισοαμυλική αλκοόλη και η αμυλική αλκοόλη, είχαν χαμηλότερες συγκεντρώσεις στην καθαρή καλλιέργεια της *T. delbrueckii* συγκριτικά με την μονοκαλλιέργεια του *S. cerevisiae*, ενώ οι μικτές ζυμώσεις σε όλες τις αναλογίες, σημείωσαν ενδιάμεσες τιμές για αυτές τις ενώσεις σε σύγκριση με τις καθαρές καλλιέργειες των δύο ειδών (Canonico et al., 2016). Σε άλλη έρευνα των Canonico et al. (2017) όπου εξετάστηκαν μικτές ζυμώσεις με διαφορετικά στελέχη του *S. cerevisiae* και στέλεχος της *T. delbrueckii* (σε αναλογία 1:20), παρατηρήθηκε ότι σε όλες τις μικτές ζυμώσεις τα επίπεδα των ανώτερων αλκοολών ήταν υψηλά. Χαμηλές συγκεντρώσεις παρατηρήθηκαν για την 2-φαινυλ-αιθανόλη στις μικτές ζυμώσεις σε σύγκριση με τις καθαρές ζυμώσεις των στελεχών του *S. cerevisiae*, όπως παρατηρήθηκε και στην προηγούμενη έρευνα. Ωστόσο συγκριτικά με τις καθαρές καλλιέργειες του *S. cerevisiae*, οι μικτές ζυμώσεις είχαν αξιοσημείωτη βελτίωση όλων των ανώτερων αλκοολών, εκτός από μια μικτή ζύμωση (Belgian wheat/*T. delbrueckii*), στην οποία δεν παρατηρήθηκαν διαφορές ως προς την ισοβουτανόλη και την n-προπανόλη (Canonico et al., 2017). Σε άλλο πείραμα το οποίο διεξάχθηκε από τους Toh et al., 2018, με εμπορικά στελέχη των *S. cerevisiae* και *T. delbrueckii* σε μικτή ζύμωση, επίσης σε αναλογία 1:20 παρατηρήθηκε σημαντική παραγωγή ανώτερων αλκοολών, συγκριτικά με την καθαρή καλλιέργεια του *S. cerevisiae* με αξιοσημείωτα υψηλότερη συγκέντρωση για την ισοαμυλική αλκοόλη και παρόμοια επίπεδα όσον αφορά την 2-φαινυλ-αιθανόλη. Ωστόσο αυτά τα επίπεδα συγκέντρωσης των ενώσεων που αναφέρθηκαν παρέμεναν χαμηλότερα από την καθαρή καλλιέργεια του εμπορικού στελεχούς της *T. delbrueckii* (Biodiva). Το γεγονός ότι στις μικτές ζυμώσεις η ισοαμυλική αλκοόλη είχε χαμηλότερη συγκέντρωση από την καθαρή καλλιέργεια της *T. delbrueckii*, αναφέρεται ότι ίσως οφείλεται στο γεγονός πως στις ζυμώσεις

που εμπλέκεται ο *S. cerevisiae* παράγεται μεγαλύτερη ποσότητα του αντίστοιχου εστέρα, ο οποίος είναι ο οξικός ισοαμυλεστέρας. Επιπλέον στην ίδια έρευνα αναφέρεται ότι δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική διαφορά ως προς την συγκέντρωση της ισοβουτανόλης μεταξύ των ζυμώσεων, με εξαίρεση την καθαρή καλλιέργεια του στελέχους της *T. delbrueckii* (Biodiva), στην οποία παρουσιάστηκε έλλειψη, ίσως λόγω της μη αφομοίωσης της βαλίνης, ενός αμινοξέος το οποίο αποτελεί πρόδρομο για την παραγωγή της ισοβουτανόλης (Toh et al., 2018). Σε πιο πρόσφατη έρευνα των Canónico et al. (2020) όπου εξετάστηκαν ο *S. cerevisiae* και η *T. delbrueckii* σε συνθήκες μικροζυθοποιίας (Microbrewery Plant) σε μικτή ζύμωση επίσης με αναλογία εμβολίου 1:20, παρατηρήθηκε αύξηση της 2-φαινύλ-αιθανόλης, συγκριτικά με τα αποτελέσματα από την καθαρή καλλιέργεια του *S. cerevisiae*. Οι συγκεντρώσεις της αμυλικής και ισοαμυλικής αλκοόλης, όπως αναφέρεται δεν έδειξαν αξιοσημείωτα αποτελέσματα, αν και στην καθαρή καλλιέργεια του *S. cerevisiae* σημείωσαν χαμηλότερες τιμές (Canónico et al., 2020). Σε ένα διαφορετικό πείραμα όπου εξετάστηκε στέλεχος της *T. delbrueckii* σε καθαρή καλλιέργεια αλλά και σε συνθήκες όπου εμβολιάστηκε στο μπουκάλι αφού είχε ολοκληρωθεί η ζύμωση από τον *S. cerevisiae*, παρατηρήθηκε αύξηση των ανώτερων αλκοολών (1-προπανόλη, ισοβουτανόλη, 2-μεθυλ-1-βουτανόλη, 3-μεθυλ-1-βουτανόλη) στη δεύτερη περίπτωση, ενώ για την καθαρή καλλιέργεια της *T. delbrueckii* οι ανώτερες αλκοόλες σημείωσαν χαμηλότερες τιμές συγκριτικά με την καθαρή ζύμωση του *S. cerevisiae* (Callejo et al., 2019).

- ο Εστέρες

Σε έρευνα των Michel et al. (2016b), όπου εξετάστηκαν διαφορετικά στελέχη της *T. delbrueckii*, αναφέρεται ότι ένα από τα στελέχη (T9) είχε συνολική συγκέντρωση αιθυλικών εστέρων 3 φορές υψηλότερη συγκριτικά με τα υπόλοιπα στελέχη που ήταν υπό μελέτη, αν και έχει αναφερθεί (Zohre and Erten, 2002) ότι οι ποσότητες χαμηλότερα των 50 mg/L, όπως σε αυτή την περίπτωση, δεν συμβάλλουν στο αρωματικό προφίλ, άλλοι συγγραφείς (Sterckx et al., 2011) έχουν αναφέρει ότι σε συνεργασία με άλλες ενώσεις το συνολικό αρωματικό προφίλ ευνοείται. Στην ίδια έρευνα αναφέρεται επίσης ότι η συνολική ποσότητα του οξικού ισοαμυλεστέρα (αρώματα φρούτων και αρώματα διαλυτή σε υψηλές συγκεντρώσεις) ήταν χαμηλότερα του επιπέδου ανίχνευσής του (0.01 mg/L). Επιπλέον παρατηρήθηκε ότι οι αιθυλικοί εστέρες καπρονοϊκός, καπρικός και καπριλικός, οι οποίοι είναι γνωστοί για τα αρώματα πράσινου μήλου, δεν έφτασαν υψηλότερα της συγκέντρωσης του 0.01 mg/L σε κανέναν από τους εξεταζόμενους ζύθους (Michel et al., 2016b). Σε μία άλλη έρευνα αναφέρεται ότι η συγκέντρωση του οξικού ισοαμυλεστέρα ήταν υψηλότερα από το κατώφλι αντίληψης για το στέλεχος της *T. delbrueckii* και επίσης ότι δεν κατάφερε να φτάσει τη συγκέντρωση των αιθυλικών εστέρων υψηλότερα από τις τιμές στις οποίες γίνονται αισθητοί (Holt et al., 2018). Υψηλή ποσότητα οξικού ισοαμυλεστέρα παρατηρήθηκε και από τους Callejo et al. (2019) για στέλεχος της *T. delbrueckii*. Σε πιο πρόσφατη έρευνα, των Toh et al. (2020) όπου εξετάστηκαν δύο εμπορικά στελέχη της *T. delbrueckii* παρατηρήθηκε ότι η συγκέντρωση του οξικού 2-φαινύλ-αιθυλ-εστέρα και του οξικού ισοαμυλεστέρα ήταν σε υψηλότερα επίπεδα για το ένα εκ' των δύο στελεχών (Prelude). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και για τους αιθυλικούς εστέρες μεσαίας αλυσίδας, εκτός του βουτυρικού αιθυλεστέρα. Η παραγωγή του δεκανοϊκού και δωδεκανοϊκού αιθυλεστέρα ήταν 15 φορές μεγαλύτερη για το στέλεχος Prelude συγκριτικά με το στέλεχος Biodiva. Αναφέρεται επίσης ότι η ποικιλομορφία που παρατηρήθηκε ως προς την παραγωγή εστέρων μεταξύ των στελεχών μπορεί να οφείλεται σε διαφορετική γενική έκφραση (Toh et al., 2020). Σε έρευνα των Canónico et al. (2016) όπου εξετάστηκαν μικτές ζυμώσεις των *S. cerevisiae* και *T. delbrueckii* σε διαφορετικές αναλογίες εμβολίου, αναφέρεται ότι για την αναλογία 1:1 παρατηρήθηκε αύξηση στη συγκέντρωση του οξικού φαινύλ-αιθύλ-εστέρα και παρόμοια επίπεδα βουτυρικού αιθυλεστέρα με τον *S. cerevisiae* σε καθαρή καλλιέργεια ζύμωσης, ενώ οι υπόλοιπες ζυμώσεις είχαν χαμηλότερες συγκεντρώσεις αυτής της ένωσης. Επίσης αναφέρεται ότι η συγκέντρωση του εξανοϊκού και οκτανοϊκού αιθυλεστέρα ήταν υψηλότερη

στις μικτές ζυμώσεις, ιδίως για την αναλογία εμβολίου 1:20, γεγονός που αναφέρεται και σε πιο πρόσφατη έρευνα των Canonico et al. (2020) για τη συγκέντρωση του εξανοϊκού αιθυλεστέρα. Η συγκέντρωση του οξικού αιθυλεστέρα ήταν χαμηλότερη για την καθαρή καλλιέργεια της *T. delbrueckii* και μειωμένη επίσης στις μικτές ζυμώσεις συγκριτικά με την μονοκαλλιέργεια του *S. cerevisiae* (Canonico et al., 2016). Σε άλλη έρευνα όπου εξετάστηκε ένα εμπορικό στέλεχος της *T. delbrueckii* σε καθαρή και σε μικτή ζύμωση με τον *S. cerevisiae*, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι μικτές ζυμώσεις είχαν υψηλότερες συγκεντρώσεις δεκανοϊκού αιθυλεστέρα και δωδεκανοϊκού αιθυλεστέρα, ειδικότερα στη μικτή ζύμωση με αναλογία εμβολίου 1:20, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω σε άλλη έρευνα, καθώς και υψηλότερες συγκεντρώσεις οξικού κιτρονελυλικού εστέρα (citronellyl acetate), ο οποίος όμως δεν εντοπίστηκε στις καθαρές ζυμώσεις των δύο μικροοργανισμών. Επιπλέον, η συγκέντρωση του εξανοϊκού αιθυλεστέρα και του οκτανοϊκού αιθυλεστέρα ήταν υψηλότερη για τις μικτές ζυμώσεις, συγκριτικά με την καθαρή καλλιέργεια της *T. delbrueckii*, ωστόσο χαμηλότερη της μονοκαλλιέργειας του *S. cerevisiae*. Όσον αφορά στον οξικό ισοαμυλεστέρα και τον οξικό 2-φαινύλ-αιθυλεστέρα η καθαρή καλλιέργεια ζύμωσης της *T. delbrueckii* σημείωσε χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε σύγκριση με την μονοκαλλιέργεια του *S. cerevisiae*. Στις μικτές ζυμώσεις οι εστέρες αυτοί είχαν συγκεντρώσεις με τιμές ενδιάμεσα από τις δύο καθαρές καλλιέργειες ζύμωσης των δύο μικροοργανισμών. (Toh et al., 2018). Σε μια άλλη έρευνα των Canonico et al. (2017) όπου εξετάστηκαν μικτές ζυμώσεις, επίσης σε αναλογία 1:20, τριών στελεχών του *S. cerevisiae* με ένα στέλεχος της *T. delbrueckii*, παρατηρήθηκε ότι η συγκέντρωση του οξικού ισοαμυλεστέρα ήταν σημαντικά υψηλότερη στις μικτές ζυμώσεις των WB-06 και Belgian Wheat με την *T. delbrueckii*, συγκριτικά με τις αντίστοιχες καθαρές καλλιέργειες ζύμωσής τους. Η ποσότητα του οξικού αιθυλεστέρα που ευθύνεται για αρώματα φρούτων ή αρώματα διαλύτη στο ζύθο, ήταν επίσης υψηλότερη σε όλες τις μικτές ζυμώσεις σε σύγκριση με τις αντίστοιχες μονοκαλλιέργειες του *S. cerevisiae*. Όσον αφορά στις συγκεντρώσεις του εξανοϊκού αιθυλεστέρα, του οκτανοϊκού αιθυλεστέρα και του οξικού φαινύλ-αιθύλ-εστέρα ήταν αξιοσημείωτα χαμηλότερες στις μικτές ζυμώσεις συγκριτικά με τις αντίστοιχες καθαρές ζυμώσεις των στελεχών του *S. cerevisiae*. Αυτά τα αποτελέσματα έρχονται σε αντίθεση με τα προηγούμενα που αναφέρθηκαν παραπάνω. Επιπλέον στην ίδια έρευνα παρατηρήθηκε ότι στις μικτές ζυμώσεις με τα στελέχη του *S. cerevisiae* US-05, WB-06, η ποσότητα του βουτυρικού αιθυλεστέρα ήταν υψηλότερη συγκριτικά με τις αντίστοιχες μονοκαλλιέργειες των στελεχών του *S. cerevisiae*, ενώ η μικτή ζύμωση με το στέλεχος Belgian Wheat του *S. cerevisiae*, δεν εμφάνισε κάποια διαφορά συγκριτικά με την αντίστοιχη καθαρή καλλιέργειά του (Canonico et al., 2017).

- Οξικό οξύ

Η *T. delbrueckii* έχει χαρακτηριστεί για την παραγωγή χαμηλών ποσοτήτων ανεπιθύμητων προϊόντων, όπως είναι το οξικό οξύ. Σε έρευνα όπου εξετάστηκαν μικτές ζυμώσεις σε διαφορετικές αναλογίες (1:1, 1:10, 1:20) με τον *S. cerevisiae* και την *T. delbrueckii*, παρατηρήθηκε ότι οι μικτές ζυμώσεις είχαν αξιοσημείωτα υψηλότερα επίπεδα οξικού οξέος, συγκριτικά με τις καθαρές ζυμώσεις της *T. delbrueckii* (Canonico et al., 2016). Ωστόσο σε άλλη έρευνα των Canonico et al. (2017), όπου εξετάστηκε η *T. delbrueckii* σε καθαρή ζύμωση και σε μικτές ζυμώσεις με διαφορετικά στελέχη του *S. cerevisiae*, η ποσότητα του οξικού οξέος ήταν υψηλότερη για την καθαρή καλλιέργεια ζύμωσης της *T. delbrueckii* συγκριτικά με τις δύο από τις καθαρές ζυμώσεις του *S. cerevisiae* και τις δύο από τις μικτές ζυμώσεις (Canonico et al., 2017). Σε πιο πρόσφατη έρευνα, στην οποία εξετάστηκαν δύο εμπορικά στελέχη της *T. delbrueckii* παρατηρήθηκε επίσης ένα υψηλό επίπεδο οξικού οξέος. Ωστόσο, αναφέρεται από τους συγγραφείς ότι δεν είναι δυνατόν να προέρχεται από το μεταβολισμό της ζύμης και ίσως οφείλεται στο εκχύλισμα της βύνης, όπου όπως αναφέρεται διάφορα πρόσθετα σε αυτό μπορούν να αυξήσουν τη συγκέντρωση του οξικού οξέος. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι το ένα από τα δύο στελέχη ίσως χρησιμοποίησε το οξικό οξύ, γεγονός το οποίο αντικατοπτρίζεται με μία μείωση η οποία μπορεί να οφείλεται στην σύνθεση

του συνενζύμου ακέτυλο-A από το οξικό οξύ προς σύνθεση διάφορων παραπροϊόντων. Αν και όπως αναφέρεται δεν παρατηρήθηκε παραγωγή οξικού οξέος από τα στελέχη της *T. delbrueckii*, η συγκέντρωση του ήταν υψηλότερα από το κατώφλι ανίχνευσης, χωρίς ωστόσο να σημειωθεί κάποια αίσθηση ξυδιού (Toh et al., 2020).

- ο Μηλικό οξύ

Σε έρευνα όπου εξετάστηκε ένα εμπορικό στέλεχος της *T. delbrueckii* (Biodiva) σε μικτές ζυμώσεις με τον *S. cerevisiae* σε αναλογίες *S. cerevisiae*/*T. delbrueckii* 1:2, 1:20, παρατηρήθηκε μια γενική μείωση του μηλικού οξέος, η οποία έφτασε τουλάχιστον το 0.40 g/L. Ωστόσο στην καθαρή καλλιέργεια της *T. delbrueckii* παρατηρήθηκε η χαμηλότερη πρόσληψη και το μηλικό οξύ σταθεροποιήθηκε στο 0.55 g/L, αν και στην καθαρή καλλιέργεια υπήρχε ο ταχύτερος ρυθμός κατανάλωσης και έπειτα ακολουθούσαν οι μικτές ζυμώσεις 1:2 και 1:20. Επίσης αναφέρεται ότι στις ζυμώσεις όπου κυριαρχούσε το στέλεχος της *T. delbrueckii* παρατηρήθηκε μια αρχική αύξηση του μηλικού οξέος, γεγονός το οποίο μπορεί να οφείλεται στην πιο εμφανή αερόβια αναπνοή του συγκεκριμένου στελέχους όπου μέσω του κύκλου του Krebs παρήγαγε το μηλικό οξύ (Toh et al., 2018). Σε μια άλλη έρευνα των Toh et al. το 2020 παρατηρήθηκε μείωση του μηλικού οξέος και για τα δύο εμπορικά στελέχη της *T. delbrueckii* που εξετάστηκαν, περίπου μέχρι την 4^η ημέρα πριν σταθεροποιηθεί. Η μείωση αναφέρεται ότι θα μπορούσε να αποδοθεί σε κυτταρική πρόσληψη και κατακράτηση του μηλικού οξέος από τα στελέχη (Toh et al., 2020).

- ο Ηλεκτρικό οξύ

Οι Toh et al. (2018) σε έρευνά τους ανέφεραν ότι οι τάσεις κατανάλωσης του ηλεκτρικού οξέος στην καθαρή καλλιέργεια του στελέχους της *T. delbrueckii* και στη μικτή ζύμωση των *S. cerevisiae*/*T. delbrueckii* σε αναλογία 1:20, παρουσίασαν πολύ μεγαλύτερη πτώση συγκριτικά με την καθαρή ζύμωση του *S. cerevisiae* και την μικτή ζύμωση σε αναλογία 1:2, γεγονός το οποίο μπορεί να οφείλεται στην είσοδο του ηλεκτρικού οξέος στον κύκλο του Krebs. Επίσης αναφέρεται ότι παρατηρήθηκε δραστική μείωση από την 7^η ημέρα για την μικτή ζύμωση σε αναλογία 1:20, γεγονός το οποίο μπορεί να οφείλεται στο στέλεχος της *T. delbrueckii* όπου μπορεί να χρησιμοποίησε το ηλεκτρικό οξύ ως υπόστρωμα έπειτα από την εξασθένηση των σακχάρων ή να οφείλεται σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο ζυμών ή στο περιβάλλον ανάπτυξης το οποίο μπορεί να υπήρξε στρεσογόνο (Toh et al., 2018). Σε άλλη πιο πρόσφατη έρευνα των Toh et al. (2020) όπου εξετάστηκαν δύο εμπορικά στελέχη της *T. delbrueckii*, αναφέρεται ότι το ηλεκτρικό οξύ ήταν το κύριο οργανικό οξύ και στους δύο ζύθους που παράχθηκαν, με εκείνον που παράχθηκε από το στέλεχος της Biodiva να έχει αξιοσημείωτα υψηλότερη συγκέντρωση. Αυτά τα αποτελέσματα είναι σύμφωνα και με τα αποτελέσματα της έρευνας των Puertas et al. (2017), όπου είχαν αναφέρει ότι οι ζύθοι που παράγονται από την *T. delbrueckii* σημειώνουν υψηλότερες συγκεντρώσεις ηλεκτρικού οξέος συγκριτικά με εκείνους που παράγονται από τον *S. cerevisiae* (Toh et al., 2020).

- ο Τερπενικές ενώσεις

Σε έρευνα των Toh et al. (2018) αναφέρεται ότι οι κύριοι τερπενικοί υδρογονάνθρακες του λυκίσκου που χρησιμοποιήθηκε ανιχνεύθηκαν στο ζυθογλεύκος. Παρατηρήθηκαν κάποιες διακυμάνσεις σε αυτές τις τερπενικές ενώσεις, παρόμοιες ανάμεσα στους ζύθους που παράχθηκαν, με εξαίρεση την καθαρή καλλιέργεια ζύμωσης του εμπορικού στελέχους της *T. delbrueckii* (Biodiva). Επιπλέον παρατηρήθηκε ότι οι τερπενικές ενώσεις λιναλοόλη και κιτρονελοόλη ενώ απουσίαζαν από το γλεύκος, εντοπίστηκαν μόνο στο ζύθο που ζυμώθηκε από το στέλεχος (Biodiva) της *T. delbrueckii*. Ωστόσο δύο άλλες ενώσεις, το α-φαρνεσένιο και το καδαλένιο (α-farnesene and cadalene) εντοπίστηκαν στους άλλους ζύθους, δηλαδή σε εκείνον που παράχθηκε από τον *S. cerevisiae* και στις δύο μικτές ζυμώσεις των δύο μικροοργανισμών. Η απελευθέρωση αυτών των τερπενίων αναφέρεται ότι μπορεί να

οφείλεται στη δράση της β-γλυκοσιδάσης, ένζυμο το οποίο έχει αναφερθεί (Chen, Yap, & Liu, 2015; Praet et al., 2012) ότι παράγεται από την *T. delbrueckii* (Toh et al., 2018). Σε άλλη πιο πρόσφατη έρευνα των Toh et al. (2020), όπου εξετάστηκαν δύο εμπορικά στελέχη της *T. delbrueckii* (Biodiva και Prelude) σε καθαρές καλλιέργειες ζύμωσης, αναφέρεται ότι παρατηρήθηκε μείωση των περισσότερων τερπενικών υδρογονανθράκων μετά τη ζυμωτική διαδικασία, με το στέλεχος της Biodiva να εμφανίζει την πιο αποτελεσματική κατακράτηση τερπενίου. Αναφέρεται επίσης ότι ενώσεις που βρίσκονται στο λυκίσκο που χρησιμοποιήθηκε, όπως το β-μυρκενίο και το α-χουμουλένιο ανιχνεύθηκαν στο ζυθογλεύκος, και η παρουσία της ένωσης β-καρβοφυλλένιο ήταν αισθητή και στους δύο ζύθους, κυρίως σε εκείνον από το στέλεχος της Prelude, αν και δεν είχε ανιχνευθεί στο ζυθογλεύκος (Toh et al., 2020). Οι Canonico et al. (2020) σε έρευνα τους ανέφεραν μια αύξηση της α-τερπινεόλης σε μικτή ζύμωση των *S. cerevisiae/T. delbrueckii* σε αναλογία 1:20 (Canonico et al., 2020).

- ο Φαινολικές ενώσεις

Οι φαινολικές ενώσεις προσδίδουν συνήθως αρώματα φαρμακευτικά, πικάντικα κ.α. όπως ήδη έχει αναφερθεί. Σε κάποιους τύπους ζύθου δεν είναι επιθυμητά. Όσον αφορά στην επίδραση της *T. delbrueckii* σε αυτή την ομάδα ενώσεων γίνεται μια αναφορά σε μία έρευνα των Holt et al. (2018), στην οποία αναφέρεται ότι η παραγωγή φαινολικών ενώσεων σχετίζεται με την ικανότητα του στελέχους της ζύμης να μετατρέπει τα υδροξυκυκνναμικά οξέα που βρίσκονται στο υπόστρωμα. Η *T. delbrueckii* σε αυτή την έρευνα βρέθηκε θετική ως προς αυτό το χαρακτηριστικό, μετατρέποντας σχεδόν όλο το φερουλικό οξύ σε 4-βινυλγλουακόλη (4VG) σε 72 ώρες. Στην ίδια έρευνα ανάμεσα στις διάφορες διαδοχικές ζυμώσεις που διεξάχθηκαν, αναφέρεται ότι η ζύμωση όπου συμμετείχε η *T. delbrueckii* σημείωσε τα υψηλότερα επίπεδα για την 4VG (Holt et al., 2018). Ωστόσο σε άλλη έρευνα παλαιότερα είχε αναφερθεί ότι η ενζυμική δραστηριότητα που απαιτείται για την μετατροπή των υδροξυκυκνναμικών οξέων δεν υπάρχει στην *T. delbrueckii*, με αποτέλεσμα να μην παράγει φαινολικές αρωματικές ενώσεις (Basso et al., 2016), γεγονός το οποίο ίσως οφείλεται καθαρά στο στέλεχος της *T. delbrueckii* που επιλέγεται.

- ο Ακεταλδεύδη και άλλες καρβονυλικές ενώσεις

Σε έρευνα όπου εξετάστηκε εμπορικό στέλεχος της *T. delbrueckii* σε καθαρή καλλιέργεια ζύμωσης και μικτή ζύμωση με τον *S. cerevisiae* σε διαφορετικές αναλογίες εμβολίου, αναφέρεται ότι οι ενδογενής αλδεύδες όπως είναι η 3-μεθυλ-βουτανάλη και η 2-φαινύλακεταλδεύδη μειώθηκαν μέσω της αναγωγής τους στις αντίστοιχες αλκοόλες, ενώ η ακεταλδεύδη παράχθηκε αξιοσημείωτα, ιδίως στη μικτή ζύμωση αναλογίας 1:20 (Toh et al., 2018). Σημαντική αύξηση της ακεταλδεύδης σε μικτές ζυμώσεις με διαφορετικά στελέχη του *S. cerevisiae* και στέλεχος της *T. delbrueckii*, σε αναλογία 1:20, έχει παρατηρηθεί επίσης από τους Canonico et al. (2017), συγκριτικά βέβαια με τις καθαρές καλλιέργειες του *S. cerevisiae*. Μία μόνο μικτή ζύμωση (Belgian wheat/*T. delbrueckii*) εξ' αυτών σημείωσε παρόμοια αποτελέσματα με την αντίστοιχη καθαρή καλλιέργεια του στελέχους του *S. cerevisiae* (Canonico et al., 2017). Σε άλλη πιο πρόσφατη έρευνα των Canonico et al. (2020) παρατηρήθηκε ότι η ποσότητα της ακεταλδεύδης στις καθαρές καλλιέργειες των δύο μικροοργανισμών εμφάνισε μειωτική τάση κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, ενώ αντίθετα στη μικτή ζύμωση (1:20) είχε την ίδια ποσότητα καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας (Canonico et al., 2020). Μια άλλη καρβονυλική ένωση είναι το διακετυλίιο, το οποίο σε έρευνα όπου εξετάστηκαν διαφορετικά στελέχη της *T. delbrueckii*, παρατηρήθηκε ότι σημείωσε τιμές πάνω από την τιμή 0.1 mg/L για όλες τις ζυμώσεις (Michel et al., 2016b). Υψηλή ποσότητα διακετυλίου από την *T. delbrueckii* παρατηρήθηκε και σε άλλο πείραμα, όπου αναφέρεται ότι τα υψηλότερα αυτά επίπεδα μπορεί να οφείλονται στη χαμηλή ικανότητα της *T. delbrueckii* να μειώσει αυτές τις υψηλές ποσότητες αυτού του συστατικού, το οποίο συνήθως μετατρέπεται σε 2,3-βουτανοδιόλη (Callejo et al., 2019). Άλλες καρβονυλικές ενώσεις είναι οι

κετόνες. Η παρουσία τους αναφέρθηκε σε έρευνα των Toh et al. (2018), όπου παρατηρήθηκαν δύο κετόνες στο ζυθογλεύκος, η 6-μεθύλ-5-επτα-2-όνη και η τρανς-β-δαμασκεόνη, οι οποίες είναι ενεργές αρωματικά, προσδίδοντας αρώματα μήλου, κίτρου και μελιού, ωστόσο αναφέρεται ότι εξαντλήθηκαν σημαντικά σε όλους τους ζύθους μετά τη ζυμωτική διαδικασία, ιδίως όταν το εμβόλιο περιείχε μεγαλύτερη ποσότητα του *S. cerevisiae* (Toh et al., 2018). Ίδια αποτελέσματα όσον αφορά την τρανς-β-δαμασκεόνη, αναφέρονται και σε άλλη έρευνα των Toh et al. 2020 και παλαιότερα είχαν αναφερθεί παρόμοια αποτελέσματα και από τους Chevance et al. (2002). Ωστόσο οι Toh et al. 2020 παρατήρησαν επίσης την παρουσία μιας άλλης κετόνης, της γερανυλ-ακετόνης, η οποία δεν ανιχνεύθηκε στο ζυθογλεύκος αλλά ανιχνεύθηκε στους ζύθους που παράχθηκαν και με τα δύο στελέχη της *T. delbrueckii*, αν και το ένα από τα δύο σημείωσε υψηλότερα επίπεδα αυτής.

5.4 Οργανοληπτική αξιολόγηση οίνων και ζύθων με την *T. delbrueckii*

Οι οίνοι οι οποίοι παράγονται αποκλειστικά με τη ζύμη *T. delbrueckii* είτε σε συνεργασία με τον *S. cerevisiae* σε διαδοχικές ή μικτές ζυμώσεις χαρακτηρίζονται ως επι το πλείστον ότι έχουν πιο βελτιωμένη γευστική και αρωματική πολυπλοκότητα. Πιο συγκεκριμένα, αναφέρεται ότι αυξάνεται ο φρουτώδης χαρακτήρας και τα αρώματα λουλουδιών, χαρακτηριστικά που εντοπίστηκαν έπειτα από γευστική δοκιμή έμπειρων δοκιμαστών αλλά και από τις αντίστοιχες αναλύσεις (Cordero-Buesco et al., 2013; Cus and Jenko, 2013; Tataridis et al., 2013; Loira et al., 2014; Renault et al., 2015; Minnaar et al., 2015). Επίσης έχει αναφερθεί ότι στους οίνους που συμμετείχε η *T. delbrueckii* ενισχύθηκε ο ποικιλιακός χαρακτήρας, ειδικότερα σε αρωματικές ποικιλίες, όπως είναι η ποικιλία Sauvignon blanc (Belda et al., 2017; Renault et al., 2016). Σημαντική επίσης αναφορά από τους Medina-Trujillo et al. (2017) είναι και η βελτίωση του αφρού και του αφρισμού σε αφρώδης οίνους (Benito, 2018).

Όσον αφορά τους ζύθους οι οποίοι παράγονται με την ζύμη *T. delbrueckii* είτε σε καθαρή καλλιέργεια ζύμωσης είτε σε συνεργασία με τον *S. cerevisiae*, αναφέρεται ότι σε αρκετές περιπτώσεις παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές από εκείνους που έχουν παραχθεί μόνο από τον *S. cerevisiae*. Έχει αναφερθεί ότι οι συγκεκριμένοι ζύθοι έχουν πιο σύνθετο άρωμα με αρώματα τριανταφύλλου και μελιού (Drosou et al., 2018). Έχει παρατηρηθεί επίσης ενίσχυση στον γευστικό χαρακτήρα δημητριακών, καραμέλα και φρυγανισμένου (Canonico et al., 2016). Επίσης έχει αναφερθεί και αύξηση του φρουτώδη/κιτρικού χαρακτήρα, κυρίως στις ζυμώσεις μόνο με την *T. delbrueckii* (Tataridis et al., 2016), και σε κάποιες αναλογίες εμβολίου για τις μικτές ζυμώσεις των δύο μικροοργανισμών (Canonico et al., 2016). Είναι σημαντικό επίσης να αναφερθεί ότι οι ζύθοι όπου συμμετέχει η *T. delbrueckii* χαρακτηρίζονται από απαλό κίτρινο χρώμα, καθώς και πιο συμπαγή δομή του αφρού, χαρακτηριστικά σημαντικά για την ποιότητα του ζύθου (Canonico et al., 2016, 2020).

Κεφάλαιο 6: Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία διεξάχθηκε βιβλιογραφική μελέτη της non-*Saccharomyces* ζύμης *T. delbrueckii* για την παραγωγή οίνου και ζύθου. Πιο συγκεκριμένα εξετάστηκε ο τρόπος με τον οποίο λειτουργεί ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός στις διάφορες παραμέτρους ζύμωσης για την παραγωγή οίνου και ζύθου, ο τρόπος με τον οποίο ανταποκρίνεται σε συνθήκες ωσμωτικού στρες, καθώς και η επίδραση της στα διάφορα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά που χαρακτηρίζουν τον οίνο και το ζύθο. Η μελέτη για τον τρόπο δράσης της *T. delbrueckii* αφορά καθαρές καλλιέργειες ζύμωσης αυτής, καθώς και μικτές ή/και διαδοχικές ζυμώσεις σε συνεργασία με τον συμβατικό ζυμομύκητα *S. cerevisiae*.

Η *T. delbrueckii* είναι μια από τις πιο διαδεδομένες non-*Saccharomyces* ζύμες, κυρίως στην παραγωγή οίνου, όπου έχει μελετηθεί και εκτενέστερα. Ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός έχει την δυνατότητα να ζυμώνει τη γλυκόζη, η οποία είναι και το βασικό σάκχαρο στο γλεύκος που προέρχεται από τα σταφύλια, καθώς και άλλα σάκχαρα όπως είναι η γαλακτόζη, η ραφινόζη, η τρεχαλόζη και η σακχαρόζη και είναι αμφιλεγόμενες οι μελέτες σχετικά με την ικανότητά της να ζυμώνει τη μαλτόζη, η οποία βρίσκεται σε μεγαλύτερο ποσοστό στο ζυθογλεύκος. Χαρακτηρίζεται από την αντοχή της στην αιθανόλη, ένα σπάνιο χαρακτηριστικό για μια non-*Saccharomyces* ζύμη, καθώς και από την αντοχή της σε ωσμωτικά στρες. Επιπλέον, θεωρείται ως ένας μικροοργανισμός με χαμηλή παραγωγή ανεπιθύμητων προϊόντων κατά τη διαδικασία ζύμωσης, όπως είναι το οξικό οξύ, η ακεταλδεΐδη κ.α, καθώς και από τη θετική της συμβολή στην ποιότητα του τελικού προϊόντος, βελτιώνοντας το αρωματικό και γευστικό προφίλ των οίνων και των ζύθων.

Οι ζυμώσεις οίνου όπου συμμετέχει η *T. delbrueckii* χαρακτηρίζονται από βραδύτερο ρυθμό ζύμωσης συγκριτικά με τις καθαρές ζυμώσεις του *S. cerevisiae*, χαρακτηριστικό το οποίο συναντάται και στις ζυμώσεις για την παραγωγή ζύθου. Οι μικτές και οι διαδοχικές ζυμώσεις οίνου και ζύθου με την *T. delbrueckii* και τον *S. cerevisiae* εμφανίζουν ταχύτερους ρυθμούς ζύμωσης, συγκριτικά με τις καθαρές καλλιέργειες της *T. delbrueckii*, ωστόσο υπάρχει άμεση εξάρτηση από τα στελέχη των μικροοργανισμών που έχουν επιλεγεί, από την αναλογία εμβολίου καθώς και από τις συνθήκες ζύμωσης (π.χ ποσότητα αζώτου στο υπόστρωμα). Η συγκέντρωση της αιθανόλης σε καθαρές καλλιέργειες ζύμωσης της *T. delbrueckii* εμφανίζει ποικιλομορφία τόσο στην παραγωγή οίνου όσο και στις ζυμώσεις ζύθου. Οι τιμές της κυμαίνονται από 7-10 % v/v και από 2-4 % v/v για τον οίνο και το ζύθο, αντίστοιχα. Στις μικτές ωστόσο αλλά και διαδοχικές ζυμώσεις προς παραγωγή οίνου και ζύθου στις περισσότερες περιπτώσεις η απαιτούμενη συγκέντρωση αιθανόλης επιτυγχάνεται. Σημαντικό χαρακτηριστικό της *T. delbrueckii* είναι ο τρόπος ανταπόκρισης σε συνθήκες ωσμωτικού στρες, όπου σε αντίθεση με τον *S. cerevisiae*, ο οποίος παράγει αυξημένες συγκεντρώσεις οξικού οξέος και γλυκερόλης, η *T. delbrueckii* διατηρεί τις δύο ενώσεις σε επιτρεπτά και χαμηλά επίπεδα. Αυτό το χαρακτηριστικό είναι εξαιρετικά σημαντικό, διότι το οξικό οξύ σε μεγάλες συγκεντρώσεις δημιουργεί οσμές ξυδιού και επηρεάζει την ποιότητα του τελικού προϊόντος. Οι δύο μικροοργανισμοί εμφανίζουν και άλλες διαφορές, όπως είναι ο τρόπος κατανάλωσης θρεπτικών ουσιών αλλά και γονιδιακές διαφορές, οι οποίες μπορούν να εξηγήσουν τον διαφορετικό τρόπο λειτουργίας της κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Επιπλέον, οι δύο μικροοργανισμοί εμφανίζουν κάποιου είδους ανταγωνισμό όταν συνυπάρχουν στην καλλιέργεια ζύμωσης, με αποτέλεσμα να χρειάζεται επαρκής μελέτη ώστε να αποφευχθούν

οποιαδήποτε προβλήματα θα μπορούσαν να προκύψουν σε ζυμώσεις βιομηχανικής κλίμακας.

Οργανοληπτικά, στους οίνους που παράγονται με την συμμετοχή της *T. delbrueckii* είτε σε καθαρή καλλιέργεια ζύμωσης είτε σε συνεργασία με τον *S. cerevisiae* παρατηρείται χαμηλή παραγωγή οξικού οξέος και ακεταλδεύδης, ενώσεις που είναι ανεπιθύμητες σε μεγάλες συγκεντρώσεις. Επίσης παρατηρείται μια γενική αύξηση στους αιθυλικούς εστέρες, καθώς και στην 2-φαινύλ-αιθανόλη και 1-προπανόλη. Σημαντική είναι η βελτίωση του ποικιλιακού χαρακτήρα στις ζυμώσεις με την *T. delbrueckii*, όπου επιδρά στις τερπενικές ενώσεις. Αντίστοιχα και στον ζύθο η *T. delbrueckii* επηρεάζει τις τερπενικές ενώσεις που προέρχονται από τον λυκίσκο, αυξάνοντας ορισμένα αρώματα προερχόμενα από αυτόν. Παρατηρείται επίσης υψηλότερη συγκέντρωση για την ισοαμυλική αλκοόλη, καθώς και την 2-φαινυλ αιθανόλη. Ακόμη έχει παρατηρηθεί αύξηση στους αιθυλεστέρες εξανοϊκό και οκτανοϊκό σε μικτές ζυμώσεις κυρίως, ενώ σε καθαρές καλλιέργειες κυρίως του οξικού ισοαμυλεστέρα και των δεκανοϊκού και δωδεκανοϊκού αιθυλεστέρα. Ωστόσο σε αρκετές περιπτώσεις στις ζυμώσεις ζύθου έχει παρατηρηθεί αυξημένη συγκέντρωση οξικού οξέος και ακεταλδεύδης, γεγονός όχι ιδιαίτερα συνηθισμένο για τη συγκεκριμένη ζύμη, αν και για το τελικό προϊόν δεν έχουν αναφερθεί ανεπιθύμητες οσμές. Επίσης στους οίνους και τους ζύθους οι οποίοι παράγονται με την *T. delbrueckii*, έχει αναφερθεί αυξημένη συγκέντρωση ηλεκτρικού οξέος, ένωση η οποία προσδίδει την αλμυρή και τραγανή αίσθηση, ωστόσο χρειάζεται προσοχή διότι σε μεγάλες συγκεντρώσεις εμφανίζει μια πικρή γεύση. Οι οίνοι και οι ζύθοι που έχουν παραχθεί με την *T. delbrueckii* γενικά χαρακτηρίζονται από φρουτώδη αρώματα, αρώματα λουλουδιών και φρεσκάδα και έχουν προτιμηθεί σε διαδικασία γευσιγνωσίας από έμπειρους δοκιμαστές, έναντι εκείνων που παράχθηκαν από τον *S. cerevisiae*.

Γενικά, η *T. delbrueckii* εμφανίζει μεγάλη ποικιλομορφία ανάμεσα στα στελέχη της και ως προς τα ζυμωτικά χαρακτηριστικά καθώς και στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Επίσης φαίνεται να επηρεάζεται και από την αναλογία εμβολίου στις μικτές ζυμώσεις, καθώς και από τη χρονική στιγμή όπου θα εμβολιαστεί ο *S. cerevisiae* σε ενδεχόμενη διαδοχική ζύμωση. Αυτό το γεγονός επιβεβαιώνεται από διάφορες αντιφάσεις και αποκλίσεις που παρατηρήθηκαν μεταξύ των αποτελεσμάτων στις διάφορες έρευνες που έχουν διεξαχθεί. Χρειάζεται λοιπόν ιδιαίτερη προσοχή και μελέτη ώστε να επιτευχθεί το καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα όταν χρησιμοποιηθεί σε ζυμώσεις οίνου και ζύθου βιομηχανικής κλίμακας. Τέλος, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός λόγω της χαμηλότερης παραγωγής αιθανόλης συγκριτικά με τον κλασικό σακχαρομύκητα, καθώς και της ταυτόχρονης παραγωγής αξιόλογων και θετικών αρωματικών και γευστικών ουσιών, έχει τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί στην παραγωγή οίνων και ζύθων με χαμηλότερο αλκοολικό τίτλο. Τέτοια προϊόντα είναι στις προτιμήσεις του καταναλωτικού κοινού της σύγχρονης κοινωνίας, όπως και τα προϊόντα με λιγότερο αντίκτυπο διατροφικά, για το οποίο βέβαια απαιτείται εκτενέστερη έρευνα στους μικροοργανισμούς που είναι ικανοί να το πραγματοποιήσουν.

Βιβλιογραφία

- Basso, R. F., Alcarde, A. R., & Portugal, C. B. (2016). Could non-Saccharomyces yeasts contribute on innovative brewing fermentations? *Food Research International*, *86*, 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.06.002>
- Belda, I., Ruiz, J., Esteban-Fernández, A., Navascués, E., Marquina, D., Santos, A., & Moreno-Arribas, M. V. (2017). Microbial contribution to Wine aroma and its intended use for Wine quality improvement. *Molecules*, *22*(2), 1–29. <https://doi.org/10.3390/molecules22020189>
- Bely, M., Stoeckle, P., Masneuf-Pomarède, I., & Dubourdieu, D. (2008). Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*-*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, *122*(3), 312–320. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.023>
- Benito, S. (2018). The impact of *Torulaspora delbrueckii* yeast in winemaking. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *102*(7), 3081–3094. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8849-0>
- Callejo, M. J., García Navas, J. J., Alba, R., Escott, C., Loira, I., González, M. C., & Morata, A. (2019). Wort fermentation and beer conditioning with selected non-Saccharomyces yeasts in craft beers. *European Food Research and Technology*, *245*(6), 1229–1238. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03244-w>
- Canonico, L., Agarbati, A., Comitini, F., & Ciani, M. (2016). *Torulaspora delbrueckii* in the brewing process: A new approach to enhance bioflavour and to reduce ethanol content. *Food Microbiology*, *56*, 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.12.005>
- Canonico, L., Ciani, E., Galli, E., Comitini, F., & Ciani, M. (2020). Evolution of Aromatic Profile of *Torulaspora delbrueckii* Mixed Fermentation at Microbrewery Plant. *Fermentation*, *6*(1), 14–16. <https://doi.org/10.3390/fermentation6010007>
- Canonico, L., Comitini, F., & Ciani, M. (2017). *Torulaspora delbrueckii* contribution in mixed brewing fermentations with different *Saccharomyces cerevisiae* strains. *International Journal of Food Microbiology*, *259*(July), 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.07.017>
- Capece, A., Romaniello, R., Siesto, G., & Romano, P. (2018). Conventional and non-conventional yeasts in beer production. *Fermentation*, *4*(2). <https://doi.org/10.3390/fermentation4020038>
- Ciani, M., & Maccarelli, F. (1997). Oenological properties of non-Saccharomyces yeasts associated with wine-making. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *14*(2), 199–203. <https://doi.org/10.1023/A:1008825928354>
- Collective, O. I. V., & Document, E. (2021). *So 2 and Wine : a Review. March*.
- Drosou, F., Tataridis, P., Oreopoulou, V., & Dourtoglou, V. (2018). *Brewing with different non-saccharomyces yeast strains. August*, 1–2. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.30797.46569>
- Elizabeth, M., & Whitener, B. (2016). Metabolomic profiling of non- Saccharomyces yeasts in wine by. *PhD Diss., Stellenbosch: Stellenbosch University*, *3*, 1–165.
- González-Barreiro, C., Rial-Otero, R., Cancho-Grande, B., & Simal-Gándara, J. (2015). Wine Aroma Compounds in Grapes: A Critical Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *55*(2), 202–218. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.650336>

- Holt, S., Mukherjee, V., Lievens, B., Verstrepen, K. J., & Thevelein, J. M. (2018). Bioflavoring by non-conventional yeasts in sequential beer fermentations. *Food Microbiology*, *72*, 55–66. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.11.008>
- Jolly, N. P., Augustyn, O. P. H., & Pretorius, I. S. (2017). The Role and Use of Non-Saccharomyces Yeasts in Wine Production. *South African Journal of Enology & Viticulture*, *27*(1). <https://doi.org/10.21548/27-1-1475>
- King, A., & Dickinson, J. R. (2000). Biotransformation of monoterpene alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulasporea delbrueckii* and *Kluyveromyces lactis*. *Yeast*, *16*(6), 499–506. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(200004\)16:6<499::AID-YEA548>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(200004)16:6<499::AID-YEA548>3.0.CO;2-E)
- Legras, J. L., Merdinoglu, D., Cornuet, J. M., & Karst, F. (2007). Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. *Molecular Ecology*, *16*(10), 2091–2102. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03266.x>
- Loira, I., Vejarano, R., Bañuelos, M. A., Morata, A., Tesfaye, W., Uthurry, C., Villa, A., Cintora, I., & Suárez-Lepe, J. A. (2014). Influence of sequential fermentation with *Torulasporea delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* on wine quality. *LWT - Food Science and Technology*, *59*(2P1), 915–922. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.06.019>
- Michel, M., Meier-Dörnberg, T., Jacob, F., Methner, F. J., Wagner, R. S., & Hutzler, M. (2016). Review: Pure non-Saccharomyces starter cultures for beer fermentation with a focus on secondary metabolites and practical applications. *Journal of the Institute of Brewing*, *122*(4), 569–587. <https://doi.org/10.1002/jib.381>
- Maximilian Michel, Jana Kopecká, Tim Meier-Dörnberg, Martin Zarnkow, Fritz Jacob & Mathias Hutzler (2016b). Screening for new brewing yeasts in the non- *Saccharomyces* sector with *Torulasporea delbrueckii* as model. *Journal Yeast*, *33*: 129–144. DOI: 10.1002/yea.3146
- Munsie, J. A. (2002). A Brief History of the International Regulation of Wine Production. *Production, March*, 1–55.
- Nissen, P., Nielsen, D., & Arneborg, N. (2003). Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-Saccharomyces yeasts in mixed cultures by a cell - Cell contact-mediated mechanism. *Yeast*, *20*(4), 331–341. <https://doi.org/10.1002/yea.965>
- Pires, E. J., Teixeira, J. A., Brányik, T., & Vicente, A. A. (2014). Yeast: The soul of beer's aroma - A review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *98*(5), 1937–1949. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5470-0>
- Rainieri, S., & Pretorius, I. S. (2000). Selection and improvement of wine yeasts. *Annals of Microbiology*, *50*(1), 15–31.
- Ramírez, M., & Velázquez, R. (2018). The yeast *Torulasporea delbrueckii*: An interesting but difficult-to-use tool for winemaking. *Fermentation*, *4*(4). <https://doi.org/10.3390/fermentation4040094>
- Renault, P., Miot-Sertier, C., Marullo, P., Hernández-Orte, P., Lagarrigue, L., Lonvaud-Funel, A., & Bely, M. (2009). Genetic characterization and phenotypic variability in *Torulasporea delbrueckii* species: Potential applications in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology*, *134*(3), 201–210. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.06.008>
- Sadoudi, M., Tourdot-Maréchal, R., Rousseaux, S., Steyer, D., Gallardo-Chacón, J. J., Ballester, J., Vichi, S., Guérin-Schneider, R., Caixach, J., & Alexandre, H. (2012). Yeast-yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine

- fermented by single or co-culture of non-Saccharomyces and Saccharomyces yeasts. *Food Microbiology*, 32(2), 243–253. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.06.006>
- Stewart, G. G. (2017a). Flavour Production by Yeast. In *Brewing and Distilling Yeasts*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-69126-8_15
- Stewart, G. G. (2017b). The production of secondary metabolites with flavour potential during brewing and distilling wort fermentations. *Fermentation*, 3(4). <https://doi.org/10.3390/fermentation3040063>
- Styger, G., Prior, B., & Bauer, F. F. (2011). Wine flavor and aroma. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38(9), 1145–1159. <https://doi.org/10.1007/s10295-011-1018-4>
- Taillandier, P., Lai, Q. P., Julien-Ortiz, A., & Brandam, C. (2014). Interactions between *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* in wine fermentation: Influence of inoculation and nitrogen content. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(7), 1959–1967. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1618-z>
- Tataridis, P., Drosou, F., Kanellis, A., Kechagia, D., Logothetis, S., & Chatzilazarou, A. (2016). Differentiating beer aroma, flavor and alcohol content through the use of *Torulaspora delbrueckii*. *Banner*, April, 2. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.24086.57923>
- Tataridis, P., Kanelis, A., Logotetis, S., & Nerancis, E. (2013). Use of non-saccharomyces *Torulaspora delbrueckii* yeast strains in winemaking and brewing. *Zbornik Matice Srpske Za Prirodne Nauke Matica Srpska Journal for Natural Sciences*, 124, 415–426. <https://doi.org/10.2298/zmspn1324415t>
- Toh, D. W. K., Chua, J. Y., & Liu, S. Q. (2018). Impact of simultaneous fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii* on volatile and non-volatile constituents in beer. *LWT - Food Science and Technology*, 91(January), 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.025>
- Toh, D. W. K., Chua, J. Y., Lu, Y., & Liu, S. Q. (2020). Evaluation of the potential of commercial non-Saccharomyces yeast strains of *Torulaspora delbrueckii* and *Lachancea thermotolerans* in beer fermentation. *International Journal of Food Science and Technology*, 55(5), 2049–2059. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14399>
- Tondini, F., Lang, T., Chen, L., Herderich, M., & Jiranek, V. (2019). Linking gene expression and oenological traits: Comparison between *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 294(February), 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.01.014>
- Tufariello, M., Fragasso, M., Pico, J., Panighel, A., Castellarin, S. D., Flamini, R., & Grieco, F. (2021). Influence of non-saccharomyces on wine chemistry: A focus on aroma-related compounds. *Molecules*, 26(3), 1–22. <https://doi.org/10.3390/molecules26030644>
- Varela, C. (2016). The impact of non-Saccharomyces yeasts in the production of alcoholic beverages. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(23), 9861–9874. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7941-6>
- Νεραντζής Η., 2009. Εισαγωγή στην μικροβιολογία. Πανεπιστημιακές εκδόσεις «ΑΡΑΚΥΝΘΟΣ»
- Νεραντζής Η., Ταταρίδης Π. & Κεχαγιά Δ., 2014. Τεχνολογίες βύνης & ζύθου. Αθήνα, Ελλάδα
- Τσακίρης Α. 2014. Οινολογία, από το σταφύλι στο κρασί. Τέταρτη έκδοση, εκδόσεις «ΨΥΧΑΛΟΥ», Αθήνα, Ελλάδα