



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΟΙΝΟΥ, ΑΜΠΕΛΟΥ ΚΑΙ ΠΟΤΩΝ**

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών στην
Επιστήμη Οίνου και Ζύθου
Κατεύθυνση: Ζύθος**

**Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία
Βρετανομύκτης και ζύθος**

Του

Μάριου Κάστανου

Παρουσιάστηκε για τη μερική εκπλήρωση των υποχρεώσεων για την απονομή του
Μεταπτυχιακού Τίτλου Σπουδών στο Τμήμα Επιστημών Οίνου, Αμπέλου & Ποτών
του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής

Επιβλέπων: Δρ. Παναγιώτης Ταταρίδης

ΑΘΗΝΑ, 2021



**UNIVERSITY OF WEST ATTICA
SCHOOL OF FOOD SCIENCES
DEPARTMENT OF WINE, VINE & BEVERAGE SCIENCES**

**Master of Science in
Wine and Beer Science
Option: Beer**

**Master Thesis
Brettanomyces and Beer**

By

Marios Kastanos

Presented for the partial fulfillment of the obligations for the award of the
Master's Degree in the Department of Wine, Vine and Beverage Sciences
of the University of West Attica

Supervisor: Dr. Panagiotis Tataridis

Athens, 2021

Διασαφήσεις

Οι υπογράφωντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία (master thesis) με τίτλο «Βρετανομύκητας και Ζύθος» που παρουσιάστηκε από τον Μάριο Κάστανο και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

The signatories declare that we have examined the postgraduate diploma thesis titled “Brettanomyces and Beer” presented by Mario Kastano and we affirm that it is accepted.

**Όνοματεπώνυμο & Υπογραφή 1ου Μέλους Επιτροπής
(Name and Signature of 1st Commission Member):**

**Όνοματεπώνυμο & Υπογραφή 2^{ου} Μέλους Επιτροπής
(Name and Signature of 2nd Commission Member):**

**Όνοματεπώνυμο & Υπογραφή 3^{ου} Μέλους Επιτροπής
(Name and Signature of 3rd Commission Member):**

Με την υποβολή αυτής της διατριβής, δηλώνω ότι το σύνολο των εργασιών που περιέχονται σε αυτή είναι το δικό μου, πρωτότυπο έργο, ότι εγώ είμαι ο μοναδικός δημιουργός τους (εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά), ότι η αναπαραγωγή και η δημοσίευσή της από το Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής δεν θα παραβιάζει οποιαδήποτε δικαιώματα τρίτων και ότι δεν έχω υποβάλει στο παρελθόν το σύνολο ή μέρος αυτής για την απόκτηση οποιουδήποτε τίτλου.

By submitting this thesis, I declare that the entirety of the work contained therein is my own, original work, that I am the sole author thereof (save to the extent explicitly otherwise stated), that reproduction and publication thereof by University of West Attica will not infringe any third party rights and that I have not previously in its entirety or in part submitted it for obtaining any qualification.

Όνοματεπώνυμο & Υπογραφή Υποψηφίου: Μάριος Κάστανος

(Surname and first name of the candidate): Marios Kastanos



Πνευματική ιδιοκτησία © 2021 Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

Όλα τα δικαιώματα διατηρούνται

Copyright © 2021 University of West Attica

All rights reserved

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μετά την ανακάλυψη του Βρετανομύκητα στις αρχές του 20ου αιώνα, θεωρείται ο κύριος οργανισμός αλλοίωσης οργανοληπτικών χαρακτηριστικών κυρίως στο κρασί, στο μηλίτη και στη μπύρα. Αυτές όμως οι ζύμες μπορούν να προσθέσουν ενδιαφέρον αρώματα αυξάνοντας την πολυπλοκότητα της ζύμωσης στα ποτά, ιδίως στην μπύρα. Η εξαιρετική ανοχή του στους περιβαλλοντικούς παράγοντες κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, καθώς και οι παράμετροι του μεταβολισμού του παρουσιάζονται αναλυτικά στη βιβλιογραφική ανασκόπηση. Οι μειωμένες ανάγκες σε πηγές άνθρακα και αζώτου χαρακτηρίζουν το Βρετανομύκητα. Η παραγωγή πτητικών φαινολών και ορισμένων εστέρων δίδουν ιδιαίτερο γνώρισμα στη ζύμη αυτή. Επίσης αναλύονται οι μέθοδοι άμεσης και έμμεσης ανάλυσης με τις γονιδιωματικές τεχνικές να είναι οι πιο αποτελεσματικές και γρήγορες. Παρουσιάζονται οι αρνητικές επιπτώσεις του Βρετανομύκητα στο κρασί και στο μηλίτη και δίδονται στο τέλος μέθοδοι αποφυγής και ελέγχου του σε μονάδες παραγωγής ποτών. Η ζύμωση με Βρετανομύκητα στην μπύρα δεν είναι κάτι καινούργιο, πιο κάτω παρουσιάζονται τα είδη μπύρας σ' όλο τον κόσμο όπου συμμετέχει μ' άλλους μικροοργανισμούς ή μόνος του. Περιγράφονται ιστορικά στοιχεία και ιδιαίτερες τεχνικές που εφαρμόζονταν και εφαρμόζεται μέχρι σήμερα στα διάφορα στυλ που παράγονται. Χαρακτηριστικό των περισσότερων αυτών των ειδών μπύρας, είναι η μεγάλη σε διάρκεια δευτερογενούς ζύμωσης και η μεγάλη ζυμωτική ικανότητα. Σ' όλα τα στάδια της ζυθοποίησης για την παραγωγή μπυρών με Βρετανομύκητα υπάρχουν ειδικές συνθήκες και τεχνικές για την καλύτερη ζύμωση και παραγωγή των βέλτιστων χαρακτηριστικών του συγκεκριμένου ζυμομύκητα. Πιο κάτω παρουσιάζεται η τεχνολογία ζυθοποίησης με Βρετανομύκητα και οι εγκαταστάσεις ενός ζυθοποιείου που χειρίζεται την συγκεκριμένη ζύμη, με έμφαση στα ξύλινα βαρέλια.

Λέξεις κλειδιά: Βρετανομύκητας, ζύθος, πτητικές φαινόλες, ζύμωση.

ABSTRACT

Brettanomyces and beer

After the discovery of *Brettanomyces* at the beginning of the 20th century, it is considered the main organism for the alteration of organoleptic characteristics, mainly in wine, cider and beer. But these yeasts can add interesting flavors by increasing the complexity of fermentation in beverages, especially beer. Its excellent tolerance to environmental factors during fermentation and the parameters of its metabolism are presented below. Reduced carbon and nitrogen requirements characterize *Brettanomyces*. The production of volatile phenols and special esters give a special feature to this yeast. The methods of direct and indirect analysis are given with the genomic techniques being the most efficient and fast. The negative effects of *Brettanomyces* on wine and cider are presented and at the end methods for its prevention and control in beverage production are given. Fermentation with *Brettanomyces* in beer is not something new, below we present the types of beer around the world where it participates with other microorganisms or alone. Also we present historical information and special techniques applied up to today in various beer styles. Characteristic of most of these types of beer, is the long-lasting secondary fermentation and the high fermentation capacity. In all stages of brewing for the production of beers with *Brettanomyces* there are special conditions and techniques for the best fermentation and production of the optimal characteristics of the specific yeast. The brewing techniques and the facilities of a brewery using *Brettanomyces* are also presented, with an emphasis on wooden barrels.

Keywords: *Brettanomyces*, beer, volatile phenols, fermentation.

Αφιέρωση:

Θα ήθελα να αφιερώσω αυτή τη μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία στη μητέρα μου Έλενα που είναι πάντα δίπλα μου σε όλες τις επιλογές στη ζωή μου που έχω κάνει.

Ευχαριστίες:

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου Δρ. Ταταρίδη Παναγιώτη για την πολύτιμη βοήθειά του στη συγγραφή και ολοκλήρωση της παρούσας μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας, όπως και τις πολύτιμες γνώσεις που μου μετέδωσε καθ'όλη τη διάρκεια παρακολούθησης του μεταπτυχιακού προγράμματος.

Βιβλιογραφικό CV

Πλήρες Ονοματεπώνυμο

Μάριος Κάστανος

Μεταπτυχιακός Τίτλος Σπουδών
«Επιστήμη Οίνου και Ζύθου», κατεύθυνση: Ζύθος

- Τίτλος: Βρετανομύκτης και Ζύθος
- Επιστημονικό Πεδίο:
- Βιογραφικά Στοιχεία: Εργάστηκε στις πιο κάτω επιχειρήσεις :
- 1) Οινοποιείο ΧΩΝΑΣ Ο.Ε, Καμίνια, Λήμνος, Ελλάδα, 2004-2005
 - 2) ΕΤΕΚΑ Ε.Π.Ε, Εισαγωγική εταιρεία μηχανημάτων και οινολογικού εξοπλισμού, Αθήνα, Ελλάδα, 2007
 - 3) Οινοποιείο Κτήμα Νίκος Ρεπάνης ΑΒΕΕ, Νεμέα, Ελλάδα, 2007-2008
 - 4) Οινοποιείο Κτήμα ΚΕΟ plc, Μαλιά, Λεμεσός, Κύπρος, 2009-2012
 - 5) Καλλιέργεια Βιολογικού Ελαιώνα, 2012-2021
- Προσωπικά Στοιχεία:
- Εκπαίδευση:
- α) Πτυχίο Οινολογίας και Τεχνολογίας Ποτών, Τ.Ε.Ι Αθηνών (2006)
 - β) Δίπλωμα Οινοχόου, Le Monde Ινστιτούτο Ξενοδοχειακών και Τουριστικών Σπουδών Αθηνών (2006)
- Εκπλήρωσε τις απαιτήσεις για το Μεταπτυχιακό Τίτλο Σπουδών Επιστήμη Οίνου & Ζύθου με κατεύθυνση: Ζύθος στο Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, Τμήμα Επιστημών Οίνου, Αμπέλου & Ποτών, το Ιούλιο, 2021.
- ΕΓΚΡΙΣΗ ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΟΣ: Δρ Ταταρίδης Παναγιώτης

Πίνακας περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	IV
ABSTRACT.....	IV
Αφιέρωση:	V
Ευχαριστίες:	VI
Βιβλιογραφικό CV	VII
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	X
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ.....	XIII
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ.....	XIII
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	XIII
1.Ιστορική αναδρομή.....	1
2. Ταξινόμηση.....	2
3. Οικολογία.....	5
4. Μεταβολισμός.....	8
4.1 Πηγές άνθρακα.....	10
4.2 Πηγές αζώτου	14
4.3 Πτητικές φαινόλες.....	17
4.4 Πτητικά λιπαρά οξέα	20
4.5 Εστέρες.....	20
4.6 Ενζυμική δραστηριότητα	21
4.7 Βιογενείς αμίνες.....	23
4.8 Τετραϋδροφυριδίνες (mouse Flavor).....	23
5. Μέθοδοι απομόνωσης, καταμέτρησης, ταυτοποίησης.....	25
5.1 Μέθοδοι άμεσης ανάλυσης.....	25
5.1.1 Μέθοδος με τρυβλία.....	25
5.1.2 Μικροσκόπιο	30
5.1.3 Τεχνικές μοριακής βιολογίας.....	32
5.1.4 Κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry)	33
5.1.5 HybriScan© Kits	34
5.2 Μέθοδοι έμμεσης ανάλυσης	34
5.2.1 Αέρια χρωματογραφία-φασματομετρίας μάζας	34
5.3 Βιοαισθητήρες	35
5.4 Γονιδιωματικές τεχνικές.....	36
6. Βρετανομύκτης : Κρασί και Μηλίτης.....	39
6.1 Κρασί.....	39
6.2 Μηλίτης	42
7. Μέθοδοι αποφυγής και ελέγχου Βρετανομύκτηα.....	45
8. Βρετανομύκτης: Μπύρα.....	46

8.1 Είδη	47
8.1.1 Old Ale	47
8.1.2 Berliner Weisse	48
8.1.3 Leipzig-Style Gose	49
8.1.4 Flanders Oud Bruin ή Oud Red Ale	49
8.1.5 Lambic	51
8.1.6 Gueuze	54
8.1.7 Fruit Lambic	55
8.1.8 Farmhouse Ales	56
8.1.8.1 Φλαμανδία	56
8.1.8.1.1 Biere de Garde	57
8.1.8.1.2 Saisons	59
8.1.8.1.3 Farmhouse B. Ευρώπης	63
8.1.9 Adambier	65
8.1.10 100% Βρετανομόκητα	65
8.1.11 Ανάμικτες καλλιέργειες - Βρετανομόκητα	66
8.1.12 Άγριες μύρες - Wild beer	67
8.1.13 India Pale Ale με Βρετανομόκητα	68
8.2 Μύρες στο εμπόριο	69
8.3 Τεχνολογία ζυθοποίησης	78
8.3.1 Νερό	78
8.3.2 Δημητριακά	78
8.3.3 Πολτοποίηση	80
8.3.4 Βρασμός	82
8.3.5 Ψύξη	83
8.3.6 Λυκίσκος	84
8.3.7 Ζυμώσεις	86
8.3.8 Αρώματα ζυμώσεων	98
8.3.9 Προσθήκη φρούτων	100
8.4 Εγκαταστάσεις ζυθοποιείου	102
8.4.1 Βαρέλια	104
8.5 Επίσημοι αναλυτικοί μέθοδοι στην μύρα	109
9. Επίλογος -Συμπεράσματα	110
10. Βιβλιογραφία	113

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Επιστημονική ταξινόμηση Βρετανομύκητα.....	3
Πίνακας 2. Ταξινόμηση Βρετανομύκητα από το National Center for Biotechnology information.....	3
Πίνακας 3. Επισκόπηση ταξινομήσεων.....	4
Πίνακας 4. Αντιδράσεις ανάπτυξης Βρετανομυκήτων και άλλα χαρακτηριστικά.....	8
Πίνακας 5. Χαρακτηριστικά ζυμών <i>Brettanomyces</i> , <i>S.pastorianus</i> , <i>S.cerevisiae</i>	13
Πίνακας 6. Πτητικές φαινόλες σε μύρα και κρασί.....	19
Πίνακας 7. Παραγωγή 4-αιθλογουαιακόλης και 4-αιθυλοφαινόλης από Βρετανομύκητες.....	19
Πίνακας 8. Παραδείγματα θρεπτικών υποστρωμάτων.....	26
Πίνακας 9. Παραδείγματα υποστρωμάτων ανάπτυξης Βρετανομύκητα.....	27
Πίνακας 10. Παραδείγματα υποστρωμάτων ανάπτυξης Βρετανομύκητα.....	27
Πίνακας 11. Συνθετικό υπόστρωμα ανάπτυξης και διαφοροποίησης Βρετανομύκητα.....	28
Πίνακας 12. Γονιδιωματικές αλληλουχίες στελεχών <i>B.bruxellensis</i>	37
Πίνακας 13. Παραγωγή πτητικών φαινολών από Βρετανομύκητες σε μηλίτες μετά από 7 ημέρες ζύμωση.....	44
Πίνακας 14. Παραγωγή πτητικών φαινολών από Βρετανομύκητες σε μηλίτες μετά από 21 ημέρες επώασης.....	44
Πίνακας 15. Ποσοτικά χαρακτηριστικά Old Ale.....	48
Πίνακας 16. Ποσοτικά χαρακτηριστικά Berliner Weisse.....	48
Πίνακας 17. Ποσοτικά χαρακτηριστικά Leipzig Goze.....	49
Πίνακας 18. Διάρκεια ζύμωσης Flanders Red.....	50
Πίνακας 19. Ποσοτικά χαρακτηριστικά Flanders Oud Bruin.....	51
Πίνακας 20. Διάρκεια ζύμωσης Lambic.....	52

Πίνακας 21. Ποσοτικά χαρακτηριστικά Lambic.....	53
Πίνακας 22. Ποσοτικά χαρακτηριστικά Gueuze.....	54
Πίνακας 23. Ποσοτικά χαρακτηριστικά Lambic Fruit.....	55
Πίνακας 24. Ποσοτικά χαρακτηριστικά Biere de Garde.....	59
Πίνακας 25. Παραδοσιακό πρόγραμμα πολτοποίησης Saison.....	62
Πίνακας 26. Παραδείγματα προσθήκης ποσοτήτων μπαχαρικών στις Saison.....	63
Πίνακας 27. Ποσοτικά χαρακτηριστικά Saison.....	63
Πίνακας 28. Ποσοτικά χαρακτηριστικά Adambier.....	65
Πίνακας 29. Χαρακτήρας οξέων και εστέρων στις Wild beer.....	68
Πίνακας 30. Ποσοτικά χαρακτηριστικά Indian Pale Ale.....	69
Πίνακας 31. Ανάλυση νερού επαρχιών Βελγίου παραγωγής Wild Beer.....	78
Πίνακας 32. Παραδοσιακό πρόγραμμα πολτοποίησης ‘Turbid’.....	80
Πίνακας 33. Πολτοποίηση με Infusion.....	81
Πίνακας 34. Παραγωγή φερουλικού οξέος στους 45 °C πολτοποίησης και αντίληψη γεύσης.....	82
Πίνακας 35. Wyeast Laboratories	90
Πίνακας 36. Omega Yeast	91
Πίνακας 37. The Yeast Bay.....	92
Πίνακας 38. White Labs	93
Πίνακας 39. Real Brewers Yeast	94
Πίνακας 40. Inland Island Yeast	95
Πίνακας 41. Escarpment Laboratories.....	95
Πίνακας 42. Giga Yeast.....	96

Πίνακας 43. East Coast Yeast.....	97
Πίνακας 44. Imperial Yeast	98
Πίνακας 45. Χαρακτηριστικά φρούτων που προστίθενται στην παραγωγή Wild Beers.....	101
Πίνακας 46. Κοινά μεγέθη βαρελιών στο Βέλγιο.....	105
Πίνακας 47. Διάλυση O ₂ σε διάφορους τύπους βαρελιών.....	106
Πίνακας 48. Πτητικές φαινόλες σε βαρέλι.....	108

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1. Φαινόμενο Custers.....	9
Σχήμα 2. Σχηματισμός των πτητικών φαινολών από το Βρετανομύκητα.....	18
Σχήμα 3. Πηγές άνθρακα και τα πιο σπουδαία μεταβολικά προϊόντα του Βρετανομύκητα...23	
Σχήμα 4. Ταυτομερή α: 2-ακέτυλο-3,4,5,6-τετραϋδροπυριδίνη και b: 2-ακέτυλο-1,4,5,6-τετραϋδροπυριδίνη.....	24
Σχήμα 5. Δομή της 2 αιθυλοτετραϋδροπυριδίνης.....	24
Σχήμα 6. Προτεινόμενη οδός για το σχηματισμό ετερόκυκλων 2-ακέτυλοτετραϋδροπυριδίνης σε 2-αιθυλοτετραϋδροπυριδίνης από το Βρετανομύκητα.....	24
Σχήμα 7. Βιοσύνθεση μεταβολική οδού στις πτητικές φαινόλες από υδροξυκιναμικούς εστέρες στο μηλίτη.....	43
Σχήμα 8. Στυλ μύρας με Βρετανομύκητα.....	47

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1. Επίδραση μετάβασης από αερόβιες σε αναερόβιες συνθήκες στο Βρετανομύκητα.....	12
Διάγραμμα 2. Δυναμική ζυμώσεως Lambic.....	52

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Ταξινόμια Βρετανομύκητα.....	4
Εικόνα 2. Nively KITBRETT.....	28
Εικόνα 3. Τρυβλίο με DBDM μέσο καλλιέργειας με αποικίες <i>Brettanomyces bruxellensis</i> ...29	
Εικόνα 4. Τυπική μορφολογία αποικιών του <i>B.bruxellensis</i> όπως καλλιεργούνται σε WL agar.....	29
Εικόνα 5. Μικροσκοπική εικόνα επιφθορισμού από κύτταρα <i>Brettanomyces bruxellensis</i> (x400)	30
Εικόνα 6. <i>B. bruxellensis</i>	31

Εικόνα 7. Βρετανομύκητας σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.....	31
Εικόνα 8. Βρετανομύκητας σε μικροσκόπιο.....	32
Εικόνα 9. HybriScan©.....	34
Εικόνα 10. Υμένιο Βρετανομύκητα.....	41
Εικόνα 11. Παραγωγοί Wild Beers Flanders στο Βέλγιο.....	50
Εικόνα 12. Χάρτης περιοχών Φλαμανδίας.....	57
Εικόνα 13. Χάρτης περιοχών Biere de Garde.....	58
Εικόνα 14. Χάρτης παραγωγών Saison στη Wallonia.....	59
Εικόνα 15. Το coolship στο ζυθοποιείο Lindemans στο Vlezenbeek.....	61
Εικόνα 16. Ξύλινο σκεύος αποξήρανσης στο μουσείο Upper Telemark.....	64
Εικόνα 17. Ξύλινος δακτύλιος με αποξηραμένες ζύμες.....	65
Εικόνα 18. Calabaza Blanca.....	67
Εικόνα 19. Nightmare on Brett.....	70
Εικόνα 20. Sanctification.....	70
Εικόνα 21. Nightmare on Brett Raspberry.....	71
Εικόνα 22. Ζυθοποιείο Crooked Stave Artisan Beer Project.....	71
Εικόνα 23. Bianca Raspberry Wild Wild Brett.....	72
Εικόνα 24. Zenne Y Frontera.....	72
Εικόνα 25. Iris.....	73
Εικόνα 26. Cuvee Saint-Gilloise.....	73
Εικόνα 27. Wild Wild Bret Violet.....	74
Εικόνα 28. Bommen & Granaten.....	74

Εικόνα 29. Peche ‘n Brett.....	75
Εικόνα 30. Brett Loves Citra.....	75
Εικόνα 31. Saison du Swaps with Brettanomyces.....	76
Εικόνα 32. La vie est Belge.....	76
Εικόνα 33. Oude Geuze Honing.....	77
Εικόνα 34. Oude Geuze Cuvee Armand & Gaston.....	77
Εικόνα 35. Coolship στο ζυθοποιείο De Dolle στο Esen, West Flanders.....	84
Εικόνα 36. Coolship στο ζυθοποιείο Cantillon.....	104
Εικόνα 37. Η λευκή μεμβράνη προστατεύει την αυθόρμητη ζύμωση στο ζυθοποιείο Gulpener.....	107
Εικόνα 38. Εσωτερική επιφάνεια ξύλινου βαρελιού χωρίς και με παρουσία Βρετανομύκητα.....	107

1. Ιστορική αναδρομή

Το 1904 το πρώτο είδος Βρετανομύκητα απομονώθηκε από τον Niels Hjelte Clausen στα εργαστήρια έρευνας της Carlsberg και αναφέρεται σαν *Brettanomyces clausenii* (Smith και Divol, 2016; Colomer et al., 2018). Απομονώθηκε για πρώτη φορά μετά από τη δεύτερη ζύμωση σε αγγλική μύρα (English stock ales), καθότι η αρχική ζύμωση από *Saccharomyces* ολοκληρώθηκε και όπως παρατήρησε ο Clausen η δεύτερη ζύμωση ήταν πολύ αργή (Clausen, 1904; Smith και Divol, 2016). Ενδιαφέρον επίσης αποτελεί ότι η αρχική αυτή απομόνωση του Βρετανομύκητα είχε ως αποτέλεσμα τον πρώτο κατοχυρωμένο με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας μικροοργανισμό στην ιστορία, με αριθμό ευρεσιτεχνίας HB GB190328184. Ο Clausen ανέφερε στο δίπλωμα ευρεσιτεχνίας ότι στόχευε στην εφαρμογή του στην κατασκευή αγγλικών μπυρών όπως Ale, Stout και Porter με την καλλιέργεια των νέων ειδών μικροοργανισμών με την ονομασία Βρετανομύκητα (που δεν σχηματίζουν ενδοσπόρια και έτσι διαφέρουν από τους *Saccharomycetes*) ώστε να παράγει γεύση και την ιδιαίτερα χαρακτηριστικά σε τέτοιες μύρες (Steensels et al., 2015). Όπως υποστηρίζει ο Gilliland σε άρθρο του το 1961, κάποιοι ερευνητές είχαν ανακαλύψει το Βρετανομύκητα πριν το Clausen, όμως δεν δημοσίευσαν ποτέ τα ευρήματά τους (Gilliland, 1961; Garshol, 2020). Η ονομασία *Brettanomyces* προέρχεται από το ελληνικό "Brettano" που σημαίνει Βρεττανοί και "myces" που σημαίνει μύκητας (Licker et al., 1999; Smith και Divol, 2016). Τα αρχικά ονόματα των ειδών που απομονώθηκαν φανερώνουν την προέλευσή τους από τη μύρα. Το είδος *lambicus* απομονώθηκε από το Βέλγιο σε μύρες Lambic, ενώ το *bruxellensis* πήρε την ονομασία του από τους ζύθους που παράγονταν στην κοιλάδα Senne κοντά στις Βρυξέλλες στο Βέλγιο (Clausen 1904; Smith και Divol, 2016).

Στην αρχή της δεκαετίας του 1920 απομονώθηκαν περισσότεροι Βρετανομύκητες από μύρες τύπου Lambic και τότε προτάθηκε ως γένος. Το 1933 απομονώθηκε από γερμανικό γλεύκος σταφυλιών και αναφερόταν ως *Mycotorula intermedia* (Smith και Divol, 2016). Η πρώτη συστηματική έρευνα από ζυμομύκητες Βρετανομύκητα διεξήχθη και αναφέρθηκε από τον Mathieu Custers το 1940, ο οποίος χαρακτήρισε 17 διαφορετικά στελέχη απομονωμένα από Αγγλικές και Βέλγικες μύρες (Steensels et al., 2015).

Ο *Brettanomyces vini* απομονώθηκε τη δεκαετία του 1950 σε γαλλικά κρασιά (Smith και Divol, 2016). Στα τέλη της δεκαετίας του 1950 και στις αρχές της δεκαετίας του 1960 δύο Βρετανομύκητες οι *B. intermedius* και *B. schanderlii* είχαν συνδεθεί για το σχηματισμό θολώματος σε κρασιά της Ν. Αφρικής (Smith και Divol, 2016). Γενικά από τη δεκαετία του 1940 έως τη δεκαετία του 1980 γίνονται αναφορές παρουσίας του Βρετανομύκητα από διάφορους συγγραφείς στην Ιταλία, Αυστραλία και Ν. Ζηλανδία (Smith και Divol, 2016).

Προς το τέλος της δεκαετίας του 1970 μερικά γένη Βρετανομύκητα απομονώθηκαν από το νερό που χρησιμοποιήθηκε για το πλύσιμο μήλων σε βιομηχανία μηλίτη (Smith και Divol, 2016). Ο *B. bruxellensis* έχει απομονωθεί τόσο κατά τη διάρκεια της ζύμωσης μηλίτη όσο και κατά τη διάρκεια ωρίμανσης του (Morrissey et al., 2004; Smith και Divol, 2016). Στη βιομηχανία οινοπνευματωδών ποτών η παρουσία του Βρετανομύκητα είναι πιο σπάνια, όμως έχει απομονωθεί σ' όλα τα στάδια ζύμωσης που οδηγούν στην παραγωγή τεκίλας (Lachance, 1995; Smith και Divol, 2016). Στη βιομηχανία παραγωγής βιοαιθανόλης έχει απομονωθεί το στέλεχος *B. bruxellensis* κατά τη διάρκεια των αλκοολικών ζυμώσεων πριν την απόσταξη τους (Basilio et al., 2008), όπως επίσης σε εργοστάσια παραγωγής αιθανόλης που χρησιμοποιούνταν διαφορετικά υποστρώματα π.χ. μελάσας και άμυλο (Smith και Divol, 2016).

2. Ταξινόμηση

Η ετυμολογική προέλευση του γένους ζυμομύκητα *Brettanomyces* προέρχεται από την Μεγάλη Βρετανία όπου και απομονώθηκε για πρώτη φορά από τον Claussen το 1904. Ενώ ο Clausen κάλεσε την απομόνωση του *Brettanomyces* το ταξινόμησε αρχικά ως είδος *Torula* (Steensels et al., 2015). Από την πρώτη του περιγραφή στην ταξινόμηση του Βρετανομύκητα έγιναν πολλές ανακατατάξεις σ' όλα αυτά τα χρόνια, με την αρχική του να βασίζεται σε λίγες ασεξουαλικές αναπαραγωγές (αναμορφικών) παραλλαγών του είδους (Steensels et al., 2015).

Το 1921, ο Kufferath και ο Van Laer απομόνωσαν ένα στέλεχος ζύμης από τις βέλγικες μύρες τύπου *Lambic* με τα ίδια χαρακτηριστικά που περιεγράφηκαν από τον Claussen και το ταξινόμησαν ως *Brettanomyces bruxellensis* (Steensels et al., 2015). Τη δεκαετία του 1960 παρατηρήθηκε σε ορισμένα στελέχη ο σχηματισμός ασκοσπορίων και έτσι το γένος *Dekkera* εισήχθη στην ταξινομία ως τηλεμορφικό, ομόλογο του Βρετανομύκητα (Steensels et al., 2015). Η ονομασία αυτή προήλθε από τον Dr. N.M. Stelling-Dekker διάσημο ταξινομο. Αρκετοί ερευνητές χρησιμοποιούν συνήθως τους όρους *Brettanomyces/Dekkera* μαζί λόγω δυσκολιών διάκρισης μεταξύ των δύο μορφών (Van der Walt, 1964), όπως και στις τεχνικές σπορογένεσης (sporulation) αυτών των ειδών (Smith και Divol, 2016). Στις τρέχουσες ταξινομήσεις οι ζύμες που ανήκουν στο γένος, δεν σχηματίζουν σπόρια (anamorph), ενώ το γένος *Dekkera* περιγράφει τις παραλλαγές όπου σχηματίζονται σπόρια (teleomorph) της ζύμης (Steensels et al., 2015). Τα είδη *B. anomalus* και *B. bruxellensis* έχουν σεξουαλική αναπαραγωγή (teleomorph state) γνωστή ως *Dekkera* (Smith και Divol, 2016). Σύμφωνα με το διεθνή κώδικα ονοματολογίας (the new International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants - the Melbourne Code) για φύκια, μύκητες και φυτά (Κώδικας Μελβούρνης 2012, (<https://www.iapt-taxon.org/melbourne/main.php>), τα είδη μυκήτων πρέπει να εκχωρούνται

μόνο με ένα έγκυρο όνομα. Έτσι το όνομα *Brettanomyces* έχει προτεραιότητα διότι είναι πιο γνωστό και χρησιμοποιείται πιο συχνά στις βιομηχανίες τροφίμων και ποτών έναντι του Dekkera (Steensels et al., 2015).

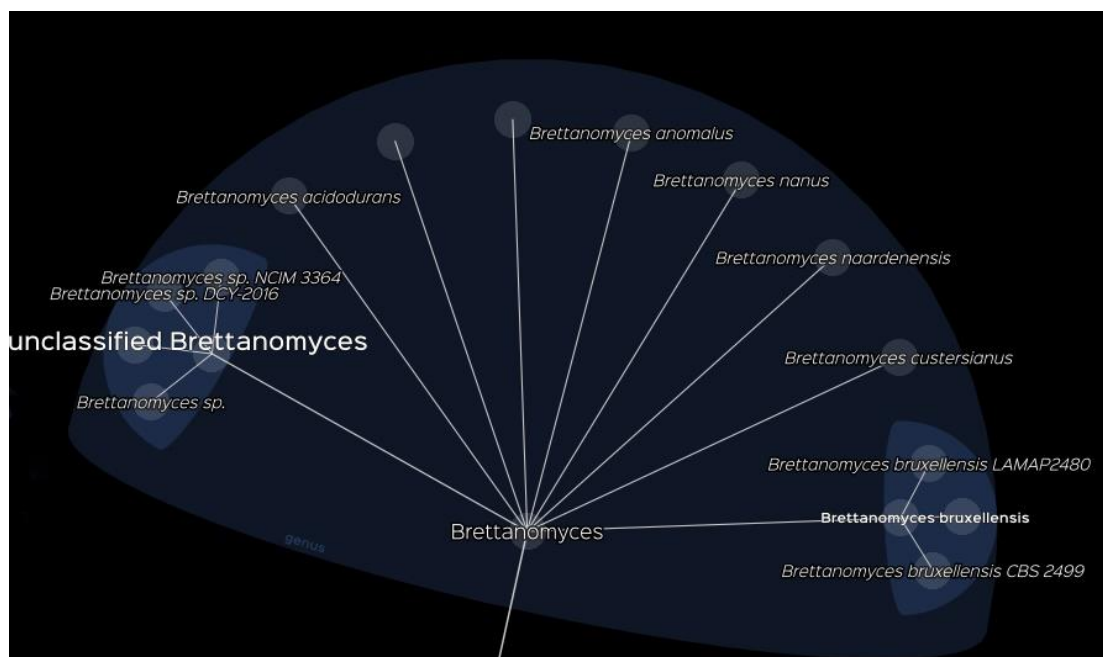
Πίνακας 1. Επιστημονική ταξινόμηση Βρετανομύκητα (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Schoch CL, et al. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. Database (Oxford). 2020: baaa062) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Tree&id=13366&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock>)

Επιστημονική ταξινόμηση Βρετανομύκητα	
Βασίλειο (Kingdom)	Fungi
Συνομοταξία (Phylum)	Ascomycota
Υφομοταξία (Subphylum)	Saccharomycotina
Ομοταξία(Class)	Saccharomycetes
Τάξη (Order)	Saccharomycetales
Οικογένεια (Family)	Pichiaceae
Γένος (Genus)	Brettanomyces

Πίνακας 2. Ταξινόμηση Βρετανομύκητα από το National Center for Biotechnology information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) Schoch CL, et al. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. Database (Oxford). 2020: baaa062 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Tree&id=13366&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock>)

Κατάταξη	Ονομασία	Ταυτότητα Ταξινόμησης (ID)
Είδος	<i>Brettanomyces sp.</i>	2073074
Είδος	<i>B. acidodurans</i>	1958866
Είδος	<i>B. anomalus</i>	37662
Είδος	<i>B. bruxellensis</i>	5007
Στέλεχος	<i>B. bruxellensis</i> AWRI1499	1124627
Στέλεχος	<i>B. bruxellensis</i> CBS 2499	747657
Στέλεχος	<i>B. bruxellensis</i> LAMAP2480	1436216
Είδος	<i>B. aff. Bruxellensis</i> D3955	424581
Είδος	<i>B. custersianus</i>	13368
Είδος	<i>B. cf. Custersianus</i> EVN 1230	1028714
Είδος	<i>B. naardenensis</i>	13370
Είδος	<i>B. nanus</i>	13502
Αταξινομητοι Βρετανομύκητες		
Είδος	<i>Brettanomyces sp.</i> DCY-2016	1807061
Είδος	<i>Brettanomyces sp.</i> HC-2020a	2752591
Είδος	<i>Brettanomyces sp.</i> NCAIM Y.012178	1940653
Είδος	<i>Brettanomyces sp.</i> NCIM 3364	1683731

Στην έκδοση εγχειριδίου από τον Barnett και των συνάδελφων του το 1983 περιγράφονται τα χαρακτηριστικά και η ταυτότητα 9 είδη Βρετανομυκήτων: *B. abstinens*, *B. anomalus*, *B. claussenni*, *B. custersianus*, *B. custersii*, *B. lambicus*, *B. naardenensis*, *Dekkera bruxellensis* και *Dekkera intermedia* (Steensels et al., 2015).



Εικόνα 1. Ταξινόμια Βρετανομύκητα (<http://lifemap-ncbi.univ-lyon1.fr/?tid=13366>)
(<http://lifemap-ncbi.univ-lyon1.fr/>)

Στον πίνακα (3) παρουσιάζεται μια επισκόπηση παλαιών και νέων ταξινομήσεων του *Brettanomyces* και *Dekkera*, καθώς και την αρχική πηγή απομόνωσης για κάθε είδος.

Πίνακας 3. Επισκόπηση ταξινομήσεων (B: *Brettanomyces*, D: *Dekkera*, C: *Candida*)
(Steensels et al., 2015).

Παλιά Ταξινόμηση	Υπόστρωμα Απομόνωσης	Νέα Ταξινόμηση
<i>B. sphaericus</i>	Άλμη αγγουριού	<i>C. etcellsii</i>
<i>B. petrophilum</i>	-	<i>C. parapsilosis</i>
<i>B. italicus</i>	Κρασί	<i>C. stellata</i>
<i>B. versatilis</i>	Άλμη Αγγουριού	<i>C. versatilis</i>
<i>D. custersiana</i>	Μπύρα	<i>B. custersianus</i>
<i>B. custersianus</i>	Μπύρα, Ελιές, Ανθρακούχα Αναψυκτικά, Κρασί	-
<i>D. naardenensis</i>	Ανθρακούχα Αναψυκτικά	<i>B. naardenensis</i>
<i>B. naardenensis</i>	Ανθρακούχα Αναψυκτικά, Μπύρα	-
<i>B. nanus</i>	Μπύρα	<i>B. nanus</i>
<i>D. nana</i>	Μπύρα	<i>B. nanus</i>
<i>E. nana</i>	Μπύρα	<i>B. nanus</i>
<i>E. nonanus</i>	Μπύρα	<i>B. nanus</i>
<i>B. anomalus</i>	Μπύρα, Μηλίτης, Sherry, Τεκίλα	<i>D. anomala</i>

<i>B. cidri</i>	Μηλίτης	<i>D. anomala</i>
<i>B/D clausenii</i>	Μηλίτης, Μπύρα, Sherry	<i>D. anomala</i>
<i>B. dublin(i)ensis</i>	Μπύρα	<i>D. anomala</i>
<i>Candida beijingsis</i>	n/a	<i>D. anomala</i>
<i>Torulopsis cylindrica</i>	Μπύρα	<i>D. anomala</i>
<i>Monilia vini</i>	Κρασί	<i>D. anomala</i>
<i>Mycotorula clausenii</i>	n/a	<i>D. anomala</i>
<i>Oospora vini</i>	Κρασί	<i>D. anomala</i>
<i>D. anomala</i>	Ανθρακούχα αναψυκτικά, Κεφίρ, Μπύρα, Sherry, Μηλίτης	-
<i>B/D abstitens</i>	Ανθρακούχα αναψυκτικά, Μπύρα	<i>D. bruxellensis</i>
<i>B. bruxellensis</i> var. <i>Vini/bruxellensis/lentus/non-membranifaciens</i>	Μπύρα	<i>D. bruxellensis</i>
<i>B. custersii</i>	Μπύρα, Κρασί, Προζύμι	<i>D. bruxellensis</i>
<i>B. intermedius</i>	Ανθρακούχα αναψυκτικά, Μπύρα, Κρασί,	<i>D. bruxellensis</i>
<i>B. lambicus</i>	Μπύρα	<i>D. bruxellensis</i>
<i>B. potavinus</i>	Κρασί	<i>D. bruxellensis</i>
<i>B. schanderlii</i>	Μπύρα, Κρασί	<i>D. bruxellensis</i>
<i>B. vini</i>	Κρασί	<i>D. bruxellensis</i>
<i>D. intermedia</i>	Τσάι	<i>D. bruxellensis</i>
<i>D. lambica</i>	Μπύρα	<i>D. bruxellensis</i>
<i>Mycotorula intermedia</i>	Κρασί	<i>D. bruxellensis</i>
<i>B/D bruxellensis</i>	Κεφίρ, Sherry, Kombucha, Μηλίτης, Βιοαιθανόλη, Προζύμι, Γιαούρτι, Μαύρες ελιές, Ανθρακούχα Αναψυκτικά	-

Τα είδη του Βρετανομύκητα *B. lambicus*, *B. intermedius*, *B. vini*, *B. schanderlii*, *B. clausenii* και *M. intermedia*, όπως και πολλά άλλα έχουν αναταξινομηθεί ως *B. bruxellensis* και τα προαναφερθέντα χρησιμοποιούνται ως συνώνυμα (Smith και Divol, 2016).

Αναγνωρισμένα είδη θεωρούνται : *B. custersianus*, *B. naardenensis*, *B. nanus*, *B. anomalus* και *B. bruxellensis* (Smith και Divol, 2016).

3. Οικολογία

Οι Βρετανομύκητες έχουν βρεθεί σε διάφορες οικολογικές θέσεις, σε διαφορετικά προϊόντα και περιβάλλοντα, εμφανίζοντας κοινά χαρακτηριστικά. Γενικά τους χαρακτηρίζει η αντοχή τους σε υψηλές συγκεντρώσεις αλκοόλης, η ικανότητα διαβίωσης σε χαμηλά θρεπτικά συστατικά όπως και σε χαμηλές συγκεντρώσεις υπολειμματικών σακχάρων και πηγές αζώτου (Smith και Divol, 2016).

Οι ζύμες του γένους Βρετανομύκητα ή του teleomorph *Dekkera* είναι από τις πιο συχνές που ανιχνεύονται ως μικροοργανισμούς αλλοιώσεις σε κρασί, μηλίτη και μπύρα. Ειδικά, οι *B.*

bruxellensis και *B. anomala* έχουν αναφερθεί ως οι πιο επικρατέστερες ζύμες αλλοίωσης (Tubia et al., 2018).

Ο Βρετανομύκητας πρόκειται για μια μη συμβατική ζύμη και μπορεί να απομονωθεί από διαφορετική προέλευση, όπως φλούδες φρούτων, kombucha (προϊόν ζύμωσης), κεφίρ, τσάι, ελιές, ανθρακούχα αναψυκτικά (σόδες) και ξύλινα βαρέλια (Colomer et al., 2018). Έχει αναφερθεί σε αλκοολούχα ποτά όπως κρασί, μπίρα, μηλίτη, στο βυνογλεύκος κατά τη διάρκεια της ζύμωσης για παραγωγή ούσκι (Buron et al., 2011) ή παραγωγής τεκίλας, σε τυριά και προϊόντα ζύμωσης γάλακτος (Tubia et al., 2018). Επίσης, έχει ανιχνευθεί Βρετανομύκητας πάνω σε μέλισσες και μύγες φρούτων, ενώ σε περιοχές με σταφύλια όπου πραγματοποιείται τρύγος κάθε χρόνο η συχνότητα ανίχνευσης είναι πολύ χαμηλή (Tubia et al., 2018).

Τρία είδη Βρετανομύκητα: *B. custersianus*, *B. naardenensis* και *B. nanus* που αναφέρονται στους πίνακες ταξινομίας βρέθηκαν και απομονώθηκαν σε βιομηχανικό εξοπλισμό κατά τη παραγωγή μπίρας, λαδιού, λεμονάδας, αναψυκτικών αλλά και εμφιαλωμένης μπίρας (Smith και Divol, 2016).

Σ' ένα περιβάλλον όπως του κρασιού, με pH 3-4, με υψηλή συγκέντρωση αιθυλικής αλκοόλης (11-15% Vol) και με την παρουσία ενός ισχυρού αντιμικροβιακού όπως του SO₂, ο Βρετανομύκητας μπορεί να αναπτυχθεί. Η παρουσία του μπορεί να βρίσκεται από την αρχή μιας φυσικής ζύμωσης ή και από τη μόλυνση καλλιέργειας όταν εμβολιάζεται σε ένα αζύμωτο γλεύκος σταφυλιού (Smith και Divol, 2016). Συχνά, οι μολύνσεις προκύπτουν από πρακτικές μη ορθής καθαριότητας κατά τη διάρκεια της παραγωγής κρασιών, όπως και στη χρήση καινούργιων βαρελιών ή μεταχειρισμένων που προέρχονται από άλλους παραγωγούς που έχουν μολυνθεί από τον Βρετανομύκητα (Henick-Kling et al., 2000; Smith και Divol, 2016). Η παρουσία του Βρετανομύκητα γίνεται αισθητή όταν μετά το τέλος της αλκοολικής και μηλικογαλακτικής ζύμωσης υπάρχουν αμελητέες ποσότητες σακχάρων και αφομοιώσιμων αζωτούχων συστατικών (Guzzo και Desroche, 2009). Κατά το μεταβολισμό του Βρετανομύκητα παράγονται προϊόντα που σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις θεωρούνται αρνητικά ως προς τον οργανοληπτικό χαρακτήρα ενός ερυθρού κρασιού. Ο χαρακτήρας "Brett" αναπτύσσεται από το συνδυασμό συστατικών όπως 4-αιθυλοφαινόλη, 4-αιθυλογουαϊακόλη και οι βινύ-φαινόλες τους, οξικού οξέος και συστατικά "mousy off flavor", όπως η τετραϋδροπυριδίνη (αζωτούχες ετεροκυκλικές ενώσεις) (Romano et al., 2008).

Ενώ στα κρασιά και στις μπίρες ο Βρετανομύκητας μπορεί με την παρουσία του να συμβάλει καταστροφικά, σε κάποιες μπίρες το είδος αυτό, παίζει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή και διαμόρφωση συγκεκριμένων χαρακτηριστικών της μπίρας. Παραδείγματα αποτελούν οι Βέλγικες μπίρες Lambic, Gueuze, Fruit Lambic (Kriek), Faro, Flanders red και Orval. Η

παρουσία των ζυμών Βρετανομύκητα σ' αυτές του τύπου μύρας μπορεί να γίνει φυσικά (αυθόρμητες ζυμώσεις) ή εμβολιάζοντας με ειδικά στελέχη και δημιουργώντας μια δεύτερη αργή συνήθως ζύμωση, με αποτέλεσμα να παράγονται θετικά οργανοληπτικά προφίλ στη μύρα (Smith και Divol, 2016). Επιπλέον, οι μύρες που εμβολιάζονται με *B. bruxellensis* έχουν την τάση να αυξάνουν το προφίλ της μύρας σε ξινά και γήινα αρώματα. (Van Oevelen et al., 1976).

Η παρουσία Βρετανομυκήτων στους μηλίτες γίνεται εμφανής μετά το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης. Ζύμες όπως *B. bruxellensis* και *B. anomalus* έχουν βρεθεί σε μηλίτη, προκαλώντας παραγωγή πτητικών φαινολών με επακόλουθη αλλοίωση (Morrissey et al., 2004). Το υπόστρωμα για την παραγωγή μηλίτη έχει χαμηλό pH, συνήθως το τελικό προϊόν κυμαίνεται από 3,1-3,5 και δυνατότητες παραγωγής αλκοόλης από 4-7% Vol. Ο χυμός μύλου έχει συγκέντρωση σακχάρων 11-17% κατά όγκο με τα κύρια σάκχαρα να αποτελούνται από τη σακχαρόζη, φρουκτόζη και γλυκόζη. Ένας ξηρός μηλίτης περιέχει μικρότερο από 0,09% κ.ο. σάκχαρα ενώ ένας ημίγλυκος από 0,101-0,105% κ.ο. σάκχαρα. Τα αζωτούχα συστατικά σ ένα μηλίτη κυμαίνονται από 0,0018-0,0063% κ.ο. και αποτελείται από ίχνη ποσότητας αμινοξέων, πεπτιδίων και αμίνων. Οι βιταμίνες στον μηλίτη περιλαμβάνουν θειαμίνη, νικοτινικό οξύ, πανταθενικό και ριβοφλαβίνη (Buglass, 2011; Smith και Divol, 2016).

Ενδιαφέρον έχει παρουσιαστεί με την παρουσία του βρετανομύκητα στη βιομηχανική διαδικασία που χρησιμοποιείται για την παραγωγή βιοαιθανόλης σε μεγάλη κλίμακα. Προκειμένου να παραχθούν σάκχαρα από τη φυτική βιομάζα γίνεται προεπεξεργασία με οξέα ή ένζυμα ώστε να υδρολυθούν οι κυτταρίνες και ημικυττρίνες της ύλης, τα προϊόντα των οποίων στη συνέχεια μπορούν να αποικοδομηθούν από το βρετανομύκητα. Αν και παλιά η παρουσία του Βρετανομύκητα θεωρείτο αρνητική, τώρα κατά περίπτωση μπορεί να θεωρείται ευνοϊκής συνεισφοράς στις ζυμώσεις παραγωγής βιοαιθανόλης (de Souza Liberal et al., 2007; Smith και Divol, 2016).

Οι χυμοί φρούτων και τα αναψυκτικά αποτελούν ευνοϊκά υποστρώματα για την ανάπτυξη του Βρετανομύκητα. Συγκεκριμένα τα προϊόντα αυτά τείνουν να περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις οξέων, με χαμηλό pH και υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων που κυμαίνονται 4-17% κατά όγκο (σακχαρόζης, γλυκόζης και φρουκτόζης). Στα αναψυκτικά ελάχιστες ποσότητες αζώτου προστίθενται, συνήθως ίχνη ποσοτήτων πηκτινών και αμινοξέων, ενώ στους χυμούς φρούτων περιέχονται υψηλές συγκεντρώσεις αζωτούχων συστατικών όπως πηκτίνες και πρωτεΐνες μεταξύ 0,05-0,5% κατά όγκο. Οι βιταμίνες δεν παρουσιάζονται στα αναψυκτικά, ενώ στους χυμούς φρούτων βρίσκονται ίχνη βιταμινών κυρίως ασκορβικό οξύ και ιόντων μετάλλων (Rodriguez-Saona et al., 2001; Smith και Divol, 2016).

4. Μεταβολισμός

Ο Βρετανομύκητας είναι ένα καλά προσαρμοσμένος μικροοργανισμός ειδικός στις ζυμώσεις. Ακόμη και αν οι γενεαλογίες των Βρετανομυκήτων και των *S. cerevisiae* διαχωρίστηκαν περίπου πριν 200 εκατομμύρια χρόνια, και οι δύο μοιράζονται αρκετά ασυνήθιστα χαρακτηριστικά (Steensels et al., 2015). Ο Βρετανομύκητας έχει την ιδιότητα να ευδοκιμήσει σε συνθήκες χαμηλού pH, σε υψηλές συγκεντρώσεις σε αιθυλική αλκοόλη, σε χαμηλή συγκέντρωση σε οξυγόνο (Tubia et al., 2018), και έχει υψηλές αντοχές σε οσμωτικά φαινόμενα (Steensels et al., 2015). Επίσης η παραγωγή απογόνων του γίνεται χωρίς μιτοχονδριακό DNA (Hellborg και Piskur, 2009). Παρά το γεγονός ότι ορισμένα από αυτά τα χαρακτηριστικά είναι ευρέως διαδεδομένα σε όλα τα γένη ζυμών, αυτοί οι παράγοντες σπάνια συνδυάζονται σ' ένα είδος (Piskur et al., 2006).

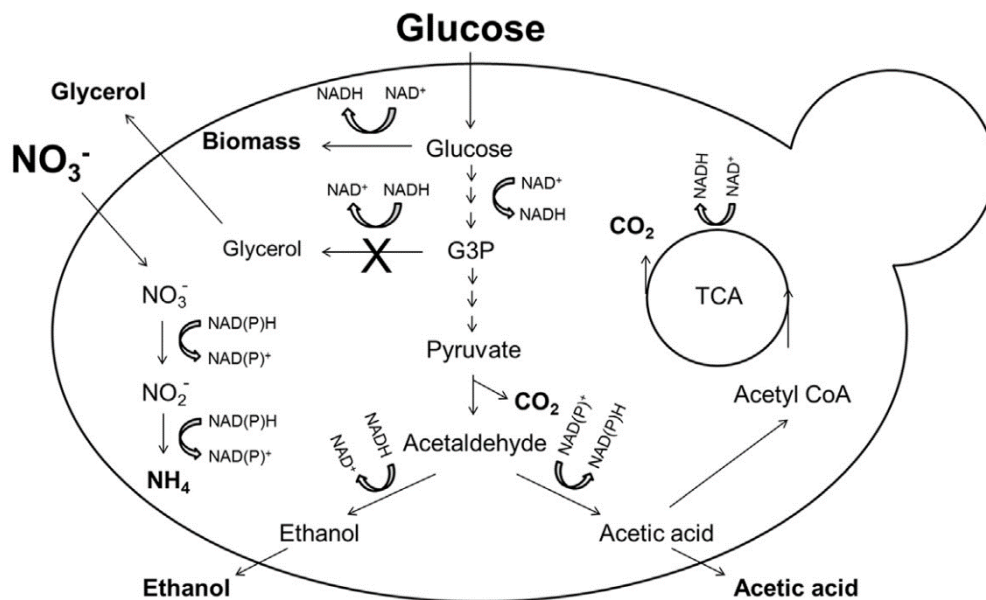
Πίνακας 4. Αντιδράσεις ανάπτυξης Βρετανομυκήτων και άλλα χαρακτηριστικά. Σύμβολα: + : θετικό ή αδύναμο, - : αρνητικό, v: μεταβλητό (+/-, αδύναμο/-) , n : χωρίς δεδομένα (Kurtzman et al., 2011).

Ln. no.	Species	Fermentation						Growth reactions and other characteristics																														
		Glucose	Galactose	Sucrose	Maltose	Lactose	Raffinose	Trehalose	Glucose	Inulin	Sucrose	Raffinose	Melibiose	Galactose	Lactose	Trehalose	Maltose	Melezitose	Methyl- α -D-glucoside	Soluble Starch	Cellulose	Salicin	D-Sorbitose	D-Rhamnose	D-Xylose	D-Arabinose	D-Arabinose	D-Ribose	Methanol	Ethanol	Glycerol	Erythritol	Ribitol	Galactitol	D-Mannitol	D-Glucitol		
76	Brettanomyces																																					
77	<i>B. custersianus</i>	+	-	-	-	-	v	+	-	-	-	-	-	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	
78	<i>B. naardenensis</i>	+	v	-	-	-	-	+	-	-	-	-	v	-		+	v	-	-	v	-	v	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	v	-	+	
79	<i>B. nanus</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	v		v	-	-	-	v	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	

Ln. no.	Species	Growth reactions and other characteristics															Mol% G + C (Ave.)	DDB																									
		myo-Inositol	DL-Lactate	Succinate	Citrate	D-Gluconate	N-Acetyl-D-glucosamine	Hexadecane	Nitrate	Nitrite	Vitamin-free	2-Keto-D-gluconate	5-Keto-D-gluconate	Saccharate	Xylitol	l-Arabinitol			Arbutin	Propane 1,2 diol	Butane 2,3 diol	Cadaverine	Creatinine	l-lysine	Ethylamine	50% Glucose	10% NaCl/5% glucose	Starch formation	Urease	Gelatin liquefaction	Cycloheximide 0.01%	Cycloheximide 0.1%	Growth at 19°C	Growth at 25°C	Growth at 30°C	Growth at 35°C	Growth at 37°C	Growth at 40°C	Growth at 45°C	CoQ (Main component)			
77	Brettanomyces																																										
78	<i>B. custersianus</i>	-	+	+	-	-	n	n	n	n	n	n	-	-	n	n	n	n	n	n	n	n	n	-	-	n	n	n	n	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9	39.1	-
79	<i>B. naardenensis</i>	-	v	+	-	-	v	n	n	n	n	n	-	-	v	n	n	n	n	n	n	n	n	n	-	-	n	n	+	+	+	+	+	v	-	-	-	-	-	-	9	42.7	-
79	<i>B. nanus</i>	-	-	-	-	-	-	-	n	n	n	n	n	-	-	n	n	n	n	n	n	n	n	-	-	n	n	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	9	40.8	-

Κατά την πορεία μιας ζύμωσης ο Βρετανομύκητας στη λανθάνουσα φάση της προσαρμόζει το μεταβολισμό του στις περιβαλλοντικές συνθήκες και καταφέρνει να αναπτυχθεί στο στάδιο

που δεν θα υπάρχει άλλη μαγιά. Οι διάφοροι μηχανισμοί προσαρμογής που διαθέτει του επιτρέπουν να επιβιώσει σε σκληρές συνθήκες (Smith και Divol, 2016). Μπορεί να προσαρμοστεί σε καταστάσεις τις οποίες τα θρεπτικά συστατικά είναι ελάχιστα και μπορεί να χαρακτηριστεί ως μη απαιτητική ζύμη (Suarez et al., 2007). Έχει επίσης παρατηρηθεί ότι ο *B. bruxellensis* είναι ανθεκτικός σε μεγάλες αλλαγές στο pH και στη θερμοκρασία περιβάλλοντος και μπορεί να έχει μεγαλύτερο ενεργειακό μεταβολισμό κάτω από περιορισμένες συνθήκες οξυγόνου (Blomqvist et al., 2010). Σε μελέτη αποκαλύφθηκε ότι το γονιδίωμα του *B. bruxellensis* εμπλουτίζεται σε γονίδια που εμπλέκονται στη μεταφορά αζώτου και λιπιδίων κατά το μεταβολισμό του και αυτό συνδέθηκε με την ικανότητα του να αναπτύσσεται σε μέσα με χαμηλά θρεπτικά συστατικά ή σε υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης (Woolfit et al., 2007). Ο Βρετανομύκητας (που απομονώθηκε σε καθαρή καλλιέργεια) βρέθηκε ότι μπορεί να αναπτυχθεί χρησιμοποιώντας ποικίλες πηγές άνθρακα και αζώτου, ωστόσο έχει προτίμηση σε συγκεκριμένες πηγές που διευκολύνουν την ανάπτυξη του (Crauwels et al., 2015).



Σχήμα 1. Φαινόμενο Custers (Steensels et al., 2015)

Στο σχήμα 1 απεικονίζεται το 'φαινόμενο Custers' στο Βρετανομύκητα με τους κύριους παράγοντες που επηρεάζουν την ισορροπία οξειδοαναγωγής και το σχέδιο ανάπτυξης. Η ισορροπία οξειδοαναγωγής είναι υπεύθυνη για το 'φαινόμενο Custers' που παρατηρείται στο Βρετανομύκητα το οποίο μπορεί να ζυμώνει τη γλυκόζη σε αιθανόλη πιο γρήγορα σε αερόβιες παρά αναερόβιες συνθήκες. Η μετατροπή της 3-φωσφορικής γλυκόζης (G3P) σε γλυκερόλη είναι τυπικά περιορισμένη ή απουσιάζει στο Βρετανομύκητα λόγω περιορισμένης ή απύσας της δραστηριότητας του ενζύμου της 3-φωσφορικής γλυκερόλης της φωσφατάσης. Η

αφομοίωση των νιτρικών καταργεί το 'φαινόμενο Custers' με το να επιτρέψει στο κύτταρο να αναπληρώσει με NAD(P)H μέσω της μείωσης του νιτρικού σε αμμώνιο (Steensels et al., 2015).

4.1 Πηγές άνθρακα

Ο Βρετανομύκητας χρησιμοποιεί πολλές πηγές άνθρακα σε διάφορες οικολογικές συνθήκες, όπως γλυκόζη, φρουκτόζη, μαλτόζη, μαννόζη, αιθανόλη, οξικό οξύ και γλυκερίνης (Smith και Divol, 2016). Υπάρχουν όμως και δημοσιεύσεις που αντικρούουν τη χρήση αυτών ως υποστρωμάτων (Galafassi et al., 2011). Σε μελέτη βρέθηκε ότι κάτω από μερικές αναερόβιες συνθήκες ο *B. bruxellensis* δεν χρησιμοποιούσε την αιθανόλη ως μοναδική πηγή άνθρακα (Vigentini et al., 2008). Αντίθετα σε άλλες μελέτες βρέθηκε ότι ο *B. bruxellensis* μπορούσε να αφομοιώσει την αιθανόλη ως μοναδική πηγή άνθρακα, χωρίς όμως να διευκρινιστούν εάν οι συνθήκες ήταν αερόβιες ή αναερόβιες (Smith και Divol, 2016). Στην περίπτωση της γλυκερίνης διαπιστώθηκε ότι υπήρξε διακύμανση μεταξύ των στελεχών, όπου κάποια μπορούσαν να χρησιμοποιήσουν ως πηγή άνθρακα και κάποια όχι (Conterno et al., 2006; Smith και Divol, 2016). Επίσης, σε άλλη μελέτη βρέθηκε ότι σε υπό ημι-αναερόβιες συνθήκες ο *B. bruxellensis* δεν μπορούσε να χρησιμοποιήσει τη γλυκερίνη καθόλου (Vigentini et al., 2008; Smith και Divol, 2016).

Όταν χρησιμοποιείται το οξικό οξύ ως μοναδική πηγή άνθρακα η μετατροπή του π-κουμαρικού οξέος σε 4-αιθυλ-φαινόλη είναι χαμηλότερη του 10%, αντίθετα με τη γλυκόζη που είναι πιο δυνατή ως μοναδική πηγή άνθρακα όπου η αναλογία παραγωγής 4-αιθυλοφαινόλη φτάνει το 90% (Dias et al., 2003).

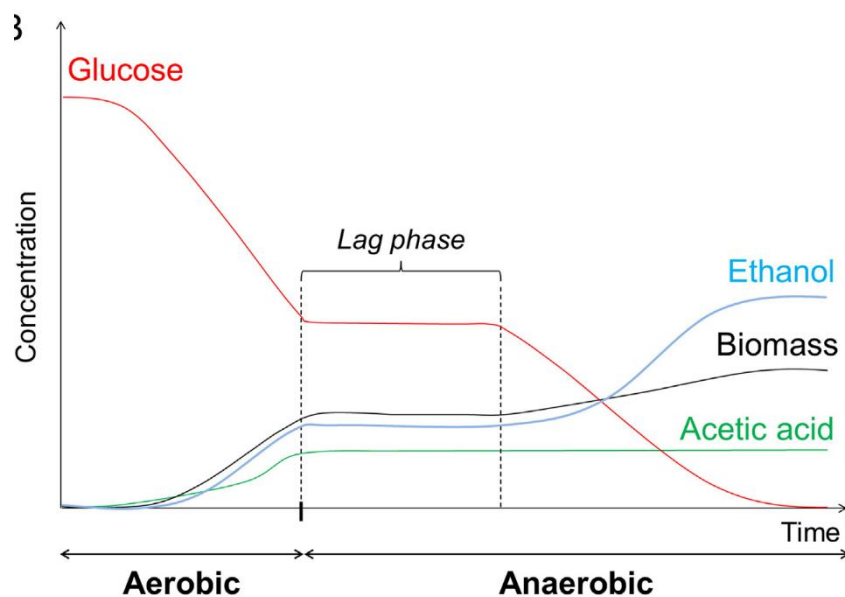
Τόσο οι ζύμες όσο και ο Βρετανομύκητας ακολουθούν τη μεταβολική οδό Grabtree (Grabtree positive) (Colomer et al., 2018). Ένας παράγοντας που μπορεί να συμβάλει στην παρουσία του φαινομένου Grabtree είναι η υψηλότερη ροή άνθρακα και το υψηλότερο ποσοστό παραγωγής ATP, μέσω ζύμωσης, σε σύγκριση με την αναπνοή, παρόλο που η απόδοση ATP για την αναπνοή είναι τουλάχιστον μια τάξη μεγέθους υψηλότερη, το οποίο εξηγεί γιατί σε αερόβιες συνθήκες και με χαμηλή συγκέντρωση σακχάρων τα κύτταρα προτιμούν την αναπνοή σε σχέση με τη ζύμωση (Pasteur effect) (Steensels et al., 2015). Μεταβάλλοντας όμως τις συνθήκες σε αναερόβιες, εμφανίζεται λανθάνουσα φάση λόγω οξειδοαναγωγικής ανισοροπίας στο Βρετανομύκητα (Custers effect) (Colomer et al., 2018). Το φαινόμενο Custers αφορά στη μετατροπή της γλυκόζης σε αιθανόλη και οξικό οξύ κατά τη διάρκεια της ζύμωσης σε αερόβιες συνθήκες). Σε αντίθεση με τους *Saccharomyces* και το φαινόμενο Pasteur όπου προτιμάται η αναπνοή παρουσία οξυγόνου, αντί της ζύμωσης, όταν οι συγκεντρώσεις σακχάρων είναι χαμηλές ο μεταβολισμός των υδατανθράκων του *B/D bruxellensis* υπόκειται σε 'αρνητικό φαινόμενο Pasteur' που σημαίνει ότι η ζύμωση της γλυκόζης σε αιθανόλη εμποδίζεται σε

πλήρη αναερόβιες συνθήκες και διεγείρεται παρουσία οξυγόνου (Barnett και Entian, 2005). Το 'αρνητικό φαινόμενο Pasteur' περιεγράφηκε πρώτα από τον Mathieu Custers το 1940 όπου στη συνέχεια επιβεβαιώθηκε και αναλύθηκε περισσότερο και μετονομάστηκε σε 'φαινόμενο Custers' (Steensels et al., 2015). Ο *B. bruxellensis* μπορεί να παράγει υψηλές ποσότητες οξικού οξέος σε αερόβιες συνθήκες μέσω των NAD⁺ - αλδεϋδικής αφυδρογονάσης της (aldehyde dehydrogenase). Αυτή η μη αναστρέψιμη οξειδωτική μετατροπή από ακεταλδεϋδη σε οξικό οξύ παράγει NADH. Όταν το οξυγόνο ή άλλος εξωτερικός υποδοχέας ηλεκτρονίων είναι παρόν το NADH μπορεί εύκολα να μετατραπεί σε NAD⁺ (Scheffers, 1961). Ωστόσο, όταν το περιβάλλον μεταβάλλεται από αερόβιο σε αναερόβιο η έλλειψη NAD⁺ που δημιουργείται από τη μετατροπή της ακεταλδεϋδης σε οξικό οξύ οδηγεί γρήγορα σε παρεμπόδιση της γλυκόλυσης (Wijisman et al., 1984; Steensels et al., 2015). Μια επιπλέον αιτία του 'φαινόμενου Custers' αποκαλύφθηκε από προσδιορισμό αλληλουχίας RNA του *B. bruxellensis* που αναπτύχθηκε σε μικροαερόβιες συνθήκες (Tiukova et al., 2013; Steensels et al., 2015). Αυτή η μελέτη αποκάλυψε την παρουσία και την υψηλή έκφραση του αναπνευστικού συμπλόκου INADH-αναγωγή της ουβικινόνης (INADH-ubiquinone reductase) (Prochazka et al., 2010; Steensels et al., 2015). Η δραστηριότητα αυτού του συμπλέγματος της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας, η οποία απουσιάζει από τον *S. cerevisiae*, οδηγεί σ' έναν πιο αποτελεσματικό μεταβολισμό σε συνθήκες με χαμηλό οξυγόνο, περιορισμένα θρεπτικά συστατικά, καθώς παράγεται περισσότερο ATP μέσω της αναπνοής (Leite et al., 2012; Steensels et al., 2015).

Οι Βρετανομύκητες παράγουν μηδαμινή έως ελάχιστη γλυκερίνη και παράγουν σημαντική ποσότητα οξικού οξέος σε αερόβιες συνθήκες (Colomer et al., 2018). Σε μελέτες παρατηρήθηκαν παραγωγή γλυκερίνης υπό αναερόβιες συνθήκες σε κάποια από τα στελέχη *B. bruxellensis* σε πολύ όμως χαμηλές συγκεντρώσεις (Blomqvist et al., 2010; Rozpedowska et al., 2011).

Αρκετές ζύμες, όπως ο *S. cerevisiae*, μπορούν να αποκαταστήσουν την ισορροπία τους σε αναερόβιες συνθήκες με την παραγωγή γλυκερίνης αντίθετα με το Βρετανομύκητα που αδυνατεί. Επομένως, λόγω του φαινόμενου Custer θα συμβεί μια ανισορροπία στο δυναμικό οξειδοαναγωγής του κυττάρου και αυτό πιθανώς θα μπορούσε να οφείλεται στην έλλειψη δραστηριότητας του ενζύμου γλυκερίνης 3-φωσφορικής φωσφατάσης (Tiukova et al., 2013; Smith και Divol, 2016). Ωστόσο, ο Βρετανομύκητας θα μπορούσε να χρησιμοποιήσει άλλες βιοχημικές οδούς για να διορθώσει την οξειδοαναγωγή ανισορροπία που εμφανίζεται κατά την κατανάλωση σακχάρων (Curtin et al., 2013). Ως θετική ζύμη Gabtree ο Βρετανομύκητας αναμένεται να συμπεριφέρεται με παρόμοιο τρόπο όπως και με την ζύμη *S. cerevisiae*, όμως

δεν έχει καταγραφεί στη βιβλιογραφία υπό ποιες συνθήκες αυτές οι διορθωτικές οδοί είναι ενεργοποιημένες ή ποιες προτιμάει (Smith και Divoi, 2016). Παρόλο που η αδυναμία στην παραγωγή γλυκερίνης δίνει στον *B/D bruxellensis* ένα ανταγωνιστικό πλεονέκτημα σε σχέση με τον *S. cerevisiae* σε περιβάλλον ζύμωσης με περιορισμένα θρεπτικά συστατικά (δεδομένου ότι η παραγωγή γλυκερίνης είναι μια διαδικασία που καταναλώνει ενέργεια), μειώνει την ταχύτητα ανάπτυξης σε πλούσια υποστρώματα σε συνθήκες αναερόβιωσης και προκαλεί μια επιπλέον σημαντική λανθάνουσα φάση, όταν τα κύτταρα παρνούν από αερόβιο σε αναερόβιο περιβάλλον (Steensels et al., 2015).



Διάγραμμα 1. Επίδραση μετάβασης από αερόβιες σε αναερόβιες συνθήκες στο Βρετανομύκητα (Steensels et al, 2015).

Στο διάγραμμα 1 φαίνεται η επίδραση της μετάβασης από αερόβιες σε αναερόβιες συνθήκες καλλιέργειας στην κινητική κατά την ανάπτυξη του Βρετανομύκητα. Η λανθάνουσα φάση κατά τη μετάβαση από ένα αερόβιο σε αναερόβιο περιβάλλον, προκαλείται από την παρεμπόδιση της γλυκόλυσης, λόγω έλλειψης συνένζυμου NAD^+ . Μόνο όταν ενεργοποιηθούν άλλες αργές διαδρομές ενδοκυτταρικής επανοξειδωσης $NADH$, ο Βρετανομύκητας θα είναι σε θέση να ξεφύγει από την λανθάνουσα φάση και θα αρχίσει να παράγει ξανά αιθανόλη χωρίς παραγωγή οξικού οξέος (Steensels et al., 2015).

Η γλυκόζη είναι από τα πιο δημοφιλή σάκχαρα ως πηγή άνθρακα, όμως τα περισσότερα στελέχη Βρετανομυκήτων μπορούν να μεταβολίσουν μονοσακχαρίτες, δισακχαρίτες, τρισακχαρίτες, αλλά και δεξτρίνες. Ο μεταβολισμός των δεξτρινών είναι σημαντικός λόγω του ότι βρίσκονται στα υπολειπόμενους υδατάνθρακες μιας μύρας που έχει ζυμώσει. Η ικανότητα των στελεχών αυτών να ζυμώνουν τα παραπάνω σάκχαρα μπορεί να έχει χρήση στην

παραγωγή ζύθων με χαμηλές θερμίδες, με το μεταβολισμό όλων των σακχάρων (Colomer et al., 2018).

Ο Βρετανομύκητας σε αναερόβιες συνθήκες χαρακτηρίζεται ως αποτελεσματικός παραγωγός αιθανόλης, εμφανίζοντας αντίσταση σε περιεκτικότητα αιθανόλης πάνω και από 15% και ανοχή σε pH 3 (Colomer et al., 2018). Σε συνθήκες αεροβίωσης και με τα θρεπτικά συστατικά να εξαντλούνται ο Βρετανομύκητας έχει την ιδιότητα να χρησιμοποιεί την αιθανόλη και το οξικό οξύ ως πηγή άνθρακα, προκαλώντας μια ισχυρή οξειδοαναγωγική αστάθεια μέσα στο κύτταρο (Colomer et al., 2018). Ο *B. bruxellensis* είναι ικανός να παράγει, να συγκεντρώνει και στη συνέχεια να καταναλώνει υψηλές συγκεντρώσεις οξικού οξέος σε αερόβιες συνθήκες, όπως επίσης να αντέχει στο προκύπτον περιβάλλον χαμηλού pH (Steensels et al., 2015). Ωστόσο, όλα τα είδη Βρετανομύκητα δεν μοιράζονται τον ίδιο φαινότυπο, παράδειγμα αποτελεί ο *B. naardenensis* ο οποίος διαχωρίστηκε περίπου πριν 100 εκατομμύρια χρόνια από τον *B. bruxellensis* και δεν μπορεί να αναπτυχθεί απουσία οξυγόνου (Rozpedowska et al., 2011). Τα στελέχη του *B. bruxellensis* έχει δειχθεί ότι χρησιμοποιούν τόσο γλυκόζη όσο και αιθανόλη για την παραγωγή οξικού οξέος σε αερόβιες συνθήκες, μ' αυτή την ιδιότητα έχουν προταθεί ως ενδιαφέροντες υποψήφιοι για βιομηχανική παραγωγή οξικού οξέος (Freer et al., 2003).

Πίνακας 5. Χαρακτηριστικά ζυμών *Brettanomyces*, *S. pastorianus*, *S. cerevisiae*
(Colomer et al., 2018)

		<i>Brettanomyces</i>	<i>S. pastorianus</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Κατανάλωση	Γλυκόζη	+	+	+
	Μαλτόζη	+	+	+
	Μαλτοτριόζη	+	+	+
	Δεξτρίνη	+	X	X
	Κελλοβιόζη	+	X	X
	Νιτρικό	+	X	X
Παραγωγή	Αιθανόλη	+	+	+
	Γλυκερόλη	X	+	+
	Οξικό οξύ	+	X	X
	Φαινόλες (μη επιθυμητές)	+	X	+
Ζύμωση	Crabtree	+	+	+
	Custers	+	X	X
	Βέλτιστες θερμοκρασίες ζύμωσης (oC)	21-25	14-16	24-28
	Attenuation	Υψηλή	Κανονική	Κανονική
	Flocculation	Χαμηλή	Χαμηλή-Υψηλή	Χαμηλή-Υψηλή

Ο πίνακας 5 παρουσιάζει γενικά χαρακτηριστικά των ζυμών *Brettanomyces*, *Saccharomyces pastorianus* (Lager) και *Saccharomyces cerevisiae* (Ale) που παίρνουν μέρος στη παραγωγή μύρας. Ο *B. bruxellensis* αποδείχθηκε ότι είναι ικανός να ζυμώσει τη μαλτόζη και τη φρουκτόζη, αν και σε χαμηλότερο ποσοστό σε σύγκριση με τη γλυκόζη (de Barros Pita et al., 2013; Steensels et al., 2015). Η αποτελεσματική κατανάλωση της σακχαρόζης εξαρτάται από την υψηλή απόδοση του μεταφορέα της σακχαρόζης, κάτι που μπορεί να είναι το κλειδί για την υψηλή ανταγωνιστικότητα αυτή της μαγιάς σε ζυμώσεις με βάση τη σακχαρόζη (Tiukona et al., 2013). Οι δεξτρίνες, όπως η μαλτοτετραόζη και η μαλτοπενταόζη υπάρχουν ως υπολειμματικά σάκχαρα μετά την κύρια ζύμωση μύρας. Ο Βρετανομύκητας παράγει α-γλυκοζιδάση επιτρέποντας τους να υδρολύσουν αυτά τα σύνθετα σάκχαρα σε γλυκόζη και να δώσουν μύρες πλήρως ζυμωμένες (superattenuated) με ελαφρώς υψηλότερα επίπεδα αιθανόλης και χαμηλότερες συγκεντρώσεις υπολειμματικών σακχάρων (χαμηλότερο θερμιδικό περιεχόμενο) (Shantha Kumara et al., 1993; Steensels et al., 2015).

Η παρουσία της φρουκτόζης και της γαλακτόζης ως υπόστρωμα έδειξε ότι τα περισσότερα στελέχη μπορούσαν να αναπτυχθούν αξιοποιώντας τα, όπως επίσης και με την παρουσία της μανόζης (Crauwels, 2015), ενώ με την παρουσία της μαλτόζης ως πηγή άνθρακα ο ρυθμός ανάπτυξης και παραγωγής αιθανόλης από το Βρετανομύκητα ήταν χαμηλότερος σε σύγκριση με τη γλυκόζη (Blomqvist et al., 2010). Με τη χρήση ζαχαροκάλαμου-μελάσσας παρατηρήθηκε χαμηλός ρυθμός ζύμωσης, ωστόσο παρατηρήθηκε υψηλή ταυτόχρονη παραγωγή οξικού οξέος και αιθανόλης. Επίσης παρατηρήθηκε ότι ο *B. bruxellensis* δεν χρησιμοποίησε το εξευγενισμένο σάκχαρο από ζαχαροκάλαμο έχοντας χαμηλή ανάπτυξη σε συνδυασμό με την παραγωγή αιθανόλης και οξικού οξέος (Uscanga et al., 2007).

Σάκχαρα, όπως η τρεχαλόζη και η κελλοβιόζη (cellobiose), δεν καταναλώνονται από κάποιες ζύμες όπως ο *S. cerevisiae*, αντίθετα η παρουσία τους σε πολύ μικρές ποσότητες μπορεί να αποτελέσει υπόστρωμα για τον Βρετανομύκητα (Tubia et al., 2018). Η κελλοβιόζη είναι ένας δισακχαρίτης που παρουσιάζεται σε υποστρώματα βιοαιθανόλης δεύτερης γενιάς και ξύλου (π.χ. σε βαρέλια που χρησιμοποιούνται σε κρασί ή μύρα) και μπορεί να αποικοδομηθεί από το ένζυμο β-γλυκοζιδάση όπου συχνά παράγεται από τον Βρετανομύκητα (Steensels et al., 2015). Παράδειγμα είναι το στέλεχος GDB284 *B. Bruxellensis*, το οποίο είναι ικανό να μεταβολίσει την κελλοβιόζη (Reis et al., 2014).

4.2 Πηγές αζώτου

Ο Βρετανομύκητας χρησιμοποιεί ως πηγή αζώτου μεγάλο εύρος αμινοξέων, με την γλουταμίνη να είναι η πιο προτιμώμενη. Η στρατηγική όμως της ζύμης αυτής είναι να επιβιώνει σε χαμηλά σε περιεκτικότητα αζώτου περιβάλλοντα. Η παρουσία του αζώτου στα

υποστρώματα υποστηρίζει το Βρετανομύκητα ώστε να παραμείνει σε αναερόβιες συνθήκες προσπερνώντας το ‘Φαινόμενο Custer’ έτσι ώστε να αυξάνεται η απόδοση της ζύμωσης (Colomer et al., 2018).

Με τη χρήση αμμωνίου ως πηγή αζώτου βρέθηκε αύξηση των στελεχών Βρετανομύκητα (Conterno et al., 2006; Smith και Divol, 2016), θετική επίδραση επίσης είχε η χρήσηθειϊκού αμμωνίου ως πηγή αζώτου (Crauwels et al., 2014). Αντιτίθετα, ορισμένες μελέτες υποστηρίζουν ότι το αμμώνιο δεν έχει καμία επίδραση στην ανάπτυξη του *B. bruxellensis*. Επίσης, σε συγκέντρωσηθειϊκού αμμωνίου παραπάνω από 2 g/l ενδέχεται να αναστέλλεται η δράση του Βρετανομύκητα (Smith και Divol, 2016). Όταν το θρεπτικό μέσο περιείχεθειϊκό αμμώνιο κάτω από απόλυτες αναερόβιες συνθήκες δεν παρατηρήθηκε καμία ανάπτυξη (Blomqvist et al., 2012). Τα αμινοξέα επιτρέπουν την ανάπτυξη του Βρετανομύκητα, ιδίως σε αναερόβιες συνθήκες (Smith και Divol, 2016). Με τη χρήση προλίνης ως μοναδικής πηγής αζώτου βρέθηκε η ανάπτυξη του *B. bruxellensis* με προϋπόθεση να υπάρχει διαθέσιμο αρκετό οξυγόνο (Crauwels et al., 2015). Με την παρουσία προλίνης παρατηρήθηκε αργή και καθυστερημένη ανάπτυξη (de Barros Pita et al., 2013), ενώ και με την επιπλέον προσθήκη της δεν προκάλεσε αύξηση του ρυθμού ανάπτυξης (Blomqvist, 2011). Με την παρουσία αργινίνης όλα τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν αυξήθηκαν (Crauwels et al., 2015). Τα αμινοξέα λυσίνη, ιστιδίνη, αργινίνη, ασπαραγίνη, ασπαρτικό οξύ, γλουταμικό οξύ και αλανίνη προώθησαν την ανάπτυξη του *B. bruxellensis* υπό αναερόβιες συνθήκες (Blomqvist, 2011; Smith και Divol, 2016). Σε μια φαινοτυπική εξέταση μικροσυστοιχιών ο *B. bruxellensis* κατάφερε να οξειδώσει την αλανίνη, ασπαραγίνη, ασπαρτικό οξύ, γλουταμικό οξύ, γλουταμίνη, γλυκίνη, ιστιδίνη, ισολευκίνη, λευκίνη, λυσίνη, μεθειονίνη, φαινυλαλανίνη, σερίνη, θρεονίνη, τρυπτοφάνη, τυροσίνη, και βαλίνη (Crauwels et al., 2015; Smith και Divol, 2016). Όμως η κυστεΐνη και η τρυπτοφάνη δεν ωθούν την ανάπτυξη του *B. bruxellensis* υπό αναερόβιες συνθήκες (Blomqvist, 2011). Η παρουσία των νιτρικών είναι θετική ως προς την ανάπτυξη του Βρετανομύκητα (de Barros Pita et al., 2013; Crauwels et al., 2014), όπως και η χρήση του νιτρικού καλίου που πιθανόν να αφομοιώνεται (Smith και Divol, 2016). Σε μελέτη δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη όπου το θρεπτικό μέσο περιείχε νιτρικό νάτριο υπό πλήρες αναερόβιες συνθήκες (Blomqvist, 2012). Με τη χρήση νιτρώδους καλίου παρατηρήθηκε μια ότι μια πολύ αδύναμη ανάπτυξη του Βρετανομύκητα είναι δυνατή (Smith και Divol, 2016). Επίσης βρέθηκε να υπάρχει δραστηριότητα του ενζύμου νιτρώδους αναγωγάσης (nitrite reductase) σε ορισμένα στελέχη του *B. bruxellensis* (Crauwels et al., 2014). Συγκεκριμένα το νιτρικό μετατρέπεται σε αμμώνιο από δύο διαδοχικές μειώσεις που καταλύονται από τα ένζυμα νιτρική αναγωγάση και νιτρώδους αναγωγάσης (Smith και Divol, 2016). Η έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν αυτά τα ένζυμα NADPH και NADH προκαλείται από τα νιτρικά

και νιτρώδη και καταστέλλεται από το αμμώνιο καθώς και από άλλους παράγοντες που εμπλέκονται στη χρήση δευτερογενών πηγών αζώτου (Rossi et al., 2005). Με τη χρήση αυξανογραφικής μεθόδου (auxanographic method) βρέθηκαν μερικά στελέχη να χρησιμοποιούν το νιτρώδες (Smith και Divol, 2016). Ενώ σε μελέτη από τον Van der Walt το 1963 δεν σημειώθηκε αφομοίωση νιτρώδους σε υγρό θρεπτικό μέσο.

Ο *B. bruxellensis* έχει συγκεκριμένες άλλες προσαρμογές που επωφελούνται σε αυτό το δυσμενές περιβάλλον, όπως η ικανότητα του να καταναλώνει μαζί ταυτοχρόνως νιτρικές και άλλες πηγές αζώτου (Smith και Divol, 2016). Έχει βρεθεί ότι η αφομοίωση των νιτρικών αλάτων καταργούν το φαινόμενο Custer στο *B. bruxellensis*, με αποτέλεσμα αυτό να επιτρέπει τον καλύτερο ζυμωτικό μεταβολισμό (Galafassi et al., 2013). Σε αντίθεση με το *S. cerevisiae* ο *B. bruxellensis* είναι ικανός να χρησιμοποιεί το νιτρικό άλας ως μοναδική πηγή αζώτου και να το καταναλώνει ταυτοχρόνως μαζί με άλλες πηγές αζώτου (de Barros Pita et al., 2011). Αντίθετα σε άλλη μελέτη διαπιστώθηκε ότι δύο στελέχη σε αυστραλιανά κρασιά δεν μπόρεσαν να χρησιμοποιήσουν τα νιτρικά άλατα (Borneman et al., 2014). Ο *S. cerevisiae* δεν μπορεί να χρησιμοποιήσει νιτρικά και νιτρώδης, και σε συγκεκριμένες συνθήκες, όπως στη παραγωγή οίνου, τα αμινοξέα προλίνη και υδροξυπρολίνη δεν μεταβολίζονται (Smith και Divol, 2016), έτσι στο τέλος της αλκοολικής ζύμωσης ορισμένα αμινοξέα είναι διαθέσιμα και άλλα αυξάνονται με την απελευθέρωση τους κατά την αυτόλυση, όπως προλίνη, λευκίνη, τρυπτοφάνη και γ-αμινοβουτυρικό οξύ (Valero et al., 2003). Η κατανάλωση ή παραγωγή συγκεκριμένων αμινοξέων μπορεί εν μέρει να σχετίζονται με τη διατήρηση του δυναμικού οξειδοαναγωγής του κυττάρου (Smith και Divol, 2016).

Η γνώση της αξιοποίησης του αζώτου ή της χρήσης μεμονωμένων πηγών αζώτου από τον *B. bruxellensis* είναι περιορισμένη. Είναι όμως γνωστό ότι ο *B. bruxellensis* χρησιμοποιεί πολλές πηγές αζώτου και έχει χαμηλό επίπεδο απαίτησης αζώτου σε αερόβιες συνθήκες (Smith και Divol, 2016). Ωστόσο, σε μελέτη υπό αυστηρές αναερόβιες συνθήκες το στέλεχος CBS 11270 βρέθηκε ότι δεν μπορούσε να αναπτυχθεί σε θρεπτικό μέσο χωρίς αμινοξέα, ενώ ένας κοινός παράγοντας που επέτρεψε την αναερόβια ανάπτυξη του Βρετανομύκητα ήταν η παρουσία εκχυλίσματος μαγιάς ή οξέων καζαμίνης (casamino acids) (Rozpedowska et al., 2011).

Είναι ενδιαφέρον το ότι σε αναερόβιες συνθήκες η παρουσία νιτρικών στο θρεπτικό υπόστρωμα ζύμωσης επιτρέπει την παραγωγή οξικού οξέος και ταυτόχρονα καταργεί το 'φαινόμενο Custer'. Το οξικό οξύ είναι ο κύριος μεταβολίτης που παράγεται από τη γλυκόζη σε αερόβιες συνθήκες όταν υπάρχει μόνο νιτρικό άλας ως πηγή αζώτου. Τα δύο αυτά φαινόμενα πιθανότητα οφείλονται στη δραστηριότητα των ενζύμων νιτρικής και νιτρώδους αναγωγής τα οποία χρησιμοποιούν το NAD(P)H ως δότη ηλεκτρονίων και λειτουργούν ως

βαλβίδα οξειδοαναγωγής σε αναερόβιες καταστάσεις ή ανταγωνίζονται με το ένζυμο αλκοολικής αφυδρογονάσης για NADH σε αερόβιες συνθήκες (Steensels et al., 2015).

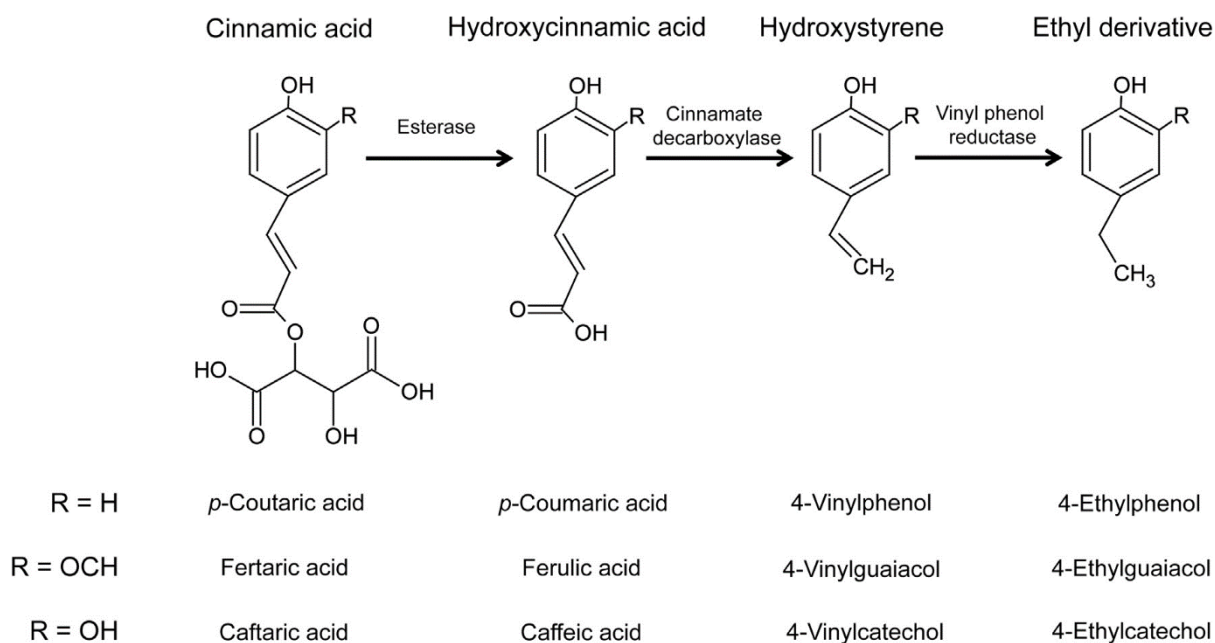
Η προσθήκη λυκίσκου κατά τη διάρκεια του βρασμού στη ζυθοποίηση, αλλά και κατά τη διαδικασία του dry hopping, αποτελεί πηγή αζώτου στο υπόστρωμα του ζυθογλεύκου, γι' αυτό και η απόδοση του Βρετανομύκητα αυξάνεται. Η αφομοίωση νιτρικών βασίζεται στην παρουσία ενός συμπλέγματος γονιδίων που αριθμούνται σε τρία, αλλά δεν βρίσκονται σε όλα τα στελέχη του Βρετανομύκητα και είναι: νιτρική αναγωγή (YNR1), νιτρώδης αναγωγή (YNR1) και μεταφορέας νιτρικού (YNT1) (nitrate reductase (YNR1), nitrite reductase (YNI1) and a nitrate transporter (YNT1)) (Colomer et al., 2018).

4.3 Πτητικές φαινόλες

Οι αρωματικές και οι δραστικές ενώσεις που παράγουν οι Βρετανομύκητες είναι πολλές και πολύπλοκες (Colomer et al., 2018). Υπάρχουν έξι ενώσεις υπεύθυνες για τα φαινολικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά: 4-αιθυλογουαιακόλη (4-ethylguaiacol)(4-EG), 4-αιθυλοφαινόλη (4-ethylphenol)(4-EC), 4-αιθυλοκατεχόλη (4-ethylcatechol)(4-EC) και οι πρόδρομες ενώσεις τους αντίστοιχα: 4-βινυλογουαιακόλη (4-vinylguaiacol)(4-VG), 4-βινυλοφαινόλη (4-vinylphenol)(4-VP) και 4-βινυλοκατεχόλη (4-vinylcatechol)(4-VC) (Steensels et al., 2015). Ένα από τα κυρίως χαρακτηριστικά του Βρετανομύκητα είναι η παραγωγή πτητικών φαινολών με αυτές που ξεχωρίζουν στην παραγωγή αρωμάτων να είναι 4-αιθυλοφαινόλη (4-ethylphenol) (4-EP) και 4-αιθυλογουαιακόλη (4-ethylguaiacol) (4-EG). Το κατώφλι αντίληψης τους είναι πολύ χαμηλό, και η παρουσία τους σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις είναι αισθητή και μπορεί να οδηγήσει σε οσμές όπως ιδρώτας αλόγου, δέρμα, πικάντικο, φαρμακευτικό και καπνιστό (Colomer et al., 2018).

Η παραγωγή πτητικών φαινολών από τον Βρετανομύκητα χωρίζεται σε δύο βήματα και αφορά το φερουλικό οξύ και το π-κουμαρικό που βρίσκονται μέσα στο ζυθογλεύκος. Το πρώτο βήμα είναι η αποκαρβοξυλίωση και το δεύτερο η μείωση. Για την αποκαρβοξυλίωση μεσολαβεί η αποκαρβοξυλάση φαινυλακρικού οξέος (phenylacrylic acid decarboxylase) και η αναγωγή βινυλοφαινόλης (vinylphenol reductase) είναι υπεύθυνη για την μείωση χρησιμοποιώντας NADH ως παράγοντα (Colomer et al., 2018). Ο Βρετανομύκητας μετατρέπει το τρανσ-φερουλικό οξύ σε 4-βινυλόγουαιακόλη (4-vinylguaiacol) και το π-κουμαρικό σε 4-βινυλοφαινόλη (4-vinylphenol). Στη συνέχεια, με τη βοήθεια των ενζύμων αναγωγάσις βινυλοφαινολών η 4-βινυλόγουαιακόλη μετατρέπεται σε 4-αιθυλογουαιακόλη και η 4-βινυλοφαινόλη σε 4-αιθυλοφαινόλη (Holt et al., 2017). Να σημειωθεί ότι τα αποτελέσματα διαφέρουν σε διαφορετικές συνθήκες όπως pH και συγκέντρωση αιθανόλης (Colomer et al., 2018). Παρατηρήθηκε ότι σε συνθήκες περιορισμένου οξυγόνου ενισχύεται η δραστηριότητα

του ενζύμου αναγωγάσης βινυλοφαινόλης, αυξάνοντας έτσι τη διαθεσιμότητα NAD⁺ (Curtin et al., 2013; Steensels et al., 2015).



Σχήμα 2. Σχηματισμός των πτητικών φαινολών από το Βρετανομύκητα

(Steensels et al., 2015).

Στο σχήμα 2 φαίνεται ο σχηματισμός των πτητικών φαινολών από το Βρετανομύκητα, με την δραστηριότητα του φαινυλακρυλικού οξέος να συναντάται συχνά και σε στελέχη *Saccharomyces*, ενώ η δραστηριότητα της αναγωγάσης βινυλοφαινόλης παρουσιάζεται ειδικά από τα στελέχη του Βρετανομύκητα (Steensels et al., 2015).

Πέρα από το Βρετανομύκητα/*Dekkera*, ο μεταβολισμός αυτός έχει παρατηρηθεί και σε άλλα είδη όπως: *Pichia guilliermondii*, *Candida versatilis*, *Candida halophila* και *Candida mannitofaciens*, όμως μόνο ο Βρετανομύκητας είναι ικανός σε τόσο χαμηλά pH, υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης και χαμηλά επίπεδα οξυγόνου (Tubia et al., 2018). Οι συγκεντρώσεις που θα παραχθούν σε 4-αιθυλογουαιακόλη και 4-αιθυλοφαινόλη στη μύρα εξαρτώνται από το ίδιο το στέλεχος του Βρετανομύκητα αλλά και από τα επίπεδα του υδροξυκινναμικού οξέος (hydroxycinnamic acid) (Holt et al., 2017). Αναφέρεται ότι το 80% των Βρετανομυκήτων μπορούν να παράγουν αυτές τις φαινόλες και μόνο το 50% αυτών σε υψηλές συγκεντρώσεις (Tubia et al., 2018).

Η πηγή απομόνωσης στελέχους Βρετανομύκητα μπορεί να έχει επίδραση στο μεταβολισμό των πρόδρομων ουσιών. Στελέχη μύρας είναι περισσότερο πιθανό να μεταβολίζουν το φερουλικό οξύ, ενώ στελέχη κρασιού το *p*-κουμαρικό οξύ (Colomer et al., 2018). Έτσι η μύρα έχει μεγαλύτερη συγκέντρωση σε 4-αιθυλογουαιακόλη με έντονα χαρακτηριστικά του πικάντικου. Ενώ στο κρασί υπάρχει μεγαλύτερη συγκέντρωση 4-αιθυλοφαινόλη με έντονα τα

χαρακτηριστικά του φαρμακευτικού και του τσιρότου (Holt et al., 2017). Στον πίνακα 6 παρουσιάζονται μετρήσεις συγκεντρώσεων από πτητικές φαινόλες ερυθρού κρασιού και μύρας τύπου Lambic.

Πίνακας 6. Πτητικές φαινόλες σε μύρα και κρασί (Steensel et al., 2015).

Πτητικές φαινόλες	Συγκεντρώσεις (ppb)		Αισθητήρια Περιγραφή
	Ερυθρός Οίνος	Μύρα Lambic	
4-βινυλοφαινόλη	8,8-43	M.A.-69	Φαινολικό, Φαρμακευτικό
4-βινυλογουαιακόλη	0,2-15	M.A.-258	Γαρίφαλο (μπαχαρικό)
4-αιθυλοφαινόλη	118-3696	63-1130	Φαρμακευτικό, Αλογίσιο
4-αιθυλογουαιακόλη	1-432	427-5770	Πικάντικο, Γαρίφαλο
4-αιθυλοκατεχόλη	27-427	M.A.	Φαινολικό, Φαρμακευτικό

(M.A.: Μη Ανιχνεύσιμο)

Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε παρατηρήθηκαν οι μετατροπές του κουμαρικού οξέος και φουμαρικού οξέος σε 4-αιθυλογουαιακόλη και 4-αιθυλοφαινόλη κατά τη διάρκεια της ζύμωσης μετά από 72 ώρες από τρία στελέχη Βρετανομύκητα (2 στελέχη *B. bruxellensis* και 1 *B. naardenensis*). Στον πίνακα 7 φαίνονται οι ποσότητες που παράχθηκαν από τα δύο στελέχη *B. bruxellensis* σε 48 και 72 ώρες (Holt et al., 2017).

Πίνακας 7. Παραγωγή 4-αιθυλογουαιακόλης και 4-αιθυλοφαινόλης από Βρετανομύκητες

(Holt et al., 2017).

Χρόνος (ώρες)	4-αιθυλογουαιακόλη (mg/L)	4-αιθυλοφαινόλη (mg/L)
48	0.79-1.22	0.12-0.22
72	1.50-2.75	1.50-2.75

Παρατηρήθηκε ότι και στα τρία στελέχη Βρετανομύκητα δεν ανιχνεύθηκε ποσότητα 4-φαινολογουαιακόλη μετά από 48 ώρες κατά τη ζύμωση υποδεικνύοντας την μετατροπή του σε 4-αιθυλογουαιακόλη. Με βάση το κατώφλι αντίληψης που είναι 0,10 mg/L για την 4-αιθυλοφαινόλη και 0,13 mg/L για την 4-αιθυλογουαιακόλη, βάσει του πίνακα 4, τα 3 στελέχη Βρετανομύκητα τα ξεπέρασαν αισθητά. Σε σύγκριση με άλλες μη συμβατικές ζύμες μόνο οι Βρετανομύκητες επιβεβαίωσαν την ικανότητα τους να παράγουν τις συγκεκριμένες ουσίες (Holt et al., 2017).

Ορισμένοι ερευνητές αναφέρουν ότι οι αιθυλοφαινόλες που παράγονται από το Βρετανομύκητα δρουν ως ελκυστικά σε έντομα. Συγκεκριμένα η *Drosophila melanogaster* (μύγα ξιδιού ή φρουτόμυγα) ανιχνεύει την παρουσία υδροξυκινναμικών οξέων μέσω οσφρητικών ενδείξεων. Τα έντομα αυτά δεν μπορούν να μυρίσουν αυτά τα οξέα απευθείας, αλλά είναι εξοπλισμένα με αποκλειστικούς οσφρητικούς αισθητήριους νευρώνες που ανιχνεύουν τις αιθυλοφαινόλες που παράγονται από τις ζύμες και προέρχονται αποκλειστικά από υδροξυκινναμικά οξέα (Dweck et al., 2015; Steensels et al., 2015).

4.4 Πτητικά λιπαρά οξέα

Ο Βρετανομύκητας, εκτός από την παραγωγή του οξικού οξέος και του ισοβαλερικού οξέος, μπορεί να παράγει αρκετά πτητικά λιπαρά οξέα. Αυτά τα προϊόντα περιγράφονται ως σάπιο ή τυρίλα (Licker et al., 1999; Steensels et al., 2015; Tubia et al., 2018). Τα πτητικά λιπαρά οξέα και οι φαινολικές ενώσεις θεωρούνται ως ένας από τους κορυφαίους συντελεστές στην ανεπιθύμητη γεύση ή άρωμα στα βαρέλια ωρίμανσης μύρας, κρασιών και μηλίτη (Tubia et al., 2018). Ενδέχεται να επηρεάζει έμμεσα το άρωμα του προϊόντος αλλάζοντας συνολικά την αντίληψη ή την ένταση των πτητικών φαινολικών ενώσεων (Oelofse et al., 2008). Σε μελέτη αποδείχθηκε ότι η αποδόμηση των αμινοξέων L-λευκίνη, L-ισολευκίνη και L-βαλίνη εμπλέκονται στον σχηματισμό αντίστοιχα του ισοβαλερικού οξέος, 2-μεθυλοβουτυρικού και ισοβουτυρικού οξέος (Oelofse, 2008). Το ισοβαλερικό οξύ γενικά παράγεται με τρανσαμίνωση λευκίνης σε α-κετοϊσοκαπροϊκό οξύ, επακολουθεί αποκαρβοξυλίωση σε ισοαμυλαλδεΰδη και τελικά οξειδώνεται σε ισοβαλερικό οξύ (Styger et al., 2013; Steensels et al., 2015). Τα γονίδια που είναι υπεύθυνα γι' αυτές τις διαδικασίες δεν έχουν ακόμη προσδιοριστεί στο Βρετανομύκητα, όμως γονίδια αλκοολικής και αλδεϋδικής αφυδρογονάσης, τα οποία κωδικοποιούν οξειδοοξειδάσες και οι οποίες έδειξαν να αντιγράφονται στο γονιδίωμα του *B. bruxellensis*, προτάθηκαν ως πιθανοί καθοριστικοί παράγοντες στην παραγωγή πτητικών λιπαρών οξέων από το Βρετανομύκητα (Piskur et al., 2012; Steensels et al., 2015).

4.5 Εστέρες

Οι εστέρες είναι από τις πιο επιθυμητές ενώσεις στη μύρα, καθώς συνεισφέρουν ευχάριστα αρώματα φρούτων. Οι αιθυλεστέρες, όπως ο οξικός ισοαμυλεστέρας (μπανάνα) και 2-φαινυλοξικό (μέλι) υποβαθμίζονται με την παρουσία των βρετανομυκήτων. Όμως η παρουσία αιθυλεστέρων (ethyl esters), όπως οξικός αιθυλεστέρας, εξανοϊκός, οκτανοϊκός, όταν βρίσκονται σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις συνεισφέρουν σε χαρακτήρες όπως τροπικών φρούτων και ανανά. Αυτή η διαφορά μεταξύ οξικών και αιθυλικών εστέρων μπορεί να οφείλεται στην απουσία ορισμένων αναγκαίων γονιδίων (Colomer et al., 2018). Κάποια στελέχη Βρετανομυκήτων έχουν υψηλή δραστηριότητα του ενζύμου εστεράσης, το οποίο

καταστρέφει τους οξικούς εστέρες που δημιουργούν το φρουτώδες προφίλ στις μπίρες (Holt et al., 2017). Οι Βρετανομύκητες έχουν την ιδιότητα της εστεροποίησης μεσαίων και μεγάλων αλυσίδων λιπαρών οξέων (C9, C10, C12, C14, C16) όπου χαρακτηρίζονται από τις γεύσεις ταγγισμένου και τυριού με αποτέλεσμα την αλλαγή στο προφίλ της μπίρας. Επιπλέον μπορεί να βρεθούν σε μπίρες τύπου Lambic και Gueuze, ο γαλακτικός αιθυλεστέρας (ethyl lactate) και ο οξικός αιθυλεστέρας (ethyl acetate) που οφείλονται στη παρουσία βακτηρίων, ζυμών αλλά και Βρετανομυκήτων (Colomer et al., 2018).

4.6 Ενζυμική δραστηριότητα

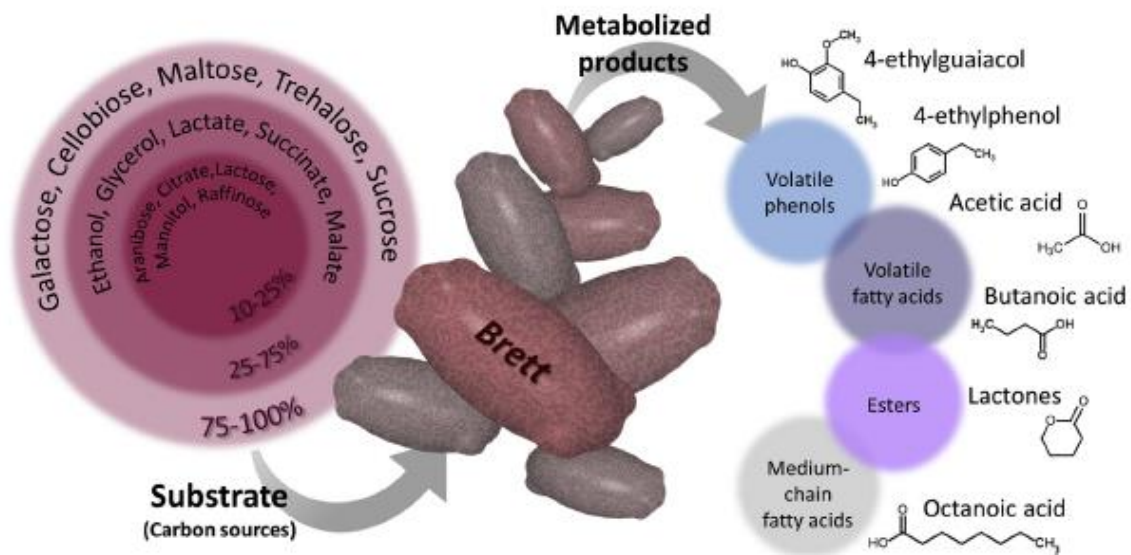
Τα στελέχη του Βρετανομύκητα εμφανίζουν δραστικότητα τόσο στην α-γλυκοζιδάση όσο και στη β-γλυκοζιδάση όπου χρησιμοποιούνται για το μεταβολισμό διαφορετικών ενώσεων προκειμένου να χρησιμοποιηθούν οι αποικοδομημένες ενώσεις (Manzanares et al., 2000). Ο Βρετανομύκητας έχει τη δυνατότητα να χρησιμοποιεί έμμεσα διάφορες πηγές άνθρακα μέσω της δράσης του ενζύμου β-γλυκοζιδάσης, επιτρέποντας έτσι να χρησιμοποιεί τα προϊόντα της υδρόλυσης από δεξτρίνες και κελλοβιόζες (Smith και Divol, 2016). Τόσο ενδοκυτταρικές όσο και εξωκυτταρικές δραστηριότητες α-γλυκοζιδάσης βρέθηκαν στο *B. bruxellensis* (Shantha Kumara et al., 1993). Επίσης, έχει βρεθεί ότι ο *B. bruxellensis* έχει την ικανότητα απελευθέρωσης γλυκοζιδικά δεσμευμένων αρωματικών ενώσεων όπως τερπένια από φυσικούς γλυκοζίτες σταφυλιών (Mansfield et al., 2002). Στην μπίρα, οι μικρές δεξτρίνες όπως μαλτοτετραόζη και μαλτοπενταόζη είναι μη ζυμώσιμα υπολείμματα υδατανθράκων/ πολυσακχαριτών που παραμένουν μετά το τέλος της κύριας ζύμωσης. Βρέθηκε ότι ο *B. bruxellensis* παράγει α-γλυκοζιδάση επιτρέποντας την υδρόλυση των πολυσακχαριτών σε λιγότερο πολύπλοκα σάκχαρα, ώστε να μπορούν να αφομοιωθούν από τον ίδιο (Steensels et al., 2015).

Αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό των Βρετανομυκήτων είναι η δραστηριότητα της β-γλυκοζιδάσης, η οποία και έχει μεγάλο αντίκτυπο στον οργανοληπτικό χαρακτήρα της μπίρας. Η β-γλυκοζιδάση επιτρέπει στο Βρετανομύκητα να σπάσει την κελλοβιόζη, σάκχαρο το οποίο βρίσκεται στο ξύλο και εξηγεί την μακρόχρονη επιβίωση του στα ξύλινα βαρέλια. Το ένζυμο έχει τη δυνατότητα να απελευθερώνει συστατικά γεύσης, τα οποία είναι άοσμα και μη πτητικά, τα οποία είναι ενωμένα με σάκχαρα (Colomer et al., 2018). Σε μελέτη εμφανίζονται 7 από τα 10 στελέχη Βρετανομύκητα χρησιμοποιώντας υπόστρωμα p-nitrophenyl-b-D-glucopyranoside στο οποίο έχει δραστικότητα η β-γλυκοζιδάση (McMahon et al., 1999; Smith και Divol, 2016). Το ίδιο υπόστρωμα σ'άλλη μελέτη έδειξε δραστηριότητα η β-γλυκοζιδάση σε 14 στελέχη (Mansfield et al., 2002; Smith και Divol, 2016). Σε μελέτη που διεξήχθη τα γονίδια που κωδικοποιούν τις β-γλυκοζιδάσες είχαν ταυτοποιηθεί στα στελέχη AWRI 1499 και CBS 2499,

ωστόσο μόνο οι 7 από τις 26 απομονώσεις για το γονίδιο που κωδικοποιεί τη β-γλυκοζιδάση ήταν θετικές (Crauwles, 2014). Επίσης παρουσιάζονται αναφορές ως προς τη δραστηριότητα της β-γλυκοσιδάσης σε στελέχη όπως *B. bruxellensis* και *B. anomala* όπου η δραστηριότητα βρέθηκε να είναι δεσμευμένη στο κύτταρο, ενδοκυτταρικά και να απελευθερώνεται αργά στο μέσο (Steensels et al., 2015). Ο *B. anomalus* σε μελέτη έδειξε να είχε την καλύτερη δραστηριότητα στη β-γλυκοζιδάση σε pH 5,75 (Janish, 2019).

Άλλη ενζυμική δραστηριότητα όπως του ενζύμου γλυκανάσης πιθανότητα να εμπλέκεται στην αργή αυθόρμητη ζύμωση της Βέλγικης μύρας Lambic, λόγω της αφομοίωσης πολυσακχαριτών και δισακχαριτών, η οποία είναι ένα άλλο μεταβολικό χαρακτηριστικό των Βρετανομυκήτων και παρέχει τη δυνατότητα να αποικούν συγκεκριμένα προϊόντα όπου περιέχουν τους παραπάνω υδατάνθρακες ως μοναδικές πηγές άνθρακα (Ciani και Comitini, 2014). Η δραστηριότητα του ενζύμου γλυκανάσης παρατηρείται κατά τη δευτερογενή, μακριά σε χρόνο, ζύμωση του Βρετανομύκητα όπου καταναλώνει όλα τα σάκχαρα και τις δεξτρίνες. Οι περισσότερες μύρες με τη συμμετοχή και παρουσία από ίχνη Βρετανομύκητα καταλήγουν πολύ ξηρές με τον καιρό, διότι μπορεί να επιβιώνει στα υπολείμματα σακχάρων για μήνες ή ακόμα και χρόνια στο δοχείο ζύμωσης ή στο μπουκάλι, καταναλώνοντας όλα τα ίχνη σακχάρων όλο αυτό το διάστημα (Smith και Divol, 2016).

Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης ορισμένοι τέτοιοι γλυκοζίτες που προέρχονται κυρίως από το λυκίσκο, μπορούν να συμβάλουν στην αύξηση συγκεκριμένων πτητικών συστατικών στη μύρα, συμπεριλαμβάνοντας τερπένια όπως η λιναλόλη. Επιπλέον, οι ζύμες μπορούν να μετατρέψουν τα μονοτερπένια σε β-κιτρονελόλη ή α-τερπινεόλη ενισχύοντας τα ανθικά και εσπεριδοειδή χαρακτηριστικά στον οργανοληπτικό χαρακτήρα της μύρας. Στην περίπτωση μυρών με φρούτα, όπως κερασιού τύπου Kriek, υπάρχουν οι αγλυκόνες, μέσω των οποίων οι Βρετανομύκητες ενισχύουν την παραγωγή σε αρωματικά συστατικά όπως η βενζαλδεύδη, λιναλόλη ή ευγενόλη. Δύο γονίδια που κωδικοποιούν τη β-γλυκοζιδάση έχουν αναφερθεί στο στέλεχος *B. bruxellensis* (Colomer et al., 2018).



Σχήμα 3. Πηγές άνθρακα και τα πιο σπουδαία μεταβολικά προϊόντα του Βρετανομύκητα (Tubia et al., 2018).

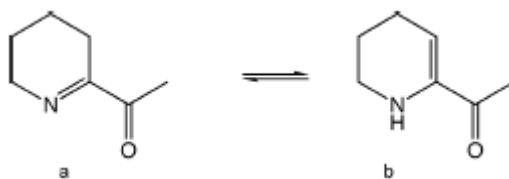
4.7 Βιογενείς αμίνες

Οι βιογενείς αμίνες είναι επικίνδυνες βιολογικές ενώσεις που μπορεί να έχει ανεπιθύμητες φυσιολογικές επιπτώσεις όταν απορροφούνται σε υψηλές συγκεντρώσεις από τον άνθρωπο. Σύμφωνα με τη χημική τους δομή ταξινομούνται ως αλειφατικές (putrescine, cadaverine, spermine και spermidine), αρωματικές (tyramine και phenylethylamine) ή ετεροκυκλικές (histamine και tryptamine). Η πιο τοξική θεωρείται η ισταμίνη (histamine) (Spano et al., 2010; Steensels et al., 2015). Παράγονται κατά τη διαδικασία της ζύμωσης με αποκαρβοξυλίωση των αμινοξέων, μια αντίδραση που συμβαίνει σε πολλούς μικροοργανισμούς συμπεριλαμβανομένων ορισμένων στελεχών βακτηρίων και Βρετανομύκητα, ειδικά, όταν αναπτύσσονται σε σύνθετα θρεπτικά μέσα, με εμπλουτισμένη συγκέντρωση αμινοξέων (Steensels et al., 2015). Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε βρέθηκαν σε κρασιά που εμβολιάστηκαν με *B. bruxellensis* οι βιογενείς αμίνες putrescine, cadaverine και spermidine, αλλά θεωρήθηκαν ακίνδυνες για τον άνθρωπο λόγω χαμηλών συγκεντρώσεων (Vigentini et al., 2008). Σε πιο παλιά μελέτη, ένα στέλεχος *B. bruxellensis* σχημάτισε έως και 15 mg/L συνολικών αμινών, κυρίως 2-φαινυλαιθυλαμίνη (Caruso et al., 2002).

4.8 Τετραϋδροπυριδίνες (mouse Flavor)

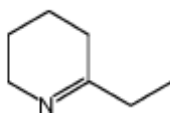
Η παραγωγή τετραϋδροπυριδινών οφείλεται στην παρουσία είτε των γαλακτικών βακτηρίων είτε των Βρετανομυκήτων. Γνωστές είναι τρεις: 2-αιθυλοτετραϋδροπυριδίνη (2-ethyltetrahydropyridine), 2-ακετυλοτετραϋδροπυριδίνη (2-acetyltetrahydropyridine) και 2-ακετυλοπυρρολίνη (2-acetylpyrroline) (Snowdon et al., 2006). Ο Βρετανομύκητας έδειξε ότι είναι ικανός να παράγει μόνο τις 2 ενώσεις που προκαλούν δυσάρεστες 'mouse' γεύσεις.

Συγκεκριμένα είναι: α) η 2-ακετυλοτετραϋδροπυριδίνη, με τα δύο ισομερή (ταυτομερή) της: οι 2-ακετυλο-1,4,5,6-τετραϋδροπυριδίνη και 2-ακετυλο-3,4,5,6-τετραϋδροπυριδίνη (Snowdon et al., 2006).



Σχήμα 4. Ταυτομερή α: 2-ακετυλο-3,4,5,6-τετραϋδροπυριδίνη και β: 2-ακετυλο-1,4,5,6-τετραϋδροπυριδίνη (Snowdon et al., 2006)

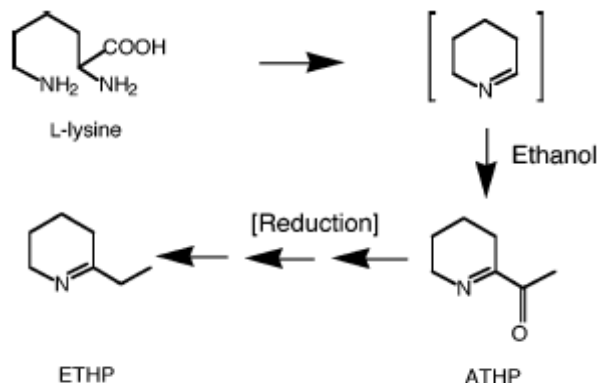
Οι συγκεκριμένες παρουσιάζουν πολύ χαμηλό κατώφλι αντίληψης της τάξης του 1,6 µg/L στο νερό (Teranashi et al., 1975), ενώ στο κρασί βρέθηκε στα επίπεδα 4,8-106 µg/L και β) 2-αιθυλοτετραϋδροπυριδίνη. Το κατώφλι αντίληψης της 2-αιθυλοτετραϋδροπυριδίνη στο κρασί βρέθηκε στα 162 µg/L (Snowdon et al., 2006).



Σχήμα 5. Δομή της 2-αιθυλοτετραϋδροπυριδίνης (.Snowdon et al., 2006)

Ο Grbin εικάζει μετά από έρευνα ότι η παρουσία της 2-αιθυλοτετραϋδροπυριδίνης μπορεί να οφείλεται στον αργό μεταβολικό σχηματισμό της 2-ακετυλοτετραϋδροπυριδίνης σε 2-αιθυλοτετραϋδροπυριδίνης από το Βρετανομύκητα (Grbin, 1998).

Υπεύθυνες ενώσεις για την παραγωγή των τριών ‘mousy’ ενώσεων είναι η L-λυσίνη και L-ορνιθίνη είναι υπεύθυνες για τους σχηματισμούς του δακτυλίου των τριών ‘mousy’ ετερόκυκλων, και η αιθανόλη και η ακεταλδεΐδη υπεύθυνα για την πλευρική αλυσίδα του ακετυλίου (Snowdon et al., 2006).



Σχήμα 6. Προτεινόμενη οδός για το σχηματισμό ετερόκυκλων 2-ακετυλοτετραϋδροπυριδίνης σε 2-αιθυλοτετραϋδροπυριδίνης από το Βρετανομύκητα (Snowdon et al., 2006).

5. Μέθοδοι απομόνωσης, καταμέτρησης, ταυτοποίησης

Οι βιομηχανίες ποτών ενδιαφέρονται για τις μεθόδους εντοπισμού και ποσοτικού προσδιορισμού των ζυμών του Βρετανομύκητα. Οι παραδοσιακές μέθοδοι ανίχνευσης ζυμών είναι οι πιο χρησιμοποιούμενες τεχνικές λόγω της απλότητας και του σχετικά χαμηλού κόστους. Αυτοί οι μέθοδοι μπορούν να είναι άμεσες ή έμμεσες, όπου η παρουσία του Βρετανομύκητα ανιχνεύεται με ακρίβεια ή βασίζεται στην αναγνώριση ορισμένων μικροβιακών μεταβολικών προϊόντων. Δυστυχώς και η άμεση και η έμμεση μέθοδος παρουσιάζουν μειονεκτήματα ως προς τη χρήση τους από μονάδες παραγωγής. Για την εφαρμογή τους απαιτείται εξειδικευμένο προσωπικό δοκιμών, χρειάζεται επώαση αρκετών ημερών έως δύο εβδομάδων ή και περισσότερο διάστημα, και μπορεί να υπάρξουν ανακριβή αποτελέσματα. Επομένως, τα ζυθοποιεία ή οινοποιεία χρειάζονται πιο ευαίσθητες, γρήγορες και αποδοτικές τεχνικές ανίχνευσης (Tubia et al., 2018).

Οι συμβατικοί μέθοδοι ταυτοποίησης για το Βρετανομύκητα είναι ανεπαρκείς για ένα ζυθοποιείο ή ένα οινοποιείο. Αυτό οφείλεται στη χαμηλή συγκέντρωση κυττάρων και στα χαρακτηριστικά του μεταβολισμού λόγω αργής ανάπτυξης τους σε θρεπτικά μέσα ζυμών σε σύγκριση με άλλες ζύμες (Vendrame et al., 2014).

5.1 Μέθοδοι άμεσης ανάλυσης

Οι μέθοδοι άμεσης ανάλυσης στοχεύουν στον εντοπισμό μικροοργανισμών που υπάρχουν στα ποτά, με βάση την άμεση παρατήρηση των κυττάρων ζύμης, την ανάλυση σε διαφορετικές παραμέτρους όπως μορφολογία, κινητική ανάπτυξης, αποικίες σχηματίζοντας μονάδες και βιοδείκτες. Γενικά, αυτές οι τεχνικές είναι υψηλής ευαισθησίας και ικανές να ανιχνεύουν μικρές συγκεντρώσεις μικροοργανισμών, αλλά μπορεί να είναι χρονοβόρες, απαιτώντας έως και δύο εβδομάδες για να βγουν αποτελέσματα (Tubia et al., 2018). Οι άμεσες μέθοδοι ανάλυσης είναι:

5.1.1 Μέθοδος με τρυβλία

Με τη μέθοδο αυτή γίνεται χρήση τρυβλίων με επιλεγμένες ή διαφορετικής καλλιέργειας και ακολουθείται από κάποια συμπληρωματική βιοχημική και φυσιολογική ανάλυση. Αυτή η τεχνική μπορεί να συμπεριλαμβάνει και μελέτη μορφολογίας με μικροσκόπιο. Δίδεται η δυνατότητα να γίνει ανάλυση διαφορετικής μορφολογίας των αποικιών, όμως είναι δύσκολο να γίνει διάκριση και ταυτοποίηση σύμφωνα με τα μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά τους. Επιπλέον, εφαρμόζεται μόνο για τον ποσοτικό προσδιορισμό βιώσιμων κυττάρων, αλλά δεν είναι ικανή να ανιχνεύσει τα βιώσιμα αλλά μη καλλιεργήσιμα κύτταρα

(VBNC – Viable But Non-Cultivable) που δεν θα αναπτυχθούν, παρόλη την επιβίωση και παρουσία τους στο μέσο ανάπτυξης (Tubia et al., 2018).

Τα πιο συνηθισμένα υποστρώματα καλλιέργειας που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση του Βρετανομύκητα είναι σάκχαρα (φρουκτόζη, γλυκόζη και σακχαρόζη), αφομοιωμένες πρωτεΐνες ως πηγή αζώτου (πεπτόνη και τρυπτόνη), και σύνθετα συμπληρώματα (εκχύλισμα βύνης και εκχύλισμα ζύμης). Επίσης, γίνεται εφαρμογή διαφορετικών αντιβιοτικών για την αποφυγή ανάπτυξης άλλων μικροοργανισμών, όπως το κυκλοεξιμίδιο (ακτιδιόνη) και χλωραμφενικόλη (Tubia et al, 2018). Ο Βρετανομύκητας είναι γενικά πολύ ανθεκτικός στο κυκλοεξιμίδιο, του οποίου η δράση βασίζεται σ' ένα κοινό αντιμυκητιακό παράγοντα που αναστέλλει την βιοσύνθεση πρωτεΐνης σε πολλούς ευκαριωτικούς οργανισμούς (Morneau et al., 2011; Steensels et al., 2015).

Η χρήση της αιθανόλης γίνεται λόγω των βακτηριοκτόνων ιδιοτήτων της, αλλά και σαν πηγή άνθρακα για τους Βρετανομύκητες. Η παρουσία του π-κουμαρικού οξέος αποτελεί πρόδρομο για την παραγωγή 4- αιθυλοφαινολών από το Βρετανομύκητα και ανιχνεύεται εύκολα από τη χαρακτηριστική μυρωδιά που παράγεται. Το πράσινο της Βρωμοκρεσόλης προστίθεται ως δείκτης pH για την ανίχνευση παραγωγής οξέων (Tubia et al., 2018).

Πίνακας 8. Παραδείγματα θρεπτικών υποστρωμάτων (Tubia et al., 2018).

Μέσα καλλιέργειας	BSM	DBDM	DHSA	WLD
Επιλογή διαφορετικών παραγόντων	Κυκλοεξιμίδιο	Κυκλοεξιμίδιο	Κυκλοεξιμίδιο	WLD
	Χλωραμφενικόλη	π-κουμαρικό οξύ	Πενικιλίνη	Κυκλοεξιμίδιο
	Χλωροτετρακυκλίνη	Πράσινο Βρωμοκρεσόλης	Σορβικό οξύ	
	Γενταμικίνη	Αιθανόλη	Πράσινο Βρωμοκρεσόλη	
		Χωρίς Υδατάνθρακες	Αιθανόλη	
			Τρεχαλόζη, Σακχαρόζη	

Πίνακας 9. Παραδείγματα υποστρωμάτων ανάπτυξης Βρετανομύκητα (Jakobson, 2010).

Υποστρώματα ανάπτυξης	MYPG	MYPG cc	MYPGch	WLN	WLD
Σύνθεση συστατικών	Malt extract 3 g/L	MYPG	Κυκλοεξιμίδιο 0,1% 10 mg/L	WLN 75 g/L	WLN 75 g/L
	Yeast extract 3 g/L	CaCO ₃ 2% w/v 10 g/L		Agar 1% 10 g/L	Agar 1% 10 g/L
	Peptone 2 g/L				Κυκλο- εξιμίδιο 0,1% 10 mg/L
	Glycose 10 g/L				
	Agar 15 g/L				
	pH 5,0				
Παρατηρήσεις	Αποθήκευσης Ανάπτυξης	Διαφοροποίησης Παραγωγής οξέος	Απομόνωσης Ανάπτυξης	Απομόνωσης Ανάπτυξης	Απομόνωσης Ανάπτυξης

Πίνακας 10. Παραδείγματα υποστρωμάτων ανάπτυξης Βρετανομύκητα (Jakobson, 2010).

Υποστρώματα ανάπτυξης	Lysine	CuSO ₄	UBA	YPD
Σύνθεση συστατικών	L-Lysine 10 g/L	MYPG 50 g/L	Universal Beer Agar 61 g/L	Yeast extract 6,7g/L
	Agar 12 g/L	CuSO ₄ 0,6 g/L	Δείγμα μύρας 250 ml	Peptone 20 g/L
	Glycose 10 g/L			Glycose 20 g/L
	Yeast Salts 1 ml/L			Agar 20g/L
	pH 6,0			
Παρατηρήσεις	Απομόνωσης Ανάπτυξης	Απομόνωσης Ανάπτυξης	Ανάπτυξης	Ανάπτυξης

Πίνακας 11. Συνθετικό υπόστρωμα ανάπτυξης και διαφοροποίησης Βρετανομύκητα (Kurtzman et al., 2011).

Συνθετικό υπόστρωμα	
Yeast Nitrogen Base	6,7 g/L
Agar	20 g/L
Κυκλοεξιμίδιο	0,01 g/L
π-κουμαρικό οξύ (ή φερουλικό οξύ)	0,1 g/L
Αιθανόλη	48 g/L ή 6 % vol.
Χρωραμφενικόλη	0,1 g/L
Πράσινο της Βρωμοκρεσόλης	0,022 g/L
pH	5,4

Τρυβλία με έτοιμα θρεπτικά μέσα καλλιέργειας υπάρχουν στην αγορά και ένα από αυτά είναι το "KITBRETT" της εταιρείας Vivelys (<https://www.vivelys.com/en>). Με τη χρήση των έτοιμων τρυβλίων επιτυγχάνεται η έγκαιρη και γρήγορη παρακολούθηση του Βρετανομύκητα μετά το τέλος της ζύμωσης, χάρη στη χαρακτηριστική οσμή ζωικών που παράγεται από το μύκητα.



Εικόνα 2. Vivelys KITBRETT (<https://www.az3oeno.com/wp-content/uploads/2015/03/VIVELYS-KIT-BRETT-2.pdf>).

Για τα μέσα καλλιέργειας που προαναφέρθηκαν υπάρχουν θετικές και αρνητικές παρατηρήσεις κατά τη διάρκεια της χρήσης τους. Το BSM δίδει αποτελέσματα γρήγορα (4-6 ημέρες), χωρίς όμως διαφοροποίηση μεταξύ των μικροοργανισμών και ενδέχεται να δίδει λανθασμένα θετικά αποτελέσματα, λόγω αντίστασης άλλων ζυμών στο κυκλοεξιμίδιο και αναπτύσσεται μούχλα. Τα DBDM, DHSΑ και WLD έχουν το θετικό ότι είναι εκλεκτικά για τους Βρετανομύκητες, και αρνητικό για χρήση τους σε ζυθοποιείο ή οινοποιείο λόγω της

ανάγκης 15 ημερών τουλάχιστον για την ανάπτυξή τους (τουλάχιστον 10 ημέρες για το WLD). Επιπλέον, η παρασκευή του DHSΑ είναι περίπλοκη (Tubia et al., 2018).



Εικόνα 3. Τρυβλίο με DBDM μέσο καλλιέργειας με αποικίες *Brettanomyces bruxellensis* (Tubia et al., 2018).

Διαπιστώθηκε σε μελέτες ότι οι Βρετανομύκητες παρ' ότι μπορεί να είναι βιώσιμοι και ενεργοί, μπορεί να μην αναπτυχθούν (VBNC – Viable But Non-Cultivable). Αυτό οφείλεται σε περιβαλλοντικούς παράγοντες που μπορεί να προκαλέσουν στρες, όπως η θερμοκρασία, η οσμωτική πίεση και η συγκέντρωση οξυγόνου. Τα κύτταρα αυτά (VBNC) μπορεί να οδηγήσουν σε υπο-εκτίμηση του πλυθισμού κατά την αρίθμηση σε τρυβλία. Παρόλα ταύτα βρέθηκε ότι παράγουν κατά το ήμισυ την ποσότητα πτητικών φαινολών σύγκριση με τα βιώσιμα κύτταρα (Tubia et al., 2018).

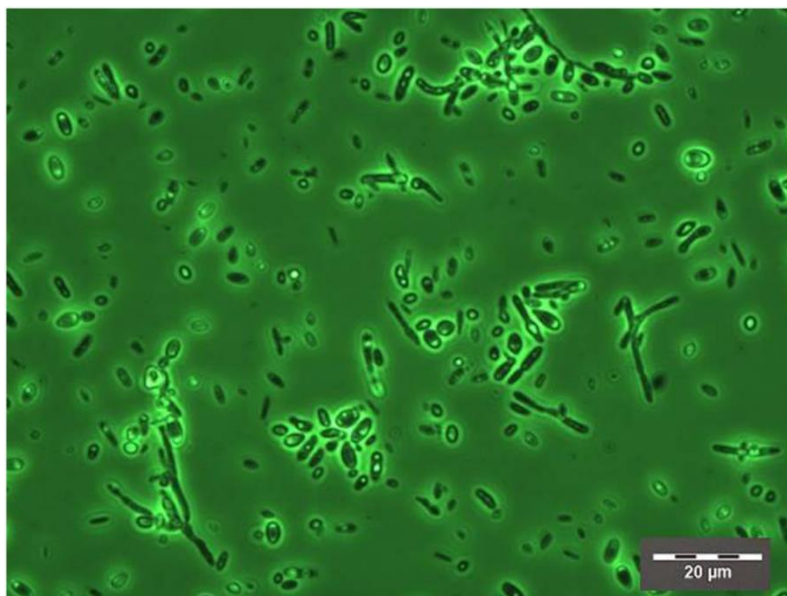


Εικόνα 4. Τυπική μορφολογία αποικιών του *B. bruxellensis* όπως καλλιεργούνται σε WL agar (Vendrame et al., 2014).

Μια νέα μεθοδολογία παρουσιάστηκε με τη χρήση ανάμειξης ακετονιτριλίου και μυρμηκικού οξέος σαν ουσίες έκλουσης και χρήση φθορισμού για ανίχνευση. Η μέθοδος είχε καλύτερη ανάλυση, περισσότερη ευαισθησία και ακριβότερη μέτρηση του φερουλικού οξέος, του π-κουμαρικού και των αντίστοιχων παραγώγων τους από το μεταβολισμό του Βρετανομύκητα (4-βινυλγουαϊακόλη, 4-αιθυλογουαϊακόλη και 4-αιθυλοφαινόλη). Η μέτρηση έγινε με χρήση HPLC-UV/fluorescence detection για τα φαινολικά συστατικά, μετά από καλλιέργεια σε υπόστρωμα και στη συνέχεια εμβολιασμό για ζύμωση μύρας. (Holt et al., 2017).

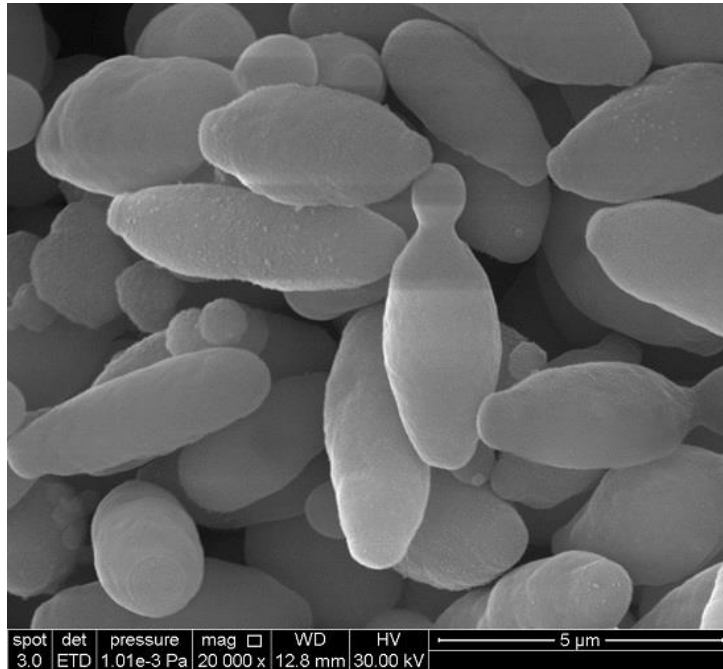
5.1.2 Μικροσκόπιο

Με τη χρήση της τεχνικής του μικροσκοπίου έρχεται σε άμεση οπτική των μικροοργανισμών ο ερευνητής. Χρησιμοποιώντας τις κλασικές τεχνικές της μικροβιολογίας, το μικροσκόπιο έρχεται να βοηθήσει στον απ' ευθείας εντοπισμό του Βρετανομύκητα. Η μορφολογία και το μέγεθος των κυττάρων αυτών των ζυμών μπορεί να ποικίλλει πάρα πολύ από το ένα στέλεχος στο άλλο. Επίσης παίζει ρόλο η μεταβλητή κυτταρική μορφολογία ανάλογα με την ηλικία, το μέσο καλλιέργειας και το περιβαλλοντικό στρες. Τα σχήματα που έχουν αναφερθεί μπορεί να είναι σχήμα βάρκας, άλλα επιμήκη, σφαιρικά, ελλειψοειδή, όπως και κυλινδρικά έχουν επίσης αναφερθεί (Tubia et al., 2018).



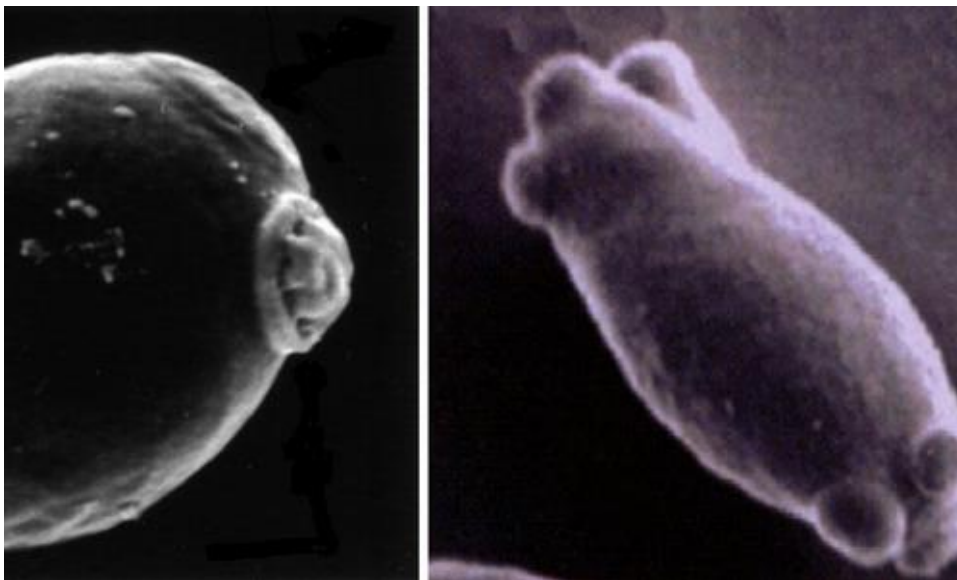
Εικόνα 5. Μικροσκοπική εικόνα επιφθορισμού από κύτταρα *Brettanomyces bruxellensis* (x400)

(Tubia et al., 2018)

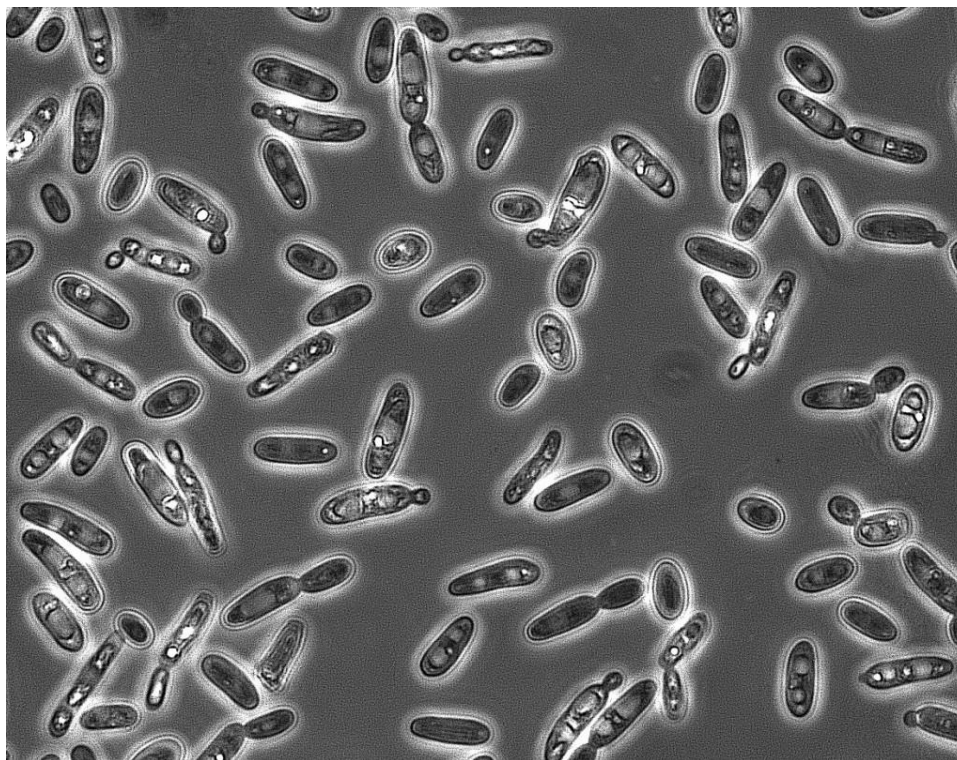


Εικόνα 6. *B. bruxellensis* (https://www.mdpi.com/fermentation/fermentation-02-00017/article_deploy/html/images/fermentation-02-00017-ag.png).

Πλέον έχουν αναπτυχθεί νέες τεχνικές μικροσκοπίας βασισμένες σε *in situ* υβριδισμού χρησιμοποιώντας πεπτίδια νουκλεϊκών οξέων ως ανιχνευτές. Έτσι παρέχουν ταχύτερη και ακριβέστερη αναγνώριση του Βρετανομύκητα με χρήση φθορισμού μικροσκοπίας (Tubia et al., 2018).



Εικόνα 7. Βρετανομύκητας σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (<https://vitiwin.s3-eu-west-1.amazonaws.com/contenido/brettanomyces-enemigo-publico-n-1.png?cache=85gift>)



Εικόνα 8. Βρετανομύκητας σε μικροσκόπιο

(https://vineandwine.vin/upload/medialibrary/8db/IMG_0160.JPG)

5.1.3 Τεχνικές μοριακής βιολογίας

Οι μοριακές τεχνικές ανίχνευσης είναι γρήγορες, ευαίσθητες και ειδικές για την ανίχνευση μικροοργανισμών. Αυτοί οι μέθοδοι βασίζονται στην ενίσχυση συγκεκριμένων τεμαχίων των ριβοσωμάτων DNA και RNA από την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για την αναγνώριση μικροοργανισμών (Tubia et al., 2018).

Αναφέρονται διάφοροι τρόποι για τον εντοπισμό του Βρετανομύκητα και σε σύγκριση με αυτή των τρυβλίων είναι δυνατή η ανίχνευση βιώσιμων και μη βιώσιμων κυττάρων (VBNC) (Tubia et al., 2018). Διάφορες μοριακές τεχνικές αναφέρονται πιο κάτω :

- α) Ανάλυση περιορισμού του μιτοχονδριακού DNA (mitochondrial DNA restriction),
- β) Ανάλυση πολυμερισμού μήκους θραυσμάτων περιορισμού (Restriction Fragment Length Polymorphism PCR),
- γ) Τυχαία ενισχυμένη πολυμορφική (Random Amplified Polymorphic DNA PCR),
- δ) PCR (polymerase chain reaction)
- ε) nested PCR

Οι τεχνικές ένθετης ενίσχυσης χρησιμοποιεί δύο εξωτερικούς και δύο εσωτερικούς εκκινητές (primers), παρέχοντας άμεση ανίχνευση των Βρετανομυκήτων στα ποτά χωρίς ανάγκη απομόνωσης στελέχους (Tubia et al., 2018).

Αυτές οι τεχνικές (α-ε) στερούνται ακρίβειας διότι χρειάζεται να πραγματοποιηθεί ένα βήμα εμπλουτισμού για την εξαγωγή του DNA και προσδιορίζει τη συγκέντρωση των κυττάρων (Vendrame et al., 2014).

στ) qPCR (quantitative real-time PCR)

Μια τεχνική που δεν χρειάζεται το βήμα του εμπλουτισμού για ταχεία ανίχνευση και ποσοτικοποίηση ζυμών και βακτηρίων είναι η qPCR. Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του στελέχους *B. bruxellensis* και τη μέθοδο PMA-qPCR (Propidium monoazide) σε δύο τύπων κρασιών (λευκό και ερυθρό) και μια μύρας έδειξε να έχει χαμηλότερο όριο ανίχνευσης από 10 cfu/ml. Η τεχνική αυτή ανιχνεύει και ποσοτικοποιεί το ζωντανό *B. bruxellensis* σε 10 ώρες από τη στιγμή που συλλεγεί το δείγμα, αντίθετα με την παραδοσιακή τεχνική με μέτρηση των αποικιών στα τρυβλία που χρειάζεται 9 ημέρες. Η μέθοδος PMA-qPCR σε αυτή τη μελέτη αποδείχθηκε πιο αποτελεσματική, γρηγορότερη και φθηνότερη (Vendrame et al., 2014). Επίσης, παρόμοια τεχνική (Cells-qPCR) με δειγματοληψία απευθείας σε δείγματα γλεύκους σταφυλιών και κρασιού είχε προσαρμοστεί για να ανιχνεύει και να ποσοτικοποιεί τις συνολικές ζύμες (*B. bruxellensis*, *S. cerevisiae* και *Zygosaccharomyces bailii*). Η τεχνική βασίζεται στη διάρρηξη του κυτταρικού τοιχώματος με μηχανική και ενζυμική μέθοδο, επιτυγχάνοντας γρήγορη, άμεση και ευαίσθητη τεχνική (Tubia et al., 2018).

ζ) Αντίστροφη μεταγραφάση PCR (RT-PCR , Reverse Transcriptase PCR).

Αυτή η τεχνική χρησιμοποιεί ένα ένζυμο ικανό να συνθέσει μονόκλωνο DNA από RNA στην κατεύθυνση 5'-3'. Σε σύγκριση με την απλή μέθοδο PCR είναι πιο ευαίσθητη μέθοδος και ο χρόνος εφαρμογή της δεν αυξάνεται. Επιπλέον, η διάκριση μεταξύ βιώσιμων και μη βιώσιμων κυττάρων σε σύγκριση με την απλή μέθοδο PCR έδωσε ακόμα καλύτερα αποτελέσματα (Tubia et al., 2018).

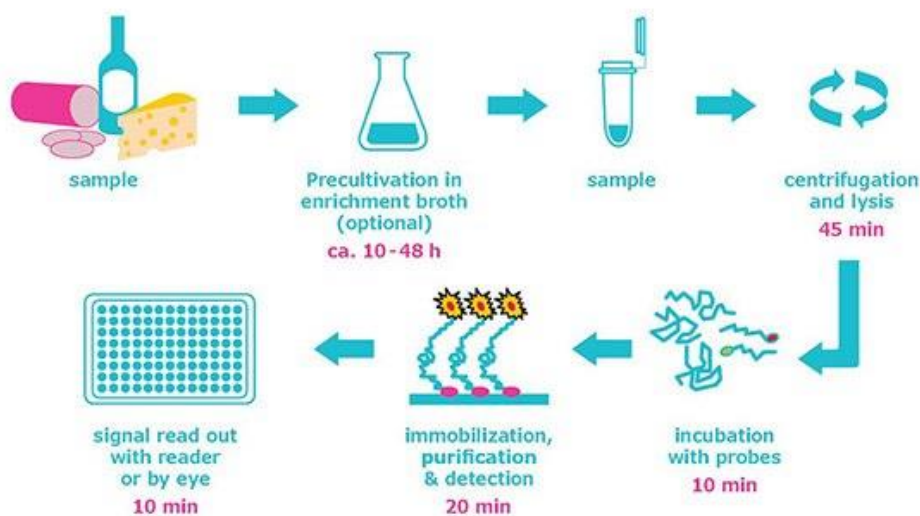
5.1.4 Κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry)

Η κυτταρομετρία ροής είναι μια ισχυρή τεχνική που επιτρέπει την ανίχνευση και απαρίθμηση μικροβιακών πληθυσμών σε τρόφιμα και ποτά κατά τη διαδικασία παραγωγής τους. Στην αναλυτική αυτή μέθοδο γίνεται χρήση φυσιολογικών χρωστικών και επιτυγχάνεται ανίχνευση του φθορισμού που εκπέμπουν οι θετικά χρωματισμένες ζύμες χρησιμοποιώντας διαφορετικούς ανιχνευτές. Σ' αυτή τη μέθοδο βασίστηκε και το ανοσοκυτταρομετρικό τεστ της Amarak Biotechnologies (Bretta Test) που αναπτύχθηκε για την ανίχνευση του *B.*

bruxellensis. Η μέθοδος βασίστηκε στη χρήση πολυκλωνικού anti-Brettanomyces αντισωμάτων συζευγμένα με φθοροχρώμιο για διάκριση και ποσοτικοποίηση αυτής της μαγιάς. Σε λιγότερο από δύο ώρες αυτή η μέθοδος μπορεί να διαφοροποιήσει το Βρετανομύκητα από άλλα είδη και αξιολογεί την βιωσιμότητα του (Tubia et al., 2018).

5.1.5 HybriScan© Kits

Το HybriScan© (<https://www.sigmaaldrich.com/GR/en>) μπορεί να εντοπίσει μικροοργανισμούς αλλοίωσης στην μύρα, όπως ο Βρετανομύκητας. Είναι ένα σύστημα ταχείας δοκιμής (rapid test) και βασίζεται στις μεθόδους sandwich hybridization και στο φωτομετρικό σήμα (photometrical signal read out). Πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι η ευκολία στο χειρισμό της, η ευαισθησία της και ταχεία λήψης αποτελεσμάτων (σε 3 ώρες). Ξεχωρίζει για την ποιοτική και ποσοτική ανίχνευση ζωντανών κυττάρων και αποτελεί οικονομικά πολύ αποδοτική ανάλυση. Μειονεκτήματα της είναι ότι δεν γίνεται καμία διαφοροποίηση ως προς τα υποείδη ή στελέχη (serotypes or subspecies). Επίσης υπάρχει περιορισμένος σχεδιασμός ανιχνευτή στόχου rRNA. Στην εικόνα 9 παρουσιάζεται η μεθοδολογία του HybriScan©.



Εικόνα 9. Μέθοδος HybriScan© (https://www.sigmaaldrich.com/GR/en/technical-documents/technical-article/microbiological-testing/pathogen-and-spoilage-testing/hybriscan-rapid-test?utm_source=redirect&utm_medium=promotional&utm_campaign=HybriScan)

5.2 Μέθοδοι έμμεσης ανάλυσης

5.2.1 Αέρια χρωματογραφία-φασματομετρίας μάζας

Με τη χρήση χρωματογραφίας αερίου σε συνδυασμό με τη φασματογραφία μάζας (GC-MS) γίνεται η ταυτοποίηση των μεταβολιτών του Βρετανομύκητα. Η ανίχνευση βασίζεται στην ποσοτικοποίηση των φαινολών 4-αιθυλοφαινόλης και 4-αιθυλογουαϊακόλης όπου είναι

μεταβολικά προϊόντα του Βρετανομύκητα. Πρόκειται για ακριβής μέθοδος για την ανίχνευση ποσοτήτων φαινολών σε δείγματα, όμως το αρνητικό στη μέθοδο αυτή είναι η μη γνωστή συγκέντρωση των κυττάρων που παράγουν αυτά τα προϊόντα (Tubia et al., 2018).

Εφαρμόζονται μέθοδοι εκχύλισης υγρού-υγρού της τεχνικής GC-MS, αλλά και πιο επιλεκτικές και απλές μέθοδοι εξαγωγής για την ανίχνευση του Βρετανομύκητα, όπως εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (SPME) και αναρροφητική ράβδο ανάδευσης (SBSA)(Tubia et al., 2018).

Η τεχνική της αέριας χρωματογραφίας και φασματομετρίας μάζας είναι ακατάλληλη για μέθοδο πρόληψης για ένα ζυθοποιείο ή οινοποιείο, διότι τα αποτελέσματα λαμβάνονται εφόσον έχει δράσει ο Βρετανομύκητας στο προϊόν. Επομένως δεν είναι μια χρήσιμη τεχνική για γρήγορη και πρόωμη ανίχνευση του Βρετανομύκητα λόγω και των υψηλών ορίων των φαινολών που είναι 28 µg/L για 4-αιθυλοφαινοόλης και 44 µg/L για αιθυλογουαϊακόλη (Tubia et al., 2018).

5.3 Βιοαισθητήρες

Οι βιοαισθητήρες είναι ένα πολύ υποσχόμενο εργαλείο στην ανάλυση τροφίμων για τον ποιοτικό έλεγχο και στην έγκαιρη ανίχνευση παθογόνων. Η ικανότητα τους στηρίζεται να ενσωματώνουν in-situ κάτω από διαφορετικά περιβάλλοντα με υψηλή ακρίβεια και ευαισθησία. Στη βιομηχανία τροφίμων για την ανίχνευση ζυμών χρησιμοποιούνται βιοαισθητήρες που βασίζονται στη διαφορά δυναμικού και στην αμπερομετρική ανίχνευση (Tubia et al., 2018).

Στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα παρατηρήθηκε αλλαγή στη τιμή μέτρησης της ηλεκτρικής εμπέδησης λόγω της προσκόλλησης και ανάπτυξης του Βρετανομύκητα (*B. bruxellensis*) και μεταβολικής του δραστηριότητας. Αυτοί οι βιοαισθητήρες μπορούν να ανιχνεύσουν την παρουσία Βρετανομυκήτων περίπου 10^2 CFU/ml και μπορεί να αυξηθεί η ευαισθησία κατά 10% με τη χρήση ακινητοποιημένων anti-brett αντισωμάτων. Επίσης αναπτύχθηκε για την ανίχνευση του *B. bruxellensis* μιας χρήσης αμπερομετρικό ανοσοαισθητήρα (immunosensor) του οποίου το όριο ανίχνευσης ήταν 8 CFU/ml σε ρυθμιστικά διαλύματα και 56 CFU/ml σε δείγματα κόκκινου κρασιού (Tubia et al., 2018). Να αναφερθεί ότι αναπτύχθηκε για την ανίχνευση στο κρασί *B. bruxellensis* ένας οπτικός νανοαισθητήρας SPR (Surface Plasmon Resonance), όπου αυτή η μέθοδος λόγω της υψηλής ευαισθησίας μπορεί να ανιχνεύσει 0,1 ng/µL Brett-DNA. Ο αισθητήρας οπτικών ινών Chemiluminescent DNA έχει επίσης αναπτυχθεί για την ανίχνευση του *B. bruxellensis*, αυτή η τεχνική αναφέρθηκε ως μια

επαναλαμβανόμενη και γρήγορης απόκρισης σε σύγκριση με παραδοσιακές μεθόδους ανίχνευσης (Tubia et al., 2018).

Μια νέα τεχνολογία όσον αφορά τους βιοαισθητήρες αποτελείται η ηλεκτρονική ανίχνευση (electronic sensing ή e-sensing). Αυτές οι συσκευές ηλεκτρονικής μύτης ή γλώσσας μπορούν να δώσουν μια ποιοτική ή και ποσοτική μέτρηση διαφορετικών ουσιών (π.χ. από ζύμες - Βρετανομύκητα) στο δείγμα. Οι ηλεκτρονικοί αισθητήρες που χρησιμοποιούνται είναι ηλεκτροχημικοί (π.χ. πετενσιομετρικοί, εμπέδησης, αμπερομετρικοί), οπτικοί και ενζυματικοί (Tubia et al., 2018).

5.4 Γονιδιωματικές τεχνικές

Η μείωση του κόστους αναγνώρισης της γονιδιακής αλληλουχίας και η ύπαρξη τεχνολογίας ελέγχου υψηλής παραγωγικότητας συμβάλουν στην καλύτερη κατανόηση των χαρακτηριστικών των ζυμομυκήτων στη ζυθοποιεία. Στη βιομηχανία της μπίρας γίνεται επιλογή ζυμών με τα πιο επιθυμητά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά. Σύγχρονες τεχνικές αλληλουχίας, όπως MinION ή Illumina, παρέχουν νέες υψηλής ποιότητας πληροφορίες για το γονιδίωμα των Βρετανομυκήτων. Ο Βρετανομύκητας εμφανίζει μεγαλύτερη βιοποικιλότητα μεταξύ των στελεχών του, σε αριθμό χρωμοσωμάτων, από ότι *S. cerevisiae* (Colomer et al., 2018).

Σε κρασί που απομονώθηκε βρέθηκαν διπλοειδή και τριπλοειδή χρωμοσώματα, με το τελευταίο να είναι πιο άφθονο και προτάθηκε ένα γεγονός υβριδισμού που προσδίδει φαινοτυπικό πλεονέκτημα (Colomer et al., 2018). Το γονιδίωμα του *B. bruxellensis* βρέθηκε να αποτελείται από 4-9 χρωμοσώματα, τα οποία κυμαίνονται από 1 έως 6 Mb (Megabase: 1 εκατομμύριο νουκλεοτίδια είναι ίσο περίπου με 1bp-base pairs) (Smith και Divol, 2016). Γενικά, το συνολικό μέγεθος του γονιδιώματος μπορεί να κυμαίνεται από 20 έως 30 Mb ανάλογα το εν λόγω στέλεχος (Woolfit et al., 2007). Αυτό υποδηλώνει ότι τα είδη Βρετανομύκητα ενδέχεται να χρησιμοποιούν συχνές παραλλαγές στη δομή των χρωμοσωμάτων για την αύξηση της μεταβλητότητας και της ανταγωνιστικότητας του γονιδιώματος. Παρόλο που η γονιδιωματική μεταβλητότητα είναι ευεργετική για την προσαρμοστικότητα του είδους, μπορεί να παρεμποδίσει τη σεξουαλική αναπαραγωγή και να οδηγήσει στην ειδογένεση (speciation) (Fischer et al., 2000).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει όχι μόνο η αλληλουχία του DNA, αλλά και γενικά το σχήμα του γονιδιώματος δείχνοντας αρκετά αξιοσημείωτα χαρακτηριστικά. Ακόμα και αν τα είδη Βρετανομύκητα δεν υπέστησαν διπλασιασμό ολόκληρου του γονιδιώματος, δείχνουν σε πολλές περιπτώσεις παραλλαγές αριθμών αντιγραφής λόγω τοπικών αναπαραγωγών όπως π.χ.

στο στέλεχος CBS2499 (Steensels et al., 2015). Εκτός από την παραλλαγή του αριθμού αντιγράφων, παρατηρήθηκαν επίσης μικτές χρωμοσωματικές αναδιατάξεις, μετά από σύγκριση του καρυότυπου για 30 διαφορετικά στελέχη αποκαλύπτοντας αξιοσημείωτες ενδοεπιλεκτικές διαφορές (Hellborg και Piskur, 2009).

Το 2007 δημοσιεύτηκε έρευνα γονιδιώματος για το γαλλικό στέλεχος αλλοιώσης κρασιού CBS 2499, παρουσιάζοντας την περίεργη φύση του γονιδιώματος του *B. bruxellensis* (Steensels et al., 2015). Σε δύο μελέτες παρακολούθησης, το γονιδίωμα CBS2499 ξανά αναλύθηκε και στη συνέχεια να επακολουθεί υψηλότερη κάλυψη επιτρέποντας την ταυτοποίηση 5600 γονιδίων, από τα οποία το 75% σχολιάστηκαν λειτουργικά (Piskur et al., 2012). Την ίδια περίπου χρονική περίοδο μια ακόμα ακολουθία δημοσιεύτηκε για ένα δεύτερο *B. bruxellensis* προερχόμενο από κρασί AWRI1499 από το Ινστιτούτο έρευνας οίνου της Αυστραλίας (Curtin et al., 2012). Ακολουθώντας το πρώτο γονιδίωμα ενός *B. bruxellensis* που προέρχεται από μύρα, το στέλεχος ST05.12/22 (Crauwels et al., 2014), όπως και το σχέδιο γονιδιώματος ενός *B. bruxellensis* από ένα Χιλιανό κρασί LAMAP2480 (Valdes et al., 2014). Ακολούθησαν συγκριτικές μελέτες αλληλουχίας στελεχών και αποκάλυψαν ότι, αν και τα περισσότερα στελέχη *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* έχουν παρόμοια γενικά χαρακτηριστικά, το γενετικό περιεχόμενο μπορεί να διαφέρει σημαντικά (Steensels et al., 2015).

Στον πίνακα 12 φαίνονται λεπτομέρειες 6 γονιδιωματικών αλληλουχιών Βρετανομύκητα.

Πίνακας 12. Γονιδιωματικές αλληλουχίες στελεχών *B. bruxellensis* (Steensels et al., 2015).

Είδος	<i>B. bruxellensis</i>					
Στέλεχος	AWRI1499	CBS2499	ST05.12/22	AWRI1608	AWRI1613	LAMAP2480
Οικολογική θέση	Κρασί	Κρασί	Μύρα	Κρασί	Κρασί	Κρασί
Χώρα Προέλευσης	Αυστραλία	Γαλλία	Βέλγιο	Αυστραλία	Αυστραλία	Χιλή
Μέγεθος γονιδιώματος (Mbp)	12.7	13.4	13.0	-	-	-
Μέση κάλυψη	26x	128x	100-110x	61x	68x	26x
Πλοειδία	Τριπλοειδές	Διπλοειδές	Διπλοειδές	Τριπλοειδές	Διπλοειδές	-

Σε δειγματοληψία απλότυπου (haplotype), όπως το στέλεχος AWRI1499, αποκαλύφθηκε ότι το γονιδίωμα περιλαμβάνει ένα μέτριο ετερόζυγο διπλοειδές γονιδίωμα σε συνδυασμό με ένα διαφορετικό απλοειδές γονιδίωμα, ένα φαινόμενο που περιγράφεται αργότερα και στο στέλεχος AWRI1608. Στα στελέχη CBS2499, AWRI1613 και ST05.12/22 απουσιάζει αυτό το φαινόμενο (Curtin et al., 2012). Αυτό υποδηλώνει ένα γεγονός υβριδισμού δύο υποειδών του *B. bruxellensis*, ένα διπλοειδές και ένα απλοειδές (Steensels et al., 2015). Τα κλάσματα

απλοειδούς γονιδιώματος των στελεχών AWEI1608 και AWR11499 ήταν φυλογενετικός μακριά, υπαινίσσοντας για δύο ανεξάρτητα συμβάντα υβριδισμού (Borneman et al., 2014; Steensels et al., 2015).

Μια πρόσφατη μελέτη, όσον αφορά το στελέχους 1488 *B. bruxellensis* που απομονώθηκε με τη χρήση μικροδορυφορικής ανάλυσης (micro-satellite analysis), επιβεβαίωσε μια προηγούμενη υπόθεση, δημιουργώντας μια καλή εικόνα της γενετικής βιοποικιλότητας του Βρετανομύκητα και της δομής των πληθυσμών του, επιβεβαιώνοντας τη σύνθετη διπλοειδή-τριπλοειδή δομή των στελεχών του και δείχνοντας επίσης να υπάρχει ισχυρή συσχέτιση μεταξύ των υποστρωμάτων απομόνωσης και της γεωγραφικής προέλευσης. Τα τριπλοειδή χρωμοσώματα στο κρασί έδειξαν μεγάλες αντοχές στο θειώδες (Colomer et al., 2018). Οι μοριακοί μηχανισμοί που μπορεί να επέτρεψαν στο *B. bruxellensis* να αποκλίνει από τον ίσως απόμακρο πρόγονο του *S. cerevisiae* είναι η παραλλαγή στην πλοειδία (αριθμός χρωμοσωμάτων στο κύτταρο), οι μετατροπές και αναδιατάξεις γονιδίων, καθώς και οι γονιδιωματικές εισαγωγές, όπως και διαγραφές και αναπαραγωγές του (Smith και Divol, 2016).

Σε συγκριτική ανάλυση αλληλουχιών του *B. bruxellensis* αποκαλύφθηκαν ενδιαφέρουσες γονιδιωματικές ιδιότητες όπως για παράδειγμα ότι πολλά στελέχη είναι εξοπλισμένα με ένα σύμπλεγμα γονιδίων που περιέχει: ένα μεταφορέα νιτρικών, αναγωγή νιτρικών, αναγωγή νιτρώδους και δύο συντελεστές μεταγραφής τύπου $Zn(II)_2$ Cys₆ που επιτρέπουν τη χρήση νιτρικών ως μοναδική πηγή αζώτου (Borneman et al., 2014; Crauwels et al., 2014).

Ανάλυση περιεχομένου γονιδίων αποκάλυψε σχετικό εμπλουτισμό των γονιδίων που συνδέονται με την κυτταρική μεμβράνη και τους μεταφορείς που σχετίζονται με την μεμβράνη, τον μεταβολισμό εναλλακτικών πηγών άνθρακα, (όπως χητίνης, N-ακετυλογλυκοζαμίνης, γαλακτόζης, μαννόζης και λακτόζης) και ένζυμα οξειδοοδουκτάσης (Curtin et al., 2012; Steensels et al., 2015). Η αναπαραγωγή της οξειδοοδουκτάσης από τα γονίδια μπορεί να αντικατοπτρίζει μια στρατηγική που αναπτύχθηκε για να επιτρέψει την επιβίωση του σε αναερόβιες συνθήκες όπου το είδος έχει εξασθενημένη ικανότητα αναγέννησης NAD (P)⁺ και μπορεί να εξηγήσει την ικανότητα του να παράγει οξικό οξύ υπό αερόβιες συνθήκες (φαινόμενο “Custer”) και την παραγωγή ορισμένων βασικών αρωματικών ενώσεων (Piskur et al., 2012; Steensels et al., 2015).

Σε μελέτες, η συγκαλλιέργεια ζυμών και βακτηρίων μετά από πολλές γενεές έδειξαν ότι η έκθεση σε βακτήρια μπορεί να οδηγήσει σε γενετικές αναδιατάξεις σε αρκετές μη συμβατικές ζύμες. Τα στελέχη *B. bruxellensis* και *B. anomalus* έδειξαν υψηλή μετατροπή και παραδείγματα αυτής της συγκαλλιέργειας είναι και η παραγωγή Lambic με τη συμμετοχή

οξικών και γαλακτικών βακτηρίων. Επίσημη μέθοδος δεν υπάρχει ως τώρα για βελτίωση στελεχών. Όμως μπορεί να υπάρξει μετάλλαξη με την έκθεση σε υπεριώδες φως (UV) ή με ethylmethanesulfonate (EMS) (Colomer et al., 2018).

6. Βρετανομύκητας : Κρασί και Μηλίτης

6.1 Κρασί

Ο Βρετανομύκητας, ιδιαίτερα στη βιομηχανία του κρασιού, αναγνωρίζεται ως ζύμη αλλοίωσης με σημαντικές απώλειες στα έσοδα των οινοποιείων. Η παρουσία του έχει ως αποτέλεσμα να αλλάξουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά ενός κρασιού, δημιουργώντας αρνητικές εντυπώσεις. Τα χαρακτηριστικά αυτά δημιουργούνται κατά πλείστον κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης σε δευτερεύον μεταβολισμό, όπου και περιγράφονται σαν ιδρώτας αλόγου, μυρωδιές αχυρώνα, φαρμακευτικά ή και ζωικό δέρμα. Εκτός αυτών των αρωμάτων, ο Βρετανομύκητας παράγει και αρώματα εξωτικών φρούτων όπως ανανά και μάνγκο ή σταφυλιού και αχλαδιού. Όμως αυτά τα χαρακτηριστικά μπορεί και να είναι επιθυμητά όταν πρόκειται για ‘φυσικούς οίνους’ (Colomer et al., 2018).

Στο χυμό σταφυλιού (μούστο) η γλυκόζη και η φρουκτόζη αποτελούν τα κύρια σάκχαρα, με συνολική συγκέντρωση 17-22%. Σε ένα ξηρό οίνο με λιγότερο από 0,2% σακχάρων κυρίαρχες είναι οι πεντόζες, όπου ο *S. cerevisiae* δεν τις χρησιμοποιεί κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και αποτελούν πηγή άνθρακα για τον Βρετανομύκητα. Όπως επίσης πιθανές πηγές άνθρακα μπορεί να αποτελεί η γαλακτόζη και η μαλτόζη με μέσο όρο παρουσίας 0,04 και 0,13 mg/L αντίστοιχα (Ribereau-Gayon et al., 2006; Smith και Divol, 2016).

Η πηγές αζώτου στο γλεύκος σταφυλιού είναι υψηλές με συγκέντρωση αζωτούχων ενώσεων 0,01 –0,1% διαλυτό N. Αναλυτικά περιλαμβάνουν το κατιόν αμμωνίου 3-10% του συνολικού αζώτου, αμινοξέα 25-30%, πολυπεπτίδια 25-40% και πρωτεΐνες 5-10%. Στο κρασί αυτές οι πηγές εξαντλούνται αφήνοντας μόνο ίχνη, συνήθως εντός το εύρος των 0 και 2 mg/l (Ribereau-Gayon et al., 2006; Smith και Divol, 2016). Τα αμινοξέα που απελευθερώνονται στο κρασί κατά τη διάρκεια και στο τέλος των αλκοολικών και μηλικογαλακτικών ζυμώσεων θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν από το Βρετανομύκητα προωθώντας έτσι την ανάπτυξη του και την επακόλουθη αλλοίωση του κρασιού (Smith και Divol, 2016).

Οι περισσότερες βιταμίνες που περιέχονται στο χυμό σταφυλιού λαμβάνονται από τους *Saccharomyces* κατά τη ζύμωση, όπως και τα αζωτούχα συστατικά. Οι βιταμίνες που συνήθως περισσεύουν μετά τη ζύμωση είναι η βιοτίνη, χολίνη, ινοσιτόλη και θειαμίνη σε συγκεντρώσεις από 1 μgr/l έως 760 μgr/l (Kunkee και Edchnauer, 2003; Smith και Divol, 2016).

Ο *Brettanomyces bruxellensis* είναι κυρίως υπεύθυνος για τη δημιουργία ανεπιθύμητων οργανοληπτικών σ' ένα ερυθρό οίνο ωριμασμένο σε δρύινα βαρέλια. Η παρουσία του όμως δεν σταματάει εκεί, μπορεί να ανιχνευτεί στην πρώτη ύλη που είναι το σταφύλι, στον εξοπλισμό του οινοποιείου και ιδιαίτερα στο χώρο της κάβας όπου βρίσκονται τα βαρέλια (Vendrame et al., 2014). Όταν το κρασί αποθηκεύεται για την ωρίμανση του στα ξύλινα βαρέλια, η πορώδης μικροδομή των βαρελιών επιτρέπει την είσοδο του οξυγόνου όπου προάγει την ανάπτυξη του Βρετανομούκητα (Tubia et al., 2018).

Ο *B. bruxellensis* έχει δείξει ότι είναι ο κυρίως οργανισμός που είναι υπεύθυνος για το σχηματισμό πτητικών ενώσεων όπως 4-αιθυλοφαινόλη και 4-αιθυλογουαιακόλη στους ερυθρούς οίνους. Το κατώφλι αντίληψης των αιθυλοφαινόλων είναι χαμηλό, όμως έστω και μια μικρή ποσότητα αν βρεθεί, μειώνεται η οσφρητική ποιότητα του οίνου. Αυτές χαρακτηρίζονται ως φαινολικές, ζωικές, ιδρώτας αλόγου και στάβλου (Vendrame et al., 2014). Για παράδειγμα, το κατώφλι αντίληψης της 4-αιθυλοφαινόλης για ερυθρά κρασιά του Bordeaux βρέθηκε να είναι κοντά στο 0,6 mg/L, ενώ για ερυθρά Beaujolais κοντά στο 4,0 mg/L. Η δραστηριότητα των ενζύμων της αποκαρβοξυλίωσης των φαινολικών οξέων και της αναγωγής της βινυλοφαινόλης στο κρασί από τις ζύμες του Βρετανομούκητα επιτρέπει την παραγωγή της 4-αιθυλοφαινόλης και της 4-αιθυλογουαιακόλης από την παρουσία του π-κουμαρικού οξέος και του φερουλικού οξέος. Η παραγωγή της 4-αιθυλοφαινόλης από το π-κουμαρικό παρουσία του *D. bruxellensis* λαμβάνει χώρα κυρίως στο τέλος της εκθετικής φάσης ανάπτυξης και στην αρχή της στατικής φάσης όταν η γλυκόζη είναι η μόνη πηγή ενέργειας και άνθρακα. Με την προσθήκη ισοβουτυρικού και ισοβαλερικού οξέος στο κρασί παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη αύξηση στο κατώφλι ανίχνευσης της αιθυλοφαινόλης (Buron et al., 2011). Έχουν βρεθεί σε μελέτες αναλογίες μεταξύ της 4-αιθυλοφαινόλης και 4-γουαιακόλης από 3:1 μέχρι και 40:1 (Gawel, 2004; Tubia et al., 2018). Εκτός από την οργανοληπτική επίδραση των αιθυλοφαινόλων στους ερυθρούς οίνους ο *B. bruxellensis* έχει επίδραση και σε άλλους παράγοντες τόσο οργανοληπτικούς όσο και οπτικούς. Κατά την παρουσία του δημιουργείται στην επιφάνεια του οίνου ένα λεπτό στρώμα (Εικόνα 10), ο οίνος θολώνει, το ερυθρό χρώμα αλλοιώνεται, αυξάνεται η πτητική οξύτητα και παράγονται μη επιθυμητές γεύσεις (mousy)-τετραϋδροπιριδίνες (Vendrame et al., 2014). Οι χρωστικές ουσίες ανθοκυανίνης όπως και η βινυλοφαινόλη μετατρέπονται από το Βρετανομούκητα σε παράγωγα αιθυλίου με συνέπεια την αλλοίωση του χρώματος του κρασιού (Tubia et al., 2018).



Εικόνα 10. Υμένιο Βρετανομύκητα (<https://i2.wp.com/accidentalis.com/wp-content/uploads/2014/05/SaisonUnderBrettInvasion-2-of-3.jpg>)

Στη διαδικασία της διαβροχής και εκχύλισης στην παραγωγή οίνου, γίνεται χρήση πηκτινολυτικών και άλλων ενζύμων που περιέχουν (cinnamoyl esterase) κινναμοϋλ εστεράση, αυτό μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση σε συγκέντρωση του υδροξυκινναμικού οξέος (hydroxycinnamic acid). Αυτά τα οξέα θεωρούνται πρόδρομοι παραγωγής μη επιθυμητών φαινολών από το Βρετανομύκητα (Tubia et al., 2018).

Η παρουσία του Βρετανομύκητα σε λευκούς οίνους δεν απαντάται τόσο συχνά. Αυτό αποδίδεται στη χαμηλή βιωσιμότητα του, που οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην αποτελεσματικότητα του διοξειδίου του θείου σε συνθήκες χαμηλού pH (Vendrame et al., 2014).

Η μόλυνση με Βρετανομύκητα δεν επέρχεται από μία μόνο αιτία, αλλά από συνδυασμό φαινομένων. Εξαπλώνεται όταν έρχεται σε επαφή ο μούστος ή το κρασί με μολυσμένες περιοχές. Συνήθως αυτές είναι ο ακαθάριστος εξοπλισμός παραλαβής σταφυλιών (σταφυλοδόχο, αποβοστρηχωτήρας-σπαστήρας, πιεστήριο), γραμμές μεταφοράς μούστου ή κρασιού, δεξαμενές που δεν έχουν καθαριστεί αποτελεσματικά και οι κάβες των βαρελιών (Tubia, et al. 2018).

Κατά την αλκοολική ζύμωση και μηλικογαλακτική ζύμωση πρέπει να γίνεται σωστή διαχείριση, ώστε να μην αναπτυχθεί ο Βρετανομύκητας. Συνθήκες ευνοϊκές είναι η σταματημένη ζύμωση ή πολύ αργή ζύμωση, pH άνω του 3,6, υψηλές θερμοκρασίες, τεχνικές μικροοξυγόνωσης και λανθασμένες θειώσεις στο τέλος (Tubia et al, 2018).

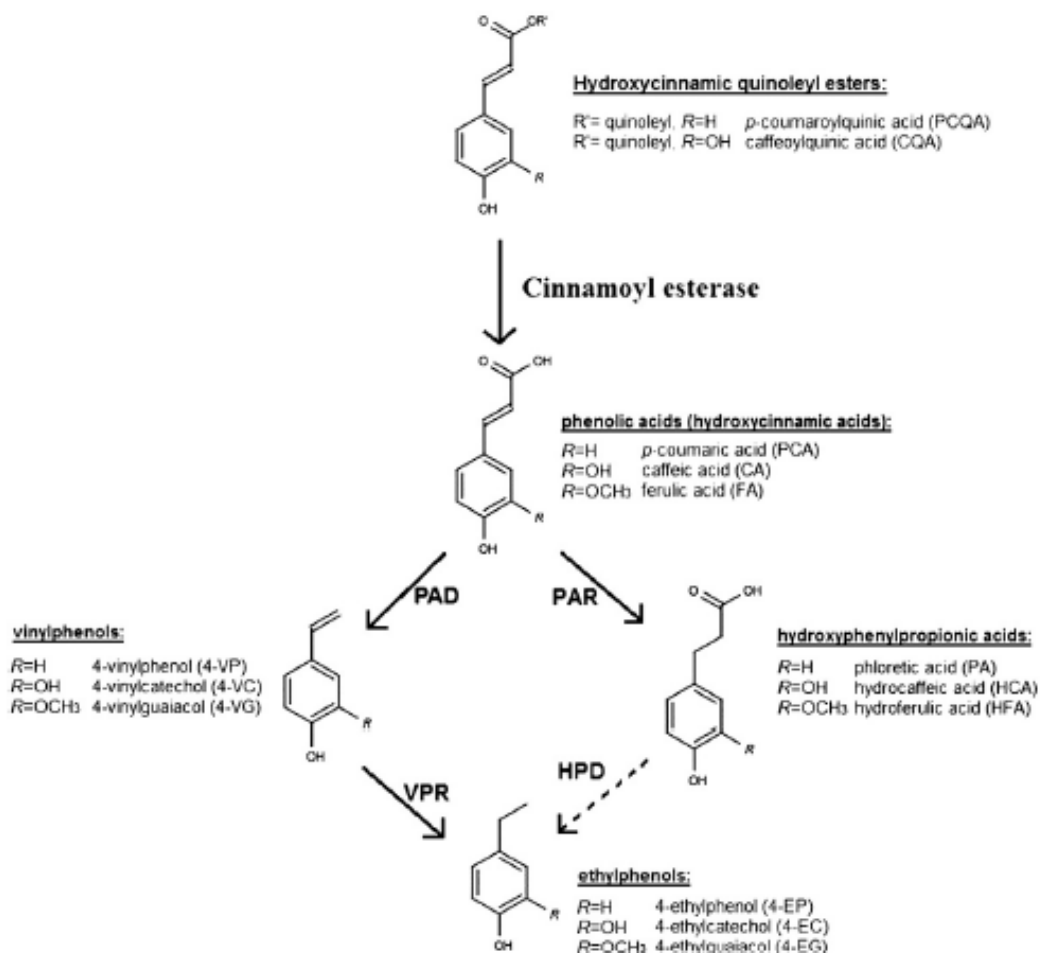
Έχει προταθεί ότι, κατά τη ζύμωση του κρασιού διάφορα είδη ζυμών μπορούν να εισέλθουν σε μια κατάσταση που ονομάζεται 'βιώσιμα αλλά μη καλλιεργήσιμα' (Viable But Not Culturable – VBNC) μετά από στρεσάρισμα λόγω παρουσίας θειώδους (Salma et al., 2013). Αυτή η κατάσταση είναι φυσιολογική στα κύτταρα και εμφανίζουν χαμηλά επίπεδα

μεταβολικής δραστηριότητας και δεν μπορούν να αναπτυχθούν ή να πολλαπλασιαστούν σε μη επιλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα (Steensels et al., 2015). Με την προσθήκη θειώδους προκαλείται απώλεια της καλλιέργειας, αλλά διατήρηση της βιωσιμότητας μέσα στο κρασί σε είδη ζυμών όπως *S.cerevisiae* (Salma et al., 2013) και *B. bruxellensis* (Zuehlke και Edwards, 2013). Ωστόσο, αναφορές για την επίδραση του SO₂ στην απενεργοποίηση του Βρετανομύκητα είναι συχνά αντιφατικές (Barata et al., 2008). Σε μελέτη βρέθηκε ότι το μέγιστο σε ανοχή σε θειώδη άλατα σε 41 στελέχη *B. bruxellensis* διαφέρουν σε πενταπλάσιο εύρος (Curtin et al., 2012). Σε παρόμοια μελέτη δοκιμάστηκαν 108 στελέχη *B. bruxellensis* για ανοχή στο SO₂ και επιβεβαίωσαν την αξιοσημείωτη μεταβλητότητα μεταξύ των ειδών. Επίσης ταυτοποιήθηκαν δύο στελέχη που θα μπορούσαν να ανεχθούν έως 0,6 mg/L μοριακού SO₂ (Vigentini et al., 2013).

Η καλύτερη στρατηγική για την αποφυγή μολύνσεων από Βρετανομύκητα είναι η συνεχής παρακολούθηση του εξοπλισμού ενός οινοποιείου. Η προσθήκη θειώδους και η διατήρηση του σε επιτρεπτά όρια, όπως και το φιλτράρισμα του οίνου αποτελούν άμυνα για την ανάπτυξη του (Vendrame et al., 2014). Διάφοροι μέθοδοι χρησιμοποιήθηκαν για τη μείωση στο κατώφλι αντίληψης των πτητικών φαινολών στο ερυθρό κρασί όπως η προσθήκη χιτοζάνης σε ερυθρό κρασί ή η χρήση ενεργού άνθρακα (Colomer et al., 2018). Επίσης, ο εμβολιασμός με καθαρές καλλιέργειες τόσο για την αλκοολική ζύμωση όσο και για την μηλογαλακτική ζύμωση έδειξε ότι μπορεί να αποφευχθεί η ανάπτυξη του *B. bruxellensis* και ο σχηματισμός πτητικών φαινολών (Tubia et al., 2018).

6.2 Μηλίτης

Η παραγωγή μηλίτη δεν περιορίζεται μόνο σε ελεγχόμενες ζυμώσεις με ζύμες *Saccharomyces* (*S. uvarum*, *S. bayanus*, *S. cerevisiae*), αλλά παράγονται και προϊόντα με άγριες ζύμες. Στους συγκεκριμένους μηλίτες τα υπολειπόμενα σάκχαρα κυμαίνονται μεταξύ 10-60 gr/L. Οι μηλίτες μπορούν να χαρακτηριστούν οργανοληπτικά σε φρουτώδεις και ανθικούς με περιγραφές όπως μήλο, μπανάνα, αχλάδι, κόκκινα μούρα, εξωτικά και εσπεριδοειδή φρούτα. Επίσης μπορούν να αναφερθούν χαρακτηριστικά κομποστοποιημένων φρούτων, όπως αυτά του μήλου, ή του δαμάσκηνο και караμέλα βουτύρου. Οι φρουτένιοι-ανθικοί μηλίτες είναι πλούσιοι σε οξικούς εστέρες και έχουν χαμηλά επίπεδα σε πτητικές φαινόλες, ενώ σε μηλίτες με έντονα τα φαινολικά χαρακτηριστικά ισχύει το αντίθετο (Guichard et al., 2019). Σε Γαλλικούς μηλίτες βρέθηκε ότι οι κύριες πτητικές φαινόλες είναι η 4-αιθυλοκατεχόλη και η 4-αιθυλοφαινόλη με συγκεντρώσεις που δίνουν επιθυμητά χαρακτηριστικά σε 12 mg/L και 3,0 mg/L αντίστοιχα (Buron et al., 2011).



Σχήμα 7. Βιοσύνθεση μεταβολική οδός στις πτητικές φαινόλες από υδροξυκινναμικούς εστέρες στο μηλίτη: PAD: Αποκαρβοξυλάση φαινολικού οξέος, VPR: Αναγωγή βινυλοφαινόλης, PAR: Αναγωγή φαινολικού οξέος, HPD: υποτιθέμενη υδροξυφαινολοπροπιονική αποκαρβοξυλάση (Buron et al., 2011).

Η βιοσύνθεση των πτητικών φαινολών αποδίδεται στη ζύμη του Βρετανομούκητα. Σε μελέτη, η παρουσία του *B. anomalus* σε μηλίτη έδειξε τη σύνθεση των πτητικών φαινολών και την αποικοδόμηση του οξικού αιθυλεστέρα. Το καφεοϋλοκινικό οξύ (caffeoylquinic acid) είναι ο κύριος υδροξυκινναμικός εστέρας (hydroxycinnamic ester) στο μηλίτη, οδηγώντας σε σχηματισμό 4-αιθυλοκατεχόλη (4-ethylcatechol). Σε μηλίτες με δυσάρεστα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά βρέθηκαν σε υψηλά επίπεδα οι συγκεντρώσεις των 4-αιθυλοκατεχόλη (4-ethylcatechol) 20,02 mg/L και 4-αιθυλοφαινόλη (4-ethylphenol) 2,22 mg/L. Αντίθετα, σε μηλίτες με έντονα φρουτώδες και ανθώδες οργανοληπτικά χαρακτηριστικά οι συγκεντρώσεις των αντίστοιχων πτητικών φαινολών κυμάνθηκαν σε 0,89-1,17 mg/L και 0,15-0,46 mg/L (Guichard et al., 2019). Σε Ισπανικό μηλίτη που είχε οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του Βρετανομούκητα βρέθηκε η συγκέντρωση 4-αιθυλοφαινόλη να προσδιορίζεται σε 0,7 mg/L (Buron et al., 2011).

Με τη χρήση της αναλυτικής μεθόδου HPLC μετρήθηκαν οι συγκεντρώσεις των πτητικών φαινολών που παράχθηκαν από τέσσερα στελέχη *Brettanomyces/Dekkera anomala* από μηλίτες μετά από 7 ημέρες ζύμωση. Στον πίνακα 13 φαίνεται η κατανάλωση του καφεϊκού οξέος, του π-κουμαρικού οξέος και του φερουλικού οξέος και η μετατροπή τους σε 4-αιθυλοκατεχόλη, 4-αιθυλοφαινόλη και 4-αιθυλογουαϊακόλη αντίστοιχα (Buron et al., 2011).

Πίνακας 13. Παραγωγή πτητικών φαινολών από Βρετανομύκητες σε μηλίτες μετά από 7 μέρες ζύμωσης (Buron et al., 2011).

	Δείγμα χωρίς στέλεχος	Brett/ Dekkera I mg/L	Brett/ Dekkera II mg/L	Brett/ Dekkera III mg/L	Brett/ Dekkera IV mg/L
Καφεϊκό οξύ	46,8	15,8	16,2	16,2	39,2
4-αιθυλοκατεχόλη	-	26,7	25,2	23,8	6,2
π-κουμαρικού	50,2	-	-	-	8,7
4-αιθυλοφαινόλη	-	41,7	41,3	39,9	34,5
Φερουλικού οξέος	45,3	2,5	1,1	-	15,8
4-αιθυλογουαϊακόλης	-	45,8	46,0	43,3	32,4

Σε 4 δείγματα (2 διαφορετικά) από μηλίτες που εμβολιάστηκαν με *Brettanomyces/Dekkera* έγινε επιπλέον προσθήκη στα 2 δείγματα με το ένζυμο cinnamoyl esterase. Στα δείγματα αυτά παρατηρήθηκαν επιπλέον ποσότητες σε υδροξυκινναμικό οξύ με αποτέλεσμα την παραγωγή υψηλότερων συγκεντρώσεων πτητικών φαινολών από τους Βρετανομύκητες (Πίνακας 14) (Buron et al., 2011).

Πίνακας 14. Παραγωγή πτητικών φαινολών από Βρετανομύκητες σε μηλίτες μετά από 21 ημέρες επώασης (Buron et al., 2011).

Μηλίτης	Cinnamoyl esterase	4-αιθυλοκατεχόλη mg/L	4-αιθυλοφαινόλη mg/L	4-αιθυλογουαϊακόλης mg/L
C1	OXI	12,0	3,4	0,8
C2	OXI	29,6	3,3	0,7
C1	NAI	22,3	8,9	1,0
C2	NAI	31,1	8,9	1,1

Το κατώφλι αντίληψης ανίχνευσης των αιθυλοφαινολών μεταξύ δύο δειγμάτων, γλυκού και ξηρού μηλίτη κατά τη δοκιμασία από 8 έμπειρους δοκιμαστές βρέθηκαν να είναι για την 4-αιθυλοκατεχόλη 20-25 mg/L και για την 4-αιθυλοφαινόλη 1,5-2,0 mg/L (Buron et al., 2011).

Οι παραγωγοί μηλίτη για να ελέγξουν την ανάπτυξη του Βρετανομύκητα σε περίπτωση μόλυνσης, αλλά και προληπτικά, εφαρμόζουν χαμηλές θερμοκρασίες ζύμωσης και συντήρησης, αποστειρωτικό φιλτράρισμα, παστερίωση και γίνεται χρήση θειώδους και χιτοζάνης (Guichard et al., 2019).

7. Μέθοδοι αποφυγής και ελέγχου Βρετανομύκητα

Ο Βρετανομύκητας αποτελεί σημαντικό πρόβλημα για τη βιομηχανία παραγωγής αλκοολούχων ποτών. Οι προσπάθειες τους επικεντρώνονται στη βελτίωση των πρωτοκόλλων υγιεινής τους και στη χρήση αντιμικροβιακών τεχνολογιών. Τα τυπικά πρωτόκολλα υγιεινής βασίζονται στο πλύσιμο και απολύμανση δεξαμενών, γραμμών, αντλιών και λοιπού εξοπλισμού πριν ή μετά από κάθε χρήση (Tubia et al., 2018).

Πιο κάτω αναφέρονται διάφοροι τρόποι ελέγχου του πληθυσμού ή αποφυγής ανάπτυξης του Βρετανομύκητα που εφαρμόζονται στην παραγωγή ποτών όπως κρασί, μηλίτη και μπίρα.

Με την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών με τη χρήση ζελανίτης, ασπράδι αυγού, καζεϊνικού κάλιου γίνεται μείωση του πληθυσμού του Βρετανομύκητα μέσω συσσωμάτωσης τους (Flocculation), όπως και μείωση των αιθυλοφαινολών. Αυτό όμως έχει επίπτωση στη μείωση του χρώματος και του αρώματος (Tubia et al., 2018).

Η χρήση φίλτρων με μεμβράνες 0,45μm ή με σύστημα Ultrafiltration έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση του πληθυσμού του Βρετανομύκητα με φυσικό διαχωρισμό. Τα μειονεκτήματα είναι η απώλεια χρώματος και αρωμάτων, το κόστος των φίλτρων (ιδίως το σύστημα Ultrafiltration) και σε περίπτωση πολύ υψηλού πληθυσμού του Βρετανομύκητα ο κίνδυνος να βουλώσουν τα φίλτρα εύκολα (Tubia et al., 2018).

Η μείωση της βιωσιμότητας ή της απενεργοποίησης του Βρετανομύκητα μπορεί να επιτευχθεί με τη δημιουργία κατάλληλων φυσικοχημικών συνθηκών. Οι μεταβλητές φυσικοχημικές συνθήκες μπορεί να είναι: α) Χαμηλές θερμοκρασίες ωρίμανσης, β) Χαμηλό pH, γ) Μείωση της συγκέντρωσης σε οξυγόνο, δ) Αποφυγή μικροοξυγόνωσης, ε) Υψηλά επίπεδα αιθυλικής αλκοόλης και στ) Θερμική απενεργοποίηση. Αυτές οι φυσικοχημικές συνθήκες μπορεί να έχουν αντίκτυπο στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος (Tubia et al., 2018).

Η μη χρήση πηκτινολυτικών ενζύμων και άλλων ενζύμων με δραστηριότητα στην cinamoyl sterase με συνδυασμό τις χαμηλές θερμοκρασίες κρυσταλλοποίησης (στα σταφύλια ή άλλα φρούτα) αποτρέπει τη διαλυτοποίηση του υδροξυκινναμικού οξέος (πρόδρομος ένωση για την παραγωγή αιθυλοφαινολών). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα στην παραγωγή λιγότερης έντασης χρώματος και αρώματος στην περίπτωση των ερυθρών οίνων (Tubia et al., 2018).

Με τη χρήση κάποιων πρόσθετων ουσιών μπορεί να επιτευχθεί αναστολή ανάπτυξης του Βρετανομύκητα και να αποτραπούν οι συνθήκες που ευνοούν για το σχηματισμό αιθυλοφαινόλων. Σε περίπτωση ποτού προσβεβλημένου με Βρετανομύκητα επιτυγχάνεται η μείωση των 4-αιθυλφαινόλης και 4-αιθυλογουαϊακόλης. Πρόσθετες ουσίες είναι: α) SO₂, β) DMCM (dimethyl dicarbonate)(διττανθρακικός διμεθυλεστέρας), γ) Χιτοζάνη, δ) Σορβικό οξύ, ε) Βενζοϊκό οξύ, στ) Φουμαρικό οξύ, ζ) Ασκορβικό οξύ, η) Ερυθροβικό οξύ, θ) Ενεργοί άνθρακες. Κάποιες από τις ουσίες αυτές έχουν επιτρεπτά όρια, κάποιες απαγορεύονται σε κάποιες χώρες και κάποιες είναι σε πειραματικό στάδιο (Tubia et al., 2018).

Η επεξεργασία με υψηλή πίεση 100-600 MPa καταστρέφει τους μικροοργανισμούς χωρίς να επηρεάζει σοβαρά τις φυσικοχημικές ιδιότητες, την ενζυματική δραστηριότητα και τις οργανοληπτικές ιδιότητες στο προϊόν. Αρνητικό σ' αυτή τη μέθοδο το πολύ υψηλό κόστος αγοράς του εξοπλισμού, αλλά και η ανάγκη χειρισμού από ειδικευμένο προσωπικό (Tubia et al., 2018).

Σε πειραματικό στάδιο βρίσκονται βιολογικές τεχνικές που αποτρέπουν την ανάπτυξη του Βρετανομύκητα ή μειώνουν τον πληθυσμό του. Αυτές είναι με τη χρήση βακτηριοκινών (Bacteriocins), βακτηριολογικά ένζυμα, ζυμοκινών (Zymocins), ζύμες με killer toxins (Tubia et al., 2018).

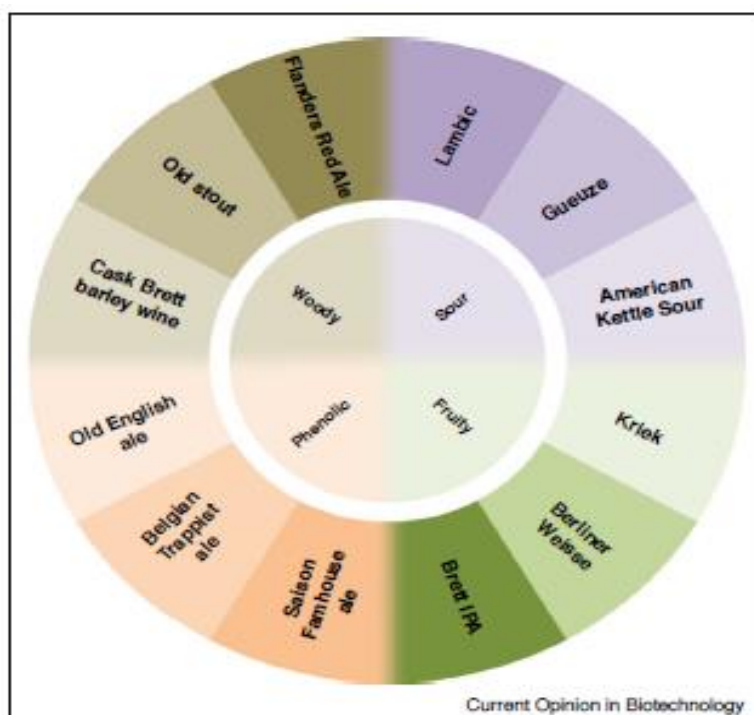
Η χρήση των τεχνικών γενετικής μηχανικής απαγορεύονται από την Ε.Ε. για εφαρμογή σε τρόφιμα. Βρίσκονται σε πειραματικό στάδιο και δεν έχουν ως τώρα την επιθυμητή απόδοση. Οι τεχνικές κάνουν χρήση γενετικά τροποποιημένων ζυμών που αποτρέπουν την ανάπτυξη των Βρετανομυκήτων (Tubia et al., 2018).

8. Βρετανομύκητας: Μπύρα

Η συντριπτική πλειονότητα της μπύρας παρασκευάζεται από καθαρές καλλιέργειες ζυμών *S. cerevisiae* (ale) ή *S. pastorianus* (lager), όμως διάφοροι τύποι μπυρών παράγονται και στηρίζονται στο φυσικό εμβολιασμό/αυθόρμητη ζύμωση (Bokulich και Bamforth, 2013). Στη βιομηχανία μπύρας παρά τη χρήση των ζυμών *Saccharomyces* που δημιουργούν ένα πλούσιο γευστικό προφίλ με αρκετή πολυπλοκότητα ή με διακριτικές νότες και έχοντας αποτελεσματική ζύμωση, αυτό βάζει κάποια όρια στις οργανοληπτικές δυνατότητες. Οι ζύμες non-*Saccharomyces* γίνονται όλο και πιο δημοφιλείς στη βιομηχανία μπύρας, παρόλο που στιγματίζονται ακόμα ως ανεπιθύμητοι οργανισμοί αλλοίωσης (Johnson, 2012; Tataridis et al., 2013a,b; Steensels et al., 2015). Μερικοί από αυτούς, όπως και κάποια στελέχη Βρετανομύκητα, μπορούν να έχουν ευεργετικό ρόλο αυξάνοντας την αποτελεσματικότητα της

ζύμωσης, τη μείωση κινδύνου περαιτέρω αλλοίωσης και την αλλαγή γευστικού προφίλ στο τελικό προϊόν. (Steensels et al., 2015).

Τα πιο γνωστά στυλ μύρας όπου συναντάτε ο Βρετανομύκτης είναι κυρίως στις μύρες τύπου Lambic και Gueuze μετά από αυθόρμητη ζύμωση όπου παράγονται στα περίχωρα των Βρυξελλών στο Βέλγιο (Colomer et al., 2018). Εξαιτίας των μοναδικών αισθητήριων χαρακτηριστικών τους, πολλές ζυθοποιίες σε όλο τον κόσμο μιμούνται τη διαδικασία παραγωγής τους και αναπτύσσουν παρόμοια στυλ μύρας, όπως American Coolship Ales (Bokulich et al., 2012; Steensels et al., 2015). Επίσης, τέτοιες μύρες που έχουν υποστεί αυθόρμητη ζύμωση παράγονται και στην Αφρική (Kayode et al., 2011).



Σχήμα 8. Στυλ μύρας με Βρετανομύκτη (Colomer et al., 2018)

8.1 Είδη

8.1.1 Old Ale

Η συγκεκριμένη κατηγορία ανήκει στα γενικά στυλ τύπου Ale που προέρχονται από τη Βρετανία (British Origin Ale Styles). Ξεχωρίζουν για τα αρώματα βύνης, για το φρουτένιο εστερικό προφίλ που προέρχεται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, αλλά και το συχνό γλυκό αλλά και οξειδωμένο χαρακτήρα μέσω της παλαιώσης της μύρας στο βαρέλι ή και κατά τη διάρκεια παραμονής της στη φιάλη. Μπορεί να προκύψουν σύνθετα χαρακτηριστικά εστέρα και συνήθως το διακετύλιο απουσιάζει ή είναι σε πολύ χαμηλά επίπεδα. Η παρουσία του Βρετανομύκτη και της οξύτητας αποτελεί τον ιστορικό χαρακτήρα της Βρετανικής Ale. Τα

ελαφρά χαρακτηριστικά που δίδει στην μύρα ο Βρετανομούκητας είναι συνήθως αυτά του αλόγου, κατσίκας, δέρματος, φαινολικών και οξύτητας (Parazian et al.,2021). Στο στέλεχος *B. clausenii* έχει αποδοθεί ο χαρακτήρας 'κρασιού' στις βρετανικές Old Ales (Sparrow,2005). Με την παραμονή της μύρας στα ξύλινα βαρέλια νότες βανίλιας μπορεί να παρουσιαστούν στο προφίλ της μύρας (Parazian et al., 2021). Στον πίνακα 15 από το BJCP του 2021 δίδονται τα ποσοτικά χαρακτηριστικά της Old Ale.

Πίνακας 15. Ποσοτικά χαρακτηριστικά Old Ale (Parazian et al., 2021)

Ποσοτικά χαρακτηριστικά Old Ale	
OG	1.058-1.088
FG	1.014-1.030
ABV%	6.3-9.1
IBU's	30-65
SRM/EBC	12-30/24-60

8.1.2 Berliner Weisse

Πρόκειται για Γερμανικής προέλευσης μύρα τύπου Ale (German Origin Ale Styles)(Parazian et al., 2021). Η ταυτοποίηση του Βρετανομούκητα στις μύρες Berliner Weisse έγινε από τους επιστήμονες στο δεύτερο μισό του 20ου αιώνα. Συγκεκριμένα, ο F.J. Methner έδειξε ότι οι ανάμεικτες καλλιέργειες που εμβολιάζονταν περιείχαν Βρετανομούκητες. Όμως η αργή αυτή ζύμη επηρέαζε τη γεύση και τα αρώματα της μύρας μόνο εάν παρέμενε για αρκετό μεγάλο χρονικό διάστημα μέσα στο εμφιαλωμένο μπουκάλι (Hieronymus, 2010).

Η Berliner Weisse ξεχωρίζει για το ελαφρύ της σώμα και την υψηλή περιεκτικότητα σε CO₂. Ενώ ο γλυκός βυνώδης χαρακτήρας και τα αρώματα λυκίσκου απουσιάζουν. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης παράγονται ελαφριά προς μέτρια εστερικά αρώματα φρούτων. Ο μοναδικός συνδυασμός ζυμών και γαλακτικών βακτηρίων κατά τη ζύμωση αποδίδει μια μύρα όξινη και πλήρως ζυμωμένη ως προς τα σάκχαρα. Ο Βρετανομούκητας, όταν συμμετέχει, δίδει ελαφρύ προς μέτριο χαρακτήρα εκφράζοντας χαρακτηριστικά αρώματα στη μύτη και στο στόμα όπως φαινολικών, φρούτων και οξύτητας, αλλά και δέρματος, αλόγου, κατσίκας (Parazian et al., 2021). Στον πίνακα 16 δίδονται τα ποσοτικά χαρακτηριστικά των Berliner Wiese.

Πίνακας 16. Ποσοτικά χαρακτηριστικά Berliner Wiese (Parazian et al., 2021).

Ποσοτικά χαρακτηριστικά Berliner Weisse	
OG	1.028-1.044
FG	1.004-1.006
ABV%	2.8-5.0
IBU's	3-6
SRM/EBC	2-4/4-8

8.1.3 Leipzig-Style Gose

Οι Γερμανικές Leipzig Gose έχουν χαρακτηριστικό γνώρισμα το μέτριο προς υψηλό σε συγκέντρωση γαλακτικό οξύ όπου εκφράζει έντονα γεμάτο φρεσκάδα τη ξινή μπίρα. Επίσης ξεχωρίζει ο αλμυρός χαρακτήρας από την προσθήκη μικρής ποσότητας αλατιού. Τα αρώματα της βύνης και των λυκίσκων είναι πολύ ελαφριά μέχρι ανύπαρκτα. Σε μερικές εκδόσεις Gose μπορεί να περιέχει μικρή ποσότητα κολιάνδρο (Parazian et al., 2021). Οι παραδοσιακές Gose παράγονται με αυθόρμητη ζύμωση και θα πρέπει να εμφανίζουν πολυπλοκότητα όξινου, στο άρωμα και στη γεύση, όπου συμβάλουν από την παρουσία των άγριων ζυμών και των βακτηρίων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Ο Βρετανομύκτης μπορεί να εμφανιστεί μ' ένα πολύ χαμηλό προφίλ στην μπίρα διότι δεν παλαιώνει μεγάλο χρονικό διάστημα. Μπορεί να δώσει ίχνη από άλογο, δέρμα ή γήινα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (Parazian et al., 2015).

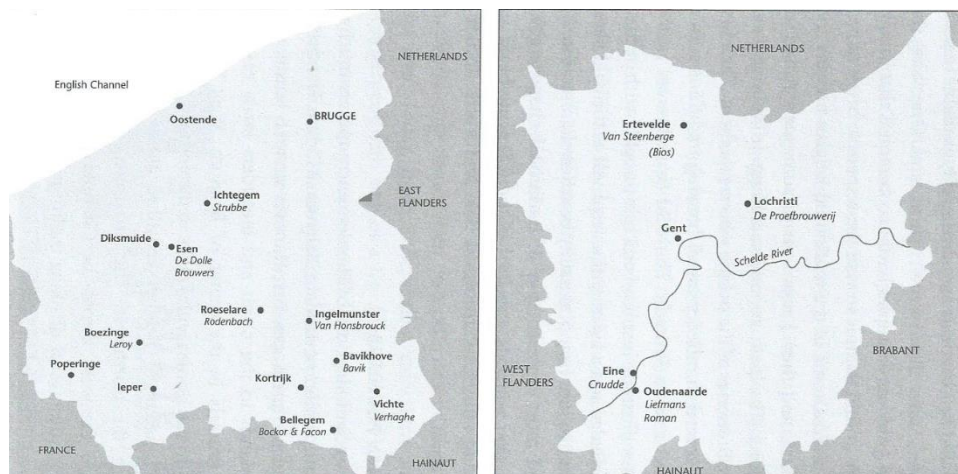
Οι Goze που περιέχουν φρούτα, άλλα μπαχαρικά (εκτός αλατιού και κολιάνδρου), σκούρες βύνες και άλλα συστατικά κατηγοριοποιούνται σε Contemporary-Style Gose και η παρουσία του Βρετανομύκτη μπορεί να είναι εξίσου προαιρετική (Parazian et al., 2021). Στον πίνακα 17 από το BJCP του 2021 δίδονται τα ποσοτικά χαρακτηριστικά της Leipzig Gose. Τα ποσοτικά χαρακτηριστικά της Contemporary Gose είναι τα ίδια.

Πίνακας 17. Ποσοτικά χαρακτηριστικά Leipzig Gose (Parazian et al., 2021)

Ποσοτικά χαρακτηριστικά Leipzig Gose	
OG	1.036-1.056
FG	1.008-1.012
ABV%	4.4-5.4
IBU's	5-15
SRM/EBC	2-7/4-14

8.1.4 Flanders Oud Bruin ή Oud Red Ale

Οι συγκεκριμένες μπίρες παράγονται στην επαρχία της Φλάνδρας (Flanders) στο Βέλγιο. Για γεωγραφικούς σκοπούς, αλλά και διαφορετικών προδιαγραφών μπορεί να χωριστούν σε West Flanders Red και East Flanders brown (εικόνα 11)(Sparrow, 2005).



Εικόνα 11. Παραγωγοί Wild Beers Flanders στο Βέλγιο: West Flanders (αριστερά) και East Flanders (δεξιά) (Sparrow, 2005).

Ο Βρετανομύκητας συμμετέχει συνήθως στις West Flanders Red, ενώ στις East Flanders Brown απουσιάζει. Μαζί με το Βρετανομύκητα συμμετέχουν στη ζύμωση και άλλοι οι μικροοργανισμοί όπως *Saccharomyces*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Acetobacter*, κ.α.. Στον πίνακα 12 παρουσιάζεται η συνήθης διάρκεια ζύμωσης από τους κύριους μικροοργανισμούς. Η ζυμωτική τους ικανότητα συνήθως φτάνει το 98% και η παραγωγή αιθυλικής αλκοόλης κυμαίνεται μεταξύ 4,6-6,5% ABV. Η περισσότερο χρησιμοποιούμενες βύνες είναι Vienna, Munich, ελαφρές προς μέτριες Cara Malt, Special 'B' και καλομπόκι. Οι ποικιλίες λυκίσκων που χρησιμοποιούνται έχουν χαμηλά α-οξέα και προέρχονται από το Βέλγιο, Τσεχία και Γερμανία. Η κυρίως ζύμωση εξελίσσεται έως μια εβδομάδα στους 21 °C και η δεύτερη ζύμωση μπορεί να φτάσει και τα 3 χρόνια μέσα σε δρύινα βαρέλια σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος. Παραδοσιακά, η ενανθράκωση γίνεται φυσικά στο μπουκάλι. Πλέον κάποιοι εφαρμόζουν φιλτράρισμα και παστερίωση της μύρας (Sparrow, 2005).

Πίνακας 18. Διάρκεια ζύμωσης Flanders Red (Sparrow, 2005).

Κύριοι Μικροοργανισμοί	Διάρκεια χρόνος
<i>Saccharomyces</i>	1 εβδομάδα
<i>Lactobacillus</i>	1 εβδομάδα
<i>Pediococcus</i>	3 – 4 εβδομάδες
<i>Brettanomyces</i>	8 μήνες

Ορισμένοι παραγωγοί ζυμώνουν και ωριμάζουν τις μύρες τους σε ξύλινες δεξαμενές και βαρέλια για 18 μήνες έως 3 χρόνια. Οι φρέσκιες Flanders Ale αναμιγνύονται με τις ξινές και ξηρές παλαιωμένες και εμφιαλώνονται. Οι παλαιωμένες μύρες δίδουν πολύπλοκα οξέα και εστέρες (Sparrow, 2005).

Η κατηγορία των Βέλγικων αυτών μπυρών έχει χρωματισμό από χάλκινο μέχρι πολύ σκούρο χρώμα. Καβουρδισμένα στοιχεία από βύνες μπορεί να περιέχει τόσο στο άρωμα όσο και στη γεύση. Οι φρουτώδεις εστέρες που εκφράζονται ως κεράσι και πράσινο μήλο είναι εμφανείς. Η παρουσία των γαλακτικών βακτηρίων μπορεί να δώσει από χαμηλά επίπεδα ξινού χαρακτήρα μέχρι και υψηλά επίπεδα. Ο Βρετανομύκτης συνήθως δεν παρουσιάζεται σ' αυτές τις μπύρες, όμως όταν υπάρχει παρουσία τα οργανοληπτικά του στοιχεία είναι πολύ χαμηλά (Papazian et al., 2021). Στον πίνακα 19 δίδονται τα ποσοτικά χαρακτηριστικά των Flanders Oud Bruin.

Πίνακας 19. Ποσοτικά χαρακτηριστικά Flanders Oud Bruin (Papazian et al., 2021).

Ποσοτικά χαρακτηριστικά Flanders Oud Bruin	
OG	1.044-1.056
FG	1.008-1.016
ABV%	4.8-6.6
IBU's	5-18
SRM/EBC	12-25/24-50

8.1.5 Lambic

Οι μπύρες τύπου Lambic χαρακτηρίζονται από το πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα ζύμωσης, όπου μπορεί να διαρκέσει μερικές φορές αρκετά χρόνια. Τα πλούσια και περίπλοκα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους, οφείλονται στην πλούσια βακτηριακή και μυκητιακή χλωρίδα που ευδοκιμεί κατά τη μεγάλη σε διάρκεια ζύμωση τους (Steensels et al., 2015). Οι επιστήμονες απομόνωσαν πάνω από 200 διαφορετικούς μικροοργανισμούς κατά τη διάρκεια ζυμώνσεων Lambic (Sparrow, 2005). Το σύνολο των μικροοργανισμών σ' αυτές τις ζυμώσεις είναι πολύπλοκο, με πολλά γένη ζυμών και βακτήρια να συνυπάρχουν και να ποικίλλουν με την πάροδο του χρόνου (Steensels και Varstrepen, 2014). Όλα τα μεμονωμένα στελέχη Βρετανομύκτητα παρουσιάζουν διαφορετικά χαρακτηριστικά και οι Lambic ζυθοποιοί έχουν διαφορετικά και μοναδικά στελέχη μέσα στις εγκαταστάσεις τους (Sparrow, 2005).

Οι οικολογία των Lambic περιεγράφηκαν λεπτομερώς το 1977 από τον Van Oevelen και τους συνεργάτες του και επανεξετάστηκε χρησιμοποιώντας σύγχρονες τεχνικές που βασίζονται στις μεθόδους όπως αλληλουχίας υψηλής ποιότητας (high-quality sequencing), Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) και συνδυασμός καλλιιεργειών και MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry). Αυτές οι μελέτες έδειξαν ότι ο μικροβιακός πληθυσμός αποτελείται κυρίως από ζύμες, lactobacilli και Pediococci (Steensels et al., 2015). Το μεγαλύτερο μέρος της αλκοολικής ζύμωσης πραγματοποιείται από το *S. cerevisiae*, όμως στα μετέπειτα στάδια όταν σάκχαρο όπως

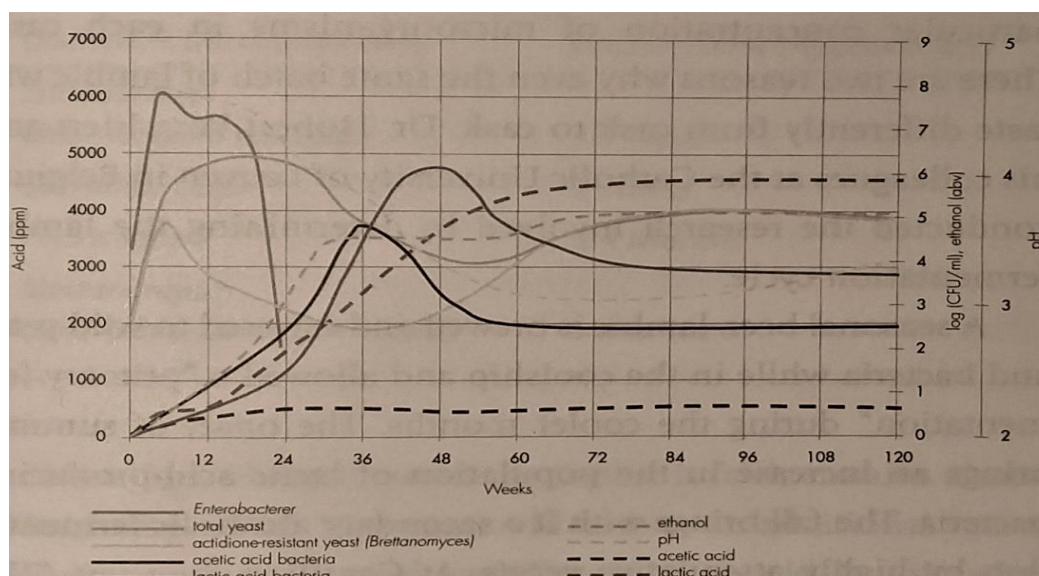
μαλτόζη και μαλτοτριόζη εξαντλούνται υπερισχύει ο Βρετανομούκητας συνήθως μετά από 4-8 μήνες (Bokulich et al., 2012). Ο Βρετανομούκητας παραμένει ο κυρίαρχος μέχρι το τέλος της ωρίμανσης της μύρας. Η μεταβολική του δραστηριότητα με συνδυασμό την παρουσία των *Lactobacilli* και *Pediococci* προκαλεί δραστικές αλλαγές στο οργανοληπτικό προφίλ της μύρας και οδηγεί σ' ένα πλήρως ζυμωμένο ποτό με μοναδική γεύση (Steensels et al., 2015). Ο *Pediococcus* είναι υπεύθυνος για τη μεγαλύτερη παραγωγή γαλακτικού οξέος στις Lambic (Sparrow, 2005). Στον πίνακα 20 παρουσιάζονται οι κύριοι μικροοργανισμοί και η διάρκεια ζύμωσης που συμμετέχουν σε μια Lambic.

Πίνακας 20. Διάρκεια Ζύμωσης Lambic (Sparrow, 2005).

Κύριοι Μικροοργανισμοί	Διάρκεια χρόνος
<i>Enterobacter</i> και <i>Kloeckera apiculata</i>	3-7 ημέρες
<i>Saccharomyces</i>	2 εβδομάδες
<i>Pediococcus</i>	3-4 μήνες
<i>Brettanomyces</i>	8 μήνες

Οι συγκεντρώσεις σε οξικό οξύ σε μύρες Lambic κυμαίνεται από 0,4-1,2 g/L (Steensels et al., 2015). Ο Βρετανομούκητας μπορεί να παράγει οξικό οξύ σε αερόβιες συνθήκες, όταν το χαρακτηριστικό αυτό υπάρχει στο στέλεχος και το είδος του (Rozpedowska et al., 2011). Η ζυμωτική ικανότητα των Lambic μπορεί να φτάσει το 100% διότι η ζύμωση εξελίσσεται τουλάχιστον 6 μήνες και μπορεί να φτάσει τα 2 χρόνια σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος (Sparrow, 2005).

Ο κάθε μικροοργανισμός που συμμετέχει έχει διαφορετική ανάπτυξη και εξαρτάται από τον πληθυσμό τους, την θερμοκρασία, τα θρεπτικά μέσα, τη συγκέντρωση του οξυγόνου και το pH (Sparrow, 2005). Στο διάγραμμα 2 απεικονίζεται η δυναμική μιας ζύμωσης Lambic.



Διάγραμμα 2. Δυναμική ζυμώσεως Lambic (Sparrow, 2005).

Οι θερμοκρασίες κατά τη διάρκεια αυτών των μηνών πρέπει να είναι φυσιολογικές στο χώρο όπου πραγματοποιείται αυτή η μεγάλη σε διάρκεια ζύμωση. Σε θερμοκρασίες χώρου άνω των 24 °C για 1-2 εβδομάδες αυξάνεται η παραγωγή του οξικού οξέος και του γαλακτικού οξέος από τα βακτήρια και η συνεχής έκθεση στους 30 °C και άνω έχει ως αποτέλεσμα να απορριφθούν ως Lambic μύρες. Κάτω από 10 °C παρατηρείται μειωμένη ανάπτυξη των βακτηρίων και στους 4 °C αδρανοποιούνται και οι άγριες ζύμες (Sparrow, 2005).

Τα δημητριακά που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι 60-70% βύνες Pilsner και 30-40% αβυνοποίητο σιτάρι. Οι ποικιλίες των λυκίσκων που χρησιμοποιούνται έχουν χαμηλά σε συγκέντρωση α-οξέα και η ηλικία τους συνήθως φτάνει και τα 3 χρόνια (Sparrow, 2005).

Το χρώμα των Lambic κυμαίνεται από χρυσαφί μέχρι μέτριο κεχριμπαρι. Λόγω του ξηρού της χαρακτήρα κανένα ίχνος από γλυκιά βύνη δεν παρουσιάζεται όπως και η πικράδα τους είναι πάρα πολύ μικρή. Το CO₂ κυμαίνεται από ελάχιστο αισθητό μέχρι υψηλό σε συγκέντρωση. Η παρουσία εστέρων φρούτων είναι μεγάλη μέχρι πολύ μεγάλη. Η συμμετοχή των Βρετανομυκήτων είναι συνήθως σε μέτρια επίπεδα και ξεχωρίζουν τα χαρακτηριστικά του αλόγου, κατσίκας, δέρματος και φαινολικών αρωμάτων και γεύσεων (Parazian et al., 2021).

Η χρήση δρύινων βαρελιών συμβάλει στη διαμόρφωση του χαρακτήρα των Lambic, με την ηλικία των βαρελιών να παίζουν ρόλο ως προς το τελικό προφίλ τους. Συνήθως μικρές ποσότητες από νέα βαρέλια χρησιμοποιούνται για τις αναμίξεις. Επίσης, η έντονη ξηρότητα των Lambic επηρεάζεται από τη χρήση μεγάλης ποσότητας σε μικρά μεγέθους ξύλινα βαρέλια. Συγκεκριμένα, λόγω της μεγαλύτερης διάχυσης O₂ στη μύρα στα μικρά μεγέθους βαρέλια έναντι των μεγαλύτερων ξύλινων δεξαμενών (foudre), οξειδώνεται περισσότερο η μύρα. Όμως οι μεγάλες ξύλινες δεξαμενές δίνουν πιο ολοκληρωμένες και ισορροπημένες Lambic (Sparrow, 2005).

Στον πίνακα 21 δίδονται τα ποσοτικά χαρακτηριστικά των Lambic.

Πίνακας 21. Ποσοτικά χαρακτηριστικά Lambic (Parazian et al., 2021).

Ποσοτικά χαρακτηριστικά Lambic	
OG	1.047-1.056
FG	1.000-1.010
ABV%	5.0-8.2
IBU's	9-23
SRM/EBC	6-13/12-26

8.1.6 Gueuze

Η καταγωγή των Gueuze προέρχεται από την ευρύτερη περιοχή των Βρυξελλών στο Βέλγιο. Οι μύρες αυτές αποτελούν αναμίξεις από παλαιωμένες και φρέσκες Lambic και η τελική ζύμωση-ωρίμανση γίνεται στο μπουκάλι (Parazian et al., 2021). Οι Gueuze είναι αποτέλεσμα από ανάμιξη 1, 2 και 3 ετών Lambic με τις νέες να έχουν ακόμα ζυμώσιμα σάκχαρα και βιώσιμες ζύμες. Η Lambic της 1^{ης} χρονιάς λόγω ότι δεν έχει ολοκληρώσει τη ζύμωση θα προμηθεύσει τους μικροοργανισμούς με σάκχαρα και θρεπτικά στοιχεία. Έτσι θα συνεχιστεί η ζύμωση στο μπουκάλι παράγοντας CO₂ και αιθανόλη. Συνήθως, η φρέσκια Lambic συμμετέχει μ' ένα 10% στην ολική ανάμειξη. Της 2^{ης} χρονιά Lambic έχει ολοκληρωθεί η ζύμωση και είναι η πιο απαλή από τις τρεις, με την πιο ισορροπημένη οξύτητα. Η Lambic της 3^{ης} χρονιάς, τα οξέα και οι εστέρες έχουν αναπτυχθεί πλήρως κάνοντας την πιο πολύπλοκη και όξινη (Sparrow, 2005).

Παραδοσιακά, η ζυθοποίηση γίνεται από αβυνοποιήτο σιτάρι (30-40%), βυνοποιημένο κριθάρι (60-70% Pilsner) και μπαγιάτικο, παλαιωμένο λυκίσκο (3 ετών)(Sparrow, 2005; Parazian, 2021). Η διάρκεια των συνεχόμενων ζυμώσεων μπορεί να φτάσουν και τα 3 έτη και κυρίως συμμετέχουν οι μικροοργανισμοί Enterobacter, Saccharomyces, Lactobacillus, Pediococcus και Brettanomyces. Η ζυμωτική ικανότητα φτάνει στο 100% (Sparrow, 2005). Παρουσιάζουν έντονους εστέρες φρούτων, ξινών και οξικού οξέος χαρακτηριστικών, που προέρχονται από την αυθόρμητη ζύμωση. Η παρουσία του γλυκού βυνώδους χαρακτήρα απουσιάζει, όπως και τα φρέσκα αρώματα λυκίσκου. Η παρουσία του λυκίσκου μπορεί να βρίσκεται σε πολύ χαμηλή ένταση και να περιλαμβάνει χαρακτηριστικά τυριού, λουλουδιών ή λεβάντας. Οι Gueuze είναι ξηρές μύρες και η παρουσία του CO₂ μπορεί να είναι ανύπαρκτη μέχρι και μέτριας συγκέντρωσης. Η παρουσία του Βρετανομμύκητα, εφόσον προέρχεται από την παραγωγή των Lambic, είναι γενικά μέτριας έντασης (Parazian et al., 2021). Στον πίνακα 22 δίδονται τα ποσοτικά χαρακτηριστικά των Gueuze.

Πίνακας 22. Ποσοτικά χαρακτηριστικά Gueuze (Parazian et al., 2021).

Ποσοτικά χαρακτηριστικά Gueuze	
OG	1.044-1.056
FG	1.000-1.010
ABV%	5.0-8.9
IBU's	11-23
SRM/EBC	6-13/12-26

Ο Βέλγος ζυθοποιός Frank Boon αναφέρει ότι για να έρθει στα σωστά επίπεδα CO₂ μια Gueuze πρέπει να περιέχει 14-16 gr/L σάκχαρα. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης μέσα στο μπουκάλι τα

μισά σάκχαρα θα μετατραπούν σε CO₂ και τα άλλα μισά σε αλκοόλη. Σε θερμοκρασίες 13-16 °C παράγονται 4,8-5,3 volumes CO₂ και 0,33-0,38% επιπλέον αλκοόλη (Sparrow, 2005).

Σύμφωνα με τον καθηγητή Hubert Verachtert, η επαναζύμωση στο μπουκάλι για την παραγωγή Gueuze περνάει από τρεις φάσεις : α) Οι αερόβιες ζύμες *Candida*, *Torulopsis* και *Pichia* αναπαράγονται ανάλογα με το οξυγόνο που διαλύθηκε κατά τη διάρκεια της εμφιάλωσης, β) Μετά από 3 εβδομάδες ξεκινάει η 2η φάση με τους *Brettanomyces* και *Pediococcus* να αναπαράγονται και να αποζυμώνουν όλα τα σάκχαρα στη μύρα παράγοντας επιπλέον οξέα και εστέρες, και, γ) Στην 3η φάση ακολουθεί ο θάνατος και η αυτόλυσις των περισσότερων κυττάρων των *Brettanomyces* και *Pediococcus* (Sparrow, 2005).

8.1.7 Fruit Lambic

Οι Fruit Lambic έχουν καταγωγή επίσης από την ευρύτερη περιοχή των Βρυξελλών στο Βέλγιο. Αυτές οι μύρες, ανάλογα με το είδος της προσθήκης των φρούτων, έχουν αντίστοιχα τις ονομασίες Framboise, Kriek, Peche, Cassis κ.α. Ιστορικά, οι παραδοσιακές αυτές μύρες είναι ξηρές και τα σάκχαρα που προέρχονται από τις βύνες, ζάχαρης, φρούτων ή άλλες ζαχαρούχες πρώτες ύλες να έχουν αποζυμωθεί πλήρως (Parazian et al., 2021). Η οξύτητα, τα αρώματα, η γεύση, τα σάκχαρα και το χρώμα που προέρχονται από τα αναλόγως προστιθέμενα φρούτα παίζουν καθοριστικό ρόλο στο τελικό προϊόν. Η προσθήκη των κερασιών στις Lambic ανατρέχει χρονολογικά πολύ πίσω, ενώ κοντά στην αλλαγή του 20ου αιώνα γινόταν και η χρήση σμέουρων. Στα μέσα του 20ου αιώνα γινόταν χρήση και του σταφυλιού, ενώ τα φρούτα όπως φραγκοστάφυλο, ροδάκινο, βερίκοκο και φράουλα εμφανίστηκαν μετά το 1980 (Sparrow, 2005). Η παρουσία του λυκίσκου είναι ανύπαρκτη λόγω της έντονης παρουσίας των φρούτων.

Η παρουσία του Βρετανομούκητα, σε περίπτωση παρουσίας του, είναι μέτριας έντασης με κύρια χαρακτηριστικά αλόγου, κατσίκας, δέρματος και φαινολικών αρωμάτων. Ο συνδυασμός των γλυκών χαρακτηριστικών των φρούτων μαζί με το ξινό χαρακτήρα προερχόμενο από τη ζύμωση έρχεται σε ισορροπία στο τελικό προϊόν της μύρας (Parazian et al., 2021). Γενικά, οι μύρες αυτές δεν έχουν πρόθεση να παλαιώσουν διότι με το χρόνο η ένταση της γεύσης, του αρώματος και του χρώματος εξασθενούν (Sparrow, 2005). Στον πίνακα 23 δίδονται τα ποσοτικά χαρακτηριστικά των Lambic Fruit κατά του BJCP.

Πίνακας 23. Ποσοτικά χαρακτηριστικά Lambic Fruit (Parazian et al., 2021).

Ποσοτικά χαρακτηριστικά Lambic Fruit	
OG	1.040-1.072
FG	1.008-1.016
ABV%	5.0-8.9
IBU's	15-21
SRM/EBC	Ανάλογα με την προσθήκη φρούτου

Τον Ιούνιο του 1998, η Ευρωπαϊκή Ένωση αποφάσισε μετά από απαίτηση της συννομοσπονδίας των Βέλγων ζυθοποιών να έχουν στις ετικέτες τους το σήμα 'Special Traditional Guarantee'. Αναφέρεται ότι οι Lambic και Gueuze γράφουν στην ετικέτα τους τα 'Oude' ή 'Ville' και πρέπει να έχουν συγκεκριμένη γεύση και αρωματικό προφίλ. Η ξινή μύρα Lambic πρέπει να προέρχεται και από ζύμωση στελεχών Βρετανομύκητα (*B. bruxellensis* και *B. lambicus*). Η ελάχιστη πυκνότητα εκκίνησης καθορίζεται στα 12,7 Plato (1.051 S.G.), το μέγιστο pH στα 3,8, το μέγιστο χρώμα 25 EBC και η μέγιστη πικράδα στα 20 IBUs. Για την μύρα Gueuze αναφέρεται ότι παράγεται από αναμίξεις μυρών Lambic με την παλαιότερη να έχει ωριμάσει σε ξύλινο βαρέλι τουλάχιστον 3 χρόνια. Όσον αφορά τις Fruit Lambic, το ελάχιστο σε προσθήκη φρούτων ή χυμού φρούτων ανέρχεται στο 10% με το μέγιστο στο 30% (25% για τα κεράσια) (Sparrow, 2005). Το Δεκέμβριο του 2017 καταχωρούνται οι πιο κάτω ονομασίες στο μητρώο των εγγυημένων παραδοσιακών ιδιότυπων προϊόντων «Vieille Kriek, Vieille Kriek-Lambic, Vieille Framboise-Lambic, Vieux fruit-Lambic / Oude Kriek, Oude Kriekenlambiek, Oude Frambozenlambiek, Oude Fruit-lambiek» και «Vieille Gueuze, Vieille Gueuze-Lambic, Vieux Lambic / Oude Geuze, Oude Geuze-Lambiek, Oude Lambiek» (Εκτελεστικός κανονισμός E.E, 2216/2017).

8.1.8 Farmhouse Ales

Οι Farmhouse ales πήραν το όνομα τους από τις παραδοσιακές μύρες που παράγονταν από τα παλαιά χρόνια ιδίως στη βόρεια Ευρώπη από οικογενειακές φάρμες ή οικίες στην επαρχία. Συνήθως, οι αγρότες ζυθοποιούσαν κυρίως για δική τους χρήση, από σιτηρά που παρήγαγαν οι ίδιοι (Markowski, 2004). Η κάθε χώρα έχει τη δική της γνωστή ονομασία για τις Farmhouse Ales, αλλά και παραλλαγές ονομάτων ανάλογα με την περιοχή. Στο Βέλγιο είναι: Saison και Grisette, στη Γαλλία: Biere de Garde, στη Νορβηγία: Malto, στη Φινλανδία: Sahti, στη Σουηδία: Gotlandsdricka, στη Δανία: Landol, στην Εστονία: Koduolu, στη Λετονία: Miezitis, στη Λιθουανία: Kaimiskas, στη Ρωσία: Derevenskoye pivo (Garshol, 2020).

8.1.8.1 Φλαμανδία

Το βασίλειο της Φλαμανδίας, που διαιρέθηκε επίσημα το 1831, αποτελούσε τις σημερινές περιοχές της Γαλλίας, του Βελγίου και της Ολλανδίας. Στις πλούσιες πεδιάδες της Φλαμανδίας, οι ανεξάρτητες τότε φάρμες έκαναν σπορά και συγκομιδή τα δικά τους σιτηρά. Σε άρθρο του 1890 που αναφερόταν σε βέλγικες μύρες τύπου Ales της περιοχής της Φλαμανδίας, τις παρουσιάζει με χαμηλό βαθμό αλκοόλης (6-10 °Plato, SG: 1.024-1.040), με χρήση κυρίως βυνοποιημένου ή αβυνοποίητου κριθαριού, όπως και άλλων δημητριακών όπως σιτάρι, βρώμη και καλαμπόκι. Επίσης, αναφορά γίνεται στη χρήση σύνθετου μείγματος ζυμών και υψηλών θερμοκρασιών ζύμωσης. Το 1905 γίνεται αναφορά από τον βρετανό ζυθοποιό

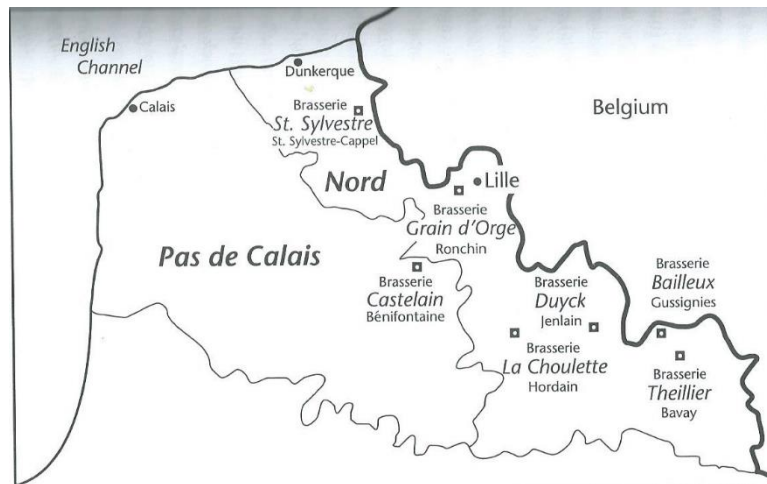
R.E. Evans για τα 1800 ‘ζυθοποιεία’ στη Γαλλία να βρίσκονται στις περιοχές Nord και Pas-de Calais, μέρος του παλιού βασιλείου της Φλαμανδίας. Τα μικρά αυτά ‘ζυθοποιεία’ παρήγαγαν απλές Ales με διακύμανση 9-13,5 °Plato (SG: 1.036-1.054) γνωστές ως biere de pays ή public house ή cabaret beers. Τα σιτηρά που χρησιμοποιούσαν ήταν βύνες κριθαριού με τα πρόσθετα (adjuncts) να φτάνουν το 10-15% στο συνολικό εκχύλισμα κατά την πολτοποίηση. Η ζύμωση γινόταν στους 18-22 °C με τη συμμετοχή αφροζυμών. Σήμερα οι φάρμες-οικίες, όσες από αυτές επιζήσαν, έχουν εξελιχθεί σε ζυθοποιεία που δεν έχουν καμία σχέση με την τότε εποχή. Στη βόρεια Γαλλική μεριά είναι γνωστές πλέον ως Biere de Garde και στη Βέλγικη μεριά ως Saison (Markowski, 2004).



Εικόνα 12. Χάρτης περιοχών Φλαμανδίας (Markowski, 2004)

8.1.8.1.1 *Biere de Garde*

Σε άρθρο του 1905 γραμμένο από το βρετανό R.E. Evans αναφέρεται στον τρόπο παραγωγής των Biere de Garde στην περιοχή της βόρειας Γαλλίας. Η συγκεκριμένη μύρα έμενε στη δεξαμενή (μεγάλα ξύλινα βαρέλια) για 6 μήνες ή περισσότερο και μερικές φορές αναμιγνυόταν με φρέσκια μύρα. Σκοπός ήταν η παραγωγή ξινή μύρα, όπου αυτό ήταν αποτέλεσμα μιας δεύτερης ζύμωσης όπου ακολουθούσε κατά τη παραμονή της στα ξύλινα βαρέλια προσδίδοντας όξινο χαρακτήρα (Markowski, 2004). Γίνεται υπόθεση ότι ο όξινος χαρακτήρας προέκυπτε από τη ζύμωση γαλακτικών βακτηρίων και από την παρουσία Βρετανομυκήτων.



Εικόνα 13. Χάρτης περιοχών Biere de Carde (Markowski, 2004)

Οι μύρες αυτές είχαν χαμηλούς βαθμούς σε αλκοόλη (3-4 vol.%), ενώ οι υψηλόβαθμες προέκυπταν όταν θέλαν να αποθηκεύσουν τις μύρες λόγω καλοκαιριού και υψηλών θερμοκρασιών (Markowski, 2004). Αυτό υποθετικά είχε ως συνέπεια λόγω συνθηκών να επικρατήσουν στο βαρέλι ή στο μπουκάλι οι Βρετανομύκητες. Με τη έλευση των σύγχρονων ψυχτικών συστημάτων, η διαδικασία παραγωγής άλλαξε μετατρέποντας τις δυνατές γεμάτο σώμα Ales σε ελαφριές Lager μύρες. Στις αρχές της δεκαετίας του 1950, ο Jenlain εμφιάλωσε την Biere de Garde σε μπουκάλι σαμπάνιας με φελλό, συγκεκριμένα, το ζυθοποιείο Brasserie Duyck, δημιουργώντας ένα καινούργιο στυλ στο συγκεκριμένο είδος (Markowski, 2004).

Στη σύγχρονη εκδοχή των γαλλικών biere de garde επικρατεί κυρίως η επιλογή στελεχών που θα παράγουν μια καθαρή χωρίς διακετύλιο, lager ζύμωση. Ζύμες που προτιμούνται είναι τύπου ale *S. cerevisiae* σε χαμηλές θερμοκρασίες 18-20 °C, αλλά και ζύμες τύπου lager, *S. uvarium*. Εξαιρέσεις αποτελούν κάποια ζυθοποιία όχι μόνο στη Γαλλία, αλλά και εκτός συνόρων όπως Η.Π.Α., που παράγουν τις Biere de Garde βάσει των παλιών τεχνικών, αλλά με σύγχρονα μέσα. Το ζυθοποιείο La Choulette Ambree, το οποίο ακολουθάει ακόμα την παλιά σχολή των Farmhouse Ales, αναπτύσσει στο μπουκάλι ξινά χαρακτηριστικά στην μύρα (Markowski, 2004).

Χρήση του Βρετανομύκητα γίνεται στο συγκεκριμένο είδος εμβολιάζοντας κατά την παραμονή στα ξύλινα βαρέλια ή στη φιάλη για μια δεύτερη ζύμωση. Στον οδηγό για τα στυλ μύρας από τους Brewers Association των Η.Π.Α. αναφέρεται ότι η Biere de Garde μπορεί να περιέχει ζύμες Βρετανομύκητα παράγοντας οργανοληπτικά χαρακτηριστικά ελαφρώς ξινά όπως επίσης φρούτων, αλόγου, κατσίκας και δέρματος. Η αιθανόλη πρέπει να είναι εμφανής και οι εστέρες φρούτων να έχουν ελαφριά μέχρι μέτρια ένταση. Επιθυμητά, αλλά σε ανεκτικά όρια, είναι τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του γήινου, υπόγειου κελαριού, φελλού ή μούχλας (Parazian et al., 2021).

Στο στυλ των Biere de Garde παρατηρούνται τρεις παραλλαγές, οι ξανθιές, οι καφέ και οι κεχριμπαρένιες. Οι πιο σκουρόχρωμες έχουν βυνώδη χαρακτήρα, ενώ οι πιο ξανθιές αυτή του λυκίσκου χωρίς να χάνονται αυτά των βυνών. Στον πίνακα 24 δίδονται τα εύρη των ποσοτικών χαρακτηριστικών των Biere de Garde από το BJCP του 2015 (Parazian et al., 2021).

Πίνακας 24. Ποσοτικά χαρακτηριστικά Biere de Garde (Parazian et al., 2021)

Ποσοτικά χαρακτηριστικά Biere de Garde	
OG	1.060-1.080
FG	1,012-1.024
ABV%	4,4-8.0
IBU's	20-30
SRM/EBC	7-16/14-32

8.1.8.1.2 Saisons

Οι μύρες Saison προέρχονται από τη Βαλλωνία (Wallonia) του νότιου Βελγίου, ειδικότερα στην επαρχία Χαϊνόντ (Hainaut). Επίσης, πολλές Flemish μύρες μπορεί να συγκαταλέγονται στις Saison. Οι Saison παράγονταν στις αρχές του χειμώνα ώστε να ξεδιψάνε οι εργάτες το καλοκαίρι που δούλευαν στα χωράφια. Η μύρα ξεδιψάγε λόγω της χαμηλής σε συγκέντρωση αλκοόλης και των αναζωογονητικών λυκίσκων, αλλά και διάφορων μπαχαρικών. Σχετικά παρουσιάζονταν ως ανοικτόχρωμες μύρες με ελαφρύ αλκοόλ και γεύση, με συχνά ξινά ή πικρά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Βάσει του R. Pinon, σε συγκεκριμένες περιοχές της Wallonia, η Saison παραγόταν τον Δεκέμβριο και τον Μάρτιο, ενώ σ' άλλες περιοχές τον Νοέμβριο (Markowski, 2004).



Εικόνα 14. Χάρτης παραγωγών Saison στη Wallonia (Markowski, 2004)

Τα Farmhouse ζυθοποιεία συνήθως καλλιεργούσαν και βυνοποιούσαν μόνοι τους τα δικά τους δημητριακά. Χρησιμοποιούσαν συνήθως εξάστιχο χειμερινό κριθάρι, αλλά και βρώμη, φαγόπυρο, αγριοσίταρο και σιτάρι. Η πυκνότητα των Saisons, περίπου το 1900, κυμαινόταν σε OG: 1,040-1,050 (10.3-12.7 °Plato), στη συνέχεια ανέβηκε σε πυκνότητες 1,057 (14 °Plato) (Markowski, 2004).

Η χρήση λυκίσκου συνήθως γινόταν άφθονα με μέσο όρο 500-800 gr/hL με το 1/3 να προστίθεται στο τέλος του βρασμού. Τα Farmhouse ζυθοποιεία είχαν στις αποθήκες τους παλιούς λυκίσκους όπου και τους προτιμούσαν φέρνοντας έτσι πιο κοντά τις Saison στις Lambic, ως προς τον τρόπο παραγωγής. Επίσης εφαρμοζόταν η πρακτική του dry hopping στις παλιές μπύρες στα βαρέλια προτού σταλούν για κατανάλωση προσδίδοντας φρεσκάδα. Η πρακτική διαμόρφωνε ένα διαφορετικό χαρακτήρα κατά τη διάρκεια μιας 2^{ης} ζύμωσης στο μπουκάλι λόγω ότι στο λυκίσκο υπήρχαν άγριες ζύμες και βακτήρια. Η δοσολογία κυμαινόταν από 100-400 gr/hL μπύρας (Markowski, 2004).

Η προσθήκη μεγάλων ποσοτήτων μπαχαρικών συνήθως γινόταν όταν η μπύρα ήταν μέτρια ποιοτικά. Τη δεκαετία του 1960, η χρήση μπαχαρικών άρχισε να φθίνει και η χρήση τους γινόταν μόνο για βελτίωση της γεύσης χωρίς να γίνονται αυτά αντιληπτά (Markowski, 2004).

Η πολτοποίηση στους 40 °C είχε ως αποτέλεσμα την εκχύλιση περισσότερων δεξτρινών, αυτό είχε ως αποτέλεσμα την ενίσχυση των άγριων ζυμών κατά τη 2^η ζύμωση, δίδοντας ξινά χαρακτηριστικά στη μπύρα. Όσοι όμως δεν επιθυμούσαν ξινά χαρακτηριστικά δεν πολτοποιούσαν σ' αυτές τις θερμοκρασίες, αλλά σκοπός τους ήταν να πάρουν όσα περισσότερα ζυμώσιμα σάκχαρα και να προσθέσουν αρκετή ποσότητα λυκίσκου. Ο βρασμός διαρκούσε 5-8 ώρες, φτάνοντας μερικές φορές τις 15 ώρες και ο λόγος είναι ότι οι ζυθοποιοί νόμιζαν ότι όσο περισσότερο γινόταν ο βρασμός τόσο αυξανόταν η διατηρησιμότητα της μπύρας με αποτέλεσμα την παραγωγή σκουρόχρωμων Saison. Οι μπύρες Saisons δεν πενούσαν από φιλτράρισμα ούτε παστεριώνονταν (Markowski, 2004).

Η ζύμωση των Saisons γινόταν αυθόρμητα με τη συμμετοχή αφοζυμών (Ale), άγριων ζυμών (Βρετανομύκητες) και βακτηρίων (γαλακτικών, οξικών). Αυτό γινόταν λόγω των συνθηκών παραγωγής όπου το ζυθογλεύκος για να κρυώσει μετά το βρασμό μεταγγιζόταν σ' ένα ρηχό, ανοιχτό παραλληλόγραμμο δοχείο γνωστό ως coolship. Ακολουθούσε ζύμωση και ωρίμανση σε ξύλινα βαρέλια χωρίς την προσθήκη καμίας καλλιέργειας μικροοργανισμών. Η χρήση καλλιεργειών από μικροοργανισμούς θα γίνει περίπου στα μέσα του 20ου αιώνα, όπου και γινόταν χρήση μικτών εμβολίων με διαφορετικά είδη από ζύμες και βακτήρια (Markowski, 2004).



Εικόνα 15. Το coolship στο ζυθοποιείο Lindemans στο Vlezenbeek (Sparrow,2005)

Το ζυθοποιείο Dupont αναφέρει τότε για μία ή περισσότερες άγριες ζύμες με υψηλή ζυμωτική ικανότητα. Οι συγκεκριμένες ‘δεύτερες’ ζύμες είχαν την ικανότητα να υδρολύουν συγκεκριμένα τις δεξτρίνες. Αναφέρεται ότι στην αρχή της ζύμωσης, οι κύριες ζύμες προσφέρουν τα δικά τους χαρακτηριστικά, ενώ οι δεύτερες ζύμες δεν ξεχωρίζουν ακόμα και δεν έχουν καμία ανάπτυξη στη φάση αυτή. Ο Van Laer το 1920 αναφέρει για τις δεύτερες αυτές ζύμες (Βρετανομύκητες) ότι παράγουν υψηλά ποσά από οργανικά οξέα όπου με αργές ταχύτητες μετατρέπουν την αλκοόλη σε εστέρες και έχουν οργανοληπτικό χαρακτήρα παλαιάς μύρας. Η πρώτη ζύμωση γινόταν συνήθως σε θερμοκρασίες 18-25 °C, ενώ η δεύτερη μετά από μετάγγιση σε νέα δοχεία σε χώρους όπως σε κρύα κελλάρια, γινόταν αργή ζύμωση στους 10-15 °C. Η ενανθράκωση της Saison εφαρμοζόταν στο τέλος με προσθήκη ζαχαροκάλαμου ή καραμέλας ή με προσθήκη σε ζύμωση μύρας στο αρχικό στάδιο. Ο χρόνος παλαίωσης συνήθως έφτανε τον ένα χρόνο, αλλά υπήρχαν περιπτώσεις να φτάσει στα δύο χρόνια. Σε μια φρέσκια Saison, για να δοθεί ο ξινός χαρακτήρας, εφάρμοζαν αναμειξείς με μύρες Lambic. Μερικές φορές, η ανάμειξη γινόταν με ξύδι, οξικό ή ταρταρικό οξύ (Markowski, 2004).

Στο ζυθοποιείο De Ranke, στο Wevelgem, παράγεται ακόμα η μύρα XX Bitter. Συγκεκριμένα, για την παραγωγή της χρησιμοποιείται αρκετή ποσότητα λυκίσκου και τα στελέχη ζυμών που χρησιμοποιούνται προέρχονται από το Rodenbach Brewery από τη Roeselare. Στην καλλιέργεια αυτή υπήρχαν διάφορα είδη ζυμών, καθώς και Βρετανομύκητες όπως και επίσης γαλακτικά βακτήρια. Λόγω της μεγάλης διάρκειας ωρίμανσης της η πικράδα της μειωνόταν με αποτέλεσμα να υπάρχει μια ισορροπία μεταξύ πικράδας και όξινων χαρακτηριστικών (Markowski, 2004).

Στη σύγχρονη περίοδο της ζυθοποιίας μια αυθεντική Saison πρέπει να έχει ρουστίκ και ελαφρός ‘άγριο’ χαρακτήρα, απροσδιόριστα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά ξεφεύγοντας από τις σύγχρονες καθαρές βιομηχανικές μύρες (Markowski, 2004). Η παρουσία του Βρετανομύκητα στις Saison δεν είναι αναγκαία, αλλά όταν προστίθεται πρέπει να είναι διακριτική τόσο στη μύτη, αλλά και τόσο στο στόμα. Ο Βρετανομυκητας δίδει χαρακτήρα ελαφρώς ξινό, φρουτώδες, αλόγου, κατσίκας ή δέρματος (Parazian et al., 2021).

Η επικρατέστερη βύνη που χρησιμοποιείται συνήθως είναι η Pilsner, με τις βύνες Vienna και Munich να δίνουν χρώμα και πολυπλοκότητα. Μερικές φορές χρησιμοποιούνται δημητριακά όπως σιτάρι και όλυρα (αγριοσίταρο). Για την αύξηση της πολυπλοκότητας και του λεπτού σώματος μερικές φορές συμμετέχει η ζάχαρη και το μέλι. Η πικράδα των Saisons συνήθως διαμορφώνεται από τους λυκίσκους Styrian και East Kent Goldings και μερικές φορές εφαρμόζεται σ αυτές και dry-hopping (Barnes, 2011). Άλλες ποικιλίες που συνηθίζεται η χρήση τους, αλλά σε πιο μικρή κλίμακα, είναι οι Brewers Gold και Hallertauer. Το dry-hopping είναι περισσότερο πρακτική που εφαρμόζεται εκτός Βελγίου και αναφέρεται συνήθως προσθήκη λυκίσκου 37 g – 80 g / hL μύρας (Markowski, 2004).

Ένα τυπικό πρόγραμμα πολτοποίησης που εφαρμόζεται, παρουσιάζεται στον πίνακα 25 από παραδοσιακούς ζυθοποιούς Saison.

Πίνακας 25. Παραδοσιακό πρόγραμμα πολτοποίησης Saison (Markowski, 2004)

Θερμοκρασία °C	Χρόνος (minutes)
45	30
55	15
62	30
68	15
74	Τέλος πολτοποίησης

Το ζυθοποιείο Brasserie Dupont εφαρμόζει ένα διαφορετικό πρόγραμμα. Η πολτοποίηση ξεκινάει στους 45 °C και για κάθε λεπτό της ώρας αυξάνεται η θερμοκρασία κατά 0,25 °C, έως ότου φτάσει τους 72 °C. Σκοπός τους είναι να πάρουν όσο πιο δυνατό περισσότερα ζυμώσιμα σάκχαρα (Markowski, 2004).

Οι Saisons γενικά χαρακτηρίζονται για την φρεσκάδα τους, το υψηλό ζυμωτικό προφίλ τους, την μέτρια πικράδα και το ξηρό τους χαρακτήρα. Περιέχουν υψηλή συγκέντρωση σε CO₂ και οργανοληπτική πολυπλοκότητα όταν γίνεται προθήκη μπαχαρικών. Στον πίνακα 26 παρουσιάζονται παραδείγματα προσθήκης ποσοτήτων μπαχαρικών.

Πίνακας 26. Παραδείγματα προσθήκης ποσοτήτων μπαχαρικών στις Saisons (Markowski, 2004)

Μπαχαρικά	Ποσότητες gr/hL
Κολιάνδρος	37-63
Κύμινο	2-6,3
Πορτοκάλι Curacao/bitter orange	37-74
Τζίντζερ	2-6,3
Πιπέρι Μελεγκέτα (Grains of paradise)	2-4
Αστεροειδής γλυκάνισος	2-4
Πορτοκάλια γλυκά	20-40

Στον πίνακα 27 δίδονται τα εύρη των ποσοτικών χαρακτηριστικών των Saisons από το BJCP του 2015 (Strong και England, 2015).

Πίνακας 27. Ποσοτικά χαρακτηριστικά Saison (Strong και England, 2015)

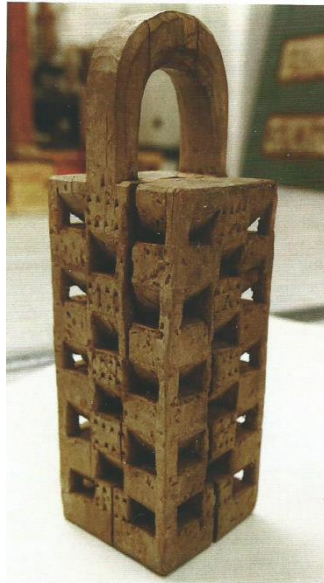
Ποσοτικά χαρακτηριστικά Saison	
OG	1.048-1.065 (standard)
FG	1002-1.008 (standard)
ABV%	3,5-5,0 (table) 5,0-7,0 (standard) 7,0-9,5 (super)
IBU's	20-35
SRM/EBC	5-14/10-28(pale) 15-22/30-44 (dark)

8.1.8.1.3 Farmhouse B. Ευρώπης

Η παραγωγή μπυρών στη Β. Ευρώπη όπως χώρες της Σκανδιναβίας, αλλά και χώρες όπως Ρωσία, Λιθουανία, Λετονία, Λευκορωσία και Εσθονία χρονολογούνται πολλά χρόνια πίσω. Ευρήματα στη Δανία που βρέθηκαν από ίχνη ποτών χρονολογούνται περίπου στο 1500 π.Χ. Οι μύρες παράγονταν στις φάρμες για δική τους χρήση, αλλά και ως μέρος πληρωμής των εργατών που δούλευαν στα κτήματα. Ο τρόπος παραγωγής ήταν ιδιαίτερος σε κάθε περιοχή και μέχρι σήμερα κάποιοι συνεχίζουν να παράγουν με τον ίδιο τρόπο και μέσα (Garshol, 2020).

Οι ζυθοποιοί διαχειρίζονταν μόνοι τους τους μικροοργανισμούς όπου ζύμωναν τις δικές τους μύρες. Μέχρι τώρα από κάποιους παραγωγούς γίνεται η συλλογή των μικροοργανισμών και φυλάσσονται μέχρι την επόμενη ζυθοποίηση. Χαρακτηριστικό των ζυμώσεων αυτών είναι η μεγάλη ταχύτητα (48 ώρες) και οι υψηλές θερμοκρασίες ζύμωσης με μέσο όρο 36 °C με μέγιστες 41-43 °C. Σε δείγματα που πάρθηκαν από διάφορα σημεία στη Β. Ευρώπη, στις γνωστές Νορβηγικές Kveik δεν βρέθηκαν Βρετανομόκητες παρά μόνο *S. cerevisiae* και σε κάποια δείγματα κάποια βακτήρια όπως και σ' ένα δείγμα μικρή συγκέντρωση *Pichia*.

Αντίθετα, σε δείγματα που πάρθηκαν από Ρωσία, Λετονία και Λιθουανία βρέθηκαν Βρετανομύκητες. Υπήρχε δείγμα με 100% Βρετανομύκητες, αλλά και με ανάμειξη με *S. cerevisiae*. Παράδειγμα τέτοιου ανάμεικτου δείγματος ήταν με *S. uvarum*, *B. custersianus* και *B. anomalus* (Garshol, 2020).



Εικόνα 16. Ξύλινο σκεύος αποξήρανσης ζυμών στο μουσείο Upper Telemark (Garshol, 2020).

Πολλοί άνθρωποι δυσκολεύονται να πιστέψουν ότι στις Νορβηγικές farmhouse δεν συμμετέχουν οι Βρετανομύκητες λόγω του ‘Funky’ χαρακτήρα τους και τη χρήση ξύλινων δοχείων για την παραγωγή τους. Αυτό ίσως οφείλεται στη χρήση ατμού και ζεστού νερού όπου και μπορεί να σκοτώσει τους Βρετανομύκητες, αλλά και στη χρήση του άρκευθου που έχει αντιμικροβιακές ιδιότητες. Ο Βρετανομύκητας, επειδή αναπτύσσεται συνήθως σε αργούς ρυθμούς, ενώ η ζύμωση ολοκληρώνεται γρήγορα και με την παραγόμενη φρέσκια μύρα να καταναλώνεται γρήγορα, εικάζεται ότι βγήκε εκτός ανταγωνισμού σταδιακά. Επίσης, ο Βρετανομύκητας ίσως δεν κατάφερε να επιζήσει λόγω ότι οι ζυθοποιοί προχωρούσαν στη διαδικασία της ξήρανσης των μικροοργανισμών (Garshol, 2020).



Εικόνα 17. Ξύλινος δακτύλιος με αποξηραμένες ζύμες (Garshol, 2020).

8.1.9 Adambier

Το στυλ της Adambier προέρχεται από την περιοχή του Ντόρτμουντ της Γερμανίας και πρόκειται για δυνατές, σκουρόχρωμες Ale μύρες με πολύ λυκίσκο. Ανάλογα με τον τρόπο παραγωγής υπάρχει και ξινή έκδοση. Αυτή οφείλεται στην περίπτωση παρατεταμένης παλαίωσης στα ξύλινα βαρέλια, λόγω παρουσίας Βρετανομυκήτων και γαλακτικών βακτηρίων, όπου στη μύρα επικαλύπτεται ο βυνώδης χαρακτήρας και η μεγάλη ποσότητα λυκίσκου που περιέχει (Paparazian et al., 2021). Στον πίνακα 28 δίδονται τα ποσοτικά χαρακτηριστικά των Adambier.

Πίνακας 28. Ποσοτικά χαρακτηριστικά Adambier (Paparazian et al., 2021).

Ποσοτικά χαρακτηριστικά Adambier	
OG	1.070-1.090
FG	1.010-1.020
ABV%	9.0-11.0
IBU's	30-50
SRM/EBC	15-35/30-70

8.1.10 100% Βρετανομύκητα

Οι μύρες αυτές προέρχονται μετά από ζύμωση μόνο από στελέχη Βρετανομυκήτων. Ο ξινός χαρακτήρας προέρχεται από τον ίδιο τον μύκητα και όχι από κάποιο βακτήριο. Σ' αυτό το στυλ μύρας μπορεί να γίνει χρήση οποιοδήποτε είδος και ποσοτήτων δημητριακών και λυκίσκων. Γι' αυτό το χρώμα μπορεί να είναι οποιοδήποτε, όπως και η ένταση της πικράδας. Στις μύρες αυτές γίνεται προσθήκη καθαρών καλλιεργήσιμων ζυμών Βρετανομύκητα, παράγοντας διακριτικά ή έντονα χαρακτηριστικά αρώματα και γεύσεις, όπως αλόγου, κατσίκας, γήινα, φαινολικά, φρούτων ή οξέων. Η παραγόμενη οξύτητα είναι σε χαμηλά μέχρι μέτρια επίπεδα

και η παραγωγή εστέρων φρούτων είναι συνήθως σε μέτρια προς υψηλή συγκέντρωση. Γίνεται χρήση βαρελιών τόσο για τη ζύμωση όσο και για την παλαίωση της μπύρας, όμως τα χαρακτηριστικά αρώματα και γεύσεις του ξύλινου βαρελιού δεν πρέπει να παρουσιάζονται στο τελικό προφίλ της μπύρας. Επίσης, συνήθως τα βαρέλια που χρησιμοποιούνται δεν προέρχονται από παλαίωση άλλων ποτών όπως ούισκι και sherry, λόγω ότι επηρεάζουνε στο οργανοληπτικό προφίλ της μπύρας (Parazian et al., 2021). Όμως η χρήση ανοξειδωτων δεξαμενών έχει το πλεονέκτημα σε μια πιο γρήγορη ζύμωση από τους Βρετανομύκητες όταν είναι μόνοι τους (Spragow, 2005). Οι μπύρες με 100% Βρετανομύκητα, η μεγάλη σε διάρκεια παλαίωση συνήθως δεν βελτιώνει δραματικά τα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά (Tonsmeire, 2014). Ποσοτικές κατευθύνσεις δεν δίδονται από BJCP 2021, λόγω ότι είναι ένα καινούργιο, ελεύθερο στυλ με πολλές παραλλαγές.

8.1.11 Ανάμικτες καλλιέργειες - Βρετανομύκητα

Στο στυλ αυτό μπύρας συμμετέχουν ζύμες και βακτήρια όπου βρίσκονται σε φυσικές καλλιέργειες. Πρόκειται για μπύρες παραγωγής ελεύθερης επιλογής υλικών τόσο σε δημητριακά όσο και σε λυκίσκους. Ξεχωρίζει η μέτρια προς υψηλή παραγωγή εστέρων φρούτων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Το τελικό ξινό αποτέλεσμα προέρχεται από τη ζύμωση τόσο του Βρετανομύκητα όσο και των βακτηρίων, δίδοντας ένα πιο περίπλοκο γευστικό προφίλ. Τα κύρια οργανοληπτικά χαρακτηριστικά που εκφράζονται από το Βρετανομύκητα είναι όπως το άλογο, κατσικά, δέρμα, φαινολικά, φρούτα και οξικά. Τα βακτήρια προσδίδουν οξύτητα που μπορεί να ξεχωρίσει ως δικό τους χαρακτηριστικό στη τελική μπύρα. Στο στυλ αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθούν και φρούτα όπως και χρήση ξύλινων βαρελιών τόσο για τη ζύμωση όσο και για την παλαίωση χωρίς όμως την παρουσία στο γευστικό και αρωματικό προφίλ χαρακτηριστικά του ξύλου (Parazian et al., 2021). Ποσοτικές κατευθύνσεις δεν δίδονται από το BJCP 2021, λόγω ότι είναι ένα καινούργιο, ελεύθερο στυλ με πολλές παραλλαγές.

Το ζυθοποιείο Jolly Pumpkin στο Μίσιγκαν των Η.Π.Α. χρησιμοποιεί δικές του ανάμικτες ζύμες και γαλακτικά βακτήρια για τη δημιουργία της μπύρας Calabaza Blanca. Επηρεασμένη από τις παραδοσιακές λευκές Βέλγικες της περιοχής Leuven δημιούργησε μια ξινή μπύρα που προερχόταν από τα γαλακτικά βακτήρια, αλλά και ξηρής λόγω της συμμετοχής των Βρετανομυκήτων που κατανάλωσαν σχεδόν όλα τα σάκχαρα. Η πρώτη ζύμωση ξεκινάει στους 18 °C και ανεβαίνει στους 26-28 °C όπου ολοκληρώνεται γρήγορα. Ακολουθεί η δεύτερη ζύμωση για δύο εβδομάδες σε δρύινες δεξαμενές και η ωρίμανση και ενανθράκωση ολοκληρώνεται στο μπουκάλι (Hieronymus, 2010).



Εικόνα 18. Calabaza Blanca (Hieronymus, 2010)

8.1.12 Άγριες μύρες - *Wild beer*

Η κατηγορία αυτή χαρακτηρίζεται από τις αυθόρμητες ζυμώσεις που λαμβάνουν για την παραγωγή τους. Καμία καλλιέργεια ζυμών ή βακτηρίων δεν συμμετέχει στη διαδικασία αυτή. Ανάλογα με τους μικροοργανισμούς που θα συλλέξει από τον αέρα ή το γύρω περιβάλλον μπορεί να εξελιχθεί σε ξινή ή μη μύρα. Επίσης, οι μικροοργανισμοί μπορεί να προέρχονται σε περίπτωση προσθήκης φρούτων (Parazian et al., 2021). Οι μικροοργανισμοί που συνήθως συμμετέχουν στην παραγωγή μιας Wild beer είναι ο *Saccharomyces*, *Brettanomyces*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Acetobacter* και *Enterobacter* (Sparrow, 2005). Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά που παράγονται κατά τη ζύμωση ποικίλουν λόγω της ποικιλομορφίας από γνωστούς και άγνωστους μικροοργανισμούς. Συνήθως αυτές οι μύρες έχουν πλήρη ζυμωτική ικανότητα και έχουν χαμηλό βυνώδη χαρακτήρα. Η συμμετοχή των λυκίσκων στα αρώματα και στη γεύση μπορεί να είναι πολύ χαμηλή, αλλά και πολύ υψηλή, όμως η τελική πικράδα είναι πολύ χαμηλή (Parazian et al., 2021). Ο έντονος ξινός και στυφός χαρακτήρας προέρχεται από την παραγωγή οξέων, ενώ τα αρώματα και γεύσεις που έχουν σχέση με τα φρούτα προέρχονται από την παραγωγή εστέρων σε μια wild beer (Sparrow, 2005). Στον πίνακα 29 παρουσιάζονται παραγόμενα οξέα και εστέρες σε Wild beer και τον αντίστοιχο οργανοληπτικό χαρακτήρα τους.

Πίνακας 29. Χαρακτήρας οξέων και εστέρων στις Wild beer (Sparrow, 2005)

ΟΞΕΑ	Χαρακτήρας	Εστέρες	Χαρακτήρας
Οξικό οξύ	Ξινό, καυστικό	Οξικός Αιθυλεστέρας	Κοφτερός, μούχλα, Φρουτένιος, Ανανάς, Μήλο, Σταφίδες Φραγκοστάφυλο, Διαλυτικό μέσο, Βερνίκι νυχιών
Γαλακτικό οξύ	Ξινό, στυφό, κοφτερό	Γαλακτικός Αιθυλεστέρας	Μαλακός, ξινός, Φρουτένιος, Βούτυρο, Butterscotch
Καπροϊκό οξύ	Κατσικίσιο, Ιδρώτας, Λιπαρός	Καπροϊκό Αιθύλιο	Κηρώδες, Λιπαρό, Φρουτένιο, Ανανάς, Πράσινη μπανάνα
Καπρικό οξύ	Σαπωνοειδές	Αίθυλο καπρίτης	Κηρώδες, Ελαιώδες, Φρουτένιο, Μήλο, Σταφύλι, Brandy
Καπριλικό οξύ	Κατσικίσιο, Λιπαρό, Ζωϊκό	Αίθυλο καπριλικό	Κηρώδες, Οίνος, Ανθικό, Φρουτένιο, Αανάς, Βερούκοκο, Μπανάνα, Αχλάδι, Brandy
Βουτυρικό οξύ	Λάστιχο, Ταγγισμένο	Βουτυρικός Αιθυλεστέρας	Τυρί, Λιπαρότητα, Φρουτένιο, Χυμός Φρούτων, Ανανάς, Cognac
Ισοβουτυρικό οξύ	Ταγγισμένο, Ιδρώτας, Τυρί, Λιπαρό	Ισοβουτυρικός Αιθυλεστέρας	Εσπεριδοειδές, Φρουτένιο
Ισοβαλερικό οξύ	Ταγγισμένο, Τυρί, Αλογίσιο	Ισοβαλερικός Αιθυλεστέρας	Φρουτένιο, Γλυκό, Μήλο, Ανανάς, Tutti Frutti

Σ' έρευνα από τον Bokulich και τους συνεργάτες του το 2012 απέδειξαν ότι είναι οι ίδιες οικογένειες μικροοργανισμών που βρέθηκαν στις Η.Π.Α στο δοχείο coolship με αυτές που βρίσκονταν στο Maine στις Βέλγικες Lambic (Tonsmeire, 2014).

Ποσοτικές κατευθύνσεις δεν δίδονται από το BJCP 2021, λόγω ότι είναι ένα ελεύθερο στυλ με πολλές παραμέτρους.

8.1.13 India Pale Ale με Βρετανομύκητα

Πρόκειται για ένα περίπλοκο στυλ μπίρας όπου ο Βρετανομύκητας συμμετέχει δίνοντας ένα διαφορετικό στυλ στις γνωστές γεμάτο λυκίσκο India Pale Ale. Ο Βρετανομύκητας συλλέγει και καταναλώνει το οξυγόνο στη μπίρα και αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τα φρέσκα και έντονα

αρώματα του λυκίσκου να πάρουν χρονική παράταση χωρίς να οξειδώνονται γρήγορα (Tonsmeire, 2014).

Στον πίνακα 30 δίδονται τα ποσοτικά χαρακτηριστικά των πειραματικών Indian Pale Ale

Πίνακας 30. Ποσοτικά χαρακτηριστικά Indian Pale Ale (Parazian et al., 2021).

Ποσοτικά χαρακτηριστικά πειραματικών Indian Pale Ale	
OG	1.060-1.100
FG	0.994-1.020
ABV%	6.3-10.6
IBU's	30-100
SRM/EBC	3-40/6-80

8.2 Μύρες στο εμπόριο

Στο εμπόριο πλέον υπάρχουν εκατοντάδες ετικέτες από μύρες που συμμετέχει ο Βρετανομύκτης με άλλους μικροοργανισμούς ή μόνος του (100% Brett). Στο διαδίκτυο υπάρχουν ιστοσελίδες οδηγί, που παρουσιάζουν τα είδη κατηγορίας μπυρών, που το κοινό όπου τις καταναλώνει έχει την ευχέρια να τις βαθμολογήσει, αλλά και να τις σχολιάσει.

Στην ιστοσελίδα Beeradvocate (<https://www.beeradvocate.com/>) αναφέρεται η κατηγορία του Βρετανομύκτη ως 'Brett Beer' και περιγράφεται το στυλ τους ως μοναδικό, με το χρώμα τους να ποικίλει ανάλογα εάν έχουν προστεθεί φρούτα ή άλλα συστατικά. Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους είναι: αλογίσια, κατσικίσια, δερματώδης, φαινολικά και όξινα φρουτώδες. Ο Brett χαρακτήρας πρέπει να είναι σε ισορροπία μαζί με τα υπόλοιπα συστατικά της μύρας. Συγκεκριμένα αναφέρονται και βαθμολογούνται 420 μύρες Brett, με τις πρώτες πέντε να είναι:

I. Nightmare on Brett από το ζυθοποιείο Crooked Stave Artisan Beer Project από το Denver στο Colorado των Η.Π.Α. Η συγκεκριμένη μύρα ζυμώνει σε μεγάλες δρύινες δεξαμενές (foaders) από καλλιέργειες άγριων ζυμών και βακτηρίων όπου στη συνέχεια μεταφέρετε σε δρύινα βαρέλια που προέρχονται από whiskey ή bourbon για να παραμείνουν για κάποιους μήνες. Οι τελικοί βαθμοί αλκοόλης είναι 9,66% vol. (<http://www.crookedstave.com/>).



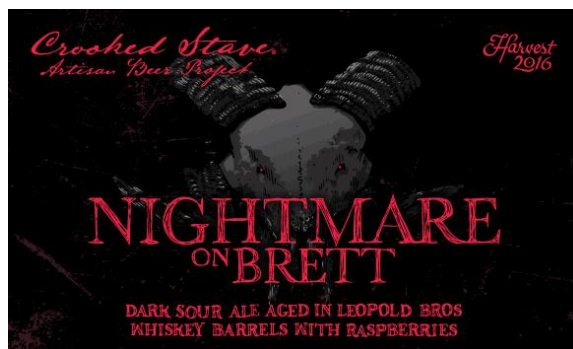
Εικόνα 19. Nighthmare on Brett. (<http://www.crookedstave.com/images/beers/crooked-stave-nightmare-on-brett.png>)

II. Sanctification του ζυθοποιείου Russian River Brewing Company από τη Santa Rosa στη California των Η.Π.Α. Αποτελεί μια 100% Brett ξενθιά μύρα, μέτριας πικράδας που στηρίζεται σε συνταγή Golden Ale και έχει OG: 1.038 και τελική αλκοόλη 4,8% vol (<https://www.russianriverbrewing.com/>).



Εικόνα 20. Sanctification (<https://www.russianriverbrewing.com/wp-content/uploads/2020/07/sanctification-bottle2.png>)

III. Nightmare On Brett Raspberry από το ζυθοποιείο Crooked Stave Artisan Beer Project από το Denver στο Colorado των Η.Π.Α. Πρόκειται για σκουρόχρωμη ξινή ale που παλαιώνει σε βαρέλια whiskey από το αποστακτήριο Leopold Brothers μαζί με σμέουρα. Η τελική αλκοόλη είναι 9,66% vol. (<http://www.crookedstave.com/>).



Εικόνα 21. Nightmare on Brett Raspberry

(https://untappd.akamaized.net/site/beer_logos_hd/beer-1359425_1a497_hd.jpeg)

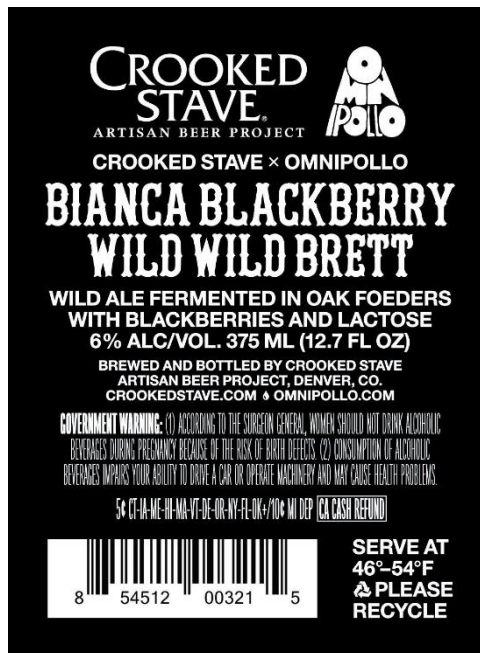
IV. Nightmare On Brett Sour Cherry από το ζυθοποιείο Crooked Stave Artisan Beer Project από το Denver στο Colorado των Η.Π.Α. Πρόκειται για σκουρόχρωμη ξινή ale που παλαιώνει σε βαρέλια whiskey από το αποστακτήριο Leopold Brothers μαζί με κεράσια από την ποικιλία Montmorency. Η τελική αλκοόλη είναι 9,66% vol. (<http://www.crookedstave.com/>).



Εικόνα 22. Ζυθοποιείο Crooked Stave Artisan Beer Project

(<https://d1ynl4hb5mx7r8.cloudfront.net/wp-content/uploads/2017/02/06082216/f5f09c42194e3f8dbeab.jpg>)

V. Bianca Raspberry Wild Wild Brett από το ζυθοποιείο Crooked Stave Artisan Beer Project από το Denver στο Colorado των Η.Π.Α. Εφαρμόζεται ζύμωση με άγριες ζύμες σε δρύινες δεξαμενές (foeders) και προστίθεται λακτόζη. Η τελική αλκοόλη είναι 6% (<http://www.crookedstave.com/>).



Εικόνα 23. Bianca Raspberry Wild Wild Brett (<https://4.bp.blogspot.com/-ff2CY8dtxRY/XIZf2u0m5EI/AAAAAAGIGo/fsIQOLy33MYLPCN1C4L1YAg6hIhFcowTQCLcBGAs/s1600/apost13.jpg>).

Στις παραδοσιακές τύπου Lambic αναφέρονται 120 ετικέτες με τις πρώτες τρεις σε προτίμηση του κοινού να είναι:

I. Zenne Y Frontera του Βέλγικου ζυθοποιείου Brouwerij 3 Fonteinen. Με τελική αλκοόλη 7,0% Vol. (<https://3fonteinen.be/en/>).



Εικόνα 24. Zenne Y Frontera
(https://www.google.com/imgres?imgurl=https%3A%2F%2Fstore.belgianshop.com%2F5251-large_default%2F3-fonteinen-zenne-y-frontera-solera-34l.jpg&imgrefurl=https%3A%2F%2Fstore.belgianshop.com%2Fgeuze-lambic-fruits%2F2151-3-fonteinen-zenne-y-frontera-solera-34l.html&tbnid=Q4rihXUzThmbJM&vet=12ahUKEwiu9cL6tLfxAhWRlqQKHdzbASEQM ygAegUIARClAQ..i&docid=XuVRHsapX0-XHM&w=600&h=600&q=Zenne%20Y%20Frontera&ved=2ahUKEwiu9cL6tLfxAhWRlqQKHdzbASEQM ygAegUIARClAQ)

II. Iris από το Βέλγικο ζυθοποιείο Brasserie Cantillon. Με τελική αλκοόλη 6,5% Vol. και τελική πικράδα 45 IBU (<https://www.cantillon.be/>).



Εικόνα 25. Iris (<http://cantillon.be/local/cache-vignettes/L800xH800/arton28-b1be5.jpg?1603550884>).

III. Cuvée Saint-Gilloise από το Βέλγικο ζυθοποιείο Brasserie Cantillon. Με τελική αλκοόλη 5,5% Vol. (<https://www.cantillon.be/>).



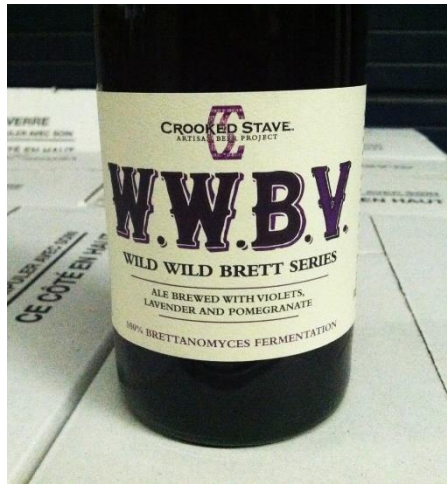
Εικόνα 26. Cuvée Saint-Gilloise (<http://cantillon.be/local/cache-vignettes/L800xH800/arton32-420d4.jpg?1603548336>)

Στην ιστοσελίδα Ratebeer (<https://www.ratebeer.com>) δεν υπάρχει ξεχωριστή κατηγορία για τους Βρετανομύκητες (Brett Beers), όμως αναφέρονται μέσα σ' άλλες κατηγορίες όπως Sour/Wild και Saison /Farmhouse/Grisette. Ακολουθούν κάποιες μπίρες που έχουν ξεχωρίσει σε βαθμολογίες από το κοινό:

Το ζυθοποιείο Crooked Stave στις Η.Π.Α ξεχωρίζει πάλι με δύο ετικέτες να παίρνουν πολύ υψηλές βαθμολογίες από το κοινό:

I. Nightmare on Brett. Raspberry και,

II. Wild Wild Bret Violet. Στην τελευταία έγινε χρήση μόνο Βρετανομούκητα κατά τη ζύμωση και προστέθηκαν κατά τη ζυθοποίηση ρόδι και λεβάντα και στη ζύμωση προστέθηκαν ολόκληρα passion fruit. Μετά το τέλος της ζύμωσης προστέθηκε πειραματική ποικιλία λυκίσκου (Ex.366) κάνοντας dry-hopping.



Εικόνα 27. Wild Wild Bret Violet

(https://res.cloudinary.com/ratebeer/image/upload/d_beer_img_default.png,f_auto/beer_211271)

III. Bommen & Granaten, Rioja barrel aged w/Brett από το Ολλανδικό ζυθοποιείο De Molen. Η συγκεκριμένη μπύρα ζυμώνει και ωριμάζει στα βαρέλια που προήρθαν από τους ερυθρούς οίνους Rioja Ισπανίας για 31 μήνες. Η τελική αλκοόλη είναι 11,9 % Vol. και η πικράδα 30 IBUs (<https://brouwerijdemolen.nl/>).



Εικόνα 28. Bommen & Granaten

(https://res.cloudinary.com/ratebeer/image/upload/d_beer_img_default.png,f_auto/beer_583342).

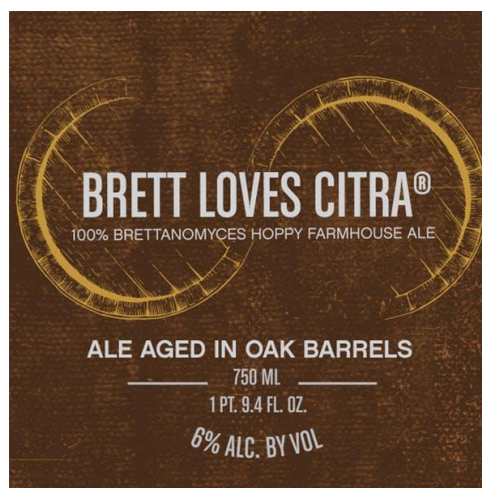
IV. Peche `n Brett του ζυθοποιείου Logsdon Farmhouse Ales στην πολιτεία Washington των Η.Π.Α. Παράγεται με επαναζύμωση Βρετανομύκητα σε μύρα και φρέσκο χυμό ροδάκινων μέσα σε δρύινα βαρέλια για κάποιους μήνες. Ακολουθεί ανάμειξη με φρέσκια μύρα και επαναμβολιασμό με Βρετανομύκητα στο μπουκάλι για απόκτηση CO₂. Η τελική αλκοόλη που παράγεται είναι 8,5 % Vol. και η πικράδα στα 15 IBUs (<https://www.farmhousebeer.com/>).



Εικόνα 29. Peche `n Brett

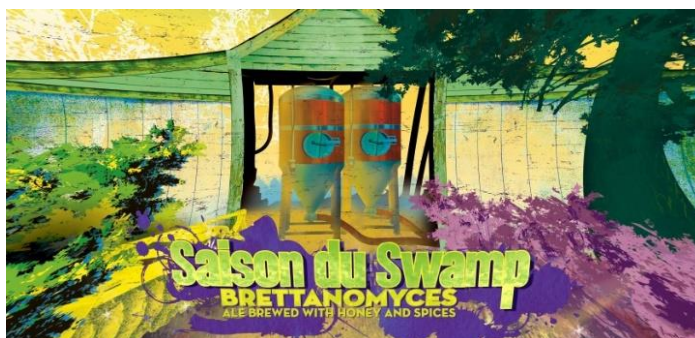
(https://res.cloudinary.com/ratebeer/image/upload/d_beer_img_default.png,f_auto/beer_173392)(https://static.wixstatic.com/media/312533_fab5f30d50714ce08fcf0aaadb88b96f~mv2.jpg/v1/fill/w_214,h_280,al_c,q_80,usm_0.66_1.00_0.01/Peche%20bottles.webp)

V. Brett Loves Citra από το ζυθοποιείο Casey Brewing and Blending στο Colorado των Η.Π.Α. Το ζυθοποιείο ζυμώνει μόνο με Βρετανομύκητες σε δρύινα βαρέλια για την παραγωγή της συγκεκριμένης ετικέτας. Γίνεται προσθήκη σε διάφορα στάδια λυκίσκου της ποικιλίας Citra. Η τελική αλκοόλη είναι 6% Vol. (<https://caseybrewing.com/>).



Εικόνα 30. Brett Loves Citra (https://craftpeak-cooler-images.imgix.net/casey-brewing-and-blending/BrettlovesCitra_print.jpg?auto=compress%2Cformat&fit=crop&h=600&ixlib=php-1.2.1&w=600&wpsize=tile_strict).

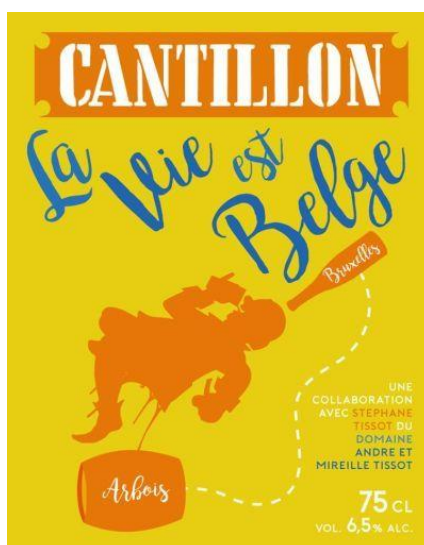
VI. Swamp Head Saison du Swamp with Brettanomyces από το ζυθοποιείο Swamp Head στη Φλόριδα των Η.Π.Α . Το ζυθοποιείο χρησιμοποιεί για τη ζύμωση τον *B. bruxellensis*, με τον τελικό βαθμό αλκοόλης να είναι 7% Vol. και η πικράδα στα 25 IBUs (<https://swamphead.com/>).



Εικόνα 31. Saison du Swaps with Brettanomyces (https://swamphead.com/wp-content/uploads/2013/11/saison_brett_feature-843x403.jpg).

Στην κατηγορία Gueuze στο Ratebeer αναφέρονται οι 50 ετικέτες που έχουν βαθμολογηθεί και σχολιασθεί από το κοινό. Οι τρεις με την υψηλότερη βαθμολογία είναι:

I. La Vie est Belge από το Βέλγικο ζυθοποιείο Cantillon. Η τελική αλκοόλη είναι 6,5% (<https://www.cantillon.be/>).



Εικόνα 32. La Vie est Belge

(https://res.cloudinary.com/ratebeer/image/upload/d_beer_img_default.png,f_auto/beer_414383)

II. Oude Geuze Honing από το Βέλγικο ζυθοποιείο 3 Fonteinen. Παραδοσιακή μύρα μετά από ανάμειξη 1, 2 και 3 χρονών Lambic. Η προσθήκη μελιού έγινε κατά τη διάρκεια της ψύξης της πιο παλιάς μύρας (3 έτη), στο coolship. Η τελική αλκοόλη είναι 7% vol. (<https://3fonteinen.be/en/>).



Εικόνα 33. Oude Geuze Honing

(http://www.lambic.info/images/thumb/f/f0/Label_3F_OGV_Honing.PNG/580px-Label_3F_OGV_Honing.PNG)

III. Oude Geuze Cuvee Armand & Gaston από το Βελγικό ζυθοποιείο 3 Fonteinen . Παραδοσιακή μύρα μετά από ανάμειξη 1, 2 και 3 χρονών Lambic. Η τελική αλκοόλη είναι 6,2% Vol. (<https://3fonteinen.be/en/>).



Εικόνα 34. Oude Geuze Cuvee Armand & Gaston

(https://res.cloudinary.com/ratebeer/image/upload/d_beer_img_default.png,f_auto/beer_423673)

Πρέπει να αναφερθεί ότι οι πιο πάνω μύρες δεν είναι σταθερές σε παραγωγή. Αυτό ισχύει για πολλές ετικέτες παραγωγής, όπου τα ζυθοποιεία επιλέγουν μια συνταγή παραγωγής μύρας και την εφαρμόζουν μια φορά μόνο. Επίσης παίζει ρόλο και στις πρώτες ύλες όπως τα φρέσκα φρούτα, που μπορεί να είναι εποχής μόνο.

8.3 Τεχνολογία ζυθοποίησης

8.3.1 Νερό

Οι παραδοσιακοί ζυθοποιοί προμηθεύονταν το νερό από το δικό τους πηγάδι με αποτέλεσμα να έχουν διαφορετικό προφίλ στην μύρα τους. Γενικά, το νερό στο Βέλγιο όπου παράγονταν μύρες από αυθόρμητη ζύμωση είχαν υψηλά επίπεδα παροδικής σκληρότητας (-HCO_3) (Sparrow, 2004). Στον πίνακα 31 παρουσιάζεται μια ανάλυση νερού 3 επαρχιών στο Βέλγιο.

Πίνακας 31. Ανάλυση νερού επαρχιών Βελγίου παραγωγής Wild Beer (1999)(Sparrow, 2004).

Επαρχία	Ca	Mg	Na	SO4	Cl	HCO ₃	Σκληρότητα
Brabant	111	12	14	74	40	315	328
East Flanders	134	22	52	76	47	306	424
West Flanders	114	10	125	145	139	370	328

Οι παραγωγοί Lambic και Flanders συνηθίζουν να αφαιρούν την παροδική σκληρότητα του νερού. Το ζυθοποιείο Rodenbach χρησιμοποιεί για να αφαιρέσει την παροδική σκληρότητα υδροξείδιο του ασβεστίου (Sparrow, 2005). Γενικά συνιστάτε τα μεταλλικά στοιχεία του νερού να μην είναι άνω των 150 ppm, όπως και η περιεκτικότητα σε Fe άνω των 0,05 ppm διότι παράγονται ανεπιθύμητα αρώματα. Ο Βρετανομύκτης όταν συμμετέχει στην παραγωγή σκουρόχρωμης μύρας και βρίσκεται σε νερό με υψηλές συγκεντρώσεις ανθρακικών με συνδυασμό μεγάλο ποσοστό καβουρδισμένων βυνών στο πολτό, μειώνεται η δριμύτητα της μύρας, Το νερό γενικά πρέπει να είναι ελεύθερο από χλωρίνη και χλωραμίνη. Με την παρουσία του Βρετανομύκτη λόγω ότι παράγει ποσότητες φαινολών, με τον συνδυασμό τους παράγονται χλωροφαινόλες. Οι χλωροφαινόλες έχουν γεύση φαρμακευτική όπου έχει αρνητικό αποτέλεσμα στην τελική μύρα (Tonsmeire, 2014).

8.3.2 Δημητριακά

Το κριθάρι ένα από τα απαραίτητα συστατικά για την παραγωγή μύρας περιέχει απαραίτητα θρεπτικά για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, αυτά τα συστατικά είναι οι αζωτούχες ενώσεις, λιπίδια, υδατάνθρακες και βιταμίνες. Οι αζωτούχες ενώσεις στην μύρα είναι σε εύρος 0,3-1,0 g/l και περιλαμβάνει αμινοξέα, αμίνες, πεπτίδια και ετεροκυκλικές ενώσεις (Smith, 2016). Ειδικά, η μη φιλτραρισμένες μύρες μπορεί να περιέχουν έως και 2000 mg/l ολικό άζωτο. Ένας μέσος όρος FAN που καταγράφηκε σε μύρα είναι 80 mg/l (Abernathy et al., 2009).

Οι υδατάνθρακες που θα παραχθούν κατά την πολτοποίηση των δημητριακών βυνών θα ζυμώσουν από τους *Saccharomyces* για να παραχθεί αιθανόλη. Στο τέλος της διαδικασίας μερικοί υδατάνθρακες θα εξακολουθούν να υπάρχουν με 1,0-6,0% κατά όγκο (Preedy, 2009; Smith και Divol, 2016). Αυτοί οι υδατάνθρακες που παραμένουν είναι αζύμωτες α-γλυκάνες (δεξτρίνες), διότι δεν αφομοιώνονται από το *S. cerevisiae*, αλλά μπορούν από την ζύμη του Βρετανομύκητα καταλαμβάνοντας την δραστηριότητα του ενζύμου β-γλυκανάσης. Επίσης ίχνη ποσοτήτων από σακχαρόζη, μαλτόζη και μαλτοτριόζη παρουσιάζονται μετά το τέλος της ζύμωσης (Smith και Divol, 2016).

Το κριθάρι και η βύνη είναι πλούσια πηγή βιταμινών και συμβάλουν στη διαδικασία της ζύμωσης. Συγκεκριμένα, οι βιταμίνες Β είναι ζωτικής σημασίας ως παράγοντας ανάπτυξης για τις ζύμες ειδικά η βιοτίνη, ινοσιτόλη και πεντοθενικό οξύ. Οι βιταμίνες εμφανίζονται σε ίχνη στη μύρα της τάξεως 0,0005-0,001% κ.ο και αποτελείται από αμινοβενζοϊκό οξύ, βιοτίνη, φολικό οξύ, νικοτινικό οξύ, πανταθενικό οξύ, ριβοφλαβίνη και θειαμίνη (Buglass, 2011; Smith και Divol, 2016).

Το σιτάρι περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις σε άμυλο και άζωτο σύγκριση με το κριθάρι. Σύμφωνα με ότι υποστηρίζει ο Βέλγος ζυθοποιός Frank Boon (Boon Brewery) το αβυνοποίητο σιτάρι έχει πολλές ειδικές ιδιότητες στην παραγωγή μια μύρας, μια από αυτές συνεισφέρουν στη μακρά παλαιώση της μύρας. Το άμυλο από το αβυνοποίητο σιτάρι δίνει πολύπλοκα συστατικά στην μύρα όπου αποδομούνται πολύ αργά από τις ζύμες κατά τη μεγάλη περίοδο της ζύμωσης. Τις ιδιότητες αυτές εκμεταλλεύεται ο Βρετανομύκητας με την παραγωγή μυρρών Lambic και Gueuze. (Sparrow, 2005).

Οι βύνες που συνήθως χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ξινών μυρών με τη παρουσία του Βρετανομύκητα είναι οι Pilsner και Pale Ale (δίστιχο ή εξάστιχο American pale) που αποτελούν οι βύνες βάσεις. Επίσης, για πιο σκουρόχρωμες γίνεται η χρήση βυνών Munich, ενώ για πιο καρβουδισμένα χαρακτηριστικά οι βύνες Vienna και English Pale. Η χρήση ειδικών βυνών (Special Malts) δίνουν στις ξινές μύρες βυνώδες χαρακτηριστικά και χρώμα. Ειδικά, η Crystal και Caramel όπου παρά τη χαμηλή σε περιεκτικότητα σακχάρων αφήνουν μια γλυκύτητα όπου ισορροπούν την αλκοόλη και την έντονη οξύτητα. Οι καρβουδισμένες ειδικές βύνες (Toasted specialty) όπως Amber, Biscuit, Brown, Special roast και Victory δεν χρησιμοποιούνται παρά ελάχιστο σε μικρές ποσότητες. Αυτό οφείλεται στο ότι ο Βρετανομύκητας παράγει παρόμοιες καρβουδισμένες γεύσεις σε μορφή τετραϋδροπυριδίων και αυτό μπορεί να οδηγήσει στην υπερβολική συγκέντρωσή τους. Με τη χρήση όξινης βύνης (acidulated malt) το pH μειώνεται ελαφρά ενισχύοντας τη ζύμωση του Βρετανομύκητα και αποτελεί ιδανικό υπόστρωμα για την παραγωγή φρουτώδων εστέρων και γαλακτικό

αιθυλεστέρα. Εκτός από βύνες κριθαριού χρησιμοποιείται αβυνοποίητο σιτάρι όπου με κατάλληλη πολτοποίηση εκχυλίζεται περισσότερο άμυλο και δεξτρίνες, υπόστρωμα κατάλληλο για τον Βρεταμόκητα. Η προσθήκη βρώμης προσφέρει θολερότητα στη μύρα αλλά σε περίπτωση μεγάλου διαστήματος ζύμωσης και ωρίμανσης η μύρα διαυγάζεται από τους μικροοργανισμούς. Η χρήση σίκαλης αυξάνει το ιξώδες της μύρας λόγω ότι περιέχει β-γλυκάνη, ενώ το ρύζι και το καλαμπόκι εξασθενεί το χαρακτήρα των βυνών και δίνουν τραγανό τελείωμα στη μύρα (Tonsmeire, 2014).

8.3.3 Πολτοποίηση

Παραδοσιακά, η μέθοδος πολτοποίησης που χρησιμοποιείται για την παραγωγή μυρών με συμμετοχή άγριων ζυμών όπως ο Βρετανομόκητας ονομάζεται ‘turbid mash’. Οι Lambic ζυθοποιοί παράγουν με turbid mash, ενώ οι ζυθοποιοί των Flanders Red – Brown και πιο σύγχρονοι χρησιμοποιούν την απλή μέθοδο του ‘infusion mash’ (Sparrow, 2015). Παράδειγμα προγράμματος turbid παρουσιάζεται στον πίνακα 32.

Πίνακας 32. Παραδοσιακό πρόγραμμα πολτοποίησης ‘Turbid’ (Sparrow, 2015)

Βήμα	Πρόγραμμα
1°	Προσθήκη στο μείγμα σιταριού και βύνης κριθαριού 20% H ₂ O ώστε η θερμοκρασία να φτάσει τους 45 °C. Παραμονή για 15 λεπτά.
2°	Προσθήκη 20% H ₂ O στους 100 °C ώστε η θερμοκρασία να φτάσει τους 52 °C. Παραμονή για 15 λεπτά.
3°	Αφαίρεση το 33% από το υγρό σε άλλο δοχείο και θέρμανση στους 88 °C.
4°	Προσθήκη 30% H ₂ O στους 100 °C ώστε η θερμοκρασία να φτάσει τους 65 °C. Παραμονή για 45 λεπτά.
5°	Αφαίρεση το 50% του υγρού σε άλλο δοχείο και θέρμανση στους 88 °C.
6°	Προσθήκη 30% H ₂ O στους 100 °C ώστε η θερμοκρασία να φράσει τους 72 °C. Παραμονή για 30 λεπτά.
7°	Επαναφορά των δύο αφαιρούμενων ποσοτήτων πίσω στο δοχείο πολτοποίησης και αύξηση θερμοκρασίας στους 78 °C. Παραμονή για 20 λεπτά.
8°	Εφαρμογή Vorlauf για διαύγαση του ζυθογλεύκος.
9°	Διαβροχή πολτού - Sparge - με νερό στους 88 °C μέχρι η πυκνότητα να πέσει στα 2 °P (1,008).

Το αποτέλεσμα της μεθόδου turbid mash είναι ένα θολό, αμυλούχο, γαλακτώδες ζυθογλεύκος. Η πολτοποίηση έχει ως αποτέλεσμα το σπάσιμο των μεγάλων πρωτεϊνικών αλυσίδων του σιταριού και της βύνης κριθαριού σε ελεύθερα αμινοξέα. Αυτό σε χαμηλή πρωτεΐνης ζυθογλεύκος, προμηθεύει λιγότερο θρεπτικά στις ζύμες που είναι στις πρώτες φάσεις της ζύμωσης. Αντίθετα, στους μικροοργανισμούς που έρχονται να αναπτυχθούν στις τελευταίες φάσεις, όπως ο Βρετανομόκητας, προμηθεύονται για τη θρέψη τους μεγάλες ποσότητες δεξτρινών και αμύλου ακόμα και μέσα στο μπουκάλι (Sparrow, 2005).

Η υψηλή θερμοκρασία διαβροχής (sparge) 88-90 °C σκοπό έχει να ξεπλυθούν από τα δημητριακά οι εναπομείναντες δεξτρίνες και το αμετάβλητο άμυλο. Η υψηλή αυτή θερμοκρασία έχει επίσης σαν αποτέλεσμα να εκπλυθούν αρκετές ταννίνες. Στην περίπτωση αυτή οι ταννίνες θα κατακρημνιστούν ή θα σπάσουν λόγω της μεγάλης διάρκειας ζύμωσης χωρίς να συνεισφέρουν κάποια αξιοσημείωτη στυπτικότητα στην τελική μύρα (Sparrow,2005).

Η πολτοποίηση με infusion αποτελεί πιο απλή μέθοδο και χρησιμοποιείται ευρέως για την παραγωγή των περισσότερων wild beer. Με την μέθοδο αυτή πολτοποίησης παράγονται υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων και πρωτεϊνών με σκοπό τη γρήγορη έναρξη της ζύμωσης. Κατά τη λανθάνουσα φάση της ζύμωσης λόγω ελάττωσης των θρεπτικών και υψηλής περιεκτικότητας σε αιθανόλη ξεκινάει η δράση των Βρετανομυκήτων (Sparrow, 2005). Στον πίνακα 33 παρουσιάζεται ένα τέτοιο είδος πρόγραμμα.

Πίνακας 33. Πολτοποίησης με Infusion (Sparrow, 2005).

Βήμα	Πρόγραμμα
1°	Θέρμανση στους 63 °C. Παραμονή 40 λεπτών.
2°	Αύξηση της θερμοκρασίας στους 72 °C . Παραμονή για 30 λεπτά.
3°	Αύξηση της θερμοκρασίας στους 76 °C. Παραμονή για 10 λεπτά (mash out)
4°	Δαβροχή πολτού - sparge - με νερό στους 80 °C.

Σε περίπτωση χρήσης αβυνοποίητου σιταριού ή καλαμποκιού θα πρέπει να ζελατινοποιηθούν πριν να χρησιμοποιηθούν με τη μέθοδο πολτοποίησης infusion (Sparrow, 2005).

Τα ζυμώσιμα σάκχαρα σ' ένα βυνογλεύκος αποτελούνται από 70% μαλτόζη, γλυκόζη, φρουκτόζη, σακχαρόζη και μαλτοτριόζη. Το υπόλοιπο αποτελείται κυρίως από μαλτοτριόζη (6%) και δεξτρίνες (22%). Οι δεξτρίνες δεν διασπώνται κατά την πολτοποίηση από την αμύλαση και γενικά αποτελεί θετικό παράγοντα στην αίσθηση στο στόμα στην τελική μύρα. Σε δοκιμασία μετά από έρευνα βρέθηκε ότι για να είναι ανιχνεύσιμες οι δεξτρίνες στο στόμα πρέπει η συγκέντρωσή τους να είναι περίπου 50 gr/L. Το ένζυμο που μπορεί να διασπάσει τις δεξτρίνες είναι η δεξτρινάση, όμως σε μελέτες έδειξε ότι σε θερμοκρασίες πολτοποίησης από 57 °C η δραστηριότητα της μειώνεται και στους 70 °C η δράση τους είναι μη ανιχνεύσιμη (Janish, 2019).

Μια τεχνική που συνίσταται για μύρες 100% Βρετανομύκητα είναι το ξίνισμα του ζυθογλεύκους κατά την πολτοποίηση πριν το βρασμό. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με τις μεθόδους sour mashing, sour worting, με χρήση όξινης βύνης και με χρήση οξέων. Η ξινή μύρα που παράγεται έχει πολύπλοκα χαρακτηριστικά χωρίς να υπάρχει μεγάλη αναμονή

όπως στις παραδοσιακές μικτές ζυμώσεις. Έτσι ο Βρετανομύκτης ολοκληρώνει μια υγιή ζύμωση με χαμηλό αρχικό pH (Tonsmeire, 2014).

Στη δεκαετία του 1970 ανακαλύφθηκε ομάδα ζυμών (Phenolic off-flavor) που ήταν υπεύθυνες για το φαινολικό χαρακτήρα από την μετατροπή φερουλικού οξέος σε 4-βινυλογουαιακόλη, χαρακτηριστικά επίσης κάποιων Βρετανομυκτών (Hieronymus, 2010). Το σιτάρι περιέχει πολύ περισσότερα σε συγκέντρωση φαινολικά οξέα και συγκεκριμένα σε φερουλικό οξύ, από το κριθάρι. Επίσης έδειξε ότι οργανικά καλλιεργούμενα βυνοποιημένα σιτάρια έχουν ακόμα πιο υψηλή συγκέντρωση σε φερουλικό οξύ από ότι τα συμβατικά σιτάρια (Janish, 2019). Μελέτες έδειξαν ότι η βέλτιστη απελευθέρωση του φερουλικού στο νερό κατά την πολτοποίηση με τη βοήθεια ενζύμων γίνεται σε θερμοκρασίες 40-43 °C και pH 5,8, ενώ σε μια άλλη μελέτη στους 45 °C σε pH 5.7. Σε μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι σε θερμοκρασίες 55 °C υπήρξε αύξηση κατά 30% σε 4-βινυλογουαιακόλη στην παραγόμενη μύρα (Hieronymus, 2010). Οι *B. bruxellensis* και *B. lambicus* δίδουν έντονα καπνιστά χαρακτηριστικά μετά από πολτοποίηση στους 45 °C και 5,8 pH (Tonsmeire, 2014). Στο ζυθοποιείο Schneider εφαρμόζεται στο πρόγραμμα πολτοποίησης εκχύλιση στη θερμοκρασία 45 °C για 10 λεπτά της ώρας. Ενώ το ζυθοποιείο Schonrager για την παραγωγή φερουλικού οξέος κάνει πολτοποίηση στους 40 °C. Στον πίνακα 34 δίδονται οι μετρήσεις αντίληψης οργανοληπτικών χαρακτηριστικών από την παραγωγή φερουλικού οξέος στους 45 °C (Hieronymus, 2010).

Πίνακας 34. Παραγωγή φερουλικού οξέος στους 45 °C πολτοποίησης και αντίληψη γεύσης (Hieronymus, 2010, Source: Ausgewählte Kapitel der Brauereitechnologie)

Χρόνος παραμονής στους 45 °C	0 min.	10 min.	>25 min.
Φαινολικά	1,2	2,1	3,3
Εστερικά	4,1	3,4	2,6
Ζυμών	1,8	2,6	2,8

Εάν δεν είναι επιθυμητά τα έντονα, επιθετικά καπνιστά χαρακτηριστικά από τους Βρετανομύκτης παραλείπεται η πολτοποίηση και παραμονή στις συγκεκριμένες θερμοκρασίες (protein rest), δεν εφαρμόζεται μεγαλύτερη σε ποσότητα νερού στη διαβροχή (over-sparge), με τις θερμοκρασίες του νερού να μην ξεπερνούν τους 77 °C και το pH να μην είναι υψηλό (Tonsmeire, 2014).

8.3.4 Βρασμός

Στις παραδοσιακές μεθόδους υπήρχε η τάση της μεγάλης διάρκειας σε ώρες βρασμού. Το Βέλγικο ζυθοποιείο Lindemans εφάρμοζε 12 ώρες βρασμό και με την πάροδο των χρόνων πλέον εφαρμόζεται το μέγιστο γύρω στις 6 ώρες. Γενικά, στα παραδοσιακά ζυθοποιεία που

παράγουν Lambic μύρες, ο βρασμός ολοκληρώνεται συνήθως στις 5-6 ώρες. Οι ζυθοποιοί στη Φλαμανδία εφαρμόζαν βρασμό και μέχρι 30 ώρες, τώρα το μέγιστο είναι στις 2 ώρες (Sparrow, 2005).

Αυτή η μεγάλη διάρκεια σε βρασμό έχει ως συνέπειες την εξάτμιση του ζυθογλεύκου, την ιζηματοποίηση των πρωτεϊνών και ταννινών και την εκχύλιση συστατικών από τους λυκίσκους. Οι πρωτεΐνες με τον παρατεταμένο βρασμό θα πήξουν και θα κατακρημνιστούν. Ενώ με τη χρήση παλαιωμένων λυκίσκων εκχυλίζονται περισσότερο αντιμικροβιακά στοιχεία όπως χουμουλόνες και χουλουπόνες και διατηρούνται όσο γίνεται περισσότερες πολυφαινόλες (Sparrow, 2005).

8.3.5 Ψύξη

Σε παλιά κείμενα του Γάλλου επιστήμονα Lacambre ((Traite Complet de la Fabrication de Bieres et de la Distillation de Grains) το 1851 και του Frenz (Livre de Poche du Fabricant de Biere Blanche) το 1872 αναφέρεται ο τρόπος ψύξης μετά το βρασμό ή όχι, του βυνογλεύκου στα coolships. Η χρήση του coolship αναφέρεται από τον G.Vanderstichele το 1905, αλλά και από τον Hendrik Verlinden το 1933 όπου αναφέρει την μεταφορά του βυνογλεύκου στο coolship και παραμονή του για όλο το βράδυ. Ακολουθούσε την επόμενη μέρα μετάγχιση σε ξύλινα βαρέλια των 40 και 60 λίτρων σε ζεστό δωμάτιο όπου γινόταν μια γρήγορη αυθόρμητη ζύμωση (Hieronymus, 2010).

Το coolship ήταν ένα ρηχό, ανοικτό στο πάνω μέρος, χάλκινο δοχείο που βρισκόταν συνήθως στον πάνω όροφο του ζυθοποιείου πιάνοντας όλο τον όροφο. Αυτό το ρηχό δοχείο είχε καλύτερη επαφή με τον αέρα δίνοντας το πλεονέκτημα στην πιο γρήγορη ψύξη. Αυτό βοηθούσε και η παρουσία παράθυρων που δημιουργούσαν ψυχρό ρεύμα αέρα σ' όλο το χώρο. Τις ειδυλλιακές εποχές του χρόνου, το ζυθογλεύκος ψυχόταν γύρω στους 20 °C καθ'όλη τη διάρκεια της νύχτας. Εκτός από την ψύξη στο εκτεθειμένο ατμοσφαιρικό αέρα coolship γινόταν και η τυχαία εισαγωγή των μικροοργανισμών στο ζυθογλεύκος από τον αέρα στο χώρο (Sparrow, 2005). Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται μέχρι τώρα όχι μόνο για την παραγωγή Lambic και Flanders αλλά και Wild μύρες.



Εικόνα 35. Coolship στο ζυθοποιείο De Dolle στο Esen, West Flanders (Sparrow, 2005).

Λόγω της αργής ψύξης του ζυθογλεύκους σημαντική συγκέντρωση σε διμεθυλοσουλφίδια (D.M.S) σχηματίζονται, όμως λόγω της μεγάλης σε χρονική διάρκεια ζύμωσης απομακρύνονται από την τελική μύρα (Sparrow, 2005).

8.3.6 Λυκίσκος

Ο λυκίσκος, εκτός από την πικράδα που προσφέρει στην μύρα, δρα και ως αντιμικροβιακό σε συγκεκριμένους μικροοργανισμούς όπου τα υποπροϊόντα τους σε υψηλές συγκεντρώσεις μπορούν να χαλάσουν μια ποιοτική μύρα που προήρθε από αυθόρμητη ζύμωση (Sparrow, 2005). Ο Βρετανομύκτης δεν επηρεάζεται από τις υψηλές συγκεντρώσεις λυκίσκου και επιτρέπεται η αυξημένη δόση σε πικράδα παρόλο που τις περισσότερες φορές ο συνδυασμός πικράδας και οξύτητας αποφέρει δυσάρεστα αποτελέσματα (Tonsmeire, 2014). Οι ζυθοποιοί παραγωγής Lambic και όχι μόνο, χρησιμοποιούν μεγάλες ποσότητες λυκίσκων μεγάλης ηλικίας (2-3 ετών) ώστε να μεγιστοποιήσουν την αντιμικροβιακή τους δράση μέσα στην μύρα, χωρίς να συνεισφέρουν καμία πικράδα. Ζυθοποιεία όπως το Rodenbach στόχος τους είναι η τελική πικράδα να φτάσει στα 8-10 IBUs με μια συνιστώμενη δόση λυκίσκου ηλικίας 3 ετών είναι στα 580 g/hL (Sparrow, 2005). Στις περισσότερες περιπτώσεις, ο λυκίσκος προστίθεται στα 60 με 90 λεπτά βρασμού, ενώ σε χρόνους κοντά στο τέλος του βρασμού τα αρώματα εξαφανίζονται σε μια ξινή μύρα μεγάλης διάρκειας ζύμωσης και ωρίμανσης. Παράδειγμα ως προς την εξέλιξη της πικράδας στη μύρα είναι η έναρξη με 25 IBUs, μετά από ένα χρόνο μειώνεται στα 19 IBUs και στο δεύτερο χρόνο στα 15 IBUs (Tonsmeire, 2014).

Με την παρουσία οξυγόνου και σε θερμοκρασίες δωματίου ο λυκίσκος μπορεί να χάσει τουλάχιστον το 25% από τα α-οξέα, δηλαδή την πικράδα του σε 6 μήνες. Όμως τα β-οξέα και οι πολυφαινόλες του λυκίσκου δεν επηρεάζονται από την οξείδωση στο όλο χρονικό διάστημα αυτό παραμονή τους. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τα β-οξέα να προσφέρουν στη παραγόμενη μύρα την αντιμικροβιακή τους δράση, ενώ οι πολυφαινόλες είναι φυσικά αντιοξειδωτικά και βελτιώνουν τη σταθερότητα στη μύρα. Επίσης, η οξείδωση των ρητίνων στο λυκίσκο έχει σαν αποτέλεσμα στην μύρα ένα γευστικό και αρωματικό αποτέλεσμα τυριού (Cheddar) χαρακτηριστικό σε κάποιες Lambic μύρες (Sparrow, 2005).

Ζυθοποιία που δεν αγοράζουν παλαιούς λυκίσκους ή φρέσκους λυκίσκους με σκοπό να τους οξειδώσουν, χρησιμοποιούν απ'ευθείας φρέσκους λυκίσκους με χαμηλά σε περιεκτικότητα α-οξέα (Sparrow, 2005).

Ο λυκίσκος περιέχει γλυκοζίτες όπου με ενζυματική υδρόλυση παράγονται τερπενικές αλκοόλες. Οι Βρετανομύκητες *B. intermedius* CMBS LD85, *B. custersii* CMBS LD72, *B. anomalus* CMBS LD84 και *D. anomala* CMBS LD88 έδειξαν καθαρά σε μελέτη την παρουσία της δραστηριότητας της β-γλυκοζιδάσης. Ενδιαφέρον έδειξε ο *B. custersii* που απομονώθηκε από μύρα Lambic να έχει τη μεγαλύτερη δραστηριότητα από όλες (Janish, 2019). Επίσης, σε άλλη μελέτη παρατηρήθηκε ότι ο *B. custersii* μπόρεσε να υδρολύσει γλυκοζιδικά δεσμευμένες αρωματικές ενώσεις από λυκίσκο κατά τη φάση ωρίμανση της μύρας (Daenen et al., 2008).

Ένα στέλεχος *Saccharomyces* CMBS LD40 έδειξε υψηλή απελευθέρωση συγκεκριμένων αγλυκόνων από γλυκοζίτες λυκίσκου κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, όπως έξω-β-γλυκανάση (exo-b-glucanase). Η έξω-β-γλυκανάση είναι ικανή να απελευθερώνει ενώσεις αρώματος απ'ευθείας πρόδρομες από γλυκοσυλίωση. Προτάθηκε η εφαρμογή μικτής ζύμωσης με το συγκεκριμένο στέλεχος *Saccharomyces* και το *B. custersii* ώστε να επιτευχθεί η υψηλότερη απελευθέρωση πτητικών από τους γλυκοζίτες του λυκίσκου (Janish, 2019).

Η δραστηριότητα της β-γλυκοζιδάσης βρέθηκε ότι το μέγιστο της απόδοσης της γίνεται σε συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Αυτό δίνεται η δυνατότητα σε μύρες με πολύ λυκίσκο ή dry hopping, μαζί με τη συμμετοχή στελεχών Βρετανομυκήτων που δραστηριοποιούνται στη β-γλυκοζιδάση να έχουν έντονο αρωματικό χαρακτήρα μεταξύ 2-5 ημερών (Janish, 2019).

Σε περίπτωση παραγωγής μυρών funky ή ξινών με την τεχνική dry hopping, ο λυκίσκος πρέπει να προστίθεται εφόσον έχει ολοκληρωθεί η ζύμωση και το ξίνισμα της μύρας και η παραμονή τους συνήθως είναι 1-2 εβδομάδες μέσα στην ανοξειδωτή ή ξύλινη δεξαμενή ή ξύλινο βαρέλι (Tonsmeire, 2014).

8.3.7 Ζυμώσεις

Υπάρχουν τρεις τύποι 'άγριων' ζυμώσεων που μπορεί να πραγματοποιηθούν από ένα ζυθοποιείο: α) αυθόρμητης ζύμωσης, β) εμβολιασμός ενός μικροοργανισμού και γ) εμβολιασμός μικτών μικροοργανισμών, ίδιων και διαφορετικών (Sparrow, 2005), ο Βρετανομύκητας μπορεί να συμμετέχει και στις τρεις περιπτώσεις. Σε περίπτωση εμβολιασμού μπορεί να γίνει ταυτοχρόνως και με άλλα είδη πριν να ξεκινήσει η κυρίως ζύμωση ή μετά. Η συνιστώμενη δόση εμβολιασμού του Βρετανομύκητα κυμαίνεται από 100 cells/ml μέχρι 2000000 cells/ml. Εμβολιάζοντας περισσότερα κύτταρα παράγονται ευδιάκριτα οργανοληπτικά σε λιγότερο χρόνο, αλλά όχι πάντα με τα ίδια χαρακτηριστικά. Ο Yakobson συνιστά σε μελέτη του ότι ο σωστός εμβολιασμός Βρετανομυκήτων είναι μεταξύ μιας Ale και μιας Lager μπύρας, δηλαδή $1,25 \times 10^6$ cells/mL ανά °P (Tonsmeire, 2014).

Το ιδανικό pH για τη ζύμωση του Βρετανομύκητα θεωρείται από τον ζυθοποιείο Vinnie Cilurzo του ζυθοποιείου Russian River στις Η.Π.Α στα 3,4. Σε μελέτη του Yakobson βρήκε ότι τα περισσότερα στελέχη σε pH 3,08 είχαν οριακά καλύτερο χρόνο ζύμωσης στο να φτάσουν στη τελική πυκνότητα και όπως αυξημένη ζυμωτική ικανότητα (attenuation). Όμως υπήρξε μειωμένη παραγωγή σημαντικών εστέρων (Tonsmeire, 2014).

Οι βέλτιστες θερμοκρασίες ανάπτυξης του Βρετανομύκητα βρίσκονται μεταξύ στους 25 °C και 28 °C (Zuehlke και Edwards, 2013; Steensels et al., 2015). Οι θερμοκρασίες στους 26 °C προωθούν μια γρήγορη ζύμωση, ενώ σε θερμοκρασίες άνω των 27 °C συνεισφέρουν δυσάρεστα χαρακτηριστικά. Σε θερμοκρασίες κάτω των 21 °C προωθείται μια αργή ζύμωση και δίδεται η δυνατότητα στο Βρετανομύκητα να διαμορφώσει τα αναγκαία υποπροϊόντα (Sparrow, 2005). Ο *B. clausenii* (WLP645) αυξάνοντας αργά τη θερμοκρασία στους 27-28 °C παράγονται άφθονα αρώματα εστέρων βερίκοκου και τροπικών φρούτων, ενώ ο *B. anomalus* (WY5110) αποδίδει καλύτερα σε θερμοκρασίες 20 °C (Tonsmeire, 2014). Αρκετές μελέτες έδειξαν ότι η απόδοση σε αιθανόλη, η παραγωγικότητα και γενικά η ανάπτυξη του Βρετανομύκητα επηρεάζεται οριακά από τη θερμοκρασία (Yakobson, 2009). Σε μελέτη παρατηρήθηκε ότι σε στελέχη *B. bruxellensis* και *B. naardenensis* μετά από 72 ώρες ζύμωσης παρήχθησαν πολύ χαμηλά επίπεδα αιθυλικής αλκοόλης (0,2-0,4% ABV) (Holt et al., 2017). Επίσης αποδείχθηκε ότι η παραγωγικότητα του στελέχους *B. bruxellensis* CBS11269 είχε ευελιξία σε θερμοκρασίες μεταξύ 25 °C και 37 °C, ακόμα και σε διαφορετικές τιμές pH (Blomqvist et al., 2010).

Η ποσότητα του O₂ που είναι διαλυμένο στο ζυθογλεύκος έχει σημαντικές συνέπειες στο παραγόμενο χαρακτήρα του Βρετανομύκητα. Με την εφαρμογή ενός φυσιολογικού αερισμού όπως σ' όλες τις μπύρες ο Βρετανομύκητας θα είναι πιο υγιής και γρήγορος κατά τη ζύμωση,

όμως ο γνωστός χαρακτήρας του θα είναι μειωμένος. Αντίθετα μειώνοντας ή μηδενίζοντας τη συγκέντρωση O₂ στο ζυθογλεύκος ο Βρετανομύκητας θα στρεσαριστεί με αποτέλεσμα την υψηλότερη παραγωγή οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του, όμως μια μεγαλύτερη και λιγότερο αναξιόπιστη ζύμωση θα πραγματοποιηθεί. Ο Yakobson, στην έρευνα του συνιστά για όλα τα στελέχη 10-12 ppm O₂ (Tonsmeire, 2014).

Το ζυθοποιείο Schneider στη Γερμανία μελέτησε τους μηχανισμούς αερισμού κατά τη διάρκεια ζύμωσης και συμπέρανε ότι η ζύμωση για την παραγωγή τύπου Weiss μύρα σε ανοιχτά δοχεία είχαν δυνατότερη ένταση ως προς τα χαρακτηριστικά γαρίφαλου, δηλαδή παραγωγής 4-βινυλογουαιακόλης (Hieronymus, 2010). Αυτό όμως χωρίς να αναφέρεται εάν ο Βρετανομύκητας συμμετείχε στη ζυμοχλωρίδα. Μελέτη από το πανεπιστήμιο Catholic του Leuven βρέθηκε ότι αυξάνοντας τη διαθεσιμότητα σε οξυγόνο αυξάνονται και τα κύτταρα του Βρετανομύκητα όμως μειώνεται η συνολική δραστηριότητα τους κατά τη διάρκεια της ζύμωσης (Sparrow, 2005). Βάσει μελέτης του Yakobson για να φτάσει στο μέγιστο η κυτταρική συγκέντρωση του Βρετανομύκητα χρειάζεται 7-8 ημέρες στους 28 °C με συνεχές αερισμό, φυσικά ανάλογα το είδος οι χρόνοι μπορεί να είναι διαφορετικοί (Tonsmeire, 2014).

Οι Βρετανομύκητες αναπαράγονται από την αρχή της ζύμωσης στο ζυθογλεύκος πολύ αργά από την κατανάλωση γλυκόζης και μαλτόζης χωρίς να γίνονται εμφανή τα υποπροϊόντα τους (Sparrow, 2005). Τα περισσότερα στελέχη Βρετανομύκητα δείχνουν υψηλή αντίσταση προς την αιθανόλη, ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα που έχουν οι ζύμες για την επιβίωσή τους σε ένα περιβάλλον ζύμωσης (Steensels et al., 2015). Ωστόσο, αυτό το χαρακτηριστικό εξαρτάται από το στέλεχος και από περιβαλλοντικούς παράγοντες (Sturm et al., 2014). Σημαντικό όμως είναι όταν ο Βρετανομύκητας βρίσκεται σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αιθανόλης, τα επίπεδα στρες επηρεάζουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του παραγόμενου προϊόντος (Conterno et al., 2013). Ο Βρετανομύκητας, ως οξειδωτική ζύμη, παράγει πιο γρήγορα αλκοόλη απ' ό,τι οξέα κατά τη διάρκεια μιας κλασικής ζύμωσης (Sparrow, 2005). Ο Βρετανομύκητας δεν συμβάλει τόσο στην οξύτητα των ξινών μπυρών σε σχέση με τα βακτήρια. Αυτό εξαρτάται από τη συγκέντρωση O₂ κατά τη διάρκεια της ζύμωσης για την ποσότητα οξικού οξέος που θα παραχθεί στην μύρα από τη ζύμη (Tonsmeire, 2014).

Κατά το τέλος της ζύμωσης όπου τα επίπεδα της αιθυλικής αλκοόλης είναι υψηλά, η συγκέντρωση των σακχάρων χαμηλή, το pH και επίπεδα οξυγόνου προκαλούν αυτόλυση στους υπάρχοντες ζυμομύκητες όπως ο *Saccharomyces cerevisiae*. Ωστόσο, οι Βρετανομύκητες έχουν εξαιρετική απόδοση και αντοχή σε τέτοιες συγκεντρώσεις αλκοόλης, σε περιβάλλον με ελάχιστα θρεπτικά συστατικά και αργών χαρακτηριστικών ανάπτυξης. Η αυτόλυση των ζυμών μετά το τέλος της ζύμωσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως θρεπτικό συστατικό από τον

Βρετανομύκητα (Tubia et al., 2018). Σε μια παραδοσιακή αυθόρμητη ζύμωση λόγω ότι γίνεται σ' ένα δοχείο συνήθως (ξύλινα βαρέλια) χωρίς μετάγγιση, οι αυτολύομενες ζύμες και ιζήματα (trub) δρουν σαν θρεπτικά μέσα για τον Βρετανομύκητα (Sparrow, 2005), συνεισφέροντας ένα πιο ρουστίκ και funky χαρακτήρα στην μύρα (Tonsmeire, 2014). Επίσης, τα κύτταρα/μεμβράνεζτων νεκρών ζυμών απορροφούν τοξικές για τον Βρετανομύκητα ενώσεις, όπως οκτανοϊκό και δεκανοϊκό λιπαρό οξύ (Tonsmeire, 2014).

Στο ζυθοποιείο Captain Lawrence των Η.Π.Α στη διάρκεια της κύριας ζύμωσης μειώνονται οι θερμοκρασίες ζύμωσης από 27-32 °C σε 10-15 °C. Με αυτό το χειρισμό, ελάττωσης της κύριας ζύμωσης παρατηρήθηκε ότι λανθάνουσα φάση των Βρετανομυκήτων μειώθηκε, ελαχιστοποιήθηκε η αυτόλυση, και μειώθηκε ο χρόνος που χρειαζόταν ο σχηματισμός αρωματικών μοριακών μορίων. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα στον έντονο τροπικό χαρακτήρα σε σύγκριση με τη μέθοδο εμβολιασμού του Βρετανομύκητα σε πιο ξηρή μύρα (Tonsmeire, 2014).

Η παρουσία εντεροβακτηρίων σε μια αυθόρμητη ζύμωση έχει σαν αποτέλεσμα την κατανάλωση θρεπτικών συστατικών στην αρχή της ζύμωσης. Με την προσθήκη γαλακτικού οξέος επιτυγχάνεται η μείωση του pH και ο θάνατος τους πριν την ανάπτυξη τους. Έτσι τα χρήσιμα θρεπτικά χρησιμοποιούνται από τους *Saccharomyces* και Βρετανομύκητες (Sparrow, 2005). Σε περίπτωση ανάπτυξης παθογόνων εντερικών βακτηρίων όπως *Escherichia coli* παράγονται κατά το μεταβολισμό τους ανεπιθύμητες βιογενείς αμίνες (Tonsmeire, 2014).

Η ποικιλία των πηγών άνθρακα που μπορεί να μεταβολίσει ο Βρετανομύκητας του δίνει το πλεονέκτημα να αναπτύσσεται ευκολότερα από άλλες ζύμες κατά τη διάρκεια των τελευταίων σταδίων της διαδικασίας της ζύμωσης. Ο Βρετανομύκητας έχει την ιδιότητα να αναπτυχθεί με την αιθυλική αλκοόλη ως μοναδική πηγή άνθρακα. Επίσης μπορεί να χρησιμοποιήσει τα νιτρικά άλατα ως πηγή αζώτου δίνοντας του το πλεονέκτημα σε σχέση με άλλους ανταγωνιστές (Tubia et al., 2018).

Ο Βρετανομύκητας μπορεί να ζυμώσει τα πλείστα σάκχαρα όχι όμως όλα σε σωστές συνθήκες και χρόνο. Όμως πολλοί επιστήμονες θεωρούν ότι η παρουσία του *Pediococcus* σε μια ζύμωση με Βρετανομύκητα μπορεί να φτάσει βαθμό ζύμωσης ως 100%. Παραδείγματα σε μύρες αποτελούν, οι Lambic, Gueuze και Red Flanders Ales (Sparrow, 2005). Ο *Pediococcus* θεωρείται είδος που παράγει υψηλές συγκεντρώσεις διακετυλίου χωρίς να μπορεί ενζυμικά να τις μειώσει, όπως το ίδιο παρατηρήθηκε και για το βακτήριο *Oenococcus oeni*. Η παραγόμενη νότα βουτύρου μειώνεται με την παρουσία του Βρετανομύκητα. Επίσης, κάποια είδη *Pediococcus* κατά τη διάρκεια παλαίωσης της μύρας παράγουν ενώσεις όπως εξωπολυσακχαρίτες (exopolysaccharides) μετατρέποντας την μύρα σε "άρρωστη" (γνωστή

ως *Sarcina* sickness). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα το αυξημένο ιξώδες και τη μορφή της μύρας σαν σιροπιασμένης και γλοιώδες σε βέλτιστες θερμοκρασίες των 12 °C. Εδώ έρχεται πάλι ο Βρετανομύκητας όπου σπάει τους εξωπολυσακχαρίτες και τους καταναλώνει με αποτέλεσμα την απομάκρυνση των ανεπιθύμητων χαρακτηριστικών στη μύρα (Tonsmeire, 2014).

Οι ζύμες του Βρετανομύκητα είναι γνωστό ότι δεν παράγουν ‘Killer toxin’, στέλεχος του *B. bruxellensis* βρέθηκε να είναι ευαίσθητο στην ‘killer toxin’ που παρήγαγε ο μικροοργανισμός *Kluyveromyces wickerhamii* (Mehlomakulu et al., 2014; Holt et al., 2017). Επίσης οι *Pichia anomala* και *Pichia membranifaciens* που είναι και αυτοί non-Saccharomyces ζύμες παράγουν killer toxin και αντιμικροβιακές πρωτεϊνούχες ενώσεις αναστέλλοντας τις ευαίσθητες ζύμες (Tubia et al., 2018).

Όταν ο Βρετανομύκητας βρίσκεται μόνος του 100% σε μια αργή ζύμωση τότε θα δώσει παραδοσιακά χαρακτηριστικά. Αντίθετα σε συνθήκες, όπως αερισμό, υψηλό πληθυσμό κυττάρων, υψηλές θερμοκρασίες μειώνεται ο παραδοσιακός χαρακτήρας (Sparrow, 2005). Αυτό δίνει αποκλειστική πρόσβαση στα απλά σάκχαρα και στο υπάρχον οξυγόνο. Οι ζυμώσεις 100% Βρετανομύκητα στο ζυθοποιείο Lost Abbey των Η.Π.Α μπορεί να διαρκέσουν το μέγιστο ένα μήνα, εφόσον ο εμβολιασμός γίνεται με το σωστό αριθμό κυττάρων που στη προκειμένη περίπτωση το συγκεκριμένο ζυθοποιείο εμβολιάζει με 400000 cell/mL (Tonsmeire, 2014).

Σε μια μικτή ζύμωση με *Saccharomyces* στόχος συνήθως είναι να ολοκληρώσει την πρώτη ζύμωση σε πυκνότητες 1,014-1,020 (3,5-5 °P), ώστε να συνεχίσει ο Βρετανομύκητας. Προϊόντα που παράγονται από τους *Saccharomyces* μπορεί να μεταβολιστούν σε διαφορετικές ενώσεις. Παράδειγμα είναι τα στελέχη Hefeweizen που παράγουν το χαρακτηριστικό οξικό ισοαμυλεστέρα, δηλαδή χαρακτηριστική μπανάνα, υδρολύεται από το ένζυμο εστεράση που παράγεται από τον Βρετανομύκητα και παράγεται αιθανόλη και οξικό οξύ (Tonsmeire, 2014).

Στο τέλος της ζύμωσης παρατηρήθηκε ότι ο Βρετανομύκητας όταν είναι μόνος του 100% συσσωματώνεται και καθιζάνει καλύτερα (flocculation) από το να συμμετέχει με άλλους μικροοργανισμούς ή μετά τη συμμετοχή του στη δεύτερη ζύμωση. Όμως εξακολουθεί να είναι πολύ αργός σε σχέση με τους *Saccharomyces* (Tonsmeire, 2014).

Τα παλιά παραδοσιακά ζυθοποιεία καλλιεργούνε συνήθως το δικό τους μείγμα μικροοργανισμών που μπορεί να προέρχεται από πολλά χρόνια πίσω. Τα καινούργια ζυθοποιεία επίσης καλλιεργούν τους δικούς τους μικροοργανισμούς όταν φυσικά είναι αρεστό το αποτέλεσμα και έχουν τον αναγκαίο εξοπλισμό και εμπειρία. Στην αγορά πλέον υπάρχουν μικροβιολογικά εργαστήρια που προμηθεύουν καθαρές και αξιόπιστες καλλιέργειες μικροοργανισμών σε κάθε επαγγελματία ζυθοποιείο αλλά και επίδοξο ερασιτέχνη. Στους

επόμενους πίνακες παρουσιάζονται κάποιες εταιρείες που προμηθεύουν παγκοσμίως καλλιέργειες μικροοργανισμών, με εστίαση το Βρετανομύκητα, αλλά και μικτές καλλιέργειες με τη συμμετοχή του.

Πίνακας 35. Wyeast Laboratories (<https://wyeastlab.com/>).

Wyeast Laboratories					
Εμπορική Ονομασία/ Κωδικός	Είδη	Βέλτιστες θερμοκρασίες °C	Μέγιστο ABV%	Flocculation	Attenuation %
Brettanomyces Bruxellensis/ 5112	<i>B. bruxellensis</i>	15-24	12	Μέτριο	-
Brettanomyces Claussenii/ 5151-PC	<i>B. claussenii</i>	15-24	12	Μέτριο	80-80
Brettanomyces Lambicus 5526	<i>B. lambicus</i>	15-24	12	Μέτριο	-
Saison-Brett Blend/ 3031- PC	<i>S. cerevisiae</i> Var.diastaticus Brettanomyces Blend	18-26	12	Χαμηλό	80-90
Belgian Lambic Blend/ 3278	<i>S. cerevisiae</i> Brettanomyces Lactobacillus Pediococcus	17-24	11	Ποικίλη	70-80
Berliner Weisse Blend/ 3191-PC	<i>S. cerevisiae</i> Brettanomyces Lactobacillus	20-22	6	Χαμηλό	73-77
Roeselare Ale Blend/ 3763	<i>S. cerevisiae</i> Brettanomyces Lactobacillus Pediococcus	18-30	11	Ποικίλη	80-80
Belgian Style Blend/ 3789-PC	<i>S. cerevisiae</i> Brettanomyces	20-30	12	Μέτριο	75-80
Old Ale Blend/ 9097-PC	<i>S. cerevisiae</i> Brettanomyces	20-24	14	Μέτριο	75-80

Πίνακας 36. Omega Yeast (<https://omegayeast.com/>).

Omega Yeast					
Εμπορική Ονομασία/ Κωδικός	Είδη	Βέλτιστες θερμοκρασίες °C	Μέγιστο ABV%	Flocculation	Attenuation %
C2C American Farmhouse / OYL-217	Saison strains Brettanomyces	20-27	10	Χαμηλό	70-85
Brett. Bruxellensis/ OYL-202	<i>B. bruxellensis</i>	21-29	10	Χαμηλό	85+
Brett. Claussenii/ OYL-201	<i>B. claussenii</i>	21-29	10	Χαμηλό	85+
Brett. Lambicus/ OYL-203	<i>B. lambicus</i>	21-29	10	Χαμηλό	85+
Brett Blend #1/ OYL-210	Saccharomyces Brettanomyces	20-27	11	Πολύ Χαμηλό	78-88
Brett Blend #2/ OYL-211	<i>B. bruxellensis</i> Saccharomyces	20-27	11	Πολύ Χαμηλό	85+
Brett Blend #3/ OYL-212	Brettanomyces (bruxellensis. lambicus) Saccharomyces	20-27	11	Πολύ Χαμηλό	85+
All the Bretts/ OYL-218	Brettanomyces	21-29	11	Χαμηλό	85+
Northwest Farmhouse Brett/ OYL-216	<i>B. bruxellensis</i>	21-29	10	Χαμηλό	85+

Πίνακας 37. The Yeast Bay (<https://www.theyeastbay.com/>).

The Yeast Bay					
Εμπορική Ονομασία/ Κωδικός	Είδη	Βέλτιστες θερμοκρασίες °C	Μέγιστο ABV%	Flocculation	Attenuation %
Amalgamation-Brett Super Blend/ WLP4637	6x Brettanomyces	21-27	Υψηλό	Χαμηλό	85-95
Amalgamation II Brett Super Blend/ WLP4641	5x <i>B. bruxellensis</i>	21-27	Υψηλό	Χαμηλό	82-86
Beersel Brettanomyces Blend/ WLP4603	<i>B. bruxellensis</i>	21-27	Υψηλό	Χαμηλό	82-85
Brettanomyces bruxellensis Strain TYB184/WLP4638	<i>B. bruxellensis</i>	22-28	Υψηλό	Μέτριο-Χαμηλό	82-88
Brettanomyces bruxellensis Strain TYB207 WLP4639	<i>B. bruxellensis</i>	22-28	Υψηλό	Μέτριο -Χαμηλό	80-82
Brettanomyces bruxellensis StrainTYB261/WLP4640	<i>B. bruxellensis</i>	22-28	Υψηλό	Μέτριο -Χαμηλό	80-82
Brettanomyces bruxellensis StrainTYB307/WLP4655	<i>B. bruxellensis</i>	21-27	Υψηλό	Χαμηλό	80-84
Brettanomyces bruxellensis StrainTYB415/WLP4656	<i>B. bruxellensis</i>	21-27	Υψηλό	Χαμηλό	82-86
Brussels Brettanomyces Blend / WLP4613	<i>B. bruxellensis</i>	21-27	Υψηλό	Μέτριο -Χαμηλό	80-90
Lochristi Brettanomyces Blend/ WLP4623	<i>B. bruxellensis</i>	21-27	Υψηλό	Μέτριο -Χαμηλό	80-88

Dark Belgian Cask/ WLP4653	<i>S. cerevisiae</i> <i>B. bruxellensis</i> (TYB184)	20-24	Υψηλό	Μέτριο	80-85
Melange/ WLP4633	<i>S. cerevisiae</i> <i>S. cer. var diast.</i> <i>S. fermentati</i> Brettanomyces <i>L. brevis</i> <i>L. Delbreucki</i> <i>P. damnosus</i>	20-26	Υψηλό	Μέτριο - Χαμηλό	85-100
Saison Brettanomyces Blend/ WLP4626	<i>S. cerevisiae</i> Brettanomyces	21-26	Υψηλό	Μέτριο - Χαμηλό	80-100
Saison Brettanomyces Blend II/ WLP4636	<i>S. cerevisiae</i> <i>B. bruxellensis</i>	22-27	Υψηλό	Μέτριο - Χαμηλό	85-90
Transatlantic Berliner Blend/ WLP4645	<i>S. cerevisiae</i> <i>L. brevis</i> TYB282 Brettanomyces blend <i>B. bruxellensis</i> TYB184	19-24	Μέτριο-Υψηλό	Μέτριο - Χαμηλό	85-100

Πίνακας 38. White Labs (<https://www.whitelabs.com/>).

White Labs					
Εμπορική Ονομασία/ Κωδικός	Είδη	Βέλτιστες θερμοκρασίες °C	Μέγιστο ABV%	Flocculation	Attenuation %
Brettanomyces Anomalus/ WLP640	<i>B. anomalus</i>	21-30	8-12	Χαμηλό	70-85
Brettanomyces Claussenii/ WLP645	<i>B. claussenii</i>	30-30	8-12	Χαμηλό	-
Brettanomyces Bruxellensis Trois Vrai/ WLP648	<i>B. bruxellensis</i> Trois Vrai	21-30	8-12	Χαμηλό	-
Brettanomyces bruxellensis/	<i>B. bruxellensis</i>	30-30	8-12	Χαμηλό	-

WLP650					
Brettanomyces Lambicus/ WLP653	<i>B. lambicus</i>	30-30	8-12	Χαμηλό	-
Belgian Sour Mix 1/ WLP655	Brettanomyces Saccharomyces Lactobacillus Pediococcus	27-29	8-12	Χαμηλό- Μέτριο	70-80
Funky Cider Blend/ WLP616	Brettanomyces Saccharomyces Lactobacillus	-	5-10	-	-
Flemish Ale Blend/ WLP665	Brettanomyces Saccharomyces Lactobacillus Pediococcus	20-27	8-12	Χαμηλό- Μέτριο	80-85
American Farmhouse Blend/ WLP670	Brettanomyces Farmhouse strains	20-22	5-10	Μέτριο	75-82

Πίνακας 39. Real Brewers Yeast (<https://realbrewersyeast.com/>).

Real Brewers Yeast					
Εμπορική Ονομασία/ Κωδικός	Είδη	Βέλτιστες θερμοκρασίες °C	Μέγιστο ABV%	Flocculation	Attenuation %
Brettanomyces Bruxellensis/ RBB1	<i>B. bruxellensis</i>	-	-	-	-
Brettanomyces Drie/ RBB2	-	-	-	-	-
Brettanomyces clausenii/ RBB3	<i>B. clausenii</i>	-	-	-	-
Brettanomyces Lambics RBB4	<i>B. lambic</i>	-	-	-	-

Πίνακας 40. Inland Island Yeast (<https://inlandislandyeast.com/>).

Inland Island Yeast					
Εμπορική Ονομασία/ Κωδικός	Είδη	Βέλτιστες θερμοκρασίες °C	Μέγιστο ABV%	Flocculation	Attenuation %
Brettanomyces Bruxellensis I/ INIS-901	<i>B.bruxellensis</i>	16-24	Μέτριο	Μέτριο	90+
Brettanomyces Bruxellensis II/ INIS-902	<i>B. bruxellensis</i>	21-30	Μέτριο-Υψηλό	Χαμηλό	85+
Brett Barrel Yeast III/ INIS-903	Brettanomyces	16-24	Μέτριο	Μέτριο	90+
Brettanomyces Morpheus/ INIS-914	Brettanomyces	21-30	Μέτριο	Χαμηλό	85+
Brettanomyces Lambicus / INIS-920	Brettanomyces	21-30	Μέτριο-Υψηλό	Χαμηλό	85+
Brettanomyces Claussenii/ INIS-930	<i>B. claussenii</i>	21-30	Μέτριο-Υψηλό	Χαμηλό	85+

Πίνακας 41. Escarpment Laboratories (<https://escarpmentlabs.com/>).

Escarpment Laboratories					
Εμπορική Ονομασία/ Κωδικός	Είδη	Βέλτιστες θερμοκρασίες °C	Μέγιστο ABV%	Flocculation	Attenuation %
Belgian Sour Blend	Brettanomyces Lactobacillus Pediococcus	20-25	Υψηλό	Χαμηλό	80+
Berliner Brett Blend	<i>B. bruxellensis</i> <i>B. anomalus</i>	22-27	Μέτριο	Χαμηλό	-
Berliner Brett I	<i>B. anomalus</i>	18-24	Υψηλό	Μέτριο-Χαμηλό	Χαμηλό
Berliner Brett II	<i>B. bruxellensis</i>	18-24	Μέτριο	Χαμηλό	Χαμηλό
Brett B	<i>B. bruxellensis</i>	22-27	Μέτριο	Χαμηλό	80+
Brett C	<i>B. anomalus</i>	22-27	Υψηλό	Χαμηλό	Χαμηλό
Brett D	<i>B. bruxellensis</i>	20-25	Υψηλό	Χαμηλό	80+
Brett L	<i>B. lambicus</i>	22-27	Μέτριο	Χαμηλό	80+

Brett M	<i>B. bruxellensis</i>	22-27	Υψηλό	Χαμηλό	80+
Brett Q	<i>B. bruxellensis</i>	-	-	-	-
Brussels Brett	<i>B. bruxellensis</i>	22-27	Υψηλό	Χαμηλό	80+
Mothership Brett Blend	Brettanomyces 10x strains	22-27	Υψηλό	Χαμηλό	80+
Spooky Saison	Saison yeasts (STA1) Brettanomyces	25-30	Υψηλό	Χαμηλό	80+
Fruit Bomb Saison Blend	Saison yeasts <i>B. anomala</i> <i>B. bruxelensis</i>	22-27	Υψηλό	Χαμηλό	85+
New World Saison Blend	Saccharomyces Brettanomyces	22-27	Υψηλό	Χαμηλό	85+
Ontario Farmhouse Ale Blend	Saccharomyces Brettanomyces	22-27	Μέτριο	Χαμηλό	80+

Πίνακας 42. Giga Yeast (<https://gigayeast.com/>).

Giga Yeast					
Εμπορική Ονομασία/ Κωδικός	Είδη	Βέλτιστες θερμοκρασίες °C	Μέγιστο ABV%	Flocculation	Attenuation %
Brussels Bruxellensis/ GB001	<i>B. bruxellensis</i>	20-27	-	-	58
Tart Cherry Brett GB002	<i>B. bruxellensis</i>	20-27	-	-	79
Farmhouse Sour GB121	Ale yeast Brettanomyces Lactic Acid Bacteria	20-27	-	-	89
Sour Cherry Funk GB150	x3 Brettanomyces Lactic Acid Bacteria	20-27	-	-	89
Brux Blend GB156	Blend Brettanomyces	20-27	-	-	79

Πίνακας 43. East Coast Yeast (<http://www.eastcoastyeast.com/>).

East Coast Yeast					
Εμπορική Ονομασία/ Κωδικός	Είδη	Βέλτιστες θερμοκρασίες °C	Μέγιστο ABV%	Flocculation	Attenuation %
Brettanomyces Anomala/ ECY04	<i>B. anomala</i>	-	-	-	-
Dirty Dozen Brett Blend/ ECY34	<i>B. bruxellensis</i> <i>B. anomala</i> <i>B. lambicus</i> <i>B. custersianus</i> <i>B. nanus</i> <i>B. clausenii</i> <i>B. naardenensis</i>	-	-	-	-
Brettanomyces Bruxellensis/ ECY35	<i>B. bruxellensis</i>	-	-	-	-
Brettanomyces Clausenii/ ECY36	<i>B. clausenii</i>	-	-	-	-
Brettanomyces Lambicus/ ECY37	<i>B. lambicus</i>	-	-	-	-
Brettanomyces bruxellensis 2/ ECY38	<i>B. bruxellensis</i>	-	-	-	-
Brettanomyces Anomalous/ ECY39	<i>B. anomalus</i>	-	-	-	-
Bug Farm/ ECY01	<i>S. cerevisiae</i> <i>S. fermentati</i> Brettanomyces Lactobacillus Pediococcus	-	-	-	-
Flemish Ale/ ECY02	<i>S. cerevisiae</i> Brettanomyces Lactobacillus Pediococcus	-	-	-	-
BugCounty/ ECY20	Over 20 isolates Brettanomyces Lactobacillus Pediococcus	-	-	-	-
Senne Valley/ ECY31	Hanseniaspora Wickerhamomyces Priceomyces Pichia	-	-	-	-

	Debaromyces Pediococcus Saccharomyces <i>B. bruxellensis</i>			
Bug Farm 2/ ECY45	Kviek Saccharomyces Brettanomyces Lachancea thermotolerans Lactobacilus	-	-	-

Πίνακας 44. Imperial Yeast (<https://www.imperialyeast.com/>).

Imperial Yeast					
Εμπορική Ονομασία/ Κωδικός	Είδη	Βέλτιστες θερμοκρασίες °C	Μέγιστο ABV%	Flocculation	Attenuation%
Sour Batch/ F08	Saccharomyces Lactobacilus Brettanomyces	20-24	12	Χαμηλό	80-95
Brett Drei/ W05	<i>B. bruxellensis</i>	21-29	10	Χαμηλό	56-85
Lambicus/ W10	<i>B. bruxellensis</i>	21-29	12	Χαμηλό	55-85
Brett Claussenii/ W12	<i>B. clausenii</i>	21-29	12	Χαμηλό	55-75
BruX/ W13	<i>B. bruxellensis</i>	17-20	12	Χαμηλό	55-85
Suburban Brett/W15	Brettanomyces	18-23	12	Χαμηλό	15-80

8.3.8 Αρώματα ζυμώσεων

Κατά τη διάρκεια, αλλά και μετά το τέλος της ζύμωσης, διαφορετικά αρώματα παράγονται από τον Βρετανομύκητα. Κάποια από αυτά είναι έντονα και ξεχωρίζουν επικαλύπτοντας άλλα αρώματα ζύμωσης. Πολλοί διαφορετικοί όροι αναφέρονται για την περιγραφή τους όπως το γαρίφαλο, πικάντικο, ποντίκι (mousy off-flavours), αχυρώνας, καπνιστό, πλαστικό, φαινολικό, ιατρικό, ιατρικό επίδεσμο, μεταλλικό, υγρό δέρμα, μπισκότο κράκερ, ιδρώτας, κατσικίσιο, μήλο, λουλουδάτο, τροπικά φρούτα, εσπεριδοειδή και άλλα. Όλοι αυτοί οι όροι χρησιμοποιούνται για να περιγράψουν το προφίλ αρώματος ενός Βρετανομύκητα, γνωστό ως ‘Brett flavour’ (Licker et al., 1999; Steensels et al., 2015). Με τη ζύμωση δεξτρινών παράγονται οι χαρακτηριστικοί εστέρες (φρούτα) και φαινόλες (πικάντικο, funky, καπνιστό). Αγαπημένα

αρώματα θεωρούνται ο ανανάς, μήλο, αχλάδι και σανό, ενώ λιγότερο σε προτίμηση θεωρούνται η κουβέρτα αλόγου (σέλα) και ο αχυρώνας. Σε καταστροφικές παρτίδες πρωταγωνιστές είναι ο δυσάρεστος δριμύς καπνός, η γάζα πρώτων βοηθειών και τέλος τα κόπρανα! (Tonsmeire, 2014).

Στο Βρετανομύκητα έχει παρατηρηθεί ότι όταν συμμετέχει στην κύρια ζύμωση (1^η) παράγει πιο ελαφριά γευστικά και αρωματικά χαρακτηριστικά ανεξαρτήτως αν είναι μόνος του ή με άλλους μικροοργανισμούς. Ο *B. bruxellensis* στην κύρια ζύμωση παράγει πιο πολύ φρουτώδεις αρώματα παρά τα κλασικά του αλόγου. Ο *B. lambicus* ξεφεύγει από τα αρώματα funky και κερασιού σε πιο πολύ φρέσκια κερασόπιτα. Τα στελέχη *B. clausseinii* και *B. anomalus* θεωρούνται πιο ήπια και είναι μια επιλογή που περιορίζεται στον απλό "Brett" χαρακτήρα. Μια εκδοχή του *B. Bruxellensis*, γνωστή ως *Brettanomyces Drie* ή *Trois*, διακρίνεται για την γρήγορη ζυμωτική ικανότητα και τα υψηλά αρωματικά χαρακτηριστικά που παράγει όπως ψωμιού, τροπικά φρούτα και ήπια funky αρώματα. Επίσης, ο συνδυασμός μεταξύ των Βρετανομυκήτων μπορεί να φέρει διαφορετικά αποτελέσματα. Παράδειγμα, ο *B. anomalus* μαλακώνει τις επιθετικές γεύσεις που παράγει ο *B. bruxellensis* (Tonsemeire, 2014).

Μια από τις κατηγορίες αρωμάτων είναι αυτό του ποντικιού (mousy off-flavour) και είναι τρεις γνωστές ενώσεις που εμπλέκονται με αυτό το άρωμα: 2-αιθυλοτετραϋδροπυριδίνη (ethyltetrahydropyridine-ETHP), 2-ακετυλοτετραϋδροπυριδίνη (2-acetyltetrahydropyridine-ATHP) και 2-ακετυλοπυρρολίνη (2-acetylpyrroline-APY) (Snowdon et al., 2006). Από αυτές τις τετραϋδροπυριδίνες μόνο δύο παράγονται από τον Βρετανομύκητα, οι EHP και ATHP, με τις παραγόμενες συγκεντρώσεις τους να κυμαίνονται ανάλογα με τα διαφορετικά είδη αλλά και στελέχη (Romano et al., 2008). Η παραγωγή τετραϋδροπυριδίνων σε μικρές συγκεντρώσεις από τους Βρετανομύκητες και η ταυτόχρονη παρουσία λυσίνης και αιθανόλης διαμορφώνουν ένα χαρακτήρα με μικρές συγκεντρώσεις από ψωμί, ποπ-κορν ή κρακεράκι. Όμως σε μεγάλες συγκεντρώσεις παράγονται ανεπιθύμητα χαρακτηριστικά όπως ούρα ποντικιού ή ακεταμίδιο ή μερικές φορές χαρακτήρα βρεγμένου αλόγου (Sparrow, 2005). Γενικά τα αρώματα αυτά μερικές φορές είναι παρόμοια με τα αρώματα μπισκότων, όμως υπό συνθήκες χαμηλού pH μπορεί να είναι αντιληπτή ως μεταλλική ή πικρή (Oelofse, 2008). Συνήθως είναι μόνο αντιληπτή μετά την κατάποση και η γεύση μπορεί να διατηρηθεί για περισσότερο από 10 λεπτά (Snowdon et al., 2006).

Οι πτητικοί εστέρες αποτελούν σημαντική ομάδα αρωματικών ενώσεων, δεδομένου ότι είναι υπεύθυνοι για το φρουτώδες ή λουλουδάτο χαρακτήρα στην μύρα όπως παράδειγμα αυτών είναι οι τύπου Lambic μύρες (Verstrepen et al., 2003). Ο Βρετανομύκητας παίζει πρωταγωνιστικό ρόλο και χαρακτηρίζεται από πολύ χαμηλή ποσότητα οξικού ισοαμυλεστέρα,

υψηλή συγκέντρωση καπρυλικού αιθυλεστέρα και γαλακτικού αιθυλεστέρα και σημαντικές ποσότητες καπρικού αιθυλίου σε σύγκριση με τις μύρες που παράγονται με ζύμες *S. cerevisiae* και *S. pastorianus*. Αυτή η διαφορά στις συγκεντρώσεις εστέρων εμφανίζεται μόνο με την εμφάνιση του Βρετανομύκητα κατά τη διάρκεια της ζύμωσης (Steensels et al., 2015). Επίσης, σε περαιτέρω αναλύσεις τα ένζυμα εστεράσες υπάρχουν στο Βρετανομύκητα και είναι υπεύθυνες για τον σχηματισμό αιθυλεστέρων, όπως οξικός αιθυλεστέρας και γαλακτικός αιθυλεστέρας, μαζί με την υδρόλυση οξικών εστέρων, όπως οξικού ισοαμύλιου και οξικού φαινυλεστέρα (Spraepen και Verachtert, 1982; Steensels et al., 2015). Μετά από δεύτερη ζύμωση από το *B. custersianus* από την εταιρεία παραγωγής ζυμών και βακτηρίων East Coast Yeast παρήχθησαν πολύπλοκα αρώματα φρούτων όπως ανανά, πράσινου μήλου, μάνγκο και ίχνη ακεταλδεύδης (Tonsmeire, 2014).

Οι πτητικές φαινολικές ενώσεις είναι υπεύθυνες για μερικές από τις πιο αισθητές γεύσεις που σχετίζονται με το Βρετανομύκητα κατά τη διάρκεια της ζύμωσης (Licker et al., 1999; Oelofse, 2008; Steensels et al., 2015). Οι 4-αιθυλοφαινόλη (4-EP) και 4-αιθυλογουαιακόλη (4-EG) συμβάλουν σε μεγάλο βαθμό στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά όπως των τύπου Lambic, American Coolship Ale, διάφορων Βέλγικων ξινών μπυρών και άλλων. Στις μύρες συνήθως περιέχει υψηλότερες συγκεντρώσεις 4-αιθυλογουαιακόλη με χαρακτηριστικά το γαρύφαλλο ή το πικάντικο άρωμα (Vanbeneden et al., 2008). Σε μελέτη του Yakobson βρέθηκε ότι η 4-αιθυλογουαιακόλη μειώνεται σε συγκέντρωση όταν χρησιμοποιούνται υπεράριθμα κύτταρα Βρετανομύκητα κατά τον εμβολιασμό (Yakobson, 2009; Tonsmeire, 2014).

Η γενετική παραλλαγή μεταξύ ειδών και στελεχών Βρετανομυκήτων επηρεάζει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά στη παραγόμενη μύρα. Επίσης επηρεάζεται και από την συγκέντρωση οξέων και αλκοολών κατά τη διάρκεια της ζύμωσης όπου με το συνδυασμό τους παράγονται εστέρες. Συγκεκριμένα μπορεί να μετατρέψει το οξικό οξύ και αιθανόλη σε οξικό αιθυλεστέρα, όπου σε χαμηλές συγκεντρώσεις μυρίζει αγλάδι, ενώ σε μεγάλες ασετόν (Tonsmeire, 2014).

8.3.9 Προσθήκη φρούτων

Εκτός από την παρουσία ενεργών αρωματικών ενώσεων σε ελεύθερη μορφή, φρούτα και άλλα μέρη φυτών προστίθενται στα διάφορα στάδια της παραγωγής μύρας (Steensels et al., 2015). Με την προσθήκη φρούτων προσδίδεται πολυπλοκότητα και ενισχύονται τα αρώματα που παράγονται κατά του ξινίσματος της μύρας. Προσθήκη κακής ή μέτριας πρώτης ύλης (φρούτων) θα δώσουν αντίστοιχα αποτελέσματα στην παραγόμενη μύρα (Tonsmeire, 2014). Παράγοντες που παίζουν ρόλο στην επιλογή των φρούτων είναι η περιεκτικότητα σε σάκχαρα, οξύτητα, το είδος οξέος και οι ταννίνες (Sparrow, 2005).

Πίνακας 45. Χαρακτηριστικά φρούτων που προστίθενται στην παραγωγή Wild Beers
(Sparrow, 2005; Tonsmeire, 2014).

Φρούτο	Σάκχαρα %	Οξύτητα	Είδος Οξέος	Ταννίνες
Βερίκοκο	Μέτρια 9,2	Υψηλή	Μηλικό	Υψηλές
Φραγκοστάφυλο	Μέτρια 8,25	Πολύ Υψηλή	Κιτρικό	Υψηλές
Κεράσι	Υψηλά 9-12,8	Υψηλή	Μηλικό	Μέτριες
Σταφύλι	Υψηλά 22-25	Μέτρια	Μηλικό	Μέτριες/Υψηλές
Ροδάκινο	Μέτρια 8,4	Μέτρια	Μηλικό	Υψηλές
Βατόμουρο	Χαμηλά 4,4	Υψηλή	Κιτρικό	Μέτριες
Φράουλα	Χαμηλά 4,9	Υψηλή	Κιτρικό	Χαμηλές

Χωρίς τη χρήση της μεθόδου παστερίωσης, οι άγριες ζύμες μετά τη προσθήκη των φρούτων σε καινούργιο ευνοϊκό περιβάλλον θα συνεχίσουν τη ζύμωση καταναλώνοντας τα σάκχαρα των φρούτων. Ενώ όσο αυξάνεται η συγκέντρωση ταννινών διαμορφώνεται μια πιο ξηρή τελική μύρα (Sparrow, 2005).

Με την προσθήκη φρέσκων φρούτων μπορεί να πραγματοποιηθεί μια δεύτερη, αυθόρμητη ζύμωση, λόγω παρουσίας άγριων ζυμών στα φρούτα. Η παραμονή των φρούτων με τη μύρα είναι στους 6-9 μήνες και τα υπολειπόμενα σάκχαρα των φρούτων μετά τη ζύμωση δεν ξεπερνούν το 5% (Sparrow, 2005).

Η ανάμειξη φρούτων γίνεται συνήθως σε μια μύρα που προέρχεται από αυθόρμητη ζύμωση μετά από ένα χρόνο, ώστε να έχει εξελιχθεί είδη η συγκέντρωση των ταννινών, της οξύτητας και γενικά ο χαρακτήρας της μύρας. Στις Lambic, η προσθήκη φρούτων γίνεται τουλάχιστον μετά από ένα χρόνο, συνήθως στον δεύτερο, ενώ στις ξινές Flander τουλάχιστον 6 μήνες με την συνήθη πρακτική στους 18-24 μήνες (Sparrow, 2005).

Στο στάδιο της ζύμωσης με τη χρήση τους λόγω ότι περιέχουν επίσης σ' αυτά ενώσεις που είναι γλυκοζιδικά συνδεδεμένες παραλαμβάνονται ενώσεις υδατοδιαλυτές, μη πτητικές και άοσμες. Ο Βρετανομύκτης έχει την ικανότητα να υδρολύει αυτές τις μη πτητικές χημικές σε αρωματικές ενώσεις συμβάλλοντας θετικά στο προφίλ αρώματος της μύρας (Steensels et al., 2015). Σε μελέτη έδειξε ότι η δραστηριότητα της γλυκοζιδάσης από το Βρετανομύκτη συμβάλλει πιθανώς στην ανάπτυξη οργανοληπτικών χαρακτηριστικών στη διαδικασία παραγωγής στις παραδοσιακές μύρες τύπου Kriek (μύρες με κεράσι), λόγω ότι

ελευθερώνονται αρωματικές ενεργές ενώσεις που υπάρχουν στα κεράσια (Daenen, 2008; Steensels et al., 2015). Τέτοιες ενώσεις που προέρχονται από τα κεράσια είναι όπως η βενζαλδεύδη, λιναλόλη και ευγενόλη (Tonsmeire, 2014).

Σε μελέτη του 2016 με θέμα την βιολογική αρωματική εξέταση ζυμών παρατηρήθηκαν 2 Βρετανομύκητες *B. anomalus* YV396 και *B. bruxellensis* YV397, να έχουν ενζυμική δραστηριότητα της β-γλυκοζιδάσης, με τον *B. anomalus* να έχει την μεγαλύτερη. Στην ίδια μελέτη παρατηρήθηκε ότι μετά από ανάμεικτη ζύμωση με στέλεχος *Saccharomyces* που δεν είχε ενζυμική δραστηριότητα και το *B. anomalus*, να έχουν σημαντική διαφορά σε μύρες που περιείχαν κεράσια. Μετά από οργανοληπτική δοκιμασία χαρακτηρίστηκε η μύρα πιο φρουτένια με την παρουσία των κερασιών να είναι πιο έντονη (Janish, 2019).

Οι συνθήκες σε υψηλό pH είναι ιδανικές για την δραστηριότητα της β-γλυκοζιδάσης ανάλογα με το στέλεχος. Προσθέτοντας λυκίσκο ή φρούτα στην αρχή της παλαίωσης της μύρας λόγω υψηλού pH και χαμηλή σε συγκέντρωση σακχάρων στη μύρα υπάρχουν ιδανικές συνθήκες για τη δραστηριότητα της β-γλυκοζιδάσης. Το ζυθοποιείο Wicked Weed στις Η.Π.Α στην παραγωγή της Red Angel μια American Wild Ale προσθέτει σμέουρα όταν η μύρα μεταγγίζεται στα βαρέλια για παλαίωση εφόσον έχει προηγηθεί η έναρξη της ζύμωσης από τους Βρετανομύκητες. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα ο φρέσκος φρουτένιος χαρακτήρας να εξελιχθεί σ' αυτό της μαρμελάδας φρούτων, δείχνοντας ότι στελέχη του Βρετανομύκητα έχουν καλές δυνατότητες βιοσχηματισμού στην μύρα (Janish, 2019).

8.4 Εγκαταστάσεις ζυθοποιείου

Ο Βρετανομύκητας βρίσκεται εξωτερικά στη φύση συνήθως στο φλοιό των φρούτων, όπως φυτείες κερασιών και αμπελώνων. Οι Βρυξέλλες τις παλιές εποχές ήταν περικυκλωμένη από κερασιές όπου εξυπηρετούσαν ως "σπίτι" των Βρετανομυκήτων. Η μετάδοση στις εγκαταστάσεις των ζυθοποιείων ήταν εύκολη μέσω των εντόμων, των φρούτων αλλά και τον ίδιο τον άνθρωπο. Οι εκτεθειμένες ξύλινες εγκαταστάσεις, όπως πατώματα, δοκάρια, κεραμίδια και ειδικά τα βαρέλια παρείχαν ειδυλλιακό περιβάλλον για την ανάπτυξη τους κάτι που συνεχίζεται μέχρι τώρα (Sparrow, 2005).

Όπως αναφέρει ο Βέλγος ζυθοποιός Frank Boon κάποιες από τις άγριες ζύμες και βακτήρια βρίσκονται στον αέρα, ενώ οι Βρετανομύκητες μπορεί να βρεθούν και στα ξύλινα βαρέλια. Όμως σημαντικοί είναι και οι μικροοργανισμοί που ζούνε στο κτίριο, στους γυμνούς τοίχους και στα ξύλινα δοκάρια της στέγης κάνοντας σημαντικότερο την περιεκτικότητα σε μικροοργανισμούς τον αέρα μέσα στο ζυθοποιείο παρά έξω (Sparrow, 2005).

Ο ζυθοποιός και παραγωγός Lambic και Gueuze, Karel Goddeau, αναφέρει πόσο σημαντικός είναι ο χώρος του ζυθοποιείου ως προς τους μικροοργανισμούς. Η Ε.Ε. για την υγιεινή των χώρων του ζυθοποιείου ζητά τους τοίχους να είναι βαμμένοι από μη πορώδες υλικό, κάτι που είναι ενάντια στη φιλοσοφία παραγωγής. Κάθε ζυθοποιείο και εγκατάσταση είναι ξεχωριστή και διαφορετική από τα υπόλοιπα, διότι δίδεται σημασία στο υπάρχον 'terroir' μικροοργανισμών (Sparrow, 2005). Σε κάποια ζυθοποιία που παράγουν μύρες non-Saccharomyces, ιδίως όταν είναι παρών ο Βρετανομούκητας διατηρούν διπλό εξοπλισμό που ο καθένας χρησιμοποιείται μόνο για την κάθε περίπτωση. Έτσι έχοντας διαφορετικές αντλίες, λάστιχα, φλάντζες, βαλβίδες, εμφιαλωτικά εξαρτήματα κ.α. γίνεται διαχωρισμός εργασιών. Παραδείγματα τέτοιων ζυθοποιείων είναι στις Η.Π.Α. ο Captain Lawrence και Bruery, ενώ στο Russian River το προσωπικό φοράει και διαφορετικά ενδύματα ανάλογα με τη μύρα που επεξεργάζονται. Επίσης, στο ίδιο ζυθοποιείο δεν επιτρέπει στους υπαλλήλους του μετά από επεξεργασία ξινή μύρας να κυκλοφορούν σε χώρους που βρίσκονται οι υπόλοιπες, για αποφυγή μολύνσεων. Κάποια ζυθοποιία διατηρούν τα βαρέλια με τις μύρες non-Saccharomyces και Βρετανομούκητα σε διαφορετικά δωμάτια ή και διαφορετικά κτίρια από τις μη "ξινισμένες" μύρες (Tonsmeire, 2014).

Στο πόσο σημαντικό είναι η παρουσία αυτών των μικροοργανισμών στις εγκαταστάσεις ενός τέτοιου ζυθοποιείου δίδεται και από το ζυθοποιείο Lindemans στο Βέλγιο που παρά την κατασκευή νέου κτιρίου στις ίδιες εγκαταστάσεις, διατήρησε ανέπαφη την αίθουσα coolship, μαζί με τον ίδιο παλιό δοχείο coolship. Επίσης, στο ζυθοποιείο Cantillon στο Βέλγιο λόγω ανάγκης αλλαγής της στέγης πάνω από το δοχείο coolship ξαναχρησιμοποίησαν τα ίδια κεραμίδια για να στεγάσουν το κτίριο (Sparrow, 2005). Αντίθετα, σε κάποια ζυθοποιία που παράγονται διαφόρων τύπων μύρες, εκτός από διπλό εξοπλισμό που μπορεί να έχουνε εφαρμόζεται απολύμανση με θερμότητα. Το ζυθοποιείο Ithaca στις Η.Π.Α, που δεν έχει ξεχωριστό εξοπλισμό για τους Βρετανομούκητες και άλλους non-Saccharomyces, εκτός από το εμφιαλωτικό εφαρμόζει χημικά απολυμαντικά και στη συνέχεια πολύ υψηλές θερμοκρασίες νερού και ατμού (Tonsmeire, 2014).



Εικόνα 36. Coolship στο ζυθοποιείο Cantillon (http://drinkbelgianbeer.com/wp-content/uploads/2018/01/IMG_0386.jpg)

Το πιο ασφαλές υλικό μέσα στο ζυθοποιείο είναι ο ανοξείδωτος χάλυβας, διότι εύκολα καθαρίζεται και δύσκολα χαράζεται. Αντίθετα, το γυαλί και τα πλαστικά χαράσσονται εύκολα και αποτελούν αυξημένη εστία μόλυνσης και εύκολη εγκατάσταση από το Βρετανομύκητα (Tonsmeire, 2014).

8.4.1 Βαρέλια

Η ζύμωση και η ωρίμανση σε δρύινα βαρέλια, είναι μια κοινή πρακτική για ένα ζυθοποιείο και συμβάλει στη βελτίωση της σταθερότητας και των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών ενός τελικού προϊόντος. Κατά την επαφή της μπίρας με το ξύλο πολλά φαινόμενα συμβαίνουν, όπως η εκχύλιση συστατικών του ξύλου, η εξάτμιση πτητικών ενώσεων, η σταδιακή οξείδωση συστατικών της μπίρας, αλλά και η μεταξύ τους αντίδραση συστατικών του ξύλου και της μπίρας (Coelho et al., 2019). Οι μπίρες τέτοιου είδους που παράγονται σε ανοξείδωτες δεξαμενές δεν φτάνουν ποτέ στο ίδιο επίπεδο πολυπλοκότητας και πλήρους ζυμώσεως (super attenuation) σύγκριση με τα ξύλινα βαρέλια (Sparrow, 2005).

Σε μια εξελισσόμενη αγορά μπίρας το βαρέλι στη μικροζυθοποιεία έπαιξε σημαντικό ρόλο στην παραγωγή καινοτόμων προϊόντων. Παράγοντες όπως τύπος ξύλου, προέλευση ξύλου, τρόπος κατασκευής, μέγεθος, πρώην χρήση, παρουσία λάσπης, μικροοργανισμοί και συνθήκες παλαίωσης δίνουν δυνατότητες για απεριόριστους συνδυασμούς στη διαμόρφωση χαρακτήρα μιας μπίρας (Sparrow, 2005; Coelho et al., 2019). Κάθε βαρέλι θεωρείται ξεχωριστό διότι παράγει τα δικά του μοναδικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, λόγω του διαφορετικού μικροβιακού φορτίου που μπορεί να φέρει (Sparrow, 2005).

Οι παραδοσιακοί ζυθοποιοί, αλλά πλέον και οι σύγχρονοι, τα καλύτερα τους βαρέλια προέρχονται από ξυλεία δρυς, διότι ξεχωρίζουν για τη δύναμη τους, την αντίσταση στη φθορά και στην ευκολία χρήσης τους (Sparrow, 2005).

Οι παραγωγοί "άγριων" μπυρών συνήθως προτιμούν μεταχειρισμένα βαρέλια που προέρχονται από διαφορετικά αλκοολούχα ποτά, όπως οίνους, Port, Cognac, Whiskey και Bourbon. Τα δύο τελευταία θεωρούνται ότι δίνουν υπερβολικό χαρακτήρα σε μια μύρα που προέρχεται από αυθόρμητη ζύμωση, σε σημείο που να καλύπτει τα χαρακτηριστικά της. Σ' ένα μεταχειρισμένο βαρέλι που προέρχεται από κρασί υπάρχουν πιθανότητες να υπάρχουν εγκατεστημένες αποικίες Βρετανομύκητα, αλλά και άλλων μικροοργανισμών (Sparrow, 2005).

Το μέγεθος των βαρελιών και η χρήση τους από τους ζυθοποιούς ποικίλει. Στον πίνακα 46 παρουσιάζονται τα πιο συχνά μεγέθη που χρησιμοποιούν οι Βέλγοι ζυθοποιοί.

Πίνακας 46. Κοινά μεγέθη βαρελιών στο Βέλγιο (Sparrow, 2005)

Βαρέλια	Χωρητικότητα (Liters)
Bordeaux	225
Burgundy	228
Tonne	267
Pipe	650
Foudre	10000-30000

Ως σημαντικός παράγοντας κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και ωρίμανσης μιας μύρας θεωρείται από τους ζυθοποιούς το μέγεθος. Η αναλογία της εσωτερικής επιφάνειας ενός βαρελιού με τον συνολικό όγκο του ζυθογλεύκου συνεισφέρει στην ταχύτητα μιας ζύμωσης. Όσο μικρότερο είναι το βαρέλι τόσο μεγαλύτερη ποσότητα ζυθογλεύκου ή μύρας έρχεται σε επαφή με αποτέλεσμα την αύξηση εκχύλισης συστατικών από το ξύλο. Έτσι αυξάνοντας το μέγεθος ενός βαρελιού τόσο μικρότερη αναλογικά ποσότητα υγρού έρχεται σε επαφή με αποτέλεσμα μια πιο πολύπλοκη "άγρια" μύρα (Sparrow, 2005).

Το πορώδες στο ξύλο των βαρελιών παίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη μιας μύρας. Όσο μικρότερη είναι η αναλογία επιφάνειας με συνολική χωρητικότητα βαρελιού τόσο λιγότερο οξυγόνο διαλύεται μέσα στο ζυθογλεύκος ή μύρα. Επίσης, το πάχος των δούγιων ενός βαρελιού επηρεάζουν τη διάλυση οξυγόνου στη μύρα, με τις πυκνότερες να αφήνουν λιγότερο οξυγόνο να περάσει. Όσο μεγαλύτερο είναι ένα βαρέλι τόσο λιγότερο κατ' αναλογία οξυγόνο θα διαλυθεί μέσα στη μύρα (Sparrow, 2005). Ο Βρετανομύκητας, ως οξειδωτική ζύμη, εξαρτάται από το πορώδες του βαρελιού σε τι ποσότητες υποπροϊόντων θα παραγάγει. Οι αργές ζυμώσεις παράγουν περισσότερο πολύπλοκες μύρες με αυξημένα ποιοτικά χαρακτηριστικά (Sparrow, 2005). Στον πίνακα 47 παρουσιάζονται μετρήσεις διάλυσης οξυγόνου από διάφορα μεγέθη ξύλινων βαρελιών.

Πίνακας 47. Διάλυση O₂ σε διάφορους τύπους βαρελιών (Sparrow, 2005).

Τύπος βαρελιού	Χωρητικότητα (Liters)	O ₂ cc/L/έτος
Ξύλινη Δεξαμενή (Rodembach Brewery)	20000	0,53
Ξύλινη Δεξαμενή (Rodembach Brewery)	12000	0,86
Βαρέλι κρασιού	300	8,5
Μικρό Βαρέλι (Οικοζυθοποιίας)	40	23

Το μέγεθος του βαρελιού επηρεάζει την μύρα από τις αυξομειώσεις της θερμοκρασίας περιβάλλοντος. Όσο πιο μεγάλο σε μέγεθος είναι ένα βαρέλι τόσο πιο δύσκολο είναι να αλλάξει η θερμοκρασία εσωτερικά που βρίσκεται μια μύρα (Sparrow, 2005).

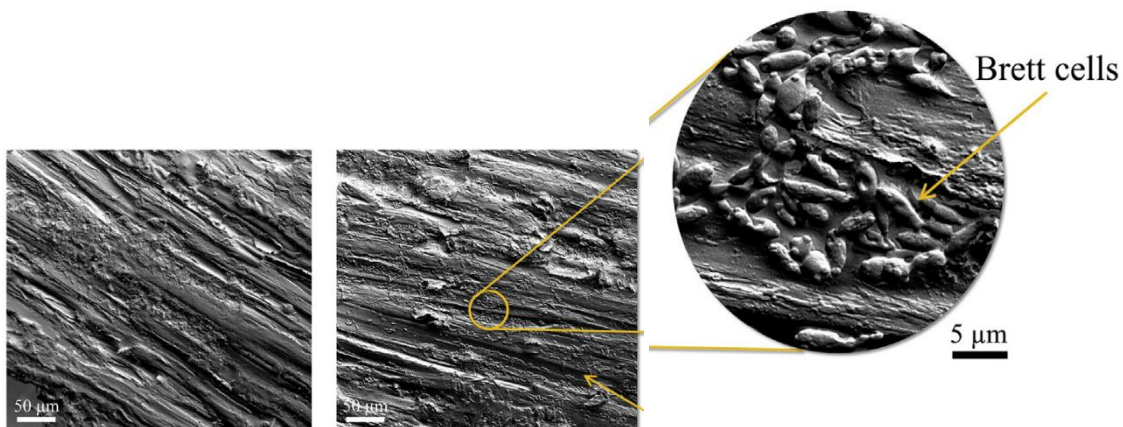
Η ανάπτυξη των ζυμών του Βρετανομύκητα μπορεί να γίνεται και μεταξύ των ινών του ξύλου και έχει την ικανότητα να δημιουργεί προστατευτικό βιοφίλμ ώστε να παραμένει ζωντανός με την πάροδο του χρόνου. Το βιοφίλμ αποτελείται από μικροβιακές κοινότητες επιφανειακών συνδεδεμένων κυττάρων ενσωματωμένο σε μια αυτοπαραγόμενη εξωκυτταρική πολυμερή μήτρα-καλούπι. Ο σχηματισμός βιοφίλμ αυξάνει την αντοχή του Βρετανομύκητα σε φυσικά και χημικά αίτια (Tubia et al., 2018). Η άσπρη συνήθως αυτή μεμβράνη (άνθηση) που σχηματίζεται στην επιφάνεια βοηθάει στη μείωση της διαλυτότητας του οξυγόνου στο γλεύκος/μύρα κατά τη μεγάλη σε διάρκεια διαδικασία ζύμωσης στο βαρέλι. Επίσης αποτρέπει στη δημιουργία ανεπιθύμητων μυκήτων και ενεργοποίηση οξικών βακτηρίων (Sparrow, 2005).

Οι Βρετανομύκητες με χαρακτηριστικό γονιδίωμα που σχετίζονται με τις εμπλουτισμένες μεμβράνες (π.χ. FIG.2, FLO1, FLO5, FLO9, HKR1, MUC1) μπορεί να έχουν πλεονέκτημα για επιβίωση στο κρασί ή μύρα που διατηρούνται σε δρύινα βαρέλια. Αυτό θα μπορούσε να προκαλέσει προσκόλληση των κυττάρων στο εσωτερικό τοίχωμα του βαρελιού και να προστατεύεται από το πλύσιμο και τον καθαρισμό με υψηλή πίεση (Christiaens et al., 2012; Steensels et al., 2015).



Εικόνα 37. Η λευκή μεμβράνη άνθησης προστατεύει την αυθόρμητη ζύμωση στο ζυθοποιείο Gulpener (Sparrow,2005).

Τα μεταχειρισμένα βαρέλια διατηρούν συστατικά από προηγούμενα φυλασσόμενα ποτά. Έτσι μεταφέρονται συστατικά παλαίωσης διαφορετικού ποτού στη μύρα. Εκτός από συστατικά μεταφέρονται και μικροοργανισμοί όπου μπορεί να βρίσκονται στους πόρους του ξύλου. Αυτά μπορεί να είναι βακτήρια όπως *Lactobacillus* και *Enterobacter* και άγριες ζύμες όπως *Debaryomyces*, *Candida* και ο Βρετανομύκητας (Coelho et al., 2019). Η παρουσία του Βρετανομύκητα, αλλά και άλλων μικροοργανισμών που μπορεί να συντηρηθούν στο βαρέλι, έχουν ανιχνευθεί σε βάθος 8 mm στις σανίδες του βαρελιού (Tubia et al., 2018).



Εικόνα 38. Εσωτερική επιφάνεια ξύλινου βαρελιού χωρίς (αριστερά) και με παρουσία (δεξιά) Βρετανομύκητα (Tubia et al., 2018).

Στην εικόνα 38, στη δεξιά φωτογραφία απεικονίζεται η παρουσία του Βρετανομύκητα στο εσωτερικό ενός βαρελιού με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, ενώ στην αριστερή είναι καθαρή (Tubia et al., 2018). Ορισμένα είδη Βρετανομύκητα έχουν την ικανότητα να υδρολύουν την κελλοβιόζη (cellobiose), ένα σύνθετο σάκχαρο που υπάρχει στο ξύλο του βαρελιού και να συνεχίζεται περαιτέρω η ζύμωση του σε αιθανόλη. Αυτό πραγματοποιείται με τη βοήθεια του ενζύμου της β-γλυκοζιδάσης που απαντάται συχνά σε διάφορα στελέχη Βρετανομύκητα. Αυτό ίσως να είναι μια εξήγηση γιατί ο Βρετανομύκητας μπορεί να επιβιώσει για χρόνια μέσα σε ξύλινα βαρέλια. (Steensels et al., 2015). Η χρήση κομματιών δρυς (oak chips) σε ανοξειδωτή δεξαμενή συνεχίζει να προμηθεύει τον Βρετανομύκητα με πολύτιμους υδατάνθρακες (Sparrow, 2005).

Τα στελέχη του Βρετανομύκητα έχουν την ιδιότητα να παράγουν πτητικά συστατικά όπου επηρεάζουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της μύρας (Coelho et al., 2019).

Πίνακας 48. Πτητικές φαινόλες σε βαρέλι (Coelho et al., 2019)

Πτητικές φαινόλες	Άγριες Ζύμες + Βαρέλι (μg/L)	Εμβολιασμός <i>S. cerevisiae</i> + Βαρέλι (μg/L)	Χωρίς εμβολιασμό Χωρίς βαρέλι (μg/L)
4-αιθύλογουαϊκόλη	1103.6 ± 59.9	108.9 ± 82.1	nd
4-αιθύλοφαινόλη	397.3 ± 13.9	48.4 ± 32.0	nd

Μελέτη που έγινε για τη μέτρηση πτητικών συστατικών μετά την παλαίωση μύρας σε δρύινο βαρέλι που προερχόταν από γλυκό κρασί του Πόρτο με τη μέθοδο GC-MS, βρέθηκε ότι κατά τη δεύτερη ζύμωση που έγινε στο βαρέλι μετά από 3 μήνες με τις υπάρχουσες άγριες ζύμες, η συγκέντρωση των φαινολών ήταν υψηλότερη από τα άλλα δείγματα (Πίνακας 48). Στο δείγμα όπου εμβολιάστηκε *S. cerevisiae* στο βαρέλι είχε πολύ μειωμένη παραγωγή πτητικών φαινολών και με το δείγμα που απλώς εμφιαλώθηκε δεν υπήρξε καθόλου παραγωγή. Η αυξημένη παραγωγή 4-αιθύλογουαϊκόλη και 4-αιθύλοφαινόλη σχετίζεται με την παρουσία και την ανάπτυξη του Βρετανομύκητα. Επίσης, η παρουσία του Βρετανομύκητα στο βαρέλι έπαιξε ρόλο στην υψηλότερη παραγωγή αιθυλικής αλκοόλης σύγκριση με τα άλλα δύο δείγματα, δείχνοντας την υψηλή ικανότητα αποζύμωσης όλων των υπολειπόμενων σακχάρων (Coelho et al., 2019).

Ο καθαρισμός των βαρελιών με χημικά διαλύματα και ιδίως με αυτούς που περιέχουν χλώριο δεν συνίσταται λόγω απελευθέρωσης ανεπιθύμητων οσμών και γεύσεων. Οι περισσότερες τυποποιημένες διαδικασίες υγιεινής περιλαμβάνουν χρήση ζεστού νερό ή μέθοδοι με ατμό (Tubia et al., 2018). Συνήθης πρακτική πλύσιμου βαρελιών είναι το ξέπλυμα με κρύο νερό και

στη συνέχεια διαβροχή με ζεστό νερό έως τους 60 °C, με κάποιους να φτάνουν τους 77 °C. Η διαβροχή γίνεται με συνδυασμό χαμηλής και υψηλής πίεσης (Sparrow, 2005).

Στο ζυθοποιείο Rodenbach όπου γίνεται παραγωγή Lambic κάθε 20 χρόνια αποσυναρμολογούν, τρίβουν και καθαρίζουν τις ξύλινες δεξαμενές (foudre), ενώ σε κάθε γέμισμα με φρέσκια μύρα έχει προηγηθεί πλύσιμο, ξύσιμο και απολύμανση (ατμό). Οι ζυθοποιοί Flanders κάνουν αυτή τη διαδικασία κάθε 2 γεμίσματα των ξύλινων δεξαμενών (Sparrow, 2005).

8.5 Επίσημοι αναλυτικοί μέθοδοι στην μύρα

Οι επίσημοι αναλυτικοί μέθοδοι στην Ευρώπη για την μύρα μπορεί οποιοσδήποτε επαγγελματίας που ασχολείται σε οποιοδήποτε τομέα παραγωγής μύρας να τις βρει στην ιστοσελίδα του οργανισμού E.B.C (European Brewery Convention) (<https://brewup.eu/ebc-analytica/search>) και διατίθεται με συνδρομή.

Οι μέθοδοι που είναι ενδιαφέρον για τον εντοπισμό του Βρετανομύκητα και αναφέρονται στο Analytica EBC περιγράφονται πιο κάτω.

Η μέθοδος 4.2.7 (Dekkera/Brettanomyces) βασίζεται στην ποσοτική ανίχνευση άγριων ζυμών Βρετανομύκητα σε δείγματα ζύμης ζυθοποιίας, μύρας εν ζύμωση και φιλτραρισμένης μύρας. Στο θρεπτικό μέσο του Βρετανομύκητα στηρίζεται στην παραγωγή οξικού οξέος (<https://brewup.eu/ebc-analytica/detection-of-contaminants/dekkera-formerly-brettanomyces/4.2.7>).

Μια πιο γενική μέθοδος είναι η 4.2.6 όπου αφορά την ανίχνευση και απαρίθμηση ζυμών non-Saccharomyces σε μύρα εν ζύμωση ή άλλα δείγματα που περιέχουν ζύμες. Η τεχνική βασίζεται σε τρυβλία με αζωτούχα θρεπτικά και λυσίνη (<https://brewup.eu/ebc-analytica/detection-of-contaminants/non-saccharomyces-yeasts/4.2.6>).

Η μέθοδος 2.3.9.5 βασίζεται στην ανίχνευση φαινολικών Off Flavour (POF). Οι απομονωμένες ζύμες σε τρυβλία με άγαρ μπορούν να ελεγχθούν για πιθανότητες αλλοίωσης λόγω της ικανότητάς τους να αποκαρβοξυλιώνουν οργανικά οξέα, παράγοντας χαρακτηριστική οσμή. Παρατηρείται η αποκαρβοξυλίωση του φερουλικού οξέος σε 4-βινυλογουαϊακόλη, δηλαδή άρωμα γαρίφαλου (<https://brewup.eu/ebc-analytica/microbiological-techniques/phenolic-off-flavour-pof/2.3.9.5>).

Στις Η.Π.Α. υπάρχει αντίστοιχα το ASBC (American Society of Brewing Chemists) που παρέχει αντίστοιχα μεθόδους ανάλυσης. Οι μέθοδοι μερικές φορές δίδονται και με συνεργασία με το EBC ως κοινοί.

Κάποιοι μέθοδοι που μπορεί να βοηθήσουν στον εντοπισμό του Βρετανομύκητα και δίδονται από τον ASBC αναφέρονται πιο κάτω:

(<https://www.asbcnet.org/Methods/MicrobiologyMethods/Pages/default.aspx>).

Η μέθοδος Yeast 13 βασίζεται στη διαφοροποίηση στελεχών ζύμης με τη χρήση PCR Fingerprinting. Αυτή η μέθοδος περιγράφει τη διαδικασία κατά την οποία ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινιτές (oligonucleotide primers) χρησιμοποιούνται για την παραγωγή δακτυλικού αποτυπώματος DNA.

Η μέθοδος Yeast 16 βασίζεται στην ανίχνευση φαινολικής ζύμης με την αποκαρβοξυλίωση του φερουλικού οξέος με αποτέλεσμα τον σχηματισμό 4-βινυλογουαιακόλης. Η ανίχνευση βασίζεται σε μια αισθητηριακή αρωματική εκτίμηση για να προσδιοριστεί εάν υπάρχει το χαρακτηριστικό φαινολικού του γαρίφαλου ή του καπνού.

Μεταξύ των άλλων μικροβιολογικών μεθόδων, σημαντικές επίσης είναι και οι ακόλουθοι:

- Microbiological Control 4. General Culture Media
- Microbiological Control 5. Differential Culture Media

(<https://www.asbcnet.org/Methods/MicrobiologyMethods/Pages/default.aspx>)

9. Επίλογος -Συμπεράσματα

Στην παραγωγή της μύρας, ο Βρετανομύκητας πάντα υπήρχε και η παρουσία του πλέον στη βιομηχανία της μύρας είτε είναι ανεπιθύμητη, είτε επιθυμητή σε ορισμένες περιπτώσεις. Αποτελεί μια από τις κύριες άγριες ζύμες στην παραγωγή ξινών ή άγριων μπυρών. Η επίσημη ανακάλυψη του από το Δανό Claussen έδωσε στην περαιτέρω έρευνα τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα αυτού του μικροοργανισμού. Οι διάφορες οικολογικές θέσεις του Βρετανομύκητα που ερευνήθηκαν έδωσαν την καλύτερη κατανόηση στη φυσιολογία και στο μεταβολισμό της ζύμης. Ο εντοπισμός του στη φύση ή στις εγκαταστάσεις ενός ζυθοποιείου δείχνει τις φυσικές και υψηλές αντοχές του στα διαφορετικά φυσικά περιβάλλοντα. Χαρακτηριστικά γνωρίσματα του Βρετανομύκητα είναι η αντοχή του σε υψηλές συγκεντρώσεις σε αιθυλική αλκοόλη, η ιδιότητα να ευδοκιμεί σε συνθήκες χαμηλού pH, σε χαμηλές συγκεντρώσεις O₂ και θρεπτικών υποστρωμάτων. Ξεχωρίζει για την ικανότητά του να μεταβολίζει μονοσακχαρίτες, δισακχαρίτες, τρισακχαρίτες και δεξτρίνες. Επίσης, η ευχέρεια στη χρήση μεγάλου εύρους αμινοξέων και η στρατηγική του να επιβιώνει σε χαμηλά σε περιεκτικότητα αζώτου περιβάλλοντα, κάνει το Βρετανομύκητα πιο ανθεκτικό στη ζύμωση.

Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης σημαντικά υποπροϊόντα παράγονται από τον Βρετανομύκητα όπου συμβάλουν στο χαρακτήρα της παραγόμενης μπύρας. Αυτά που ξεχωρίζουν είναι τα οξέα, πτητικές φαινόλες, εστέρες και τετραϋδροπυριδίνες.

Η ζύμη αυτή ξεχωρίζει για την παραγωγή πτητικών φαινολών όπως 4-αιθυλογουαιακόλη και 4-αιθυλοφαινόλη. Ανάλογα με το στέλεχος παράγεται και αντίστοιχα η ανάλογη συγκέντρωση, με αποτέλεσμα τον ανάλογο οργανοληπτικό χαρακτήρα στην παραγόμενη μπύρα, από πικάντικο έως και βαρύ ζωικό. Η παραγωγή ποσοτήτων φερουλικού οξέος εξαρτάται και από τις θερμοκρασίες πολτοποίησης και τα χρησιμοποιούμενα σιτηρά, όπου μετέπειτα θα μετατραπεί σε 4-αιθυλογουαιακόλη από τον Βρετανομύκητα.

Ανάλογα με το είδος και το στέλεχος του Βρετανομύκητα παράγονται αρώματα και γεύσεις από οξέα και αλκοόλες που μετατρέπονται σε εστέρες.

Η δραστηριότητα των ενζύμων α-γλυκοζιδάση και β-γλυκοζιδάση από τους Βρετανομύκητες χρησιμοποιούνται για την αποικοδόμηση ενώσεων. Με το ένζυμο α-γλυκοζιδάση υδρολύονται πολυσακχαρίτες σε απλά σάκχαρα, ενώ η δραστηριότητα της β-γλυκοζιδάσης χαρακτηριστικό της να σπάει και την κελλοβιόζη σε πιο απλά σάκχαρα. Η κελλοβιόζη βρίσκεται στα δρύινα βαρέλια και αποτελεί παράγοντα επιβίωσης του Βρετανομύκητα στο περιβάλλον αυτό.

Έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνικές ανίχνευσης του Βρετανομύκητα, ώστε να μπορούν να απομονωθούν, να καταμετρηθούν και να ταυτοποιηθούν. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται παρουσιάζουν πλεονεκτήματα όσο και μειονεκτήματα. Ένα ζυθοποιείο χρειάζεται πλέον μια γρήγορη, ευαίσθητη, όσο γίνεται πιο απλή και φτηνή μέθοδο ώστε να μπορεί να εντοπίσει το Βρετανομύκητα μέσα στις μπύρες του ή στους χώρους του. Φυσικά σ' ένα ζυθοποιείο που δεν θέλει την παρουσία του Βρετανομύκητα στόχος του πρώτα είναι η πρόληψη, εφαρμόζοντας μεθόδους αποφυγής και συστηματικό έλεγχο.

Η χρήση του Βρετανομύκητα στη ζυθοποιία εσκεμμένα ή μη, ξεκινάει πολλά χρόνια πίσω. Αυτό έδωσε τη δυνατότητα στη δημιουργία διαφορετικών στυλ μπύρας ανά περιοχή. Οι παραδοσιακές Farmhouse Ale στη Β. Ευρώπη έδωσαν τη δυνατότητα τότε στην ανάπτυξη αυτής της μπύρας στην τότε Ευρώπη. Η παρουσία του Βρετανομύκητα γίνεται αισθητή στην παραγωγή μπυρών στο Βέλγιο τύπου Lambic και Gueuze μέσω αυθόρμητης ζύμωσης. Όμως η επανάσταση και αναβίωση των τεχνικών ζυθοποίησης με την παρουσία Βρετανομύκητα έγινε από την ανάπτυξη των μικροζυθοποιίων, ιδίως στις Η.Π.Α. Πολλές ζυθοποιίες προσπάθησαν να μιμηθούν τα στυλ και τις διαδικασίες παραγωγής, με αποτέλεσμα να γίνει αναβίωση αυτών των ειδών μπύρας και συγχρόνως να εκσυγχρονιστούν και να δημιουργηθούν νέες τάσεις στην αγορά. Με την τεχνολογία να αναπτύσσεται στον κλάδο της μπύρας, αυτό έχει ως συνέπεια τη συνεχή βελτίωση ποιότητας και τεχνικών στην παραγωγή μπύρας. Η

ανάπτυξη τόσο στην καλλιέργεια όσο και στην τεχνολογία βυνοποίησης δημητριακών έχει ως συνέπεια την παραγωγή καλύτερων βυνών. Η δημιουργία νέων ποικιλιών και η τεχνολογία συμπύκνωσης αρωμάτων από τους λυκίσκους, έχει ως αποτέλεσμα στην παραγωγή πιο πολύπλοκων αρωματικών και γευστικών προφίλ μύρας. Η συνεχής αναπτυσσόμενη τεχνολογία στη ζυθοποίηση δίνει το πλεονέκτημα στα ζυθοποιεία στον έλεγχο και στην ποιοτικότερη παραγωγή προϊόντων. Οι ζυθοποιοί έχουν μεγαλύτερες πλέον επιλογές σε χρήση απομονωμένων Βρετανομυκήτων και επιπλέον νέα στελέχη δίνονται στην αγορά από τις εταιρείες παραγωγής και πώλησης μικροοργανισμών.

Ο Βρετανομύκητας αν και θεωρείται ζύμη επιμόλυνσης στα περισσότερα ζυθοποιεία, χρησιμοποιείται σήμερα από μια μικρή μερίδα μικροζυθοποιείων για να παράξουν νέους διαφοροποιημένους τύπους ζύθου, με πολύπλοκα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, και όπως διαφαίνεται αυτή η τάση θα συνεχιστεί.

10. Βιβλιογραφία

- Abernathy D.G., Spedding G., Starcher B. (2009). Analysis of protein and total usable nitrogen in beer and wine using a microwell ninhydrin assay. *J. Inst.Brew.* 115 pp.122-127.
- ASBC. (2021). ASBC Methods of Analysis, 14th Edition. American Society of Brewing Chemists. <https://www.asbcnet.org/Methods/Pages/default.aspx>
- Barata A., Caldeira J., Botelho, Pagliara D., Malfeito-Ferreira M., Loureiro V. (2008). Survival patterns of *Dekkera bruxellensis* in wines and inhibitory effect of sulphur dioxide. *International Journal of Food Microbiology* 121, pp.201-207.
- Barnes Thomas (2011). BJCP Style Flashcards, World-wide certifying organization.
- Barnett J.A., Entian K.D. (2005). A history of research on yeasts 9: regulation of sugar metabolism. *Yeast* 22, pp.835-894.
- Basilio A. C., de Araujo P. R. L., de Moraes J. O. F., da Silva Filho E. A., de Moraes M. A., Jr. Simoes D.A. (2008) Detection and identification of wild yeast contaminants of the industrial fuel ethanol fermentation Process. *Curr. Microbiol* 56 pp.322-326.
- Blomqvist J. (2011). *Dekkera Bruxellensis – a Competitive Yeast for Ethanol Production from Conventional and Non-conventional Substrates*. Doctoral Thesis. Swidish University of Agricultural Sciences, Uppsala.
- Blomqvist J., Eberhard T., Schnurer J., Passot V. (2010). Fermentation characteristics of *Dekkera bruxellensis* strains. *Appl Microbiol. Biotechnol* 87 pp.1487-1497.
- Blomqvist J., Nogue V.S., Gorwa-Grausland M., Passoth V. (2012). Physiological requirements for growth and competitiveness of *Dekkera bruxellensis* under oxygen-limited or anaerobic conditions. *Yeast* 29 pp.265-274.
- Bokulich N.A., Bamforth C.W. (2013). The microbiology of malting and brewing. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 77. pp. 157-172.
- Bokulich N.A., Bamforth C.W., Mills D.A. (2012). Brewhouse-resident microbiota are responsible for multi-stage fermentation of American coolship ale. *PLoS one* 7, e35507.
- Borneman A.R., Zeppel R., Chambers P.J., Curtin C.D. (2014). Insights into the *Dekkera bruxellensis* genomic landscape: comparative genomics reveals variations in ploidy and nutrient utilisation potential amongst wine isolates. *Plos Genet* 10 (2) e1004161.
- Buglass A.J. (2011). *Handbook of Alcoholic Beverages, Technical, Analytical and Nutritional Aspects*, Wiley, Hoboken, NJ.

- Buron N., Coton M., Legendre P., Ledauphin J., Kientz-Bouchart V., Guichard H., Barillier D., Coton E. (2011). Implications of *Lactobacillus collinoides* and *Brettanomyces/Dekkera anomala* in phenolic off-flavour defects of ciders. *International Journal of Food Microbiology* 153 (2012) pp. 159-165.
- Caruso M., Fiore C., Contursi M., Salzano G., Paparella A., Romano P. (2002). Formation of biogenic amines as criteria for the selection of wine yeasts. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 18, pp. 159-163.
- Christiaens J.F., Van Mulders S.E., Duitama J., Brown C.A., Ghequire M.G., De Meester L., Michiels J., Wenseleers T., Voordeckers K., Veerstepen K.J. (2012). Functional divergence of gene duplicates through ectopic recombination. *EMBO reports* Vol.13 pp.1145-1151.
- Ciani M., Comitini F. (2014). *Brettanomyces*. *Encyclopedia of Food Microbiology*. 2 edition Elsevier, pp. 316-323.
- Claussen, N.H. (1904). On a method for the application of Hansen's pure yeast system in the manufacturing of well-conditioned English stock beers. *J. Inst. Brew.* 10 pp. 308-331.
- Coelho E, Megalhaes J., Pereira F. B., Macieira F., Domingues L., Oliveira J.M. (2019). Volatile fingerprinting differentiates diverse-aged craft beers. *Food Science and Technology* 108 pp.129-136.
- Colomer M. S., Funch B. and Forster J. (2018). The raise of *Brettanomyces* yeast species for beer production. *Current opinion in Biotechnology*, 56, pp. 30-35.
- Conterno L. Joseph C. Arvik T.J., Henicke-Kling T., Bisson L. F. (2006). Genetic and physiological characterization of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from wines. *Am. J. Enol. Vitic* 57 pp.139-147.
- Conterno L., Aprea E., Franceschi P., Viola R., Vrhovsek U. (2013). Overview of *Dekkera bryxellensis* behaviour in an ethanol-rich environment using untargeted and targeted metabolomic approaches. *Food Research International* 51, pp.670-678.
- Crauwels S., Van Assche A., de Jonge R., Borneman A. Verreth C., Troels P., De Samblanx G., Marchal K., Van de Peer Y., Willems K.A., Verstrepen K.J., Curtin C.D., Lievens B. (2015). Comparative phenomics and targeted use genomics reveals variation in carbon and nitrogen assimilation among different *Brettanomyces bruxellensis* strains. *Appl Microbiol Biotechnol* 99 pp.9123-9134.
- Crauwels S., Zhu B., Steensels J., Busschaert P., De Samblanx G., Marchal K., Willems K.A., Verstrepen K.J., Lievens B. (2014). Assessing genetic diversity in *Brettanomyces* yeasts

- using DNA fingerprinting and whole genome sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* 80 pp.4398-4413.
- Curtin C., Kennedy E., Henschke P.A. (2012). Genotype-dependent sulphite tolerance of Australian *Dekkera* (*Brettanomyces*) *bruxellensis* wine isolates. *Letters in Applied Microbiology* 55 pp.56-61.
- Curtin C., Langhans G., Henschke G., Grbin P. R. (2013). Impact of Australian *Dekkera bruxellensis* strains grown under oxygen-limited conditions on model wine composition and aroma. *Food Microbiol.* 36 pp. 241-247.
- Daenen L. (2008). Exploitation of the flavour potential of hop and sour cherry glycosides by *Saccharomyces* and *Brettanomyces* glycoside hydrolase activities. *Biongenieurswetenschappen, KUL, Leuven.*
- Daenen L., Sterckx F., Delvaux F.R., Verachtert H., Derdelinckx G. (2008). Evaluation of the glycoside hydrolase activity of a *Brettanomyces* strain on glycosides from sour cherry (*Prunus cerasus* L.) used in the production of special fruit beers. *FEMS Yeast Res.* 8, pp.1103-1114.
- de Barros Pita E., Leite F.C., de Souza Liberal A.T., Simoes D.A., de Morais Jr. M.A. (2011). The ability to use nitrate confers advantage to *Dekkera bruxellensis* over *S.cerevisiae* and can explain its adaptation to industrial fermentation processes. *Antonie Van Leeuwenhoek* 100, pp. 99-107.
- de Barros Pita W., Silva D.C., Simoes D.A., Passoth V., de Morais Jr M.A. (2013). Physiology and gene expression profiles of *Dekkera bruxellensis* in response to carbon and nitrogen availability. *Antonie van Leeuwenhoek* 104 pp.855-868.
- de Souza Liberal A.T., Basilio A.C.M., do Monte Resende A., Braselleiro B.T.V., da Silva-Filho, de Morais J.O.F., D.A Simoes, de Morais Jr M.A. (2007) Identification of *Dekkera bruxellensis* as a major contaminant yeast in continuous fuel ethanol fermentation. *Journal of Applied Microbiology* 102 pp.539-547.
- Dias L., Pereira da Silva S., Tavares M., Malfeito-Ferreira M., Loureiro V. (2003). Factors affecting the production of 4-ethylphenol by the yeast *Dekkera bruxellensis* in enological conditions. *Food Microbiology* 20 pp.377-384.
- Dweck H.K., Ebrahim S.A., Farhan A., Hansson B.S., Stensmyr M.C. (2015). Olfactory Proxy Detection of Dietary Antioxidants in *Drosophila*. *Current Biology* 25, pp.455-466.

- EBC. (2019). Analytica EBC. European Brewery Convention. <https://brewup.eu/ebc-analytica/about>
- Fischer G., James S.A., Robers I.N., Oliver S.G., Louis E.J. (2000). Chromosomal evolution in *Saccharomyces*. *Nature* 405, pp. 451-454.
- Freer S.N., Dien B., Matsuda S. (2003). Production of acetic acid *Dekkera/Brettanomyces* yeasts under conditions of constant pH. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 19, pp.101-105.
- Galafassi S., Capusoni C., Moktaduzzaman M., Compagno C. (2013). Utilization of nitrate abolishes the “Custers effect” in *Dekkera bruxellensis* and determines a different pattern of fermentation products. *J.Ind.Microbiol Biotechnol* 40 pp.297-303.
- Galafassi S., Merico A., Pizza F., Hellborg L.,Molinari F., Piskur J., Compagno C. (2011). *Dekkera/Brettanomyces* yeasts for ethanol production from renewable sources under oxygen-limited and low-pH conditions. *J. Ind. Microbiol Biotechnol.* 38 pp.1079-1088.
- Garshol Lars Marius. (2020). *Historical Brewing Techniques: The lost art of Farmhouse brewing*, Brewers Publications.
- Gawel R. (2004). *Brettanomyces Character in Wine*. Australian Society of Wine Education National Convention, Hunter Valley, Australia.
- Gilliland, R.B. (1961). *Brettanomyces* I. Occurrence, characteristics, and effects on beer flavor. *Journal of the Institute of Brewing* 67, issue 3: 257-61.
- Guichard H., Poupard P., Legoahec L., Millet M., Bauduin R., Le Quere J-M. (2018). *Brettanomyces anomalus*, a double drawback for cider aroma. *Food Science and Technology* 102 pp. 214-222.
- Guzzo J., Desroche N. (2009) Physical and chemical Stress factors in lactic acid bacteria. *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. Springer, Berlin Heidelberg pp.293-306.
- Hellborg L., Piskur J. (2009). Complex nature of the genome in a wine spoilage yeast, *Dekkera bruxellensis*. *Eukaryotic Cell* pp.1739-1749.
- Henick-Kling T., Egli C., Licker J., Mittrakul C., Acree T.E. (2000). *Brettanomyces* in wine. *Proceeding of the 5th International Symposium on Cool Climate Viticulture and Oenology*, Melbourne, Australia.
- Hieronimus Stan, (2010). *Brewing with Wheat: The ‘Wit’ and ‘Weizen’ of World Wheat Beer Styles*, Brewers Publications.

- Holt S., Mukherjee V., Lievens B., Verstrepen K. J., Thevelein J. M. (2017). Bioflavoring by non-conventional yeasts in sequential beer. *Food Microbiology* 72 pp. 55-66.
- Janish Scott, (2019). *The New Ipa: A scientific guide to hop aroma and flavor*.
- Johnson E. A., 2012. Biotechnology of non-Saccharomyces yeasts-the ascomycetes. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 97 pp.503-517.
- Kayode A.P.P., Vieira-Dalode G., Linnermann A.R., Kotchoni S.O., Hounhouigan A.J.D., van Boekel M.A.J.S., Nout M.J.R. (2011). Diversity of yeasts involved in the fermentation of tchoukoutou, an opaque sorghum beer from Benin. *African Journal of Microbiology Research* 5, pp.2737-2742.
- Kunkee R. E., Eschnauer H. R. (2003). *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 6th edition, Chadwick S.S., Wiley, Germany, pp. 393-431.
- Kurtzman C.P., Fell J. W., Boekhout T., (2011). *The Yeasts, a Taxonomic Study*, Volume 1, Fifth Edition, Elsevier B.V.
- Lachance M. (1995). Yeast communities in a natural tequila fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek* 68 p.p 151-160.
- Leite F.C.B., Basso T.O., de Barros Pita W., Gombert A.K., Simoes D.A., de Morais Jr M.A. (2012). Quantitative aerobic physiology of the yeast *Dekkera bruxellensis*, a major contaminant in bioethanol production plants. *FEMS Yeast Res.* 13, pp.1-10.
- Licker, J.L., Acree, T.E., Henick-Kling, T. (1999). What is "Brett" (*Brettanomyces*) flavour? A preliminary investigation. In: *Chemistry Wine Flavor*. ACS Symp. Series, 714, pp. 96-115.
- Mansfield A.K., Zoecklein B. W., Whiton R. S. (2002). Quantification of Glycosidase activity in selected strains *Brettanomyces bruxellensis* and *Oenococcus oeni*. *Am.J.Enol.Vitic* 53 pp. 303-307.
- Manzanares P., Rojas V., Genoves S, Valles S. (2000). A preliminary search for anthocyanin- β -D-glucosidase activity in non-Saccharomyces wine yeasts. *International Journal of Food Science and Technology* 35 pp.95-103.
- Markowski P. (2004). *Farmhouse Ales: Culture and Craftsmanship in the Belgian Tradition*, Brewers publications.
- McMahon H., Zoecklein B. W., Fugelsang K., Jisinski Y. (1999). Quantification of glycosidase activities in selected yeasts and lactic acid bacteria. *J.Ind.Microbiol.Biotechnol.* 23, pp.198-203.

- Mehlomakulu N.N., Setati M.E., Divol B. (2014). Characterization of novel killer toxins secreted by wine-related non-Saccharomyces yeasts and their action on *Brettanomyces* spp. *International Journal of Food Microbiology* 188, pp.83-91.
- Morneau A.D., Zuehlke J.M., Edwards C.G. (2011). Comparison of media formulations used to selectively cultivate *Dekkera/Brettanomyces*. *Letters in Applied Microbiology* 53, pp. 460-465.
- Morrissey, W.F., Davenport, B., Querol, A., Dobson, A.D.W. (2004). The role of indigenous yeasts in traditional Irish cider fermentations. *J. Appl. Microbiol* 97 pp. 647-655.
- Oelofse A. (2008). Investigating the role of *Brettanomyces* and *Dekkera* during winemaking. Stellenbosch University, Institute for wine biotechnology, Faculty of AgriSciences.
- Oelofse A. Pretorius I.S., Su Toit M. (2008). Significance of *Brettanomyces* and *Dekkera* during Winemaking. A Synoptic Review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 29, pp.128-144.
- Papazian C. Jackson M., Swersey C., Gatza P., Skypeck C., Kirkpatrick K., Williams C., Sparhawk A., Rabin D., (2021). *Brewers Association Beer Style Guidelines, USA.*
- Papazian C. Jackson M., Swersey C., Gatza P., Skypeck C.,(2015). *Brewers Association Beer Style Guidelines, USA.*
- Piskur J., Ling Z., Marcet-Houben M., Ishchuk O.P., Aerts A., LaButti K., Copeland A., Lindquist E., Barry K., Compagno C., Bisson L., Grigoriev I.V., Gabaldon T., Phister T. (2012). The genome of wine yeast *Dekkera bruxellensis* provides a tool to explore its food-related properties. *International Journal of Food Microbiology* 157 pp.202-209.
- Piskur J., Rozpedowska E., Polakova S., Nerico A., Compagno C. (2006). How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? *TRENDS in Genetics* 22, pp.183-186.
- Preedy, V.R. (2009). *Beer in Health and Disease Prevention.* Academic Press, London, UK.
- Prochazka E., Polakova S., Piskur J., Sulo P. (2010). Mitochondrial genome from the facultative anaerobe and petite-positive yeast *Dekkera bruxellensis* contains the NADH dehydrogenase subunit genes. *FEMS Yeast Res.* 10, pp.545-557.
- Reis A.L.S., de Souza R.d.F.R., Torres R.R.N.B., Leite F.C.B., Paiva P.M.G., Vidal E.E., de Morais Jr.,M.A. (2014). Oxygen-limited cellobiose fermentation and the characterization of the cellobiase of an industrial *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* strain. *SpringerPlus* 3/38.

- Ribereau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D. (2006). Handbook of Enology Volume 2. The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments 2nd Edition. John Wiley & Sons.
- Rodriguez-Saona L.E., Fry F.S., McLaughlin M.A., Calvey E.M. (2001). Rapid analysis of sugars in fruit juices by FT-NIR spectroscopy. *Carbohydrate Research* 336 pp.63-74.
- Romano A., Perello M.C., de Revel G., Lonvaud-Funel A. (2008). Growth and volatile compound production by *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* in red wine. *Journal of Applied Microbiology* 104 pp.1577-1585.
- Rossi B., Manasse S., Serrani F., Berardi E. (2005). *Hansenula polymorpha* NMR2 and NMR4, two new loci involved in nitrogen metabolite repression. *FEMS Yeast Research* 5 pp.1009-1017.
- Rozpedowska E., Hellborg L., Ishchuk O.P., Orhan F., Galafassi S., Merico A., Woolfit M., Compagno C., Piskur J. (2011). Parallel evolution of the make-accumulate-consume strategy in *Saccharomyces* and *Dekkera* yeasts. *Nature Communications* 2:302.
- Salam M., Rousseaux S., Sequeira-Le Grand A., Divol B., Alexandre H. (2013). Characterization of the Viable but Nonculturable (VBNC) state in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLOS ONE* Vol.8, Issue 10, e77600.
- Scheffers W.A. (1961). On the inhibition of alcoholic fermentation of *Brettanomyces* yeasts under anaerobic conditions. *Experientia* 17, pp.40-42.
- Shantha Kumara H.M.C., De Cort S., Verachtert H. (1993). Localization and Characterization of α -Glucosidase Activity in *Brettanomyces lambicus*. *Applied and Environmental Microbiology* 59 pp.2352-2358.
- Smith D. Brendan, Divol Benoit. 2016. *Brettanomyces bruxellensis*, a survivalist prepared for the wine apocalypse and other beverages. *Food Microbiology* 59 pp.161-175.
- Snowdon E.M., Bowyer M.C., Grbin P.R., Bowyer P.K. (2006). Mousy off-Flavor: A Review. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 54 pp.6465-6474.
- Spaepen M., Verachtert H. (1982). Esterase activity in the genus *Brettanomyces*. *Journal Institute of Brewing* 88, pp. 11-17.
- Spano G., Russo P., Lonvaud-Funel A., Lucas P., Alexandre H., Grandvalet C., Coton E., Coton M., Bernayon L., Bach B., Rattray F., Bunte A., Magni C., Ladero V., Alvarez M., Fernandez M., Lopez P., de Palencia P.F., Corbi A., Trip H., Lolkema J.S. (2010). Biogenic amines in fermented foods. *European Journal of Clinical Nutrition* 64, pp.S95-S100.

- Sparrow Jeff. (2005). *Wild Brews: Beer beyond the influence of Brewer's Yeast. Culture and Craftsmanship in the Belgian Tradition*, Brewers Publications.
- Steensels J., Daenen L., Malcorps P., Derdelinckx G., Verachtert H., Verstrepen K.J. (2015). *Brettanomyces yeasts- from spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations. International Journal of Food Microbiology* 206, pp.24-38.
- Steensels J., Verstrepen K.J. (2014). *Taming wild yeast: potential of conventional and nonconventional yeasts in industrial fermentations. Annu. Rev. Microbiol.* 68, pp.61-80.
- Strong G., England K. (2015). *Beer Judge Certification Program (BJCP): Style Guidelines- Beer Style Guidelines*, World-wide certifying organization.
- Sturm M.E., Arroyo-Lopez F.N., Garrido-Fernandez A., Querol A., Marcado L.A., Ramirez M.L., Combina M. (2014). *Probabistic model for the spoilage wine yeast Dekkera bruxellensis as a function of pH, ethanol and free SO₂ using time as a dummy variable. International journal of Food Microbiology* 170, pp.83-90.
- Styger G., Jacobson D., Prior B.A., Bauer F.F. (2013). *Genetic analysis of the metabolic pathways responsible for aroma metabolite production by Saccharomyces cerevisiae. Appl. Microbiol Biotechnol.* 97, pp.4428-4442.
- Suarez R., Suarez-Lepe J.A, Morata A., Calderon F. (2007). *The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera Brettanomyces and Dekkera A review. Food Chemistry* 102 pp. 10-21.
- Tataridis Panagiotis, Anastassios Kanellis, Stylianos Logothetis, Elias Nerantzis. 2013. *Use Of non-Saccharomyces Torulaspora delbrueckii Yeast Strains In Winemaking and Brewing. Jour. Nat. Sci., Matica Srpska Novi Sad, No 124, 415-426.*
- Tataridis Panagiotis, Dimitris Diamantis, Kaliopi Gialitaki, Anastassios Kanellis, Despina Kechagia, Elias Nerantzis. 2013. *Comparison of growth kinetics, major metabolites and sensory profiles in brewing with non-Saccharomyces yeast. 34th European Brewery Convention Congress, May 26-29, 2013, Luxembourg*
- Teranashi R., Buttery R. G., Guadagni D. G. (1975). *Odor, thresholds and molecular structure. In Gerunch und Geschmackstoffe, Drawert F., Ed., Verlag: Nurnberg, Germany, pp. 177-186.*
- Tiukova I.A., Petterson M.E., Tellgren-Roth C., Bunikis I., Eberhard T., Pettersson P.V., Passoth V. (2013). *Transcriptome of the Alternative Ethanol Production Strain Dekkera*

- bruxellensis CBS 11270 in sugar limited, low oxygen cultivation. Plos One Vol.8, Iss.3, e58455.
- Tonsmeire Michael. (2014). American Sour Beers: Innovative techniques for mixed fermentations, Brewers Publications.
- Tubia I., Prasad K., Perez-Lorenzo E., Abadin C., Zumarraga M., Oyanguren I., Barbero F., Paredes J., Arana S. (2018). Beverage spoilage yeast detection methods and control technologies: A review of *Brettanomyces*. International Journal of Food Microbiology 283 pp. 65-76.
- Uscanga M.A., Esudero Abarca B.I., Gomez Rodriguez J., Cortes Garcia R. (2007). Carbon sources and their effect on growth, acetic acid and ethanol production by *Brettanomyces bruxellensis* in batch culture. Journal of Food Process Engineering 30 pp.13-23.
- Valdes J., Tapia P., Cepeda V., Varela J., Godoy L., Cubillos F.A., Silva E., Martinez C., Ganga M.A. (2014). Draft genome sequence and transcriptome analysis of the wine spoilage yeast *Dekkera bruxellensis* LAMAP2480 provides insights into genetic diversity, metabolism and survival. FEMS Microbiol. Lett. 361 pp.104-106.
- Valero E., Millan C., Ortega J.M., Mauricio J.C. (2003). Concentration of amino acids in wine after the end of fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* strains. J. Sci Food Agric, 83 pp.830-835.
- Van der Walt J. P. (1964). *Dekkera* a new genus of Saccharomycetaceae. Antonie Leewenhoek 30 pp.273-280.
- Van der Walt J.P. (1963). Nitrite utilization by *Brettanomyces*. Antonie van Leeuwenhoek 29 pp.52-56.
- Van Oevelen D. De l'Escaille F. Verachtert H. (1976). Synthesis of aroma components during spontaneous fermentation of Lambic and Gueuze. J. Inst. Brew., 82 pp.322-326.
- Vanbeneden N., Gils F., Delvaux F., Delvaux F.R. (2008). Formation of 4-vinyl and 4-ethyl derivatives from hydroxycinnamic acids: Occurrence of volatile phenolic flavour compounds in beer and distribution of Pad1-activity among brewing yeasts. Food Chemistry 107, pp.221-230.
- Vendrame M., Manzano M., Comi G., Bertrand J., Iacumin L. (2014). Use of propidium monoazide for the enumeration of viable *Brettanomyces bruxellensis* in wine and beer by quantitative PCR. Food Microbiology 42 pp.196-204.

- Verstrepen K.J., Derdelinckx G., Dufour J.P., Winderickx J., Thevelein J.M., Pretorius I.S., Delvaux F.R. (2003). Flavor-active esters: adding fruitiness to beer. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 96, pp.110-118.
- Vigentini I. Romano A., Compagno C., Merico A., Molinari F., Tirelli A., Foschino R., Volonterio G. (2008). Physiological and oenological traits of different *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* strains under wine-model conditions *FEMS Yeast Res.* 8 pp.1087-1096.
- Vigentini I., Lucy Joseph C.M., Picozzi C., Foschino R., Bisson L.F. (2013). Assessment of the *Brettanomyces bruxellensis* metabolome during sulphur dioxide exposure. *FEMS Yeast Res.* 13, pp.597-608.
- Wijsman M.R., van Dijken J.P., van Kleeff B.H.A., Scheffers W.A. (1984). Inhibition of fermentation and growth in batch cultures of the yeast *Brettanomyces intermedius* upon a shift from aerobic to anaerobic conditions (Custers effect). *Antonie van Leeuwenhoek* 50, pp.183-192.
- Woolfit M., Rozpedowska E., Piskur J., Wolfe K. H. (2007). Genome survey sequencing of the wine spoilage yeast *Dekkera (Brettanomyces) bruxellensis*. *Eukaryotix Cell.* Vol.6 No4 pp.721-733.
- Yakobson C.M. (2009). Pure Culture Fermentation Characteristics of *Brettanomyces* yeast species and their use in the Brewing Industry. School of life sciences, Heriot-Watt University, Edinburgh.
- Zuehlke J.M. Edwards C.G., (2013). Impact of sulfur dioxide and temperature on culturability and viability of *Brettanomyces bruxellensis* in wine. *Journal of Food Protection* 76, pp.2024-2030.
- Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης, (EE L 318 της 2.12.2017). Εκτελεστικός κανονισμός (ΕΕ) 2017/2216 της Επιτροπής, της 1ης Δεκεμβρίου 2017, για την καταχώριση ορισμένων ονομασιών στο μητρώο των εγγυημένων παραδοσιακών ιδιότυπων προϊόντων «Vieille Kriek, Vieille Kriek-Lambic, Vieille Framboise-Lambic, Vieux fruit-Lambic / Oude Kriek, Oude Kriekenlambiek, Oude Frambozenlambiek, Oude Fruit-lambiek» (ΕΠΙΠ) και «Vieille Gueuze, Vieille Gueuze-Lambic, Vieux Lambic / Oude Geuze, Oude Geuze-Lambiek, Oude Lambiek» (ΕΠΙΠ). C/2017/7909. https://eur-lex.europa.eu/eli/reg_impl/2017/2216/oj