



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

## **ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Η χρήση ζυμών non *Saccharomyces* και ιδιαίτερα του γένους  
*Pichia* στην παραγωγή ζυμωμένων ποτών**

**ΑΦΕΝΤΟΥΛΙΔΗΣ ΣΤΥΛΙΑΝΟΣ**

**ΑΜ: 151008**

**ΕΥΣΤΑΘΙΟΥ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ**

**ΑΜ: 151026**

**Επιβλέπων: Καθηγητής Ταταρίδης Παναγιώτης**

**ΑΘΗΝΑ, 2022**



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

**BACHELOR THESIS**

**The use of non Saccharomyces yeasts, and especially of the genus  
Pichia in the production of fermented beverages**

**AFENTOULIDIS STYLIANOS**

**Registration Number: 151008**

**EFSTATHIOU KONSTANTINOS**

**Registration Number: 151026**

**Supervisor name and surname: Tataridis Panagiotis**

ATHENS, 2022

## Διασαφήσεις εξεταστικής επιτροπής

Οι υπογράφωντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη διπλωματική εργασία με τίτλο «Η χρήση ζυμών non Saccharomyces και ιδιαίτερα του γένους Pichia στην παραγωγή ζυμωμένων ποτών» που παρουσιάστηκε από τον Αφεντουλίδη Στυλιανό και τον Ευσταθίου Κωνσταντίνο, και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

<b>Ψηφιακή Υπογραφή Επιβλέποντα Καθηγητή (1<sup>ο</sup> Μέλους Επιτροπής)</b>	
<b>Ψηφιακή Υπογραφή Καθηγητή (2<sup>ο</sup> Μέλους Επιτροπής)</b>	
<b>Ψηφιακή Υπογραφή Καθηγητή (3<sup>ο</sup> Μέλους Επιτροπής)</b>	

## ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Οι κάτωθι υπογεγραμμένοι Στυλιανός Αφεντουλίδης του Γεωργίου, με αριθμό μητρώου 151008, και ο Ευσταθίου Κωνσταντίνος του Δαμιανού, με αριθμό μητρώου 151026, φοιτητές του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστημών Οίνου, Αμπέλου και Ποτών, δηλώνουμε υπεύθυνα ότι:

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

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μας ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση των πτυχίων μας.

### Ονοματεπώνυμο & Υπογραφή Συγγραφέων Πτυχιακής Εργασίας

Αφεντουλίδης Στυλιανός

Ευσταθίου Κωνσταντίνος

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η πτυχιακή έχει στόχο την μελέτη των ζυμών *non Saccharomyces* και πιο συγκεκριμένα την *Pichia kluyveri* στην χρήση της σε διάφορα ποτά με έμφαση της χρήσης της στην μύρα. Στην αρχή γίνεται μία αναφορά της διαδικασίας με την οποία γίνεται η παραγωγή της μύρας καθώς και της ζύμης που χρησιμοποιείται ευρέως για της ζυμώσεις μύρας. Έπειτα αναλύεται η χρήση ζυμών *non Saccharomyces* σε κρασί και στην μύρα ως προς τα χαρακτηριστικά οργανοληπτικά αρώματα που προσδίδουν αλλά και πιθανές ενώσεις που παράγονται κατά την ζύμωση και μπορούν να επηρεάσουν αυτά τα χαρακτηριστικά. Ακολουθεί μία ανάλυση για την άνθηση, καθώς η *Pichia* αποτελεί μία ζύμη άνθησης, η οποία απαντάται σε κρασιά αλλά και μύρες οι οποίες ζυμώνουν εσκεμμένα σε κατάσταση άνθησης αποκτώντας έτσι ιδιαίτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Στην συνέχεια αναφέρεται η χρήση της *Pichia kluyveri* στην ζύμωση σε διάφορα αλκοολούχα ποτά στα οποία εξετάζεται η διαδικασία παραγωγής τους και οι διάφορες ενώσεις που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας αυτής. Στο τέλος αναφέρεται η διαδικασία παραγωγής μύρας με τα συνήθη ποσοστά αλκοόλης και μύρας με χαμηλή αλκοόλη στην οποία χρησιμοποιείται για ζύμη η *Pichia kluyveri* μεμονωμένα ή σε συν ζύμωση με άλλες ζύμες.

**Λέξεις κλειδιά:** *Pichia kluyveri*, *non-Saccharomyces*, κρασί, μύρα, καφέ, άνθηση

## ABSTRACT

This particular thesis aims to study non-Saccharomyces yeasts and more specifically *Pichia kluyveri*'s use in various beverages with an emphasis on its use in beer. At first, there is a reference about classic beer brewing process, as well as, the yeast that is widely used for beer fermentation. Furthermore, the use of non-Saccharomyces yeasts in wine and beer is analyzed in terms of the unique organoleptic characteristics they impart, as well as the possible compounds produced during fermentation that can affect these characteristics. An analysis of the flor yeast follows, as *Pichia* is a flor yeast which is used in wines and beers that are deliberately fermented in a flor state, thus acquiring special organoleptic characteristics. The use of *Pichia kluyveri* in the fermentation of various alcoholic beverages is then discussed, in which the process of their production and the various compounds created during this process are examined. At the end, the process of regular-alcohol beer and low-alcohol beer production with the use of *Pichia kluyveri* is mentioned, where its use is observed individually or in co-fermentation with other yeasts.

**Keywords:** *Pichia kluyveri*, *non-Saccharomyces*, wine, beer, coffee, flor

## **Ευχαριστίες**

Ευχαριστούμε θερμά την Καλαντζή Ελένη για την βοήθεια της στην επιμέλεια του κειμένου.

## Πίνακας περιεχομένων

<b>1</b>	<b>Εισαγωγή</b> .....	<b>8</b>
1.1	Το γένος <i>Saccharomyces</i> .....	8
1.2	Κλασσική παραγωγή μύρας .....	9
<b>2</b>	<b>Βιβλιογραφική ανασκόπηση</b> .....	<b>11</b>
2.1	Χρήση <i>Saccharomyces</i> στην παραγωγή ζύθου .....	11
2.2	Χρήση μικροοργανισμών <i>non Saccharomyces</i> .....	11
2.2.1	Χρήση <i>non Saccharomyces</i> στον οίνο .....	12
2.2.2	Χρήση <i>non Saccharomyces</i> στον ζύθο .....	20
2.2.3	Ζύμες άνθισης .....	24
2.2.3.1	Χρήση των ζυμών άνθισης στον οίνο .....	24
2.2.3.2	Χρήση των ζυμών άνθισης στο ζύθο .....	26
2.3	Η <i>Pichia kluyveri</i> .....	26
2.3.1	Ταξινόμια γένους <i>Pichia</i> .....	27
2.3.2	Οικολογία.....	27
2.3.3	Μορφολογικά χαρακτηριστικά και φυσιολογία.....	28
2.3.4	Μεταβολισμός.....	28
2.3.5	Η χρήση της <i>Pichia kluyveri</i> στην βιομηχανία των ποτών. ....	29
2.3.6	Η χρήση της <i>Pichia kluyveri</i> στην παραγωγή μύρας.....	35
<b>3</b>	<b>Συμπεράσματα</b> .....	<b>41</b>
<b>4</b>	<b>Βιβλιογραφία</b> .....	<b>42</b>

## Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1. Non-Saccharomyces ζύμες και που είναι διαθέσιμες.	<b>18</b>
Πίνακας 2. Επιστημονική ταξινόμηση του γένους <i>Pichia</i> .	<b>27</b>
Πίνακας 3. Συγκέντρωση πτητικών ενώσεων στο τέλος της ζύμωσης που ρυθμίζεται από την πρότυπη παραγωγή τεκίλας (NOM-006-SCFI-2005, 2006) σε mg / 100 mL άνυδρης αιθανόλης.	<b>31</b>
Πίνακας 4. Συγκεντρώσεις βουτυλικού αιθυλεστέρα, οξικού ισοαμλεστέρα, ισοαμυλικής αλκοόλης, εξανοϊκού αιθυλεστέρα και οκτανοϊκού αιθυλεστέρα σε έξι εμπορικές μύρες , μύρας που παρασκευάζεται με στέλεχος A <i>Pichia kluyveri</i> και μύρας που παρασκευάζεται με στέλεχος B <i>Pichia kluyveri</i> .	<b>39</b>

## Κατάλογος Σχημάτων

Σχήμα 1. Διαδικασία παραγωγής κλασσικής μπύρας.	10
Σχήμα 2. Non-Saccharomyces ζύμες και τα ποσοστά διαθεσιμότητας τους.	19
Σχήμα 3. Σύγκριση μεθόδων παραγωγής μπύρας , με ή χωρίς τη χρήση <i>Pichia</i> .	37
Σχήμα 4. Προφίλ γεύσης απο μπύρες χωρίς αλκοόλη σε σύγκριση με μπύρες κανονικής αλκοόλης.	37
Σχήμα 5. Προφίλ γεύσης απο μπύρες με χαμηλή η χωρίς αλκοόλη σε σύγκριση με μπύρες κανονικής αλκοόλης.	38
Σχήμα 6. Σύγκριση παραγωγής αρωμάτων, μεταξύ κανονικής μπύρας pilsner και μπύρας που ζυμώθηκε με <i>Pichia</i> .	40

## Κατάλογος Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1. Συγκεντρώσεις πτητικών θειολών της <i>Pichia kluyveri</i> στο Sauvignon blanc της Χιλής.	29
Διάγραμμα 2. Δυναμική συμπεριφορά πληθυσμών ζυμομυκήτων κατά τη διάρκεια των αυθόρμητων και εμβολιασμένων ζυμώσεων του κακάου.	32
Διάγραμμα 3. Υδατάνθρακες, οργανικά οξέα και αιθανόλη που ανιχνεύονται στον πολτό κατά τη διάρκεια αυθόρμητης και εμβολιασμένης ζύμωσης κακάου.	33



## Συντμήσεις, ακρωνύμια, σύμβολα και ορισμοί

Spp.	Species Pluralis
g.	Grams
kg.	Kilos
3MHA	3-mercaptohexyl acetate
4EG	4-ethylguaiacol
4EP	4-ethylphenol
4VG	4-vinylguaiacol
v/v	Όγκος κατ. όγκος
POF	Phenolic Off Flavor
pH	Potential of hydrogen
ABV	Alcohol by volume
°C	celsius
rRNA LSU	Large subunit ribosomal ribonucleic acid
SSR rRNA	simple sequence repeats ribosomal ribonucleic acid
YPD	yeast extract peptone dextrose
mg	milligram
mL	milliliter
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
~	περίπου
%	επι της εκατό
log	Logarithm
OTA	ωχρατοξίνη A
MEA	εκχύλισμα βύνης
CA	άγαρ καφέ
Co-I	συν-εμβολιασμού
Seq-I	διαδοχικό εμβολιασμό
vol.	volume

GC-FID	gas chromatography with flame ionization Detection
°P	βαθμοί πλάτο (εκχύλισμα)
L	liter

# 1 Εισαγωγή

Αδιαμφισβήτητα ο επικρατέστερος ζυμομύκητας που χρησιμοποιείται για την ζύμωση ποτών αποτελούσε και συνεχίζει να αποτελεί ο *Saccharomyces cerevisiae*. Όμως με την εξέλιξη της τεχνογνωσίας στον κλάδο των ποτών και των τροφίμων, ανήλθαν στο παρασκήνιο πολύ δυναμικά και αρκετές *non-Saccharomyces* ζύμες, οι οποίες χρησιμοποιούνται πλέον για την ζύμωση αρκετών αλκοολούχων ποτών σε συνζύμωση με τον *Saccharomyces cerevisiae* η ακόμη και αντικαθιστώντας τον πλήρως προσδίδοντας έτσι τα ιδιαίτερα αρωματικά και γευστικά χαρακτηριστικά τους. Σκοπός της πτυχιακής είναι η μελέτη των χαρακτηριστικών ορισμένων ειδών *non-Saccharomyces* ζυμών και ιδιαίτερα της *Pichia kluyveri* στην παραγωγή ποτών και πιο συγκεκριμένα στην παραγωγή ζύθου. Ειδικότερα εξετάζεται το γευστικό και αρωματικό προφίλ που προσφέρουν σε μύρες με χαμηλή αλκοόλη ή χωρίς αλκοόλη.

Σκοπός της πτυχιακής είναι η συλλογή πληροφοριών πάνω στην χρήση και την δράση ζυμών *non Saccharomyces* στην παραγωγή ζυμώσιμων ποτών, κυρίως στο κρασί και στην μύρα. Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στην ζύμη άνθησης *Pichia kluyveri* η οποία τα τελευταία χρόνια έχει αξιοποιηθεί για την παραγωγή αρκετών ζυμώσιμων ποτών, με νεότερες έρευνες να εστιάζουν στη χρήση της στην παραγωγή μύρας με χαμηλή ή χωρίς αλκοόλη . Μέσω της πτυχιακής δίνεται η δυνατότητα να διερευνηθούν οι έως τώρα γνωστές ιδιότητες της συγκεκριμένης ζύμης καθώς επίσης και τα πλεονεκτήματα ή τα μειονεκτήματα χρήσης της στην βιομηχανία των ποτών .

## 1.1 Το γένος *Saccharomyces*

Την σημερινή εποχή η λέξη κρασί είναι άμεσα συνδεδεμένη με την λέξη *Saccharomyces*. Παλαιότερα ο μούστος αφηνόταν να ζυμώσει με τη φυσική μαγιά που υπάρχει στα σταφύλια ενώ σήμερα είναι δυνατό, και στην πραγματικότητα είναι κοινό για τους οινοποιούς να εμβολιάζουν με επιλεγμένα στελέχη *S. cerevisiae* για την εξασφάλιση επιτυχούς και ομοιόμορφης ζύμωσης. Ο *S. cerevisiae* είναι ο καλύτερος παραγωγός αλκοόλ του γένους του, όμως υπάρχουν και άλλα είδη *Saccharomyces* που βρίσκονται συνήθως σε ποτά που έχουν υποστεί ζύμωση όπως, *S. bayanus*, *S. bayanus var. uvarum*, *S. kudriazevii* (López-Malo et al., 2013) *S. pastorianus*, *S. paradoxus*, *S.uvarum*, και ορισμένα υβρίδια αυτών των ειδών έχουν συσχετιστεί με το διαδικασία οινοποίησης (Kurtzman & Fell, 2011). Κάθε είδος συμβάλλει στη σύσταση, στο συνολικό άρωμα και την πολυπλοκότητα του κρασιού διαφορετικά.

## 1.2 Κλασσική παραγωγή μύρας

Η παραγωγική διαδικασία για την δημιουργία της μύρας ακολουθεί κάποια βασικά στάδια ανεξάρτητα από την χώρα καταγωγής της, τον ειδικό τύπο της και το εκάστοτε ζυθοποιείο.

Αρχικά λαμβάνει χώρα η άλεση της βύνης στον επιθυμητό βαθμό. Έπειτα ακολουθεί το στάδιο της ανάμιξης του νερού και της βύνης και της πολτοποίησης, όπου δρουν διάφορα ένζυμα και διασπών το άμυλο της της βύνης σε απλούστερα απλούστερα σάκχαρα και δεξτρίνες και τις πρωτεΐνες σε πεπτίδια και αμινοξέα. Αυτό επιτυγχάνεται με τη θέρμανση σε διάφορες θερμοκρασίες. Η πολτοποίηση συνήθως απαιτεί παύσεις σε συγκεκριμένες θερμοκρασίες (συνήθως 45-56-62-73 βαθμούς Κελσίου). Από την διαδικασία της πολτοποίησης λαμβάνουμε ένα βύνογλευκος που είναι πλούσιο σε σάκχαρα το οποίο μεταφέρεται στο δοχείο διήθησης (lauter), στο οποίο γίνεται διαχωρισμός των στερεών με τα υγρά μέσω του ψευδοπάτου που διαθέτει το δοχείο αυτό. Έπειτα προστίθεται επιπλέον νερό για να γίνει συλλογή των περισσοτέρων σακχάρων/εκχυλίσματος του γλεύκους (μια διαδικασία γνωστή ως sparging). Το γλεύκος στην συνέχεια μεταφέρεται στο δοχείο βρασμού και οδηγείτε σε βρασμό. Μέσω του βρασμού επιτυγχάνεται η συμπύκνωση αλλά και η “αποστείρωση” του γλεύκους. Σε αυτό το ζυθογλεύκος που βράζει, προστίθεται σε διαφορετικά στάδια ο λυκίσκος (σε ποσότητες ανάλογα με την πικράδα και το άρωμα/γεύση που θέλουμε να δώσουμε στη μύρα). Έπειτα το παραπάνω ζυθογλεύκος μεταφέρεται μετά από ψύξη και οξυγόνωση στις δεξαμενές ζύμωσης όπου προστίθεται η μαγιά για να ξεκινήσει η ζύμωση.

Υπάρχουν δύο κατηγορίες μαγιάς που μπορούν να χρησιμοποιηθούν, οι μαγιές που ζυμώνουν στην επιφάνεια, και αυτές που ζυμώνουν στον πάτο της δεξαμενής, οι οποίες είναι υπεύθυνες να μετατρέπουν τα σάκχαρα του γλεύκους σε αλκοόλη και διοξείδιο του άνθρακα.

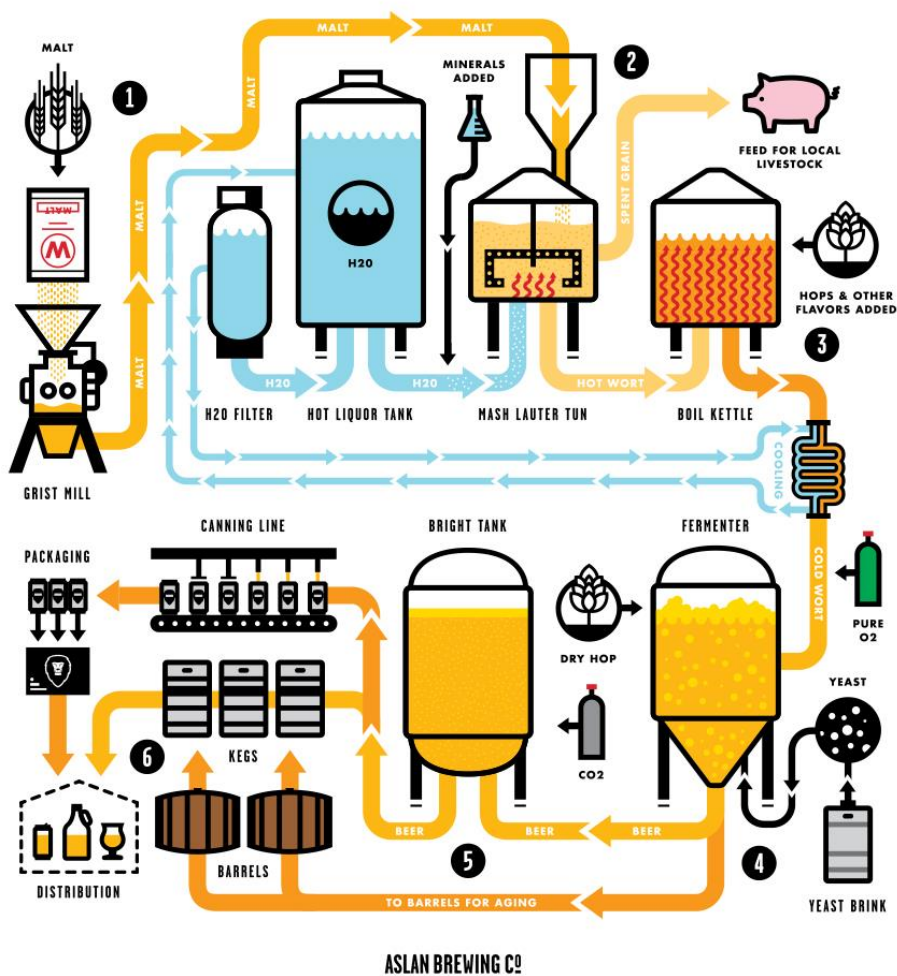
Μετά το τέλος της ζυθοποίησης, λαμβάνει χώρα η περίοδος ωρίμανσης, που γίνεται μέσα στις δεξαμενές σε χαμηλές θερμοκρασίες περίπου 0 – 2 βαθμούς Κελσίου για 4 έως 8 εβδομάδες (ανάλογα με τον τύπο της μύρας, ξανθιές ή σκούρες, γενικότερα οι ξανθιές θέλουν λιγότερο χρόνο από τις σκουρόχρωμες). Την περίοδο αυτή οι μύρες εξελίσσονται, μαλακώνουν και καθαρίζουν.

Μόλις περάσει ο χρόνος ωρίμανσης και διαύγασης στις δεξαμενές, ακολουθεί το φιλτράρισμα.

Πριν ή μετά την εμφιάλωση συνήθως γίνεται παστερίωση (θέρμανση για την θανάτωση των διάφορων μικροοργανισμών) ο βαθμός της οποίας προσδιορίζεται ανάλογα με τον τρόπο αποθήκευσης της μύρας και το χρονικό διάστημα κατανάλωσης της. Ο τρόπος εμφιάλωσης γίνεται είτε σε βαρέλια , είτε σε μπουκάλια , είτε σε κουτάκια.

Όσον αφορά στην τελική αποθήκευση η μύρα, σαν ποτό με χαμηλό αλκοόλ είναι ευαίσθητη, θέλει λοιπόν προσοχή και δροσερό περιβάλλον μακριά από τον ήλιο και την υψηλή θερμοκρασία.

Στο παρακάτω σχήμα 1 απεικονίζεται η διαδικασία παραγωγής μύρας από την παραλαβή της βύνης έως το τελικό προϊόν στο μπουκάλι.



Σχήμα 1. Διαδικασία παραγωγής κλασσικής μύρας. (Suwirjo 2019)

## 2 Βιβλιογραφική ανασκόπηση

### 2.1 Χρήση *Saccharomyces* στην παραγωγή ζύθου

Όπως και στο κρασί έτσι και στην παραγωγή μπίρας, η λέξη μπίρα είναι συνδεδεμένη άμεσα με την λέξη *Saccharomyces*. Παραδοσιακά, η *Saccharomyces pastorianus* (παλαιότερα *Saccharomyces carlsbergensis*, είναι πιθανώς διασταύρωση μεταξύ *Saccharomyces cerevisiae* και *Saccharomyces eubayanus*) (Martini και Martini, 1987), είναι η μαγιά που χρησιμοποιείται για ζυμώσεις μπίρας *lager*, αντιπροσωπεύοντας σχεδόν το 90% της αγοράς μπίρας (Varela, 2016). Το άλλο στυλ είναι η μπίρα *ale*. Η συνήθης χρησιμοποιούμενη μαγιά είναι η *Saccharomyces cerevisiae* και αντιπροσωπεύει το 5% της αγοράς μπίρας (Varela, 2016). Το υπόλοιπο ποσοστό λαμβάνεται από μύρες που παράγονται με αυθόρμητη ζύμωση ή μικτές ζυμώσεις με γηγενείς ζυμομύκητες και βακτήρια (Petruzzi et al., 2016).

### 2.2 Χρήση μικροοργανισμών *non Saccharomyces*

Για την ζύμωση κρασιού, μπίρας και μηλίτη χρησιμοποιούνται παραδοσιακά στελέχη του *Saccharomyces cerevisiae*, που αποτελεί την πιο συνηθισμένη και εμπορικά διαθέσιμη ζύμη. Τα στελέχη του είναι ευρέως γνωστά για την ζυμωτική τους συμπεριφορά και τεχνολογικά χαρακτηριστικά, παράγοντας έτσι προϊόντα συγκεκριμένης και σταθερής ποιότητας. Ο *Saccharomyces cerevisiae* είναι ο πιο κλασσικός ζυμομύκητας που χρησιμοποιείται στις διαδικασίες ζύμωσης. Στη ζύμωση κρασιού, χρειάζονται στελέχη με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά (όπως για παράδειγμα υψηλή παραγωγή αιθανόλης για την επίτευξη 11–13% v/v) που κυρίως βρίσκεται σε ποτά. Από την άλλη, οι μύρες και οι μηλίτες περιέχουν μικρότερα ποσοστά αιθανόλης με ένα ισορροπημένο και οργανοληπτικό προφίλ χαρακτηριστικό του καθενός. Τα τελευταία χρόνια, δημιουργήθηκαν νέες καταναλωτικές συνήθειες και απαιτήσεις για νέα και καινοτόμα προϊόντα. Αυτή η κατάσταση οδήγησε στην επανεξέταση των ήδη υπάρχοντων ζυμωμένων ποτών ώστε να ανταποκρίνονται στις απαιτήσεις των καταναλωτών. Οι ζύμες ευθύνονται σε μεγάλο βαθμό για την πολυπλοκότητα και την οργανοληπτική ποιότητα των ποτών που έχουν υποστεί ζύμωση. Με βάση αυτό, οι τρέχουσες μελέτες επικεντρώνονται κυρίως στην αναζήτηση νέου τύπου ζυμών με τεχνολογικές εφαρμογές. Οι *non-Saccharomyces* ζύμες ανέκαθεν θεωρούνταν επιμολυντικές στην παραγωγή του κρασιού και της μπίρας. Οπότε, πραγματοποιούνται συνήθως διαδικασίες

για την εξάλειψή τους όπως η παστερίωση μούστου, η προσθήκη θειώδους και η απολύμανση του εξοπλισμού και των αιθουσών επεξεργασίας. Τα τελευταία χρόνια, η αρνητική αντίληψη για τις ζύμες non *Saccharomyces* έχει αλλάξει λόγω του γεγονότος ότι αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι κατά τις αυθόρμητες ζυμώσεις κρασιού, ορισμένες από αυτές οι ζύμες παίζουν σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της οργανοληπτικής ποιότητας και πολυπλοκότητας του τελικού προϊόντος. Βασισμένοι σε αυτά τα συμπεράσματα, η ζυμωτική συμπεριφορά κάποιων στελεχών διαφόρων ειδών non-*Saccharomyces* ζυμών μελετάται εις βάθος με σκοπό την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών αλλά και την επιλογή του καταλληλότερου στελέχους που θα χρησιμοποιηθεί στην παραγωγή ζυμώσιμων ποτών. (Estela-Escalant, 2018)

### 2.2.1 Χρήση non *Saccharomyces* στον οίνο

Όπως προαναφέρθηκε, με την εξέλιξη των οινοποιητικών τεχνικών ξεκίνησε η χρήση επιλεγμένων στελεχών non-*Saccharomyces* ζυμών στην παραγωγή κρασιών υψηλής ποιότητας, για την αύξηση της πολυπλοκότητας του οίνου, εξομοιώνοντας μερικώς τις αυθόρμητες ζυμώσεις. Πολλές από αυτές ανήκουν στην κατηγορία "άγριων" ζυμών που συνήθως έχουν μικρή έως και μηδενική ζυμωτική ικανότητα. Σύμφωνα με το *The Yeasts*, μια ταξινομική μελέτη, τα ακόλουθα 15 γένη ζυμών non *Saccharomyces* είναι γνωστό ότι σχετίζονται με το κρασί: *Brettanomyces*, *Dekkera*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Torulaspora*, *Hanseniaspora*, *Kloeckera*, *Kluveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Schizosaccharomyces* και *Zygosaccharomyces* (Kurtzman & Fell, 2011). Προστέθηκαν έπειτα από περαιτέρω έρευνες στην λίστα τα γένη: *Issatchenkia*, *Aureobasidium*, *Saccharomycopsis*, *Belleromyces*, *Sporidiobolus*, *Sporobolomyces* και *Trichosporon* (Barata et al., 2012; Bezerra-Bussoli et al., 2013; Duarte et al., 2012; Jolly et al., 2014; Ženišová et al., 2014). Για ορισμένα από τα παραπάνω γένη έχουν απομονωθεί στελέχη τα οποία χρησιμοποιούνται για ελεγχόμενο εμβολιασμό για ζυμώσεις.

Οι κατηγορίες χημικών ενώσεων που επιδρούν περισσότερο στο άρωμα ενός κρασιού είναι ανώτερες αλκοόλες, οξικοί εστέρες και αιθυλεστέρες, οργανικά οξέα, πτητικές φαινόλες, τερπένια πυραζίνες και άλλες θειούχες ενώσεις (υδρόθειο, μερκαπτάνες και πτητικές θειόλες). Η σύνθεση αυτών των ενώσεων και τα εμπλεκόμενα γονίδια έχουν μελετηθεί περισσότερο στον *S. cerevisiae*. Παρόλο που μερικές μελέτες έχουν αρχίσει να ερευνούν εν μέρει την παρουσία αυτών των ενώσεων σε ζυμώσεις από ζύμες non *Saccharomyces*, δεν έχουν μελετηθεί εξίσου

καλά όπως για τον *S. cerevisiae* (Andorrà et al., 2012; Benito et al., 2015; Benito et al., 2011; Ciani et al., 2006; Comitini et al., 2011; Dashko et al., 2015; Sadoudi et al., 2012; Zott et al., 2011; Zott et al., 2008).

### ***Torulaspora delbrueckii* (πρώην *Saccharomyces rosei* ή *Saccharomyces delbrueckii*)**

Η *T. delbrueckii* χρησιμοποιείται στην οινοποίηση για αρκετά χρόνια και είναι ένα από τα λίγα είδη *non Saccharomyces* που διατίθενται στο εμπόριο για χρήση στην παραγωγή κρασιού και μπύρας. Ενώ μπορεί να είναι το πιο καλά μελετημένο και πιο διαθέσιμο είδος του γένους, όπως όλα τα είδη *non Saccharomyces*, πολλά παραμένουν άγνωστα. Από τις μελέτες που έχουν διεξαχθεί, έχει αναφερθεί ότι το κρασί που έχει υποστεί ζύμωση με *T. delbrueckii* σε συν-καλλιέργεια με *S. cerevisiae* χαρακτηρίζεται από χαμηλή πτητική οξύτητα, υψηλότερες τερπενόλες και 2-φαινυλαιθανόλη (Ciani & Maccarelli, 1998; Sadoudi et al., 2012; Van Breda et al., 2013). Ένα χαρακτηριστικό του είδους *T. delbrueckii* είναι χαμηλή πτητική οξύτητα (κυρίως οξική) και παραγωγή γλυκερόλης (Ciani and Maccarelli, 1998).

Μια μελέτη που διεξήχθη από Renault et al., (2009) εξέτασε συγκεκριμένα τη μεταβλητότητα του στελέχους σε αυτό το είδος και ενώ οι διαφορές ήταν εμφανείς μεταξύ των στελεχών, βρήκαν μερικούς εστέρες που μπορεί να είναι ενδεικτικοί για την μεταβολική δραστηριότητα του *T. delbrueckii*. Αυτές οι ενώσεις ήταν: προπανοϊκός αιθυλεστέρας, ισοβουτανοϊκός αιθυλεστέρας, διϋδροξυκιναμικός αιθυλεστέρας και ισοβουτυρικός αιθυλεστέρας. Οι αιθυλεστέρες είναι το προϊόν των λιπαρών οξέων σε αντίδραση με αιθανόλη και προκαλείται από ακυλτρανσφεράσες. Υψηλές συγκεντρώσεις λιπαρών οξέων συνήθως δεν είναι επιθυμητές στο κρασί, καθώς πολλές από αυτές έχουν έντονες και δυσάρεστες οσμές. Οι εστέρες αντιθέτως είναι γνωστοί για τα φρουτώδη και λουλουδάτα χαρακτηριστικά τους και συνήθως αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος αναγνωρίσιμων αρωμάτων στο κρασί. Κατά τη διάρκεια ζύμωσης του κρασιού, τα στελέχη ζύμης *T. delbrueckii* παράγουν αισθητά υψηλότερη συγκέντρωση ανώτερων αλκοολών, εστέρων, τερπενίων και φαινολικών αλδευδών, καθώς και άλλων μορίων όπως 2-φαινυλαιθανόλη, λιναλοόλη, μεθυλβανιλίνη, που προσδίδουν ένα ξεχωριστό άρωμα λουλουδιών και φρούτων καθώς προστίθεται στην αισθητική πολυπλοκότητα δίνοντας ένα «άγριο/φυσικό» αποτέλεσμα ζύμωσης (Fagan et al., 1981; Herraiz et al., 1990; Lema et al., 1996; King et al., 2000; Plata et al., 2003; Raynal et al., 2011).



Οι *Azzolini et al., (2012)* παρήγαγαν κρασιά *Amarone* μέσω διαδοχικού εμβολιασμού της *T. delbrueckii* και *S. cerevisiae*, και το οργανοληπτικό πάνελ έδειξε ότι τα κρασιά που προέκυψαν είχαν περισσότερα έντονα αρώματα «ώριμων κόκκινων φρούτων» από ότι ο *S. cerevisiae* δίνει μόνος του.

### ***Lachancea thermotolerans* (πρώην *Kluyveromyces thermotolerans*)**

Παρόμοια με την *T. delbrueckii*, η *L. thermotolerans* έχει ένα εμπορικά διαθέσιμο στελέχη που χρησιμοποιούνται για παραγωγή κρασιού. Η *CHR Hansen* παράγει μια καθαρή μονοκαλλιέργεια (*Viniflora® CONCERTO™*) για χρήση στην οινοποίηση (*Hansen, 2011*). Διάφορες μελέτες έχουν διερευνήσει την πιθανή χρήση της στην οινοποίηση όσον αφορά την ακεταλδεΐδη, το γαλακτικό οξύ, τη γλυκερόλη, την 2-φαινυλαιθανόλη, παραγωγή πολυσακχαριτών καθώς και την δραστικότητα β-γλυκοσιδάσης. Είναι αποδεδειγμένο ότι αυτό το στέλεχος είναι ικανό να παράγει γαλακτικό οξύ και να μειώνει το pH του κρασιού, ενώ έχει μειωμένη παραγωγή πτητικής οξύτητας. Έχει επίσης αποδειχθεί ότι αυξάνει τις συγκεντρώσεις γλυκερόλης και 2-φαινυλαιθανόλης παρόλο που είναι παραγωγός χαμηλής ακεταλδεΐδης (*Ciani et al., 2006; Ciani & Comitini, 2010; Comitini et al., 2011; Cordero-Bueso et al., 2012; Kapsopoulou et al., 2007*).

Η μελέτη που διεξήχθη από τους *Gobbi et al., (2013)* είναι η πιο εκτεταμένη αυτού του είδους στο κρασί μέχρι σήμερα. Ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε γλεύκος σταφυλιών *Sangiovese* σε δοκιμές βιομηχανικής ζύμωσης. Αναφέρουν ότι ακόμη και σε διαδοχικό εμβολιασμό, η *L. thermotolerans* ήταν το κυρίαρχο είδος κατά τη ζύμωση, και ότι αυτές οι ζυμώσεις έδειξαν μειωμένη 2-μεθυλ-1-προπανόλη και 3-μεθυλ-1-βουτανόλη, υψηλότερη 2-φαινυλαιθανόλη, μειωμένους οξικούς εστέρες αλλά υψηλότερα ποσοστά οξικού αιθυλεστέρα. Τα κρασιά ήταν επίσης γνωστά για τις υψηλότερες «πικάντικες» και όξινες νότες σε σύγκριση με τη ζύμωση αποκλειστικά από την *S. cerevisiae* με την οποία συγκρίθηκε. Όσο πιο γρήγορα προστίθεται ο *S. cerevisiae*, τόσο λιγότερο γαλακτικό οξύ και γλυκερόλη βρίσκονταν στο τελικό κρασί.

### ***Metschnikowia pulcherrima***

Η *Metschnikowia pulcherrima* συναντάται συχνά σε αμπελώνες και στο γλεύκος σταφυλιών. Η ζύμη που κυκλοφορεί εμπορικά ονομάζεται *Flavia®* και περιγράφεται ως είδος που μπορεί να βοηθήσει στην αύξηση των χαρακτηριστικών της ποικιλίας και της περιεκτικότητας σε πτητικές θειόλες, ιδίως σε λευκό κρασί. Η *M. pulcherrima* έχει συσχετιστεί με τα σταφύλια καθώς το κρασί και έρευνες για το δυναμικό αυτού του στελέχους έδειξαν ότι

συγκεκριμένα από τα προϊόντα απομόνωσης παρουσίασαν υψηλή δραστηριότητα β-γλυκοσιδάσης ([Fernández et al., 2000](#); [González-Pombo et al., 2008](#)). Οι [Clemente-Jimenez et al., \(2004\)](#) επιπλέον ανέφεραν ότι η *M. pulcherrima* έχει την ικανότητα να παράγει υψηλές ποσότητες καπριλικού αιθυλεστέρα και 2-φαινυλο αιθανόλης. Οι [Sadoudi et al., \(2012\)](#) πραγματοποίησαν μελέτη του *M. pulcherrima* σε συν-καλλιέργεια με *S. cerevisiae*. Παρατηρήθηκε ότι η φρουκτόζη καταναλώνεται πιο αργά κατά τη διάρκεια της ζύμωσης συν-καλλιέργειας και ότι παράγεται λιγότερο οξικό οξύ σε σύγκριση με τις ζυμώσεις μονοκαλλιέργειας *S. cerevisiae*. Η *M. pulcherrima* στη μονοκαλλιέργεια ήταν χαμηλός παραγωγός πτητικής οξύτητας ([Comitini et al., 2011](#)).

## Είδη Candida

Το γένος *Candida* είναι μεγάλο και εξαιρετικά ποικίλο με περισσότερα από 50 διαφορετικά είδη που έχουν ταυτοποιηθεί, πολλά από τα οποία έχουν συσχετιστεί με την οινοποίηση ([Kurtzman & Fell, 2011](#)). Τα περισσότερα αξιοσημείωτα από αυτά είναι η *C. lambica*, *C. cantarellii*, *C. pulcherrima* και *C. zemplinina* ([Comitini et al., 2011](#); [Magyar & Tóth, 2011](#); [Sipiczki, 2003](#); [Toro & Vazquez, 2002](#)). Στην πραγματικότητα το συνηθέστερο είδος *Candida* που σχετίζεται με το κρασί, η *C. zemplinina* ήταν γνωστή ως *C. stellata* και αργότερα μετονομάστηκε σε *Starmerella bacillaris* ([Duarte et al., 2012](#)). Ανεξάρτητα από την ονομασία της *S. bacillaris* ή *C. zemplinina*, έρευνα έχει δείξει ότι έχει την ικανότητα μείωσης της ποσότητας οξικού οξέος σε μια ζύμωση κρασιού ειδικά όταν χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με τον *S. cerevisiae* ([Englezos et al., 2015](#); [Rantsiou et al., 2012](#); [Sadoudi et al., 2012](#)). Ερευνήθηκε η περιεκτικότητα σε τερπένια σε ζυμώσεις μονής και μικτής καλλιέργειας των *C. zemplinina* και *S. cerevisiae* στην οποία οι [Englezos et al., \(2015\)](#) δοκίμασαν 63 διαφορετικά στελέχη και διαπίστωσαν ότι μόνο το 5% των στελεχών έδειξαν δραστηριότητα β-γλυκοσιδάσης που δείχνει μεγάλη μεταβολική ποικιλότητα εντός του είδους. Επιπλέον οι [Sadoudi et al., \(2012\)](#) διαπίστωσαν ότι, σε μονοκαλλιέργεια, η *C. zemplinina* παράγαγε περισσότερα νορισοπρενοειδή και τερπενόλες, αλλά αυτή η συμπεριφορά δεν διατηρήθηκε σε μικτή ζύμωση με *S. cerevisiae*. Η *C. zemplinina* είναι μια φρουκτοφιλική μαγιά, και έχει αναγνωριστεί για την ικανότητά της να παράγει κρασιά με χαμηλότερο αλκοόλ όταν χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με την *S. cerevisiae* ([Englezos et al., 2015](#); [Maio et al., 2012](#); [Zara et al., 2014](#)). Στελέχη *Candida stellata* ([Ciani and Ferraro, 1996](#); [Soden et al., 2000](#)) και *Candida zemplinina* ([Magyar and Tóth, 2011](#)) αναφέρθηκε ότι έχουν έντονο φρουκτοφιλικό χαρακτήρα, που μπορεί να είναι χρήσιμο για την εξισορρόπηση του γλυκοφιλικού χαρακτήρα

στα είδη *Saccharomyces* και να επιλύουν προβλήματα που σχετίζονται με βραδείς ή κολλημένες ζυμώσεις.

### ***Kazachstania species (πρώην *Saccharomyces exiguus* )***

Έχει καθοριστεί ότι το γένος συνολικά είναι πιο στενά συνδεδεμένο γένος με τον *S. cerevisiae* όσον αφορά την εξέλιξη του ([Hagman et al., 2013](#)). Έτσι το γένος αυτό απέκτησε ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την βιομηχανία τροφίμων και ποτών. Η *K. aerobia* εντοπίστηκε για πρώτη φορά το 2004 από ενσίρωση καλαμποκιού, ενώ η *K. gamospora* ανακαλύφθηκε ως είδος το 2007 ([Imanishi et al., 2007](#); [Lu et al., 2004](#)). Η *K. gamospora* είχε την ικανότητα ζύμωσης τόσο της σακχαρόζης όσο και της ραφινόζης, αλλά όχι γαλακτόζη. Αποδείχθηκε επίσης ότι μπορεί να αφομοιώσει την αιθανόλη και τη γλυκερόλη ως πηγές άνθρακα ([Imanishi et al., 2007](#)). Οι [Νησιώτου & Νύχας \(2008\)](#) απομόνωσαν την *K. hellenica* από ζύμωση χυμού σταφυλιών επηρεασμένη από βοτρυτή στην Ελλάδα. Οι [Setati et al., \(2012\)](#) απομόνωσαν την *K. aerobia* από υγιή άθικτα σταφυλιών στη Νότια Αφρική. Οι [Dashko et al., \(2015\)](#) χρησιμοποίησαν την *K. gamospora* σε ζύμωση κρασιού και μετά από πειράματα εργαστηριακής κλίμακας έδειξαν ότι είχε καλή απόδοση και παρήγαγε ένα μοναδικό αρωματικό προφίλ.

### ***Zygosaccharomyces species***

Το γένος *Zygosaccharomyces* είναι γνωστό για την ικανότητά του να αλλοιώνει το κρασί, ειδικά τα γλυκά και αφρώδη κρασιά ([Loureiro, 2003](#)). Οι *Z. bailii* και *Z. rouxii* είναι συχνά η πηγή αλλοίωσης στα γλυκά κρασιά λόγω της ικανότητάς τους να ανέχονται υψηλά οξέα, άλατα και υψηλών ποσοστών σακχάρων, οξειδώνοντας έτσι το τελικό προϊόν. Η *Z. kombuchaensis* είναι πιθανώς η μόνη ζύμη που αξίζει να ερευνηθεί καθώς απομονώθηκε από το τσάι *Kombucha*, ένα ελαφρώς αλκοολούχο ποτό από ζύμωση γλυκού παρασκευασμένου τσαγιού με μείγμα βακτηρίων ή/και μυκήτων.

### ***Hanseniaspora***

Τα στελέχη ζύμης στο γένος *Hanseniaspora* παράγουν υψηλά επίπεδα οξικού φαινυλαιθυλεστέρα και φαινυλαιθανόλη, που συμβάλλουν στην πολυπλοκότητα του αρώματος του κρασιού ([Moreira et al., 2005](#); [Rojas et al., 2001; 2003](#); [Viana et al., 2008](#)). Ωστόσο, λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης αιθανόλης που οφείλεται στη χαμηλή δραστηριότητα ζύμωσης, δεν

είχαν αναπτυχθεί καθαρές καλλιέργειες ζύμης, ως εκκινητές ζύμωσης. Οι πηκτινάσες, οι πρωτεάσες και οι γλυκοσιδάσες είναι μερικά από τα ένζυμα που εκκρίνονται από την *H. uvarum* τα οποία βελτιώνουν την αποσαφήνιση, τη σταθεροποίηση και το άρωμα των κρασιών. Επιπλέον έχει παρατηρηθεί πως συγκεκριμένα το είδος *H. guilliermondi* προσδίδει αρωματικές ενώσεις όπως ακετόνη και οξικούς εστέρες σε φαγητά και ποτά ([Cadez and Smith, 2011](#)).

### ***Pichia kluyveri* και άλλα είδη *Pichia***

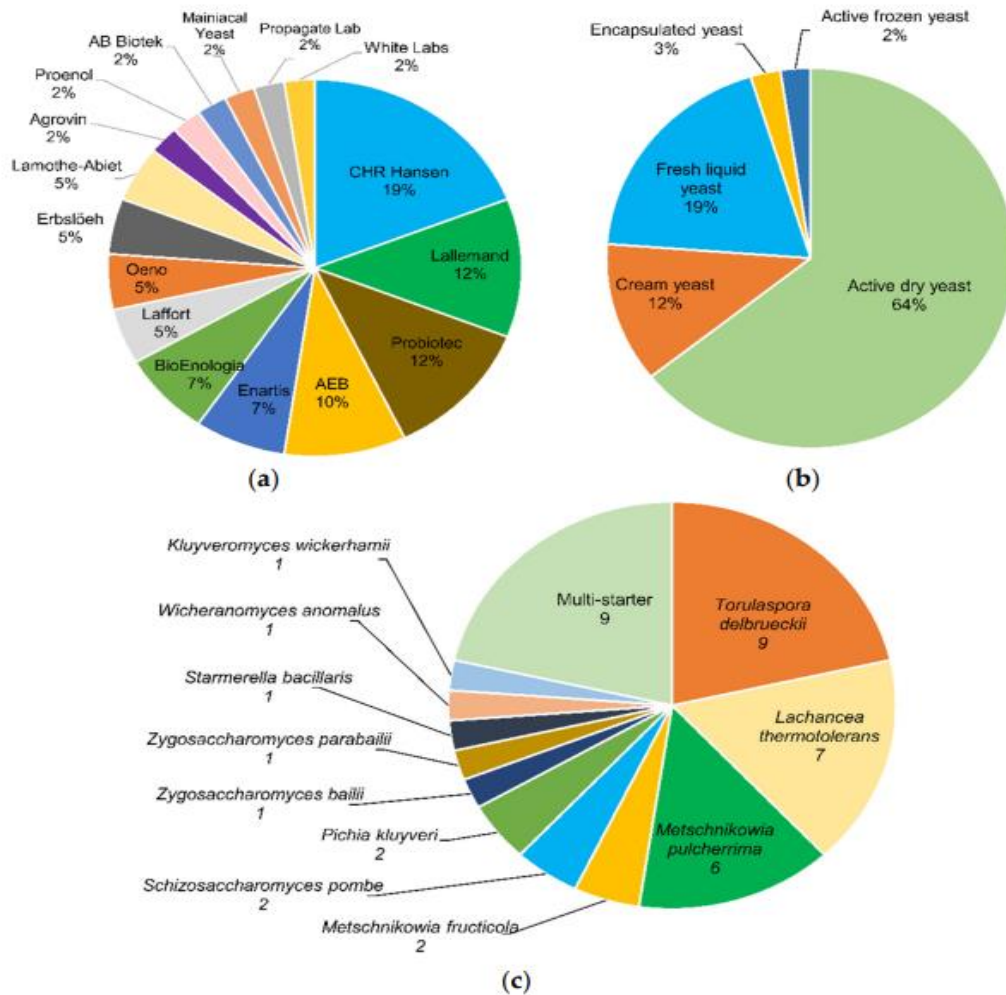
Υπάρχει ένα πολύ μεγάλο ποσοστό βιοποικιλότητας στο γένος *Pichia*, ορισμένα στελέχη των οποίων είναι υποσχόμενα στην οινοποίηση ([Domizio et al., 2011](#)). Η *P. kluyveri* είναι εμπορικά διαθέσιμη με το όνομα *FrootZen*™. Σε ζύμωση *Sauvignon blanc* από τη Νέα Ζηλανδία με *P. kluyveri*, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα κρασιά είχαν αυξημένα επίπεδα 3ΜΗΑ, υποδεικνύοντας ότι το συγκεκριμένο στέλεχος ήταν σε θέση να απελευθερώσει πιο ευνοϊκές πτητικές θειόλες από το μούστο *Sauvignon blanc* [Anfang et al., \(2009\)](#). Η πλειονότητα των εργασιών της *Pichia* σχετικά με το κρασί έχει διεξαχθεί με την *P. membranifaciens* και *P. guilliermondii*. Η *P. membranifaciens* χαρακτηρίστηκε ως καλός παραγωγός οξικού εστέρα [Viana et al., \(2008\)](#). Η *P. guilliermondii* έδειξε υψηλή ενζυμική δραστηριότητα της υδροξυκινναμικής αποκαρβοξυλάσης (hydroxycinnamate decarboxylase) ακόμη και με παρουσία *S.cerevisiae* που μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό ενώσεων βινυλοφαινολικής πυρανοανθοκυανίνης (vinylphenolic pyranoanthocyanin adducts) που αποτελεί μια από τις πιο σταθερές μορφές χρώματος που απαντώνται στην οινοποίηση ([Benito et al., 2011](#)). Στον παρακάτω πίνακα 1 απεικονίζονται τα διάφορα στελέχη ζυμών non Saccharomyces και οι εταιρίες που διαθέτουν το κάθε στέλεχος.

Πίνακας 1. Non Saccharomyces ζύμες και που είναι διαθέσιμες. (Vejarano et al., 2021).

Yeast Species	Commercial Brand	Providing Company (Country)	Format <sup>1</sup>
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	Biodiva TD291	Lallemand (Canada)	ADY
	Prelude	CHR Hansen (Denmark)	ADY
	Zymaflore Alpha	Laffort (France)	ADY
	Viniferm NSTD	Agrovin (Spain)	ADY
	EnartisFerm Qr	Enartis (Italy)	ADY
	EnartisFerm Qr Liquido	Enartis (Italy)	CRY
	Oenovin Torulaspora BIO	Oeno (Italy)	ADY
	Torulaspora delbrueckii	Probiotec (Italy)	FLY
	Torulaspora delbrueckii 12.2	Probiotec (Italy)	FLY
<i>Lachancea thermotolerans</i>	Laktia	Lallemand (Canada)	ADY
	Concerto	CHR Hansen (Denmark)	ADY
	Octave	CHR Hansen (Denmark)	ADY
	EnartisFerm Qr	Enartis (Italy)	CRY
	Excellence X'Fresh	Lamothe-Abiet (France)	ADY
	LEVULIA Alcomeno	AEB Group (Italy)	ADY
	Kluyveromyces thermotolerans	Probiotec (Italy)	FLY
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Flavia MP346	Lallemand (Canada)	ADY
	Oenoferm MProtect	Erbslöh (Germany)	ADY
	AWRI Obsession	AB Biotek (United Kingdom)	ADY
	LEVULIA Pulcherrima	AEB Group (Italy)	ADY
	Primaflora VB BIO	AEB Group (Italy)	ADY
	Excellence B-Nature	Lamothe-Abiet (France)	ADY
<i>Metschnikowia fructicola</i>	Levia Nature	Oeno (Italy)	ADY
	Gaïa	Lallemand (Canada)	ADY
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Atecrem 12H	BioEnologia (Italy)	CRY
	Promalic	Proenol (Portugal)	ENCY
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Anti Brett 1	Probiotec (Italy)	FLY
<i>Kluyveromyces wickerhamii</i>	Anti Brett 2	Probiotec (Italy)	FLY
<i>Starmerella bacillaris</i>	Atecrem 11H	BioEnologia (Italy)	CRY
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	Fructoferm W3 <sup>2</sup>	Lallemand (Canada)	ADY
<i>Zygosaccharomyces parabaillii</i>	Hardened Spaniard	Mainiacal Yeast (United States)	FLY
<i>Pichia kluyveri</i>	Frootzen	CHR Hansen (Denmark)	AFY
	Pichia kluyveri MIP-001	Propagate Lab (United States)	FLY
<i>Pichia kluyveri</i> + <i>Kazachastania servazzii</i>	Trillyeast	BioEnologia (Italy)	CRY
<i>Torulaspora delbrueckii</i> + <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Oenoferm Wild & Pure	Erbslöh (Germany)	ADY
<i>Torulaspora delbrueckii</i> + <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	New Nordic Ale Yeast	White Labs (United States)	FLY
<i>Torulaspora delbrueckii</i> + <i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Zymaflore Égide	Laffort (France)	ADY
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> + <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Primaflora VR BIO	AEB Group (Italy)	ADY
<i>Lachancea thermotolerans</i> + <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Symphony	CHR Hansen (Denmark)	ADY
<i>Lachancea thermotolerans</i> + <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Rhythm	CHR Hansen (Denmark)	ADY
<i>Lachancea thermotolerans</i> + <i>Torulaspora delbrueckii</i> + <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Harmony	CHR Hansen (Denmark)	ADY
<i>Lachancea thermotolerans</i> + <i>Torulaspora delbrueckii</i> + <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Melody	CHR Hansen (Denmark)	ADY

<sup>1</sup> Formats included in Resolution OIV-OENO 576B-2017: ADY, active dry yeast; CRY, cream yeast; AFY, active frozen yeast; ENY, encapsulated yeast. FLY, fresh liquid yeast (according to the technical datasheets). <sup>2</sup> For the treatment of stuck fermentations (reported by Sütterlin [6]).

Το σχήμα 2 παρουσιάζει : a) Το ποσοστό των non-Saccharomyces προϊόντων που παρέχονται από αυτές τις εταιρίες. b) Το ποσοστό των τύπων των μαγιών που διατίθενται στην αγορά και c) Τον αριθμό των διαφημιστικών προϊόντων βασισμένων σε ζύμες non Saccharomyces που είναι διαθέσιμες στην αγορά ανά είδος.



Σχήμα 2. Non Saccharomyces ζύμες και τα ποσοστά διαθεσιμότητάς τους. (Vejarano et al., 2021)

## 2.2.2 Χρήση *non Saccharomyces* στον ζύθο

### *Brettanomyces* (*Dekkera*)

Τα τελευταία χρόνια μια χρησιμοποιούμενη *non-Saccharomyces* μαγιά παρασκευής μύρας είναι η *Brettanomyces*, η οποία εμβολιάζεται συνήθως στη ζύμωση μερικών ξινών μπυρών. Βρίσκεται σε αυθόρμητη ζύμωση σε μύρες *Gueuze* και *Lambic*, στις οποίες συμβάλλει στην τυπικό ξινό και μοναδικό περίπλοκο προφίλ γεύσης (*Bokulich and Bamforth, 2013; Schifferdecker et al., 2014; Steensels et al., 2015*). Σε αντίθεση με το κρασί, όπου τα υψηλά επίπεδα 4EP σχετίζονται κυρίως με «φαρμακευτικές» γεύσεις όπως αυτή του "τσιρότου", ο πικάντικος χαρακτήρας "Brett" στην μύρα κυριαρχείται συνήθως από υψηλότερα επίπεδα 4EG και θεωρείται θετικό για ορισμένα είδη μύρας και ειδικά για αυθόρμητα ζυμωμένες μύρες *Gueuze* και *Lambic*. Οι συγκεντρώσεις των 4EG και 4EP στην μύρα καθορίζονται από τα επίπεδα του υδροξυκινναμονικών οξέων (κυρίως φεουλικού οξέος) στα μέσα ζύμωσης και την ικανότητα της μαγιάς *Brettanomyces* να μετασχηματίσει την ένωση (*Steensels et al., 2015*). Μερικές ζύμες *Brettanomyces* έχουν επίσης υψηλή δραστηριότητα εστεράσης, η οποία είναι υπεύθυνη για τον σχηματισμό αιθυλεστέρων όπως ο οξικό και γαλακτικός αιθυλεστέρας καθώς επίσης και για την υδρόλυση οξικών εστέρων όπως ο οξικός ισοαμυλεστέρας και ο οξικός φαιναιθυλεστέρας (*Steensels et al., 2015; Verstrepen et al., 2003a*). Για την εφαρμογή των υποψηφίων στελεχών *Brettanomyces* στην μύρα, είναι επομένως σημαντικό να αξιολογηθούν τα επίπεδα που παράγονται τόσο οι φαινολικοί όσο και οι οξικοί εστέρες.

Η ειδική παραγωγή πτητικών ουσιών της *Dekkera*, κυρίως φαινολικών ενώσεων, αιθυλεστέρων και λιπαρών οξέων, οδηγεί σε μια σύνθετη αισθητηριακή αντίληψη που περιγράφεται ως γαρίφαλο, καπνός, υγρό δέρμα, τροπικά φρούτα και μπαχαρικά (*Steensels et al., 2014*). Υπό αυτήν την έννοια, υπάρχει μία αυξανόμενη τάση των αμερικανικών μικροζυθοποιείων να κάνουν χρήση των *Dekkera spp.* στη ζύμωση, στην ωρίμανση, ή στην διαδικασία επαναζύμωσης στην φιάλη, και ορισμένοι παραγωγοί πραγματοποιούν ζύμωση εξ ολοκλήρου από την *Dekkera* (*Bokulich et al., 2013*).

### ***Torulaspota delbrueckii***

Η *T. delbrueckii* έχει χρησιμοποιηθεί στην μύρα γιατί έχει υψηλή καθαρότητα ζύμωσης, χαμηλά επίπεδα οξικού οξέος ακεταλδεΐδη, και οξικού αιθυλεστέρα και ενισχύει τις αρωματικές της ενώσεις με ανθικό και φρουτώδη χαρακτήρα([Canónico et al., 2016](#)).

Τα στελέχη *T. delbrueckii* έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί στην παραγωγή μύρας σιταριού γερμανικού τύπου (*Hefe-weizen*) για τις γεύσεις μπανάνας, τσίχλας και γαρίφαλου που προσδίδουν ([Tataridis et al., 2013](#)). Η *T. delbrueckii* έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει τα επίπεδα οξικό αιθυλεστέρα και αλκοόλης και παράγει το υψηλότερα επίπεδα 4VG (POF-Phenolic Off Flavor), σε διαδοχικές ζυμώσεις μύρας. Οι [King και Richard \(2000\)](#) έδειξαν ότι η μαγιά *T. delbrueckii*, καθώς και ο *S. cerevisiae* θα μπορούσε να μετατρέψει μονοτερπενικές αλκοόλες λυκίσκου σε άλλα παράγωγα. Πρόσφατα, οι [Tataridis et al., \(2013\)](#) έκαναν μια προκαταρκτική μελέτη για τη χρήση των στελεχών του *T. delbrueckii* στην παραγωγή μύρας τύπου σιταριού και διαπίστωσαν ότι αυτό το είδος μπόρεσε να καταναλώσει μαλτόζη (εξαρτάται από το στέλεχος), αλλά πιο αργά από το εμπορικό στέλεχος *S. cerevisiae*, δίνοντας μεγαλύτερη ένταση αρωμάτων και πολυπλοκότητα στο προϊόν. Η μύρα που παράχθηκε περιείχε υψηλή περιεκτικότητα σε εστέρες, με αρώματα τριαντάφυλλου, τσιχλόφουσκας και μπανάνας.

Οι μικτές καλλιέργειες με *S. cerevisiae* και *T. delbrueckii* παρήγαγαν μύρες με επίπεδα αιθανόλης, που ήταν συγκρίσιμα με αυτά των δοκιμών ελέγχου *S. cerevisiae*. Αντιθέτως, οι καθαρές καλλιέργειες *T. delbrueckii* έδειξαν μεγάλη μείωση στο επίπεδο της αιθανόλης (2,66% v/v) ([Canónico et al., 2019](#)).

### ***Saccharomycodes***

Η *Saccharomycodes ludwigii* έχει μελετηθεί για την παραγωγή μύρας με χαμηλή περιεκτικότητα σε αλκοόλ ή χωρίς αλκοόλ, λόγω της αδυναμίας της να ζυμώσει τη μαλτόζη. Σε έρευνα , οι [De Francesco et al., \(2015\)](#) δοκίμασαν 11 μη συμβατικά στελέχη ζύμης για παραγωγή μύρας με χαμηλή περιεκτικότητα σε αλκοόλ. Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ανήκαν σε δύο διαφορετικά είδη: *S. ludwigii* και *Zygosaccharomyces rouxii*. Τα στελέχη *S. ludwigii* ήταν πιο κατάλληλα για την παραγωγή μύρας με χαμηλή περιεκτικότητα σε αλκοόλη. Η μύρα που παρήχθη είχε χαμηλή παραγωγή αρώματος και παρέμειναν κυρίαρχες οι γεύσεις που θυμίζουν δημητριακά.



### ***Scheffersomyces***

Δεν έχει υπάρξει εκτεταμένη χρήση της συγκεκριμένης ζύμης στην παραγωγή ζύθου. Παρόλα αυτά υπάρχουν στοιχεία από μια έρευνα που διεξήχθη στην οποία έγινε χρήση ενός στελέχους *Scheffersomyces shehatae* στην παραγωγή μύρας. Σαν αποτέλεσμα της έρευνας βρέθηκε ότι η ζύμη ήταν ικανή να παράγει μύρα χωρίς αλκοόλ με <0,5% v/v αιθανόλη ([Li et al., 2011](#)).

### ***Candida zemplinina***

Το δυναμικό ζύμωσης της *Candida zemplinina* αξιολογήθηκε για να διερευνηθεί η πιθανή χρήση της σε ζύμωση μύρας *lager*. Τα στελέχη *C. zemplinina* είχαν καλύτερη ανάπτυξη, υψηλότερα ποσοστά βιώσιμων κυττάρων, λιγότερο ελεύθερη κατανάλωση αμινοαζώτου, χαμηλότερους ρυθμούς καθίζησης και μικρότερες αλλαγές στις τιμές του *pH*, σε σύγκριση με τα αποτελέσματα του *Saccharomyces cerevisiae* στη μαγιά μύρας *lager* στο συνδυαστικό μέσο που δοκιμάστηκε ([Estela-Escalante et al., 2015](#)).

### ***Cyberlindnera* (πρώην *Williopsis* spp.)**

Η παλαιότερα ονομαζόμενη *Williopsis* spp. είναι γνωστή για την υψηλή παραγωγή των οξικών εστέρων (αιθυλ, ισοαμυλ και οξικός 2-φαινυλαιθυλεστέρας). Η *C. fabianii* είχε υψηλή αναλογία παραγωγής εστέρων ([Van Rijswijck et al., 2017](#)). Η *C. mrakii* είχε υψηλές συγκεντρώσεις εστέρων, ιδιαίτερα οξικού ισοαμυλεστέρα, και έδινε μύρα με χαμηλή περιεκτικότητα σε αλκοόλη ([Liu & Quek 2016](#)).

### ***Zygosaccharomyces***

Μπορεί να αναπτυχθεί σε υψηλή οσμωτική πίεση, χαμηλό *pH* και υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης. Η *Z. rouxii* είχε τιμές διακετυλίου πάνω από το όριο γεύσης ([De Francesco et al., 2015](#)). Η *Z. bailii* και *Z. kombuchaensis* έδιναν στην παραχθείσα μύρα χαμηλής περιεκτικότητας σε αλκοόλη, γεύση από μέλι ή γλοώδη και φρουτώδη χαρακτηριστικά και έναν χαρακτήρα διακετυλίου (βουτυρώδη).

### ***Kazachstania* (πρώην *Saccharomyces exiguus* )**

Παρατηρήθηκε ότι η ζύμωση με *K. servazzi* στην παραγωγή μύρας είχε ως αποτέλεσμα μύρες με αυξημένα επίπεδα 3-μεθυλοβουτανόλης, φαινυλαιθανόλης και οξικού

φαινυλαιθυλεστέρα, καθώς επίσης και δεκανοϊκού αιθυλεστέρα και καπρυλικού εστέρα, τα οποία προσδίδουν αρώματα από τριαντάφυλλο και μπανάνα (*Gibson et al., 2013*).

## *Pichia*

Έχει παρατηρηθεί ότι όλα τα στελέχη της *Pichia* παράγουν υψηλά επίπεδα οξικού αιθυλεστέρα (γεύση τύπου διαλύτη), και ξεχωρίζουν στην παραγωγή υψηλών επιπέδων όλων των οξικών εστέρων. Η *Pichia anomala* έχει παρατηρηθεί ότι επηρεάζει τα επίπεδα οξικού εστέρα καθώς και τα επίπεδα αλκοόλης. Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε με σκοπό την παρατήρηση των ζυμωτικών χαρακτηριστικών και της δράσης μερικών non-*Saccharomyces* ζυμών στη ζύμωση μύρας, σε σύγκριση με τον *Saccharomyces cerevisiae*, εξετάστηκαν διαφορές στις ζυμωτικές παραμέτρους, στο αρωματικό προφίλ, καθώς επίσης και στις προτιμήσεις των καταναλωτών. (Tataridis et al., 2014)

Σε μια συγκεκριμένη έρευνα η *P. kluyverii* παρατηρήθηκε ότι σαν μαγιά επιφάνειας (flor yeast) έδινε ένα χαρακτηριστικό και δυνατό άρωμα μπανάνας και τσιχλόφουσκας (Tataridis et al., 2014).

## 2.2.3 Ζύμες άνθισης

### 2.2.3.1 Χρήση των ζυμών άνθισης στον οίνο

Το *Flor* το οποίο στα Ισπανικά και Πορτογαλικά σημαίνει άνθη, στην οινοποίηση, είναι μια στρώση ζύμης στην επιφάνεια του κρασιού, σημαντική για την κατασκευή ορισμένων κρασιών *sherry*. Το άρωμα σχηματίζεται φυσικά υπό ορισμένες οινοποιητικές συνθήκες, από γηγενείς ζύμες που βρίσκονται στην περιοχή της Ανδαλουσίας στη νότια Ισπανία. Κατά την παραγωγή των κρασιών *sherry*, τα ελαφρώς πορώδη δρύινα βαρέλια γεμίζουν σκόπιμα περίπου τα πέντε έκτα γεμάτα με το νεαρό κρασί, αφήνοντας "χώρο δύο γροθιών" άδειο, για να επιτρέψει στη μαγιά *flor* να σχηματιστεί (άνθηση) ενώ το κούμπωμα δεν είναι πλήρως σφραγισμένο. Η άνθηση ευνοείται σε ψυχρότερα κλίματα και υψηλότερη υγρασία. Κατά τη διάρκεια της φάσης ζύμωσης της παραγωγής *sherry*, η μαγιά *flor* λειτουργεί αναερόβια, μετατρέποντας τη ζάχαρη σε αιθανόλη. Όταν έχει καταναλωθεί όλη η ζάχαρη, η φυσιολογία της ζύμης αλλάζει σε σημείο που ξεκινά μια αερόβια διαδικασία διάσπασης και μετατροπής ουσιών σε άλλες ενώσεις, όπως η ακεταλδεΰδη. Μια κηρώδης επικάλυψη εμφανίζεται στο εξωτερικό των κυττάρων, προκαλώντας τη ζύμη να επιπλέει στην επιφάνεια και σχηματίζει μια προστατευτική "κουβέρτα" αρκετά παχιά για να προστατεύει το κρασί από το οξυγόνο. Αυτή η διαδικασία μειώνει δραστικά την οξύτητα του κρασιού και καθιστά το *sherry* ένα από τα πιο αλδεϊδικά κρασιά στον κόσμο. Μελέτες έχουν δείξει ότι για να ευδοκιμήσει η άνθηση, το κρασί

πρέπει να παραμείνει σε περιοχή αλκοόλ από 14,5% έως 16% ABV. Κάτω από 14,5% η μαγιά δεν θα σχηματίσει το προστατευτικό της κάλυμμα, και έτσι το κρασί θα οξειδωθεί σε μεγάλο βαθμό, ενώ πάνω από το 16% το *flor* δεν μπορεί να επιβιώσει, και έτσι το κρασί ουσιαστικά γίνεται *oloroso* (Robinson, 2006). Εκτός από τα συγκεκριμένα επίπεδα αλκοόλ, το *flor* χρειάζεται ένα πολύ ιδιαίτερο κλίμα για να ανθίσει. Η υγρασία είναι ένας θεμελιώδης παράγοντας (ιδανικά 70% ή υψηλότερη). Θεωρείται επίσης ότι διαφορετικά στελέχη ζύμης κυριαρχούν στο *flor* ανάλογα με τις εποχιακές αλλαγές στη θερμοκρασία του κελαριού, που είναι ιδανικά μεταξύ 18-22°C. Κατά τη βιολογική γήρανση του *sherry*, παρατηρείται σημαντική μικροβιακή ποικιλομορφία στο *velum* (μεμβράνη επιφάνειας που σχηματίζεται από τις *flor* ζύμες) που προστατεύει το κρασί από την οξείδωση κατά τη διαδικασία της παλαίωσης του οίνου. Οι τέσσερις κύριες φυλές ζύμης *flor* είναι: *Saccharomyces cerevisiae beticus*, *Saccharomyces cerevisiae cheresiensis*, *Saccharomyces cerevisiae montuliensis* (Zygo), *Saccharomyces cerevisiae rouxii*. (Ruben, 2013)

Δράσεις της άνησης: 1) Προστατεύει το κρασί από το οξυγόνο ενώ καταναλώνει επίσης το μεγαλύτερο μέρος του. Αυτό αφήνει τα βιολογικά *sherries* πολύ πιο χλωμά και κάνει το αρωματικό τους προφίλ πιο αναγωγικό, 2) Μειώνει τα σάκχαρα, 3) Μείωση του μεταβολισμού της αιθανόλης, (4) Μείωση της γλυκερόλης, η μαγιά θα τη χρησιμοποιήσει ως πηγή άνθρακα για να υποστηρίξει την ανάπτυξή της, 5) Αύξηση της ακεταλδεΐδης έως 1000 χιλιοστόγραμμα ανά λίτρο. Εκτός από την ακεταλδεΐδη, η άνηση θα αυξήσει επίσης και την περιεκτικότητα σε άλλες ενώσεις αρώματος όπως ανώτερες αλκοόλες, λακτόνες και τερπένια οι οποίες θα προσδώσουν άλλες γεύσεις όπως πράσινα αμύγδαλα, αλμυρές νότες και μεσογειακά βότανα. (Ruben, 2013)

Κατά την εμφιάλωση, το *sherry* θα φιλτραριστεί, οι φιάλες ενδέχεται να περιέχουν λίγες ζωντανές ζύμες άνησης, αλλά δεδομένης της μικρής ποσότητας, αυτό είναι απολύτως ακίνδυνο για κατανάλωση (Ruben, 2013). Τα αμινοξέα είναι σημαντικές ενώσεις επειδή χρησιμοποιούνται από τις ζύμες άνησης ως πηγή αζώτου. Τα κρασιά με χαμηλή συνολική περιεκτικότητα σε φαινόλη είναι κατάλληλα για να σχηματίσουν άνηση. Η ανάπτυξη της άνησης εξαρτάται από τη θερμοκρασία, και τα κρασιά πρέπει να αποθηκεύονται μεταξύ 15 και 20°C. Η δραστηριότητα της άνησης εξαρτάται και από την εποχή. Η άνηση είναι πιο ενεργή μεταξύ Φεβρουαρίου και Ιουνίου, και στη συνέχεια μειώνεται έως τον Οκτώβριο, που η δραστηριότητα αυξάνεται ξανά. Η ταινία που σχηματίζεται στην επιφάνεια δεν πρέπει να διαταραχθεί. Ωστόσο, το σύστημα ανάμειξης είναι ζωτικής σημασίας για τη διατήρηση του *flor*. Μικρές ποσότητες κρασιού πρέπει να λαμβάνονται συχνά και να αντικαθίστανται με

φρέσκο κρασί για να ανανεώσουν την παροχή οξυγόνου και να ανανεώσουν θρεπτικά συστατικά για τη συντήρηση της άνθησης (*Bakker, 2011*).

Τα κρασιά *sherries* προκύπτουν από τη βιολογική γήρανση από ένα μείγμα μοναδικών ζυμών άνθησης όπως *Saccharomyces beticus*, *Saccharomyces cheresiensis*, *Saccharomyces montuliensis* και *Saccharomyces rouxii*, που αναπτύσσονται στην επιφάνεια του κρασιού κατά την παραγωγή. (*Esteve-Zarzoso et al. 2003*)

### 2.2.3.2 Χρήση των ζυμών άνθησης στο ζύθο

Όπως στο κρασί πρωτοπόρος για την άνθηση είναι τα κρασιά *sherry*, έτσι και στην μύρα έχει χρησιμοποιηθεί η τεχνική της *solera*. Σε μελέτες που έγιναν η παραγωγή ξεκίνησε από ένα *all pale malt, English - style barley wine* με πυκνότητα 1,086 το οποίο ενώθηκε μετά από ένα χρόνο με *pale barley wine* πυκνότητας 1,051 σε ένα βαρέλι 5 λίτρων. Μετά από 5 χρόνια είχε αναπτύξει ένα πλούσιο, βυνώδες, πολύπλοκο αλλά παρόλα αυτά φρέσκο οινικό *ale* άρωμα, με νότες *λικέρ-εσπεριδοειδών Cointreau*. Έπειτα, από αυτή την αρχική *ale* ξεκίνησαν να μεταφέρουν ποσότητα σε άλλες παλιωμένες *ale*, για να πάρουν και αυτές παρόμοια χαρακτηριστικά με την αρχική (*Renner, 2002*).

## 2.3 Η *Pichia kluyveri*

Η *Pichia kluyveri* μπορεί να βοηθήσει τα οινοποιεία να ανταπεξέλθουν στην ανάγκη των καταναλωτών για φυσικά, αυθεντικά και πιο φρουτώδη κρασιά.

Επειδή το στέλεχος της συγκεκριμένης ζύμης που κυκλοφορεί εμπορικά (*FrootZen™, CHR HANSEN*) δεν αντέχει στην ξήρανση, διατίθεται σε μορφή παγωμένου υποστρώματος

Είναι πιο ασφαλής και εύκολη στην χρήση καθώς δεν χρειάζεται να ενυδατωθεί, ούτε να γίνει εγκλιματισμός ή να γίνει έλεγχος του νερού πριν προστεθεί. Γενικά μειώνεται η πιθανότητα λάθους και αργής ή πρόωρα σταματημένη ζύμωσης.

Αυτή η ζύμη θα πρέπει να χρησιμοποιείται σε επακόλουθο εμβολιασμό, όπου γίνεται πρώτα εμβολιασμός της *Pichia*, και 2 μέρες αργότερα ένας δεύτερος εμβολιασμός, όταν η θερμοκρασία ζύμωσης είναι περίπου 18 - 19°C (χρησιμοποιείται συνήθως *Saccharomyces cerevisiae*), καθώς η *Pichia* δεν μπορεί να υποστηρίξει ζύμωση πάνω από 4 - 5% αλκοόλη. Με αυτόν τον τρόπο, πετυχαίνετε η πολυπλοκότητα μιας άγριας ζύμωσης αλλά και η ασφάλεια μία ελεγχόμενης ζύμωσης με επιλεγμένες ζύμες (*CHR HANSEN, 2020*).

### 2.3.1 Ταξινόμια γένους *Pichia*

Οι φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των ειδών του *Pichia* προσδιορίστηκαν από τη μέγιστη ανάλυση συνδυασμένων αλληλουχιών γονιδίων από σχεδόν πλήρη rRNA LSU, SSR rRNA και τον παράγοντα επιμήκυνσης μετάφρασης-1α. Οι αριθμοί ένταξης της GenBank για τα τρία γονίδια στην ανάλυση αλληλουχίας δίδονται με κάθε περιγραφή είδους και από τους Kurtzman κ.α.(2008). The Yeasts (Fifth Edition). Στον πίνακα 2 φαίνεται και η επίσημη επιστημονική ταξινόμηση του γένους *Pichia* (Kurtzman, 2011).

Πίνακας 2. Επιστημονική ταξινόμηση του γένους *Pichia*.

<b><i>Pichia</i></b>	
<b>Scientific classification</b>	
Kingdom:	Fungi
Phylum:	Ascomycota
Subphylum:	Saccharomycotina
Class:	Saccharomycetes
Order:	Saccharomycetales
Family:	Saccharomycetaceae
Genus:	<b><i>Pichia</i></b> Hansen, 1904

### 2.3.2 Οικολογία

Η *Pichia kluyveri* είναι μία ζύμη κρασιού που βρίσκεται φυσικά στον πολτό των σταφυλιών, έχει βρεθεί σε σταφύλια της Νέα Ζηλανδίας και όχι μόνο. (CHR HANSEN, 2020).

Η *Pichia kluyveri* συναντάται επίσης σε σαπισμένα φρούτα ή σε σαπισμένο κάκτο. Σε μία περίπτωση βρέθηκε σε ντομάτες που τις είχαν αφήσει για 15 μέρες σε επαφή με έντομα (Starmer et al., 1992) ενώ σε άλλη περίπτωση απομονώθηκε από ροδάκινο (*Prunus persica*) (Cavalcante Fai et al., 2014). Επιπλέον απομονώθηκε από χυμούς και ζυμώσεις από κρασιά στον ποταμό *Kumeu* της Ν. Ζηλανδίας (Borley, 2008). Περισσότερα από 100 είδη αυτού του γένους είναι γνωστά. Μερικά από αυτά παρεμποδίζουν τη διαδικασία ζύμωσης για την παραγωγή αλκοόλης. Στην οινοποίηση, ορισμένα είδη της *Pichia* μπορούν να δημιουργήσουν

πιθανές βλάβες στα κρασιά ([Fugelsang et al., 2010](#)). Τα περισσότερα βρίσκονται σε σαπισμένα φυτά ενώ μερικά ζουν σε στενή συμβίωση με έντομα.

### 2.3.3 Μορφολογικά χαρακτηριστικά και φυσιολογία

Η *Pichia* είναι ένα γένος ζυμών της οικογένειας [Saccharomycetaceae](#) με κυκλικά, ελλειπτικά ή επιμήκη κύτταρα. Η *Pichia* είναι τελεόμορφη ζύμη, και σχηματίζει ημισφαιρικά η κυκλικά ασκοσπόρια σε σχήμα καπέλου, κατά τον αγενή πολλαπλασιασμό ([Fugelsang et al., 2010](#))

Σε έρευνα των [Mewa-Ngongang et al., \(2019\)](#) ορισμένα στελέχη της *P. kluyveri* χρησιμοποιήθηκαν ως βιοσυντηρητικά με σκοπό την πρόληψη της αλλοίωσης τροφίμων και ποτών. Κατά την πειραματική διαδικασία τα στελέχη αυτά παρουσίασαν θερμική αντοχή καθώς επίσης και αντιβακτηριακή δράση έναντι ορισμένων παθογόνων βακτηριακών ειδών ([Mewa-Ngongang et al., 2019](#)).

### 2.3.4 Μεταβολισμός

Η *Pichia kluyveri* είναι ικανή να μεταβολίζει την γλυκόζη στο γλεύκος της μύρας, και να συμμετέχει θετικά στο τελικό αρωματικό και γευστικό προφίλ του γλεύκους παράγοντας υψηλά ποσοστά ειδικών αρωματικών ενώσεων. Ανάλογα με τα ποσοστά της γλυκόζης στο γλεύκος η συγκεκριμένη ζύμη έχει την δυνατότητα να παράξει μύρες με χαμηλό αλκοόλ η μύρες χωρίς αλκοόλ ([Saerens et al., 2014](#)).

Παρατηρήθηκε ότι η παρουσία υψηλής συγκέντρωσης λακτόζης ήταν βοηθητικός παράγοντας στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων της *Pichia kluyveri*. Η συμπεριφορά της απέναντι σε άλλους υδατάνθρακες εξαρτάται από το κάθε στέλεχος ([Bueno et al., 2014](#))

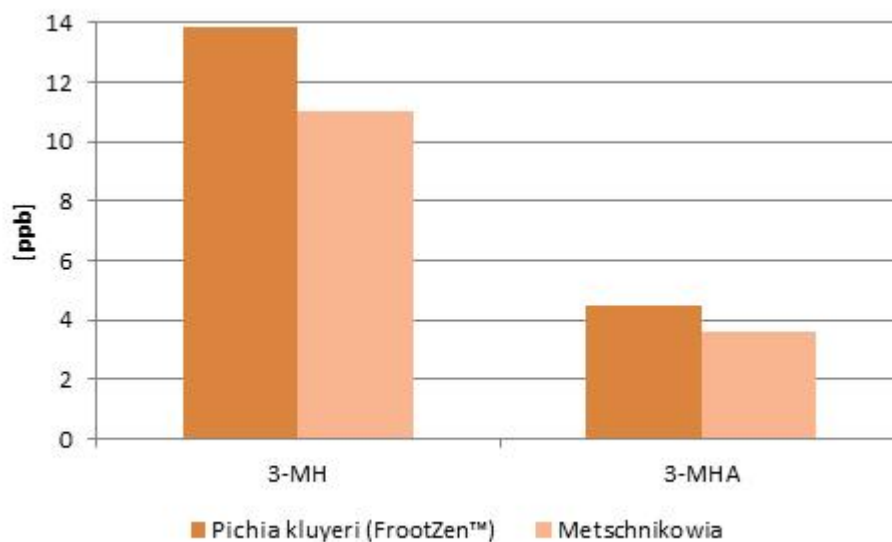
Η *P. kluyveri* παράγει οξικό φαινυλ-αιθυλεστέρα το οποίο δίνει χαρακτηριστικά αρώματα τριαντάφυλλου και άνθους όπως επίσης παράγει και αξιοσημείωτες ποσότητες οξικού ισοαμυλεστέρα (μπανάνα, αχλάδι) ([Tataridis et al., 2014](#)).

Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η *Pichia kluyveri* θα μπορούσε μερικώς να αποικοδομήσει το L-μηλικό οξύ ([Lu et al., 2016; Redzepovic et al., 2003](#))

### 2.3.5 Η χρήση της *Pichia kluyveri* στην βιομηχανία των ποτών.

Χρήση της *pichia* στο κρασί :

Είναι ιδιαίτερα ταιριαστή για την παραγωγή καλά ισορροπημένων λευκών και ροζέ κρασιών αλλά μελέτες έχουν δείξει ότι έχει ενδιαφέρον η χρήση της σε κόκκινα κρασιά το οποίο οφείλεται στην ικανότητα της να ενισχύει τις θειόλες στα *Cabernet-Sauvignon*, *Cabernet Franc*, *Syrah (Shiraz)*, *Merlot* ή *Pinot Noir* (Anfang et al., 2009). Σε μελέτη που έγινε πάνω στην επίδραση της *Pichia kluyveri* στις συγκεντρώσεις πτητικών θειολών στο *Sauvignon blanc* της Χιλής έδειξε ότι ο συν-εμβολιασμός της *Pichia kluyveri* είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή περισσότερων πτητικών θειολών σε σύγκριση με τον συν-εμβολιασμό με *Metschnikowia* όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 1 (CHR HANSEN, 2020).



Διάγραμμα 1. Συγκεντρώσεις πτητικών θειολών της *Pichia kluyveri* στο *Sauvignon blanc* της Χιλής (CHR HANSEN, 2020).

Το *FrootZen™* είναι ιδιαίτερα κατάλληλο για τις ακόλουθες ποικιλίες σταφυλιών για κρασιά όπου αναμένεται αύξηση του εύρους γεύσης και ένταση:

*Chardonnay*, *Sauvignon Blanc*, *Riesling*, *Verdejo*, *Vermantino*, *Gewürztraminer*, *Chenin*, *Semillon*, *Pinot Gris*, *Μοσχάτο*, *Grenache Blanc*, *Roussanne*, *Viognier*, *Grenache Noir*, *Pinot Noir*, *Merlot*, *Cabernet-Sauvignon*, *Shiraz*, *Zinfandel*, *Cinsaut*, *Carignan*, *Tempranillo*, *Mourvèdre*, *Malbec*.

Η *Pichia* μπορεί να βοηθήσει οινοποιεία να ανταπεξέλθουν στην ανάγκη των καταναλωτών για φυσικά, αυθεντικά και πιο φρουτώδη κρασιά.



Έχει την ικανότητα να ενισχύει την φρουτώδη γεύση μέσω μιας πιο αποτελεσματικής χρήσης των γευστικών προδρόμων που βρίσκονται φυσικά στο φλοιό του σταφυλιού, και μετατρέπονται από τις ζύμες στην αλκοολική ζύμωση σε πτητικές θειόλες, ισχυρές φρουτώδεις ενώσεις που παράγουν passion fruit και τροπικά αρώματα στο λευκό κρασί και φραγκοστάφυλο στο κόκκινο.

Διαπιστώθηκε μια ποικιλία απομονωμένων στελεχών ζύμης *Pichia* από κρασί της Νέας Ζηλανδίας και βρέθηκε ότι κάποιες από αυτές ήταν σε θέση να απελευθερώσουν είτε 3-μερκαπτο εξάνιο-1-όλη (3MH η οποία δίνει αρώματα *grapefruit* ) είτε οξικό 3-μερκαπτο εξυλεστέρα (3MHA η οποία δίνει αρώματα *passion fruit*).

Πτητικές θειόλες δεν υπάρχουν στο σταφύλι. Αντ' αυτού, απελευθερώνονται από άοσμες S-κυστεΐνης πρόδρομες ουσίες μέσω της δράσης της ζύμης κατά τη διάρκεια της ζύμωσης.

Σε σχετικό πείραμα οι αραιώσεις των δειγμάτων τοποθετήθηκαν σε YPD άγαρ και επώαστηκαν στους 30°C για 24 ώρες πριν μετρήσουν τις αποικίες. Οι *P. kluyveri* και *S. cerevisiae* διακρίθηκαν εύκολα με τη μοναδική μορφολογία αποικιών τους στο YPD. Δείχθηκε ότι η συν-ζύμωση με ειδικά εμπορικά στελέχη και ένα προϊόν απομόνωσης του *Pichia kluyveri* από τη Νέα Ζηλανδία, σε αναλογία έναρξης 1:9, αυξάνει σημαντικά τις συγκεντρώσεις 3MHA σε σύγκριση με το *Sauvignon Blanc* σε μονές ζυμώσεις. Η συν-ζύμωση με αυτό το προϊόν απομόνωσης της *P. kluyveri* μπορεί να παρέχει ένα μέσο για την αύξηση των συγκεντρώσεων του 3MHA στο *Sauvignon Blanc*. Ο μηχανισμός πίσω από αυτή την αύξηση είναι άγνωστος ( [Anfang et al., 2009](#)).

Δύο απομονωμένα στελέχη *Pichia kluyveri* παρήγαγαν αισθητά μεγαλύτερες συγκεντρώσεις 3MHA και 3MH. Οι συγκεντρώσεις θειόλης που παράγονται από αυτά τα δύο στελέχη non-Saccharomyces βρίσκονται στην ανώτερη γκάμα εκείνων που συνήθως συναντώνται στο κρασί ( [Tominaga et al., 1996; 1998](#) ) και έτσι έχουν τη δυνατότητα να επηρεάσουν τη γεύση και το άρωμα.

Επίσης έγινε χρήση της *Pichia* σε ζύμωση κρασιών *shiraz*. Οι ζυμώσεις που ξεκίνησαν από την *P. kluyveri* έδειξαν σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις σε ακεταλδεΐδη, οξικό οξύ, μεθυλεστέρα και οκτανοϊκό βουτύλιο (methyl ester and butyl octanoate). Το οκτανοϊκό βουτύλιο έχει άρωμα καρυδιού και βουτύρου ( [Whitener et al., 2017](#) ).

Χρήση της *Pichia* στην τεκίλα:

Η τεκίλα Αγαύης έχει δοκιμαστεί να παραχθεί σε βιομηχανικό επίπεδο χρησιμοποιώντας δύο ζυμομύκητες *non Saccharomyces* (*Pichia kluyveri* και *Kluyveromyces marxianus*) με απόδοση ζύμωσης μεγαλύτερη από 85%. Σύμφωνα με τους ερευνητές είναι τεχνολογικά βιώσιμο να παραχθεί τεκίλα σε βιομηχανικό επίπεδο χρησιμοποιώντας τους *non-Saccharomyces Pichia kluyveri* (GRO3) και *Kluyveromyces marxianus* (GRO6), δεδομένου ότι η απόδοση αλκοόλης (*Yp/s*) ήταν μεγαλύτερη από 0,45. Η *Pichia kluyveri* (GRO3) ήταν πιο αποτελεσματική για την παραγωγή αλκοόλης και γαλακτικού αιθυλεστέρα από ότι ο *S. cerevisiae*. Αυτή ήταν η πρώτη φορά που η *P. kluyveri* έχει δοκιμαστεί για παραγωγή τεκίλας σε βιομηχανικό επίπεδο. Όπως φαίνεται και στον παρακάτω πίνακα 3 στο τέλος της ζύμωσης, εμφανίζονται τα ποσοστά συγκέντρωσης των πτητικών ενώσεων για τα τρία διαφορετικά στελέχη μαγιάς. Και τα τρία στελέχη παρήγαγαν ανώτερες αλκοόλες εντός του επιτρεπόμενου επιπέδου. Ωστόσο η τελική συγκέντρωση μεθανόλης για τον *S.cerevisiae* και τον *K. marxianus* βρέθηκαν άνω του επιτρεπτού. Τα επίπεδα των αλδευδών και των εστέρων έφτασαν σε συγκεντρώσεις εντός του επιτρεπόμενου εύρους. (Amaya-Delgado et al., 2013).

Πίνακας 3 : Συγκέντρωση πτητικών ενώσεων στο τέλος της ζύμωσης που ρυθμίζεται από την πρότυπη παραγωγή τεκίλας σε mg / 100 mL άνυδρης αιθανόλης.(Amaya-Delgado et al., 2013).

Yeast species	Higher alcohols	Esters	Aldehydes	Methanol
<i>K. marxianus</i> (GRO6)	337.69 ± 30.94	20.23 ± 2.17	8.68 ± 0.14	279.07 ± 2.07
<i>S. cerevisiae</i> (AR5)	266.12 ± 1.24	17.42 ± 3.42	10.27 ± 0.24	310.7 ± 11.52
<i>P. kluyveri</i> (GRO3)	324.4 ± 6.33	19.61 ± 2.67	10.55 ± 0.43	357.32 ± 15.35
NOM-006-SCFI-2005 <sup>a</sup>	20–400	2–270	0–40	30–300

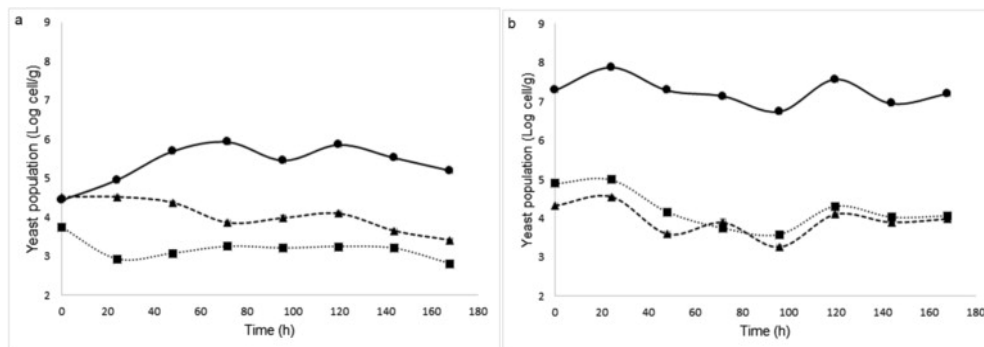
<sup>a</sup> Minimum and maximum values

Χρήση της *Pichia* σε ζύμωση κακάο:

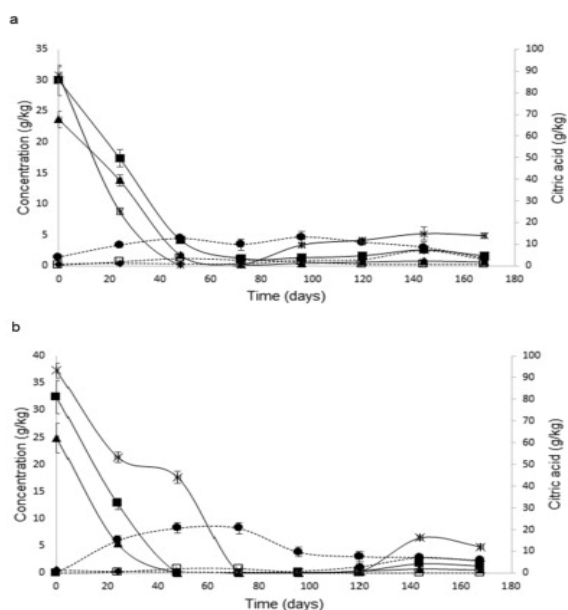
Η δυνητική επίδραση των αρωματικών και πηκτινολυτικών ζυμών στη γεύση του κακάου διερευνήθηκε χρησιμοποιώντας δύο καθορισμένες μικτές αρχικές καλλιέργειες, που περιείχαν στελέχη *Pichia kluyveri* και *Kluyveromyces marxianus* για τον εμβολιασμό των κόκκων κακάο σε ζυμώσεις μικρής κλίμακας. Δείγματα για μικροβιακή ανάλυση και ανάλυση του μεταβολισμού συλλέχθηκαν ανά διαστήματα 12-24 ωρών κατά τη διάρκεια 120 ωρών ζύμωσης. Οι αριθμοί των κυττάρων των ζυμών κορυφώθηκαν μετά από 12 ώρες ζύμωσης, με το κυρίαρχο είδος να αναγνωρίζεται ως *Hanseniaspora opuntiae* και *Hanseniaspora thailandica*. Η *P. kluyveri* και *Kluyveromyces marxianus* βρέθηκαν να συνθέτουν 9,3% και

13,5% του πληθυσμού των ζυμών, αντίστοιχα, μετά από 12 ώρες ζύμωσης, ενώ το *PFGE* (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) έδειξε ότι ~88% όλων των προϊόντων απομόνωσης της *P. kluyveri* και 100% όλων των στελεχών *Kluyveromyces marxianus* ήταν ταυτόσημα με τα ενοφθαλμισμένα στελέχη. Παρά το γεγονός ότι ποτέ δεν ήταν τα κυρίαρχα είδη ζυμών σε κάποιο στάδιο ζύμωσης, οι μη συσσωματωμένες σοκολάτες που παρήχθησαν από τις δύο εμβολιασμένες ζυμώσεις κρίθηκαν από οργανοληπτική ανάλυση να διαφέρουν στο προφίλ γεύσης σε σύγκριση με τον αυθόρμητα ζυμωθέντα μάρτυρα. Αυτό θα μπορούσε να δείξει ότι οι ζύμες έχουν μεγαλύτερο αντίκτυπο στις οργανοληπτικές ιδιότητες του κακάου από ό,τι είχε προηγουμένως υποθεθεί. (*Crafack et al., 2013*)

Ερευνήθηκε η δυναμική των *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kluyveri* και *Hanseniaspora uvarum* κατά τη διάρκεια αυθόρμητων και εμβολιασμένων ζυμώσεων κακάο και η επίδρασή τους στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της σοκολάτας. Όπως αναμενόταν, η ζύμη *P. kluyveri* ανιχνεύθηκε σε μικρούς αριθμούς (μέση τιμή 3,1 *log* κυττάρου/g) κατά την αυθόρμητη ζύμωση. Η *P. kluyveri* έδειξε τον υψηλότερο πληθυσμό στην εμβολιασμένη χημική δοκιμή (μέσο όρο 4,2 *log* κυττάρου/g). Παρατηρήθηκαν διαφορές στις ιδιότητες γεύσης, καθώς οι καταναλωτές ανέφεραν ισχυρότερες ιδιότητες καφέ και ξινές ιδιότητες στην εμβολιασμένη χημική δοκιμή. Ο εμβολιασμός επιτάχυνε τη διαδικασία. Οι *S. cerevisiae* και *P. kluyveri* συνέβαλαν πιθανώς στην ξινή και πικρή γεύση καθώς και τη γεύση καφέ, στην εμβολιασμένη σοκολάτα (*Crafack et al., 2013*).



Διάγραμμα 2. Δυναμική συμπεριφορά πληθυσμών ζυμομυκήτων (*S. cerevisiae*, *P. kluyveri* (■) και *H. uvarum* (▲)) κατά τη διάρκεια των (a) αυθόρμητων και (b) εμβολιασμένων ζυμώσεων του κακάου, μετρούμενη με *qPCR*. Η τυπική απόκλιση του μέσου κυμαίνεται από 0,003 έως 0,1 *log* κυττάρου g<sup>-1</sup> (*Batista et al., 2015*).



Διάγραμμα 3. Υδατάνθρακες, οργανικά οξέα και αιθανόλη που ανιχνεύονται στον πολτό κατά τη διάρκεια (a) αυθόρμητης και (b) εμβολιασμένης ζύμωσης κακάου. ▲ = γλυκόζη. ■ = φρουκτόζη. ● = αιθανόλη. ◆ = οξικό οξύ; □ = γαλακτικό οξύ; \* = κιτρικό οξύ (Batista et al., 2015).

Χρήση της *Pichia* σε ζύμωση καφέ:

Οι επιδράσεις των *Pichia anomala*, *Pichia kluyveri* και *Hanseniaspora uvarum* ήταν καθοριστικές για την ανάπτυξη του *Aspergillus ochraceus* κατά την επεξεργασία του καφέ όπου μελετήθηκε η παραγωγή ωχρατοξίνης Α (OTA) σε άγαρ εκχυλίσματος βύνης (MEA) και σε άγαρ καφέ (CA). Στελέχη της *P. anomala*, *P. kluyveri* και *H. uvarum* που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτήν τη μελέτη αποδείχθηκαν να είναι ισχυροί παραγωγοί ορισμένων πτητικών ενώσεων, κυρίως οξικού αιθυλεστέρα, οξικού 2-φαινυλαιθυλεστέρα, προπιονικού αιθυλεστέρα και ισοαμυλικής αλκοόλης. (Wafa et al., 2006).

Παραγωγή κρασιού *durian* με την *Pichia kluyveri*:

Πραγματοποιήθηκε μελέτη σχετικά με τη χρήση δύο *non Saccharomyces* ζυμών, *Torulaspora delbrueckii* Biodiva και *Pichia kluyveri* FrootZen για την παραγωγή κρασιού *durian* μέσω συν-εμβολιασμού (Co-I) και διαδοχικό εμβολιασμό (Seq-I). Η *Pichia kluyveri*, θα μπορούσε να βελτιώσει τη φρουτώδη γεύση των κρασιών με σταφύλια δημιουργώντας περισσότερους οξικούς εστέρες. Ο πληθυσμός της *P. kluyveri* στο συν-εμβολιασμό Co-I αυξήθηκε ελαφρώς την ημέρα 2, στη συνέχεια μειώθηκε και ήταν μη ανιχνεύσιμος μέχρι την 7η ημέρα. Στον διαδοχικό εμβολιασμό Seq-I ο πληθυσμός της *P. kluyveri* αυξήθηκε όπως αναμενόταν (την ημέρα 2 και την ημέρα 5), αλλά μειώθηκε βαθμιαία με τον εμβολιασμό του

*T. delbrueckii* και ήταν μη ανιχνεύσιμη μέχρι την 15η ημέρα και στις δύο περιπτώσεις. Η παρουσία της *P. kluyveri* σε Co-I και Seq-I έδειξαν αξιοσημείωτη αρνητική επίδραση στην ανάπτυξη του *T. delbrueckii*. Από την άλλη πλευρά, η ανάπτυξη της *P. kluyveri* σε Co-I και Seq-I περιορίστηκε σημαντικά από την παρουσία του *T. delbrueckii*, όπως φαίνεται από το γεγονός ότι η *P. kluyveri* μειώθηκε δραματικά κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, εφόσον είναι μη ανιχνεύσιμη την έβδομη μέρα στο Co-I. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι οι δύο ζύμες μπορεί να έχουν σημαντικό ανταγωνιστικό αποτέλεσμα όταν συγχωνεύονται και διαδοχικά εμβολιάζονται σε πολτό του *durian*. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η *P. kluyveri* θα μπορούσε να αποικοδομήσει μερικώς το L-μηλικό οξύ. Η *P. kluyveri* είναι το κύριο μέσο συνεισφοράς της ισοβουτυλικής αλκοόλης λόγω της υψηλότερης παραγωγής της στην Seq-I. Τα εξαιρετικά υψηλότερα επίπεδα εστέρων οξικού οξέος στην Seq-I θα μπορούσαν να αποδοθούν στα σχετικά υψηλότερα επίπεδα προδρόμων όπως το οξικό οξύ που παράγονται από την *P. kluyveri* (Lu et al., 2017).

Παραγωγή cider με τη χρήση της *Pichia kluyveri*:

Ανακαλύφθηκε ότι η ζύμωση του χυμού μήλου ή/και χυμού αχλαδιού με *Pichia kluyveri* οδηγεί σε ένα πολύ φρέσκο προϊόν μηλίτη. Ιδιαίτερα βελτιώθηκαν οι κύριες ενώσεις που θεωρούνται ότι δίνουν τη «φρέσκια γεύση μήλου». Δεδομένου ότι η *Pichia kluyveri* καταναλώνει τα σάκχαρα για να παράγει αρωματικές ενώσεις με λίγη παραγόμενη αιθανόλη, αυτή η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή μηλίτη χωρίς αλκοόλη ή με μικρό ποσοστό αλκοόλης με αυξημένες ποσότητες επιθυμητών αρωματικών ενώσεων. Όταν είναι ζητούμενο ένα υψηλότερο ποσοστό αλκοόλης, μπορεί να εκτελεστεί μεγαλύτερη χρονικά ζύμωση με *Pichia kluyveri* ή και διαδοχική ζύμωση με ζύμη *Saccharomyces*.

Συγκεκριμένα, η έρευνα αναφέρεται σε μία μέθοδο παρασκευής ενός ποτού με αυξημένα επίπεδα επιθυμητών ενώσεων γεύσης που προέρχονται από ζύμωση, η οποία περιλαμβάνει ένα στάδιο ζύμωσης χυμού μήλου ή και χυμού αχλαδιού με τουλάχιστον ένα στέλεχος ζυμομύκητα *Pichia kluyveri*. Η *Pichia kluyveri* X31-10 (Pk31) ήταν το καταλληλότερο στέλεχος από αυτά που μελετήθηκαν για ζύμωση χυμού μήλου και ο χυμός μήλου *Fuji* ήταν το καλύτερο υπόστρωμα για αυτήν τη ζύμωση. Το Pk31 παρουσίασε έντονη ικανότητα παραγωγής γαλακτικού οξέος. Η βιωσιμότητα της *P. kluyveri* CD34 δεν επηρεάστηκε από αντιοξειδωτικά πρόσθετα. (Jianping et al., 2018).

Χρήση της *Pichia* για αλκοολούχο ποτό *tofu*:

Ο ορός γάλακτος σόγιας από την παραγωγή *tofu* είναι ένα θρεπτικό υγρό υπόστρωμα που συχνά απορρίπτεται από τους παραγωγούς *tofu*. Έρευνα έδειξε ότι ο ορός γάλακτος *tofu* μπορεί να μετατραπεί σε αλκοολούχο ποτό σόγιας χρησιμοποιώντας ζύμες *non-Saccharomyces*. Σε αυτήν τη μελέτη, αξιολογήθηκαν πέντε ζύμες *non Saccharomyces* (*Torulaspora delbrueckii*, *Lachancea thermotolerans*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Pichia kluyveri* και *Williopsis saturnus*). Η *P. kluyveri* χρησιμοποιεί μόνο την ενδογενή φρουκτόζη και τη γλυκόζη, παράγοντας ίχνη αιθανόλης. Έχει αποδειχθεί ότι η *P. kluyveri* έχει χαμηλή παραγωγή ακεταλδεϋδης (Benito et al., 2015). Δείγματα της *P. kluyveri*, περιείχαν σημαντικά μεγαλύτερη ποσότητα οξικού ισοαμυλεστέρα, η οποία μπορεί να συμβάλει στη χαρακτηριστική νότα μπανάνας όταν υπάρχει σε επαρκείς ποσότητες. Το δείγμα της *P. kluyveri* ήταν το μόνο δείγμα με ανίχνευση βουτυρολακτόνης. Η βουτυρολακτόνη αναγνωρίζεται ως μία από τις λακτόνες που υπάρχουν στο κρασί και ο μηχανισμός παραγωγής της είναι παρόμοιος με εκείνη των ανώτερων αλκοολών με το γλουταμικό οξύ ως πρόδρομο. (Carrau et al., 2008; Pietruszko and Fowden 1961; Yong et. al., 2018)

### 2.3.6 Η χρήση της *Pichia kluyveri* στην παραγωγή μύρας

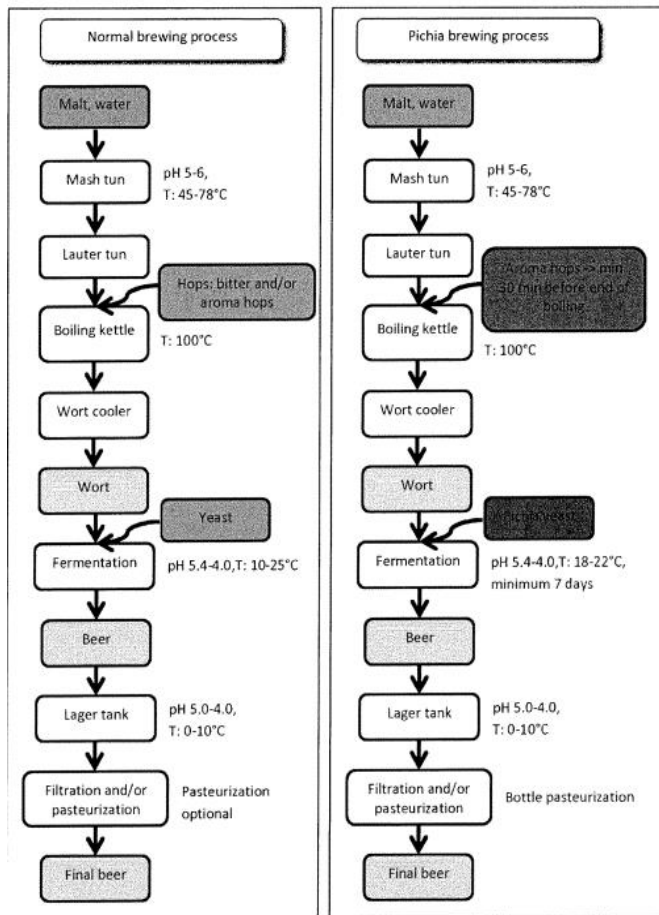
Έχει βρεθεί απροσδόκητα ότι ένα ποτό χαμηλής περιεκτικότητας σε αλκοόλη ή χωρίς αλκοόλη, με προφίλ γεύσης πολύ κοντά σε μία μύρα αλκοόλης τουλάχιστον 4% (όγκο/κατ' όγκο), μπορεί να παραχθεί με χρήση στελεχών ζύμης *Pichia kluyveri*. Συγκεκριμένα, τα στελέχη ζύμης *Pichia kluyveri* χρησιμοποιούν μόνο τη γλυκόζη από το γλεύκος της μύρας. Με αυτό τον τρόπο τα στελέχη της *Pichia kluyveri* μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να παράγουν είτε ένα ποτό χαμηλής περιεκτικότητας αλκοόλης είτε χωρίς αλκοόλη, ανάλογα με τα επίπεδα γλυκόζης στο γλεύκος. Οι κύριες γευστικές ενώσεις που παράγονται από την *Pichia kluyveri* στη ζύμωση του γλεύκους είναι οξικός ισοαμυλεστέρας, ισοαμυλική αλκοόλη, βουτυρικός αιθυλεστέρας, εξανοϊκός αιθυλεστέρας και οκτανοϊκός αιθυλεστέρας. (Saerens et. al., 2014)

Οι δημιουργοί της αναφερόμενης πατέντας έχουν βρει ότι με τη χρήση αυτής της μεθόδου και των στελεχών ζύμης *Pichia kluyveri* είναι δυνατόν να παραχθεί μύρα χωρίς αλκοόλη και μύρα χαμηλής περιεκτικότητας σε αλκοόλη (σύμφωνα με τη νομοθεσία της ΕΕ), διατηρώντας την ίδια γεύση με τις συνήθεις, κανονικής περιεκτικότητας σε αλκοόλ, μύρες. Στο παρακάτω σχήμα 3 απεικονίζεται μία βελτιστοποιημένη μέθοδος παρασκευής μύρας για

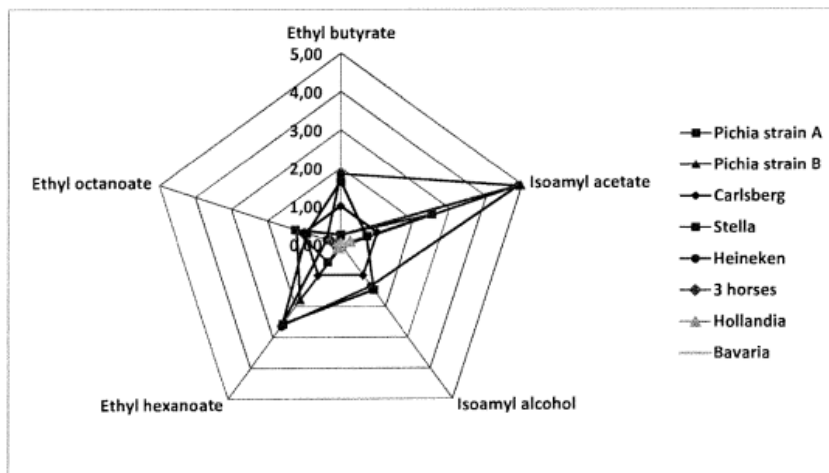
μπύρα που ζυμώνει με ζύμη *Pichia kluyveri*. Παρατηρείται σύγκριση της πρότυπης (αριστερά) έναντι της διαδικασίας παρασκευής με *Pichia kluyveri* (δεξιά). Τα βήματα που διαφέρουν από την τυπική διαδικασία ζυθοποίησης επισημαίνονται στο σχήμα 3.

Εν συνεχεία στο σχήμα 4 απεικονίζεται η σύγκριση στο προφίλ γεύσης από 5 διαφορετικές μπίρες χωρίς αλκοόλη: 3 *Horses*, *Hollandia*, *Bavaria* (με αλκοόλη 0%) και οι μπίρες που παράγονται με στέλεχος A *Pichia kluyveri* (αλκοόλη 0,1% vol. ) και με στέλεχος B (αλκοόλη 0,2% vol.). Χρησιμοποιήθηκε η μπίρα *Pilsner Carlsberg* με αλκοόλη 4,6% vol. ως μπίρα αναφοράς *pilsner* και παρουσιάζονται επίσης δύο άλλες μπίρες *pilsner*: *Stella* (5,2% vol. αλκοόλη) και *Heineken* (5,0% vol.). Μετρήθηκαν 5 διαφορετικές γευστικές ενώσεις με *headspace- GC-FID*: οξικό ισοαμύλεστέρα, ισοαμυλική αλκοόλη, βουτυρικός αιθυλεστέρα, εξανοϊκός αιθυλεστέρα και οκτανοϊκός αιθυλεστέρα. Οι συγκεντρώσεις των γευστικών ενώσεων στην μπίρα *pilsner Carlsberg* χρησιμοποιήθηκαν ως αναφορά και μπήκαν στην κλίμακα 1. Οι συγκεντρώσεις γεύσης σε όλες τις μπίρες τοποθετήθηκαν στην ίδια κλίμακα για να είναι σε θέση να συγκριθούν οι τιμές.

Τέλος στο σχήμα 5 παρουσιάζεται η σύγκριση στο προφίλ γεύσης από 4 διαφορετικές μπίρες: μπίρα χωρίς αλκοόλη με στέλεχος A *Pichia kluyveri* (αλκοόλη 0,1% vol., μπίρα χαμηλής περιεκτικότητας σε αλκοόλη με στέλεχος A *Pichia kluyveri* (αλκοόλη 0,7% vol. *Carlsberg pilsner beer* (αλκοόλη 4,6% vol.) που χρησιμοποιήθηκε ως μπίρα αναφοράς *pilsner* (μάρτυρας) και μπίρα βύνης (με αλκοόλη 1,8% vol.). Χρησιμοποιήθηκαν 5 διαφορετικές γευστικές ενώσεις με *headspace-GC-FID*: οξικό ισοαμύλεστέρα, ισοαμυλική αλκοόλη, βουτυρικός αιθυλεστέρα, εξανοϊκός αιθυλεστέρα και οκτανοϊκός αιθυλεστέρα. Οι συγκεντρώσεις των γευστικών ενώσεων στη μπίρα *pilsner Carlsberg* χρησιμοποιήθηκαν ως αναφορά και τοποθετήθηκε στην κλίμακα 1. Οι συγκεντρώσεις γεύσης στις 3 μπίρες τοποθετήθηκαν στην ίδια κλίμακα για να είναι σε θέση να συγκριθούν τις τιμές.

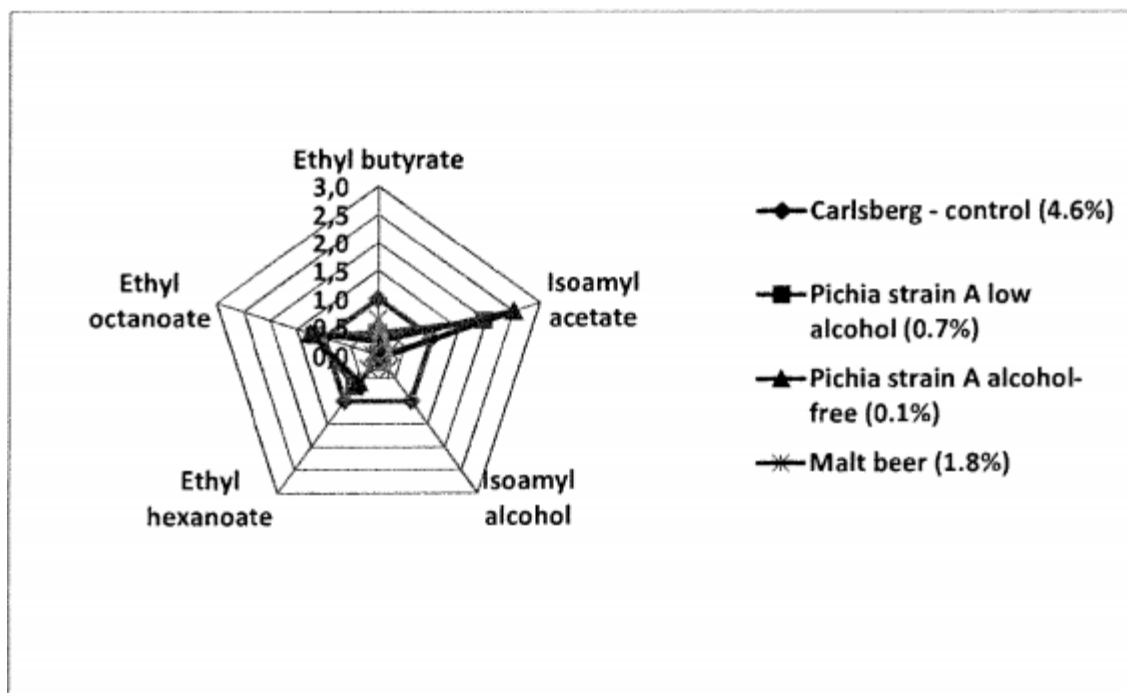


Σχήμα 3. Σύγκριση μεθόδων παραγωγής μύρας, με ή χωρίς τη χρήση Pichia. (Saerens et. al., 2014)



Σχήμα 4. Προφίλ γεύσης απο μύρες χωρίς αλκοόλη σε σύγκριση με μύρες κανονικής αλκοόλης (Saerens et. al., 2014).





Σχήμα 5. Προφίλ γεύσης απο μύρες με χαμηλή η χωρίς αλκοόλη σε σύγκριση με μύρες κανονικής αλκοόλης ([Saerens et al., 2014](#)).

Η βάση για όλες τις μύρες ήταν ένα μείγμα από 4 διαφορετικά είδη βύνης: βύνη *pilsner* 20%, βύνη σίτου 38%, 15 Μόναχο *malt* 38% και *Cara 50 malt* 4%.

Ζυμώθηκαν παρτίδες των 1000 λίτρων γλεύκους για παραγωγή μύρας με αρχική πυκνότητα 8,3°P με δύο διαφορετικά στελέχη *P. kluyveri* (στελέχη A και B, και εμβολιάστηκε  $5 \times 10^5$  κύτταρα/mL) στους 20°C για παραγωγή 3 εβδομάδων μύρας χωρίς αλκοόλ. Για την παραγωγή μύρας με χαμηλή περιεκτικότητα σε αλκοόλ χρησιμοποιήθηκαν 1500L του ίδιου μούστου αλλά προστέθηκαν δύο διαφορετικοί λυκίσκοι (*Tettnang* και *Amarillo*) και ζυμώθηκαν για 3 εβδομάδες στους 21°C μόνο με το στέλεχος A. Στα μέσα της ζύμωσης πρόσθεσαν *Tettnang* και *Amarillo* για *dry hop*. Μετά τη ζύμωση η θερμοκρασία των δειγμάτων ορίστηκε στους 4°C. Οι μύρες στη συνέχεια αναλύθηκαν για οξικούς εστέρες, αιθυλεστέρες και ανώτερες αλκοόλες καθώς και περιεκτικότητα σε αιθανόλη. Η μύρα χωρίς αλκοόλ που έχει υποστεί ζύμωση με το στέλεχος *P. kluyveri* A είχε συγκέντρωση αιθανόλης 0,1% v/v, ποσότητα οξικού ισοαμυλεστέρα 1,96 mg/L και περιεκτικότητα σε ισοαμυλική αλκοόλη 2,00 mg/L. Το στέλεχος B παράγαγε 0,2% v/v αιθανόλη με το ίδιο επίπεδο ισοαμυλικής αλκοόλης αλλά 4,94 mg/L οξικού ισοαμυλεστέρα. Η μύρα με χαμηλή περιεκτικότητα σε αλκοόλ είχε 0,7% v/v αιθανόλη, 2,5 mg/L οξικού ισοαμυλεστέρα και 1,8 mg/L ισοαμυλικής αλκοόλης. Η

*P. kluyveri* χρησιμοποιήθηκε και για ζύμωση μούστου μπύρας με αρχική πυκνότητα 10°P το οποίο χωρίστηκε σε τέσσερις παρτίδες, στις οποίες χρησιμοποιήθηκε και από μια διαφορετική ποικιλία λυκίσκου (*Nelson Sauvín, Amarillo, Saaz and Cascade*). Χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις παρτίδες του 1L όπου δύο μούστοι ζυμώθηκαν στους 20°C και δύο στους 22°C (καλύτερα αποτελέσματα βρέθηκαν στους 20°C). Σε κάθε θερμοκρασία η *P. kluyveri* εμβολιάστηκε σε μία παρτίδα και συγκρίθηκε με ένα μάρτυρα ζύμωσης *S. cerevisiae* και τα δύο εμβολιάστηκαν στα  $5 \times 10^5$  κύτταρα/mL. Μετά από 2 ημέρες το στέλεχος *S. cerevisiae* προστέθηκε στα δείγματα που είχαν υποστεί ζύμωση με *P. kluyveri*. Μετά από συνολικά 5 και 13 ημέρες ελήφθησαν δείγματα και αναλύθηκαν για γεύση και συγκέντρωση αιθανόλης. Οι περισσότεροι εστέρες βρέθηκαν να αυξάνονται στο προ-ζυμωμένο μούστο με την *P. kluyveri*. Με τον πολλαπλασιασμό του *S. cerevisiae* παρατηρήθηκε και αύξηση των ποσοστών της ακεταλδεΐδης και της περιεκτικότητας σε οξικό ισοαμυλεστέρα σε ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν με την προσθήκη των λυκίσκων *Amarillo* και *Cascade*. Η *Pichia kluyveri* παράγει πολύ λιγότερο διακετύλιο σε σύγκριση με ένα κλασικό στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae*. Αυτό είναι σημαντικό δεδομένου ότι το διακετύλιο απαντάται συχνά ως μια ανεπιθύμητη αρωματική ουσία στην μπύρα. ([Saerens et al., 2014](#)).

Πίνακας 4. Συγκεντρώσεις βουτυλικού αιθυλεστέρα, οξικού ισοαμυλεστέρα, ισοαμυλικής αλκοόλης, εξανοϊκού αιθυλεστέρα και οκτανοϊκού αιθυλεστέρα σε έξι εμπορικές μπύρες, μπύρας που παρασκευάζεται με στέλεχος A *Pichia kluyveri* και μπύρας που παρασκευάζεται με στέλεχος B *Pichia kluyveri*. ([Saerens et al., 2014](#)).

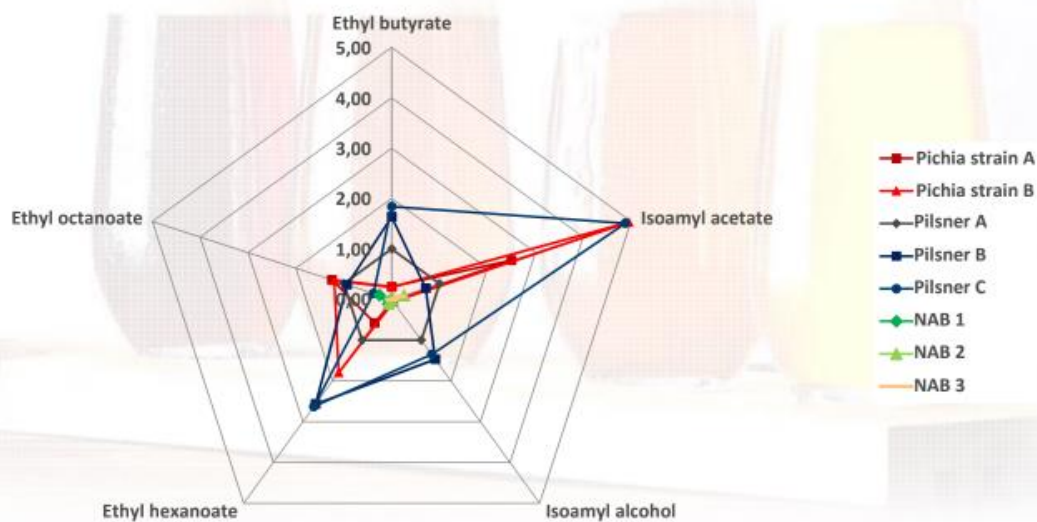
	<b>Ethyl butyrate</b>	<b>Isoamyl acetate</b>	<b>Isoamyl alcohol</b>	<b>Ethyl hexanoate</b>	<b>Ethyl octanoate</b>
<b>Carlsberg</b>	1,10	1,00	34,0	0,04	0,10
<b>Stella</b>	2,14	0,71	50,0	0,11	0,10
<b>Heineken</b>	2,02	4,87	46,0	0,10	0,09
<b>3 horses</b>	0,00	0,00	0,0	0,00	0,00
<b>Hollandia</b>	0,00	0,26	3,2	0,00	0,00
<b>Bavaria</b>	0,00	0,18	2,0	0,00	0,00
<b>Malt beer</b>	0,71	0,21	11	0,01	0,01
<b>Pichia A – alcohol-free</b>	0,43	1,96	2,00	0,03	0,12
<b>Pichia B – alcohol-free</b>	0,26	4,94	2,00	0,07	0,13
<b>Pichia A – low alcohol</b>	0,27	2,50	1,80	0,02	0,13

Όπως προαναφέρθηκε η *Pichia kluyveri* μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή μύρας με χαμηλή αλκοόλη η μύρας χωρίς αλκοόλ καθώς η ζύμη δεν έχει την ικανότητα παραγωγής υψηλών ποσοστών αλκοόλης. Επομένως για την παραγωγή μύρας με κανονική αλκοόλη θα πρέπει να γίνει συν-ζύμωση με κάποιο άλλο στέλεχος ζυμομύκητα (όπως για παράδειγμα ο *Saccharomyces cerevisiae*). Έτσι γίνεται δυνατή η παραγωγή μιας μύρας κανονικού αλκοολικού τίτλου όπου προσλαμβάνονται συνδυαστικά και τα ιδιαίτερα γευστικά και αρωματικά χαρακτηριστικά της *Pichia kluyveri*.



### ***Pichia kluyveri* beer flavor close to pilsner beer**

➤ *Pichia kluyveri* flavor wheel close to pilsner beers



10



Σχήμα 6. Σύγκριση παραγωγής αρωμάτων, μεταξύ κανονικής μύρας pilsner και μύρας που ζυμώθηκε με *Pichia* (CHR HANSEN, 2020).

### 3 Συμπεράσματα

Μέσω της μελέτης αυτής πάνω στις ζύμες non-Saccharomyces βλέπουμε ότι το αντικείμενο αυτό αποτελεί έναν τομέα ο οποίος είναι ακόμα στην αρχή των ερευνών και έχει μεγάλες δυνατότητες και προοπτικές για το μέλλον της βιομηχανίας των ποτών. Συγκεκριμένα η *Pichia kluyveri*, στην οποία εστιάζει και η βιβλιογραφία της συγκεκριμένης έρευνας, της οποίας η χρήση και τα χαρακτηριστικά δεν είχαν διερευνηθεί εις βάθος, έπειτα από πειράματα και μελέτες που διεξήχθησαν στην πάροδο των τελευταίων ετών, απέδειξε ότι μπορεί να προσδώσει τον δικό της ιδιαίτερο οργανοληπτικό χαρακτήρα και να παράγει μοναδικά προϊόντα ευρείας κατανάλωσης, με σημαντικότερα αυτών, τον οίνο και την μύρα.

Η χρήση της ως αποκλειστική ζύμη στην παραγωγή μύρας μπορεί να παράξει μια μύρα με χαμηλή αλκοόλη ή μια μύρα χωρίς αλκοόλ καθώς οι αντοχές της στα υψηλά ποσοστά αιθανόλης και η δυνατότητα μεταβολισμού της μαλτόζης είναι μικρές. Λειτουργεί βέλτιστα σε θερμοκρασία ζύμωσης 20 βαθμούς κελσίου και προσδίδει αρώματα ανθέων και φρούτων όπως αυτό της μπανάνας και του αγγουριού (οξικού ισοαμυλεστέρα). Επίσης σημαντικό ρόλο στην διαδικασία της ζύμωσης έχει και το είδος λυκίσκου που θα χρησιμοποιηθεί συνδυαστικά με την ζύμη καθώς όπως είδαμε στο σχετικό πείραμα που αναφέρεται στο κείμενο σε ζυμώσεις με Amarillo και Cascade, η ακεταλδεΐδη και η περιεκτικότητα σε οξικό ισοαμυλεστέρα αυξήθηκαν.

Ακόμη και σήμερα οι μελέτες που διεξάγονται πάνω στη συγκεκριμένη ζύμη καθιστούν δυνατή την καλύτερη κατανόηση των χαρακτηριστικών της, αλλά και τη βελτιστοποίηση των τελικών προϊόντων στα οποία συμμετέχει.

## 4 Βιβλιογραφία

Amaya-Delgado L., Herrera-López E.J., Arrizon J., Arellano-Plaza M., Gschaedler A. (2013). Performance evaluation of *Pichia kluyveri*, *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* in industrial tequila fermentation. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23329062>

Andorrà I., Berradre M., Mas A., Esteve-Zarzoso B. (2012). Effect of mixed culture fermentations on yeast populations and aroma profile [https://www.researchgate.net/publication/256804537\\_Effect\\_of\\_mixed\\_culture\\_fermentations\\_on\\_yeast\\_populations\\_and\\_aroma\\_profile](https://www.researchgate.net/publication/256804537_Effect_of_mixed_culture_fermentations_on_yeast_populations_and_aroma_profile)

Anfang N., Brajkovic C., Goddard M.R. (2009). Co-fermentation with *Pichia kluyveri* increases varietal thiol concentrations in Sauvignon Blanc. ASVO <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1755-0238.2008.00031.x>

Azzolini M., Fedrizzi B., Tosi E., Finato F., Vagnoli P., Scrinzi C. & Zapparoli G. (2012). Effects of *Torulasporea delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* mixed cultures on fermentation and aroma of Amarone wine. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00217-012-1762-3>

Bai F.Y., Bandoni R. J, Batra R. , Blackwell M., Boekhout T., Boundy-Mills K., Brul S., Cadez N., Chen C.J., Cooper C. R., Cushion M. T., Groot P. W.J.d., G., Hoog S., Echavarri-Erasun C., Fell J. W., Fleet G.H., Fonseca Á., Göker M., Wuczowski M. (2011). The Yeasts (Fifth Edition) <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444521491001816>

Bajwa P.K., Phaenark C., Grant N., Zhang X., Paice M., Martin V.J.J., Trevors J.T., Lee H. (2011). Ethanol production from selected lignocellulosic hydrolysates by genome shuffled strains of *Scheffersomyces stipitis*. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852411011151>

Bakker J. and Clarke R.J. (2011). Wine: Flavour Chemistry. [https://books.google.gr/books?hl=el&lr=&id=4E8t6EGZwpMC&oi=fnd&pg=PT7&dq=J+Bakker+2003+fino&ots=mS8ZHTKR9f&sig=vmqBUgIEk2RRLejj-z\\_Mx0Q\\_ReY&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.gr/books?hl=el&lr=&id=4E8t6EGZwpMC&oi=fnd&pg=PT7&dq=J+Bakker+2003+fino&ots=mS8ZHTKR9f&sig=vmqBUgIEk2RRLejj-z_Mx0Q_ReY&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)

Barata A., Malfeito-Ferreira M., Loureiro V. (2012). The microbial ecology of wine grape berries <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160511006878>

Benito A., Calderón F., Palomero F and Benito S. (2015). Combine Use of Selected *Schizosaccharomyces pombe* and *Lachancea thermotolerans* Yeast Strains as an Alternative to the Traditional Malolactic Fermentation in Red Wine Production. <https://www.mdpi.com/1420-3049/20/6/9510>

Benito S., Morata A., Palomero F., Gonzalez C., Suárez-Lepe J.A. (2011). Formation of vinylphenolic pyranoanthocyanins by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia guilliermondii* in red wines produced following different fermentation strategies. [https://www.researchgate.net/publication/222085979\\_Formation\\_of\\_vinylphenolic\\_pyranoant](https://www.researchgate.net/publication/222085979_Formation_of_vinylphenolic_pyranoant)

hocyanins by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia guillermondii* in red wines produced following different fermentation strategies

Benito S., Morata A., Palomero F., González M. C., Suárez-Lepe J.A. (2011). Formation of vinylphenolic pyranoanthocyanins by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia guillermondii* in red wines produced following different fermentation strategies. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814610006709>

Bezerra-Bussoli C., Baffi M. A., Gomes E., Da-Silva R. (2013) Yeast diversity isolated from grape musts during spontaneous fermentation from a Brazilian winery. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23636496/>

Bokulich N.A. and Bamforth C.W. (2013). The Microbiology of Malting and Brewing. <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/MMBR.00060-12>

Borley C. (2008). Yeast adds fruity zing to wine. Nzherald [https://www.nzherald.co.nz/nz/news/article.cfm?c\\_id=1&objectid=10499550](https://www.nzherald.co.nz/nz/news/article.cfm?c_id=1&objectid=10499550)

Brian G.R., Storgårds E., Krogerus K., Vidgren V. (2013). Comparative physiology and fermentation performance of Saaz and Froberg lager yeast strains and the parental species *Saccharomyces eubayanus*. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/yea.2960>

Cadez N. and Smith M.T. (2011). Chapter 32 - *Hanseniaspora zikes* (1912). <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978044452149100032X>

Canonico L., Agarbati A., Comitini F., Ciani M. (2016). *Torulaspora delbrueckii* in the brewing process: A new approach to enhance bioflavour and to reduce ethanol content. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002015002609>

Canonico L., Solomon M., Comitini F., Ciani M., Varela C. (2019). Volatile profile of reduced alcohol wines fermented with selected *non-Saccharomyces* yeasts under different aeration conditions. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002019300346>

Carrau F.M., Medina K., Farina L., Boido E., Henschke P.A., Dellacassa E. (2008). Production of fermentation aroma compounds by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts: effects of yeast assimilable nitrogen on two model strains. <https://academic.oup.com/femsyr/article/8/7/1196/493799?login=false>

CHR HANSEN (2020). FROOTZEN® - first ever *Pichia kluyveri* yeast. <https://www.chr-hansen.com/en/food-cultures-and-enzymes/fermented-beverages/cards/product-cards/frootzen-first-ever-pichia-kluyveri-yeast>

Chua J.Y., Lu Y., Liu S.Q. (2018). Evaluation of five commercial *non-Saccharomyces* yeasts in fermentation of soy (tofu) whey into an alcoholic beverage, Food Microbiology, Volume 76, Pages 533-542, ISSN 0740-0020 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002018302983>

Ciani M. & Maccarelli F. (1998). Oenological properties of *non-Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1008825928354>

Ciani M. and Ferraro L. (1996). Enhanced Glycerol Content in Wines Made with Immobilized *Candida stellata* Cells. <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/aem.62.1.128-132.1996>

Ciani M., Beco L., Comitini F. (2006). Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16487611/>

Ciani M., Comitini F., Mannazzu I., Domizio P. (2010). Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of *non-Saccharomyces* yeasts in winemaking. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19807789/>

Clemente-Jimenez J.M., Mingorance-Cazorla L., Martínez-Rodríguez S., Heras-Vázquez F.J.L., Rodríguez-Vico F. (2004). Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002003000637>

Comitini F, Gobbi M, Domizio P, Romani C, Lencioni L, Mannazzu I, Ciani M (2011). Selected *non-Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. <https://www.yeastgenome.org/reference/S000145441>

Comitini F., Gobbi M., Domizio P., Romani C., Lencioni L. , Mannazzu I., Ciani M. (2011). Selected *non-Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002010002996>

Cordero-Bueso G., Esteve-Zarzoso B., Cabellos J.M., Gil-Díaz M. & Arroyo T. (2013). Biotechnological potential of *non-Saccharomyces* yeasts isolated during spontaneous fermentations of Malvar (*Vitis vinifera* cv. L.). <https://link.springer.com/article/10.1007/s00217-012-1874-9>

Crafack M, Mikkelsen M.B., Saerens S., Knudsen M., Blennow A., Lowor S., Takrama J., Swiegers J.H., Petersen G.B. Heimdal H., Nielsen D. S.(2013) Influencing cocoa flavour using *Pichia kluyveri* and *Kluyveromyces marxianus* in a defined mixed starter culture for cocoa fermentation. NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23866910>

Crafack M., Keul H., Eskildsen C.E., Petersen M.A, Saerens S., Blennow A., Skovmand-Larsen M., . Swiegers J.H., Petersen G.B, Heimdal H. , Nielsen D.S. (2014). Impact of starter cultures and fermentation techniques on the volatile aroma and sensory profile of chocolate. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996914002816>

Crafack M., Mikkelsen M.B., Saerens S., Knudsen M., Blennow A., Lowor S., Takrama J., Swiegers J.H. , Petersen G.B., Heimdal H., Nielsen D.S. (2013). Influencing cocoa flavour using *Pichia kluyveri* and *Kluyveromyces marxianus* in a defined mixed starter culture for cocoa fermentation. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23866910/>

Dashko S., Zhou N., Tinta T., Sivilotti P., Lemut M.S., Trost K., Gamero A., Boekhout T., Butinar L., Vrhovsek U., Piskur J. (2015). Use of non-conventional yeast improves the wine aroma profile of *Ribolla Gialla*. <https://academic.oup.com/jimb/article/42/7/997/5995414?login=false>

- De Francesco G., Turchetti B., Sileoni V., Marconi O., Perretti G. (2015). Screening of new strains of *Saccharomyces ludwigii* and *Zygosaccharomyces rouxii* to produce low-alcohol beer. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jib.185>
- Di Maio S., Genna G., Gandolfo V., Amore G., Ciaccio M., Oliva D. (2012). Presence of *Candida zemplinina* in Sicilian Musts and Selection of a Strain for Wine Mixed Fermentations. <https://www.journals.ac.za/index.php/sajev/article/view/1309>
- Duarte F.L., Pimentel N. H., Teixeira A., Fonseca A. (2012). *Saccharomyces bacillaris* is not a synonym of *Candida stellata*: reinstatement as *Starmerella bacillaris* comb. nov. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22733059/>
- Englezos V., Rantsiou K., Torchio F., Rolle L., Gerbi V., Cocolin L. (2015). Exploitation of the non-*Saccharomyces* yeast *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) in wine fermentation: Physiological and molecular characterizations. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160515000203>
- Estela Escalante W.D. (2018). Perspectives and Uses of *Non-Saccharomyces* Yeasts in Fermented Beverages. <https://www.intechopen.com/chapters/64367>
- Estela-Escalante W. D., Kumaran AP K., Dutta S., Rodríguez-Best A. (2015). Lactic acid production by *Lactobacillus plantarum* L10 in a cell-retention continuous culture under different cultivation strategies. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1027-28522015000200003&script=sci\\_arttext&tlng=en](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1027-28522015000200003&script=sci_arttext&tlng=en)
- Esteve-Zarzoso B., Fernandez-Espinar M.T., Querol A. (2003). Authentication and identification of *Saccharomyces cerevisiae* 'flor' yeast races involved in sherry ageing. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15031656/>
- Cavalcante Fai A.E., Silva J.B., Andrade C.J., Bution M.L., Pastore G.M. (2014). Production of prebiotic galactooligosaccharides from lactose by *Pseudozyma tsukubaensis* and *Pichia kluyveri*. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S187881811400070X>
- Fernández M., Úbeda J.F., Briones A.I. (2000). Typing of non-*Saccharomyces* yeasts with enzymatic activities of interest in wine-making. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016816050000283X>
- Fugelsang, Kenneth C.; Edwards, Charles G., eds. (2010). "Yeasts". Wine Microbiology (2nd ed.). Boston, MA: Springer.
- Gobbi M., Comitini F., Domizio P., Romani C., Lencioni L., Mannazzu I., Ciani M. (2013). *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and sequential co-fermentation: A strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002012002286>
- Hagman A., Säll T., Compagno C., Piskur J. (2013). Yeast "Make-Accumulate-Consume" Life Strategy Evolved as a Multi-Step Process That Predates the Whole Genome Duplication. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0068734>



Herraiz T., Reglero G., Herraiz M., Martin-Alvarez P.J., Cabezudo M.D., Vitic A. J. E. (1990). The Influence of the Yeast and Type of Culture on the Volatile Composition of Wines Fermented Without Sulfur Dioxide. <https://www.ajevonline.org/content/41/4/313>

Hui-Zhong Lu, Yimin Cai, Zuo-Wei Wu, Jian-Hua Jia, Feng-Yan Bai. (2004a). *Kazachstania aerobia* sp. nov., an ascomycetous yeast species from aerobically deteriorating corn silage. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:2431–2435. <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijs.0.63257-0>

Imanishi Y., Ueda-Nishimura K., Mikata K. (2007). Two new species of *Kazachstania* that form ascospores connected by a belt-like intersporal body: *Kazachstania zonata* and *Kazachstania gamospora*. <https://academic.oup.com/femsyr/article/7/2/330/617341?login=false>

Jianping W., Yuxiang Z., Yahong Y., Lu D., Tianli Y. (2018). Characteristic fruit wine production via reciprocal selection of juice and *non-Saccharomyces* species, *Food Microbiology*, Volume 79, Pages 66-74, ISSN 0740-0020 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002018306397>

Jolly N., Varela C., Pretorius I. S. (2014). Not your ordinary yeast: *Non-Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered [https://www.researchgate.net/publication/258115060\\_Not\\_your\\_ordinary\\_yeast\\_Non-Saccharomyces\\_yeasts\\_in\\_wine\\_production\\_uncovered](https://www.researchgate.net/publication/258115060_Not_your_ordinary_yeast_Non-Saccharomyces_yeasts_in_wine_production_uncovered)

Kapsopoulou K., Mourtzini A., Anthoulas M. & Nerantzis E. (2007). Biological acidification during grape must fermentation using mixed cultures of *Kluyveromyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11274-006-9283-5>

King A. and Dickinson J. R. (2000). Biotransformation of monoterpene alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* and *Kluyveromyces lactis*. [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(200004\)16:6%3C499::AID-YEA548%3E3.0.CO;2-E](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/(SICI)1097-0061(200004)16:6%3C499::AID-YEA548%3E3.0.CO;2-E)

Kurtzman C.P. Chapter 57 - *Pichia* E.C. Hansen (1904), *The Yeasts* 2011, Pages 685-707) <https://www.elsevier.com/books/the-yeasts/kurtzman/978-0-444-52149-1>

Lema C., Garcia-Jares C., Orriols I., Angulo L., Vitic A.J. E. (1996). Contribution of *Saccharomyces* and *Non-Saccharomyces* Populations to the Production of Some Components of Albariño Wine Aroma. <https://www.ajevonline.org/content/47/2/206.short>

Liu S.Q. & Quek A.Y.H. (2016). Evaluation of Beer Fermentation with a Novel Yeast *Williopsis saturnus*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5253982/>

López-Malo M., Querol A., Guillamonv J.M. (2013) Metabolomic comparison of *Saccharomyces cerevisiae* and the cryotolerant species *S. bayanus* var. *uvarum* and *S. kudriavzevii* during wine fermentation at low temperature. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23527304/>

Loureiro V. and Malfeito-Ferreira M. (2003). Spoilage yeasts in the wine industry. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160503002460>

- Magyar I. & Tóth T. (2011). Comparative evaluation of some oenological properties in wine strains of *Candida stellata*, *Candida zemplinina*, *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae*. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002010002224>
- Masoud W. and Kalsoft C. H. (2006). The effects of yeasts involved in the fermentation of *Coffea arabica* in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*. International Journal of Food Microbiology, Volume 106, Issue 2, 2006, Pages 229-234. ISSN 0168-1605  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168160505004265>
- Melkonian C., Gottstein W., Blasche S., Kim Y., Abel-Kistrup M., Swiegers H., Saerens S., Edwards N., Patil K.R., Teusink B and Molenaar D. (2019). Finding Functional Differences Between Species in a Microbial Community: Case Studies in Wine Fermentation and Kefir Culture. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.01347/full>
- Middelbeek E. J., Stumm C. & Vogels G. D. (1980). Effects of *Pichia kluyveri* killer toxin on sensitive cells. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00444075>
- Middelbeek E.J, Hermans J. M., C. Stumm (1979) Production, purification and properties of a *Pichia kluyveri* killer toxin. Springer <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00443282>
- Middelbeek E.J. Hermans, J.M.H & Stumm C. (1979). Production, purification and properties of a *Pichia kluyveri* killer toxin. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00443282>
- Moreira N., Mendes F., Hogg T., Vasconcelos I. (2005). Alcohols, esters and heavy sulphur compounds production by pure and mixed cultures of apiculate wine yeasts. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160505001054>
- Ngongang M.M., Plessis H.W. D, Ntwampe S.K.O., Chidi B.S., Hutchinson U.F., Mekuto L., Jolly N.P. (2019). The Use of *Candida pyralidae* and *Pichia kluyveri* to Control Spoilage Microorganisms of Raw Fruits Used for Beverage Production. <https://sciprofiles.com/publication/view/c3352bb5846cd12c5718c8aeeb6c2e9f>
- Nisiotou A.A., Nychas G.J.E (2008). *Kazachstania hellenica* sp. nov., a novel ascomycetous yeast from a Botrytis-affected grape must fermentation. <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijms.0.65649-0>
- Petrucci L., Corbo M. R., Sinigaglia M. & Bevilacqua A. (2016) Brewer's yeast in controlled and uncontrolled fermentations, with a focus on novel, nonconventional, and superior strains
- Pietruszko R. and Fowden L. (1961).  $\gamma$ -Aminobutyric Acid Metabolism in Plants: Part 1. Metabolism in Yeasts. <https://academic.oup.com/aob/article-abstract/25/4/491/212057?login=false>
- Plata C., Millán C., Mauricio J.C, MOrtega J. (2003). Formation of *ethyl acetate* and *isoamyl acetate* by various species of wine yeasts. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002002001016>
- Pombo González P., Pérez G., Carrau F., Guisán J.M., Batista-Viera F. & Brena B.M. (2008). One-step purification and characterization of an intracellular  $\beta$ -glucosidase from *Metschnikowia pulcherrima*. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10529-008-9708-3>

Radler F., Pfeiffer P., Denner tM. (1985). Killer toxins in new isolates of the yeasts *Hanseniaspora uvarum* and *Pichia kluyveri*. FEMS Microbiology Letters, Volume 29, Issue 3, Pages 269–272 <https://academic.oup.com/femsle/article/29/3/269/513778>

Rantsiou K., Dolci P., Giacosa S., Torchio F., Tofalo R., Torriani S., Suzzi G., Rolle L., Cocolin L. (2012)c. *Candida zemplinina* Can Reduce Acetic Acid Produced by *Saccharomyces cerevisiae* in Sweet Wine Fermentations. <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/AEM.06768-11>

Raynal C., WARDROP F., Pillet O., LANGUET P., Dumont A. and ORTIZ-JULIEN A. (2011). An Innovative Tool for the WINEMAKER: Sequential Inoculation with a *non-Saccharomyces* Yeast and a *Saccharomyces cerevisiae* Yeast. <https://www.lallemandwine.com/wp-content/uploads/2014/04/Sequential-Inoculation-with-a-non-Saccharomyces-and-a-Saccharomyces-Yeast-ENG-2010.pdf>

Redzepovic S., Orlic S., Majdak A., Kozina B., Volschen H.k, Viljoen-Bloom M. (2003). Differential malic acid degradation by selected strains of *Saccharomyces* during alcoholic fermentation. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160502003203>

Renault P., Miot-Sertier C., Marullo P., Hernández-Orte P., Lagarrigue L., Lonvaud-Funel A., Bely M. (2009). Genetic characterization and phenotypic variability in *Torulaspora delbrueckii* species: Potential applications in the wine industry. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160509003250>

Renner J.(2002) Solera ale. Homebrewers Association. Page 3-4. <https://www.homebrewersassociation.org/attachments/0000/6021/JFzym02-Solera.pdf>

Robinson J. (ed), (2006). The Oxford Companion to Wine, Third Edition, Oxford University Press, pp 664-665. <https://en.wikipedia.org/wiki/Flor>

Rojas V., Gil J.V., Piñaga F., Manzanares P. (2001). Studies on acetate ester production by *non-Saccharomyces* wine yeasts. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160501005529>

Ruben (2013).Flor, the mystery of sherry, Sherry Notes <https://www.sherrynotes.com/2013/background/flor-sherry-yeast/>

Sadoudi M., Tourdot-Maréchal R., Rousseaux S., Steyer D., Gallardo- Chacón J.J., Ballester J., Vichi S. , Guérin-Schneider R., Caixach J. , Alexandre H. (2012). Yeast–yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of *non-Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S074000201200130X>

Saerens S. and Swiegers J. H. (2015). Production of low-alcohol or alcohol-free beer with *pichia kluyveri* yeast strains. <https://patents.google.com/patent/EP2964742A2>

Saerens S., Swiegers J. H., Fredensborg D.K., (2017) . Enhancement of beer flavor by a combination of *pichia* yeast and different hop varieties. <https://patentimages.storage.googleapis.com/83/37/ff/5b2837c18fa28a/US20170183612A1.pdf>

- Sarens S. & Swiegers J. H. (2012). Enhancement of beer flavor by a combination of *pichia yeast* and different hop varieties <https://patents.google.com/patent/US20140234480A1/en>
- Schifferdecker A.J., Dashko S., Ishchuk O.P., Piškur J. (2014). The wine and beer yeast *Dekkera bruxellensis*. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/yea.3023>
- Setati M.E., Jacobson D., Andong U.C., Bauer F. (2012). The Vineyard Yeast Microbiome, a Mixed Model Microbial Map. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0052609>
- Silva T.C., Ávila R.I.d., Amâncio Zara A.L.S., Santana Santos A., Ataídes F., Queiroz Freitas V.A., Rodrigues Costa C., Campos Valadares M. & Rodrigues Silva M.d.R. (2014). Punicalagin triggers ergosterol biosynthesis disruption and cell cycle arrest in *Cryptococcus gattii* and *Candida albicans*. <https://link.springer.com/article/10.1007/s42770-020-00364-4>
- Sipiczki M. (2003). *Candida zemplinina* sp. nov., an osmotolerant and psychrotolerant yeast that ferments sweet botrytized wines. <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijms.0.02649-0>
- Soden A., Francis I.L., Oakey H., Henschke P.A. (2000). Effects of co-fermentation with *Candida stellata* and *Saccharomyces cerevisiae* on the aroma and composition of Chardonnay wine. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1755-0238.2000.tb00158.x>
- Starmer W. T., Ganter P. F. and Aberdeen' V. (1991). Geographic Distribution and Genetics of Killer Phenotypes for the Yeast *Pichia kluyveri* across the United States. Volume 58, No. 3. <https://aem.asm.org/content/aem/58/3/990.full.pdf>
- Starmer W.T., Ganter P.F. and Aberdeen V. (1992). Geographic distribution and genetics of killer phenotypes for the yeast *Pichia kluyveri* across the United States. <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/aem.58.3.990-997.1992>
- 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. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160515001865>
- Steensels J., Snoek T., Meersman E., Nicolino M.P., Voordeckers K., Verstrepen K.J. (2014). Improving industrial yeast strains: exploiting natural and artificial diversity. <https://academic.oup.com/femsre/article/38/5/947/497594?login=false>
- Tataridis P., Kanelis A., Logotetis S., Nerancis E. (2013). Use of *non-saccharomyces Torulaspora delbrueckii* yeast strains in winemaking and brewing. <http://www.doiserbia.nb.rs/Article.aspx?id=0352-49061324415T#.YiM3wnpByUk>
- Tataridis Panagiotis, Areti Barbari, Migena Lelaj, Kanellis Anastasios, Despina Kechagia. (2014). Effect of selected *non-Saccharomyces* yeast strains in brewing. 11th International Trends In Brewing. April 13th-17th 2014. Ghent, Belgium.
- Tominaga T., Murat M.L. and Dubourdieu D. (1998α). Development of a Method for Analyzing the Volatile Thiols Involved in the Characteristic Aroma of Wines Made from *Vitis vinifera* L. Cv. Sauvignon Blanc. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf970782o>

Toro M.E. & Vazquez F. (2002). Fermentation behaviour of controlled mixed and sequential cultures of *Candida cantarellii* and *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1015242818473>

Van Breda V., Jolly N., van Wyk J. (2013). Characterisation of commercial and natural *Torulaspora delbrueckii* wine yeast strains. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160513001098>

Van Rijswijck I.M.H., Wolkers–Rooijackers J.C.M., Abee T., Smid E.J. (2017). Performance of non-conventional yeasts in co-culture with brewers' yeast for steering ethanol and aroma production. <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1751-7915.12717>

Varela C., (2016). The impact of *non-Saccharomyces* yeasts in the production of alcoholic beverages. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27787587/>

Vejarano R., Calderón A.G. (2021). Commercially Available *Non-Saccharomyces* Yeasts for Winemaking: Current Market, Advantages over *Saccharomyces*, Biocompatibility, and Safety. <https://doi.org/10.3390/fermentation7030171>

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. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389172303901125>

Viana F., Gil J.V., Genovés S., Vallés S., Manzanares P. (2008). Rational selection of *non-Saccharomyces* wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002008000841>

Whitener M.E. B., Stanstrup J., Carlin S., Divol B., Du Toit M., Vrhovsek U. (2017). Effect of *non-Saccharomyces* yeasts on the volatile chemical profile of Shiraz wine. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ajgw.12269>

Yuyun L., Dejian H., Pin-Rou L., Shao-Quan L. (2015). Assessment of volatile and non - volatile compounds in durian wines fermented with four commercial *non-Saccharomyces* yeasts. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jsfa.7253>

Yuyun L., Marilyn Kai W. V., Jian-Yong C., Dejian H., Pin-Rou L. & Shao-Quan L. (2017). The effects of co- and sequential inoculation of *Torulaspora delbrueckii* and *Pichia kluyveri* on chemical compositions of durian wine. Springer <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-017-8527-7>

Ženišová K., Chebeňová- Turcovská K, V., Godálová Z. Č., Krakova L. (2014). Mapping of wine yeast and fungal diversity in the Small Carpathian wine-producing region (Slovakia): evaluation of phenotypic, genotypic and culture-independent approaches. <https://www.researchgate.net/publication/269277365> Mapping of wine yeast and fungal diversity in the Small Carpathian wine-producing region Slovakia evaluation of phenotypic genotypic and culture-independent approaches

Zott K., Miot-Sertier C., Claisse O., Lonvaud-Funel A., Masneuf-Pomarede I. (2008). Dynamics and diversity of *non-Saccharomyces* yeasts during the early stages in winemaking. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160508001621>

Zott K., Thibon C., Bely M., Lonvaud-Funel A., Dubourdieu D., Masneuf-Pomarede I. (2011). The grape must *non-Saccharomyces* microbial community: Impact on volatile thiol release. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160511005149>