



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

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

**Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία  
«Συγκριτική μελέτη παραγωγής ζύθου με χρήση εμπορικής ζύμης  
του είδους *Lachancea thermotolerans* σε ελεύθερη και  
ακινητοποιημένη μορφή»**

**Της  
Άρτεμις Τσιόκα**

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

**Επιβλέπων:** Ταταρίδης Παναγιώτης

ΑΘΗΝΑ, 2023



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

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

**Master Thesis**

**«Comparative study of beer production with the use of  
commercial yeast of the species *Lachancea thermotolerans* in free  
and immobilized form»**

**By**

**Artemis Tsioka**

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

**Supervisor:** Tataridis Panagiotis

Athens, 2023



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

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

**Διασαφήσεις**

Οι υπογράφοντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία (master thesis) με τίτλο «**Συγκριτική μελέτη παραγωγής ζύθου με χρήση εμπορικής ζύμης του είδους *Lachancea thermotolerans* σε ελεύθερη και ακινητοποιημένη μορφή**» που παρουσιάστηκε από την **ARTEMIS ΤΣΙΟΚΑ** και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

The signatories declare that we have examined the postgraduate diploma thesis titled “**Comparative study of beer production with the use of commercial yeast of the species *Lachancea thermotolerans* in free and immobilized form**” presented by **ARTEMIS ΤΣΙΟΚΑ** and we affirm that it is accepted.

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

**Όνοματεπώνυμο & Υπογραφή 2<sup>ου</sup> Μέλους Επιτροπής  
(Name and Signature of 2<sup>nd</sup> Commission Member):**

**Όνοματεπώνυμο & Υπογραφή 3<sup>ου</sup> Μέλους Επιτροπής  
(Name and Signature of 3<sup>rd</sup> Commission Member):**

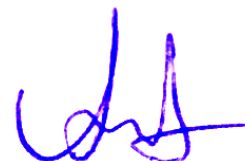
# ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η κάτωθι υπογεγραμμένη **Τσίοκα Άρτεμις** του **Δημητρίου** , με αριθμό μητρώου 20216 φοιτήτρια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών Επιστήμη Οίνου και Ζύθου του Τμήματος Επιστήμης Οίνου, Αμπέλου και Ποτών της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

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

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

Η Δηλούσα



Τσίοκα Άρτεμις

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι ξινές μπύρες συνήθως παράγονται με την χρήση γαλακτικών βακτηρίων, η χρήση των οποίων επιφέρει τον κίνδυνο διασταυρούμενης επιμόλυνσης μέσα στο ζυθοποιείο. Γι' αυτό το λόγο, πολλοί ζυθοποιοί που επιθυμούν να κάνουν ξινές μπύρες θα ήθελαν να αποφύγουν την παραπάνω διαδικασία και έτσι τα τελευταία χρόνια, έχουν πραγματοποιηθεί έρευνες σχετικά με την παραγωγή ξινής μπύρας με χρήση εναλλακτικών μεθόδων. Η Philly Sour™ (*Lachancea thermotolerans*, Lallemand) είναι μια εμπορική ζύμη η οποία παράγει σε σημαντική ποσότητα γαλακτικό οξύ, σε σχέση με άλλες ζύμες, με αποτέλεσμα την σημαντική μείωση του pH. Προσδίδει με αυτό τον τρόπο ξινή γεύση στην μπύρα. Στη συγκεκριμένη εργασία, ερευνάται η παραγωγή ξινής μπύρας, με χρήση της *Lachancea thermotolerans* σε ελεύθερη και ακινητοποιημένη μορφή, καθώς και η επαναχρησιμοποίησή της σε διαδοχικές ζυμώσεις. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η *L. thermotolerans* τόσο σε ελεύθερη, όσο και σε ακινητοποιημένη μορφή, κατανάλωσε τα σάκχαρα σχεδόν με τον ίδιο ρυθμό, αλλά πιο αργά συγκριτικά με τον μάρτυρα (*Saccharomyces cerevisiae*) και χρειάστηκαν ως 16 ημέρες για να ολοκληρωθεί η ζύμωση. Η πτώση της τιμής του pH σημειώθηκε κατά τις πρώτες 4 ημέρες ζύμωσης, με την χαμηλότερη τιμή pH να έχει η ζύμωση με *L. thermotolerans* σε ακινητοποιημένη μορφή, 3,38 στην 1<sup>η</sup> παρτίδα και 3,56 στην επαναληπτική παρτίδα. Ακολούθησε η ζύμωση με *L. thermotolerans* σε ελεύθερη μορφή, η οποία είχε τιμή pH 3,75. Δεν υπήρξε σημαντική διαφορά μεταξύ των τιμών για τον φαινομενικό βαθμό ζύμωσης (~ 75%), την απόδοση σε αιθανόλη [~ 57-58% (%vol/°P φαινομενικού εκχυλίσματος)], το χρώμα και τη θολερότητα για όλες τις μπύρες, ανεξάρτητα με το στέλεχος της ζύμης ή την μέθοδο ζύμωσης (με ελεύθερα ή ακινητοποιημένα κύτταρα). Η μπύρα με την χαμηλότερη τιμή pH ήταν με την *L. thermotolerans* σε ακινητοποιημένη μορφή και ακολουθεί η *L. thermotolerans* σε ελεύθερη μορφή με μικρή τις περισσότερες φορές διαφορά. Η ολική ογκομετρούμενη οξύτητα κυμάνθηκε από 3,9 έως 6,3 g/L. Με χρήση συστήματος HPLC-DAD βρέθηκε ότι η συγκέντρωση του γαλακτικού στη μπύρα από ζύμωση με Philly Sour σε ελεύθερη μορφή ήταν 3,60 g/L, ενώ στις ζυμώσεις με Philly Sour σε ακινητοποιημένη μορφή ήταν 5,84 g/L και 2,34 g/L στην επαναληπτική ζύμωση (με διαφορετική παρτίδα γλεύκους). Με χρήση GC-MS, βρέθηκε ότι παράχθησαν περισσότερες σημαντικές πτητικές ουσίες στις μπύρες που παράχθησαν με *L. thermotolerans* τόσο σε ελεύθερη όσο και σε ακινητοποιημένη μορφή, συγκριτικά με την μπύρα που παρήχθει με *S. cerevisiae*. Στην μπύρα που παρήχθει με *L. thermotolerans* σε ελεύθερη μορφή παράχθησαν σημαντικές ενώσεις σε υψηλότερη συγκέντρωση από ότι στην μπύρα που παρήχθει με *L. thermotolerans* σε ακινητοποιημένη μορφή, χωρίς όμως στατιστικά σημαντική διαφορά. Τα αποτελέσματα της οργανοληπτικής ανάλυσης έδειξαν ότι η μπύρα που παρήχθει με *L. thermotolerans* σε ελεύθερη μορφή συγκέντρωσε στα περισσότερα αρωματικά χαρακτηριστικά υψηλότερη βαθμολογία από την μπύρα από ζύμωση με *L. thermotolerans* σε ακινητοποιημένη μορφή, με μικρή όμως διαφορά μεταξύ τους και χωρίς να είναι στατιστικά σημαντική. Στατιστικά σημαντική διαφορά υπήρξε μόνο στο χαρακτηριστικό της ξινής γεύσης, στο οποίο υπερτερούσε (Μ.Ο. 7,5) η μπύρα που παρήχθει με *L. thermotolerans* σε ακινητοποιημένη μορφή. Για όλα τα υπόλοιπα χαρακτηριστικά δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά και βαθμολογήθηκαν ως χαμηλής έντασης. Στις διαδοχικές ζυμώσεις, παρατηρήθηκε κατανάλωση των σακχάρων σε ίσο ή μικρότερο χρονικό διάστημα στην 2<sup>η</sup> και 3<sup>η</sup> διαδοχική ζύμωση, συγκριτικά με την 1<sup>η</sup> ζύμωση. Η τιμή του pH δεν μειώθηκε αποτελεσματικά στην 2<sup>η</sup> και 3<sup>η</sup> διαδοχική ζύμωση, παραμένοντας έως και 0,58 υψηλότερη από ότι αυτής της 1<sup>ης</sup> ζύμωσης. Ο φαινομενικός βαθμός ζύμωσης ήταν αρκετά υψηλός (~ 78 %) σε όλες τις μπύρες των διαδοχικών ζυμώσεων. Αντίθετα, η απόδοση σε αιθανόλη και η ολική ογκομετρούμενη οξύτητα μειωνόταν στατιστικώς σημαντικά, με κάθε επαναζύμωση.

**Λέξεις κλειδιά:** *Lachancea thermotolerans*, ξινή μπύρα, ακινητοποίηση ζυμών, διαδοχικές ζυμώσεις, πτητικές ενώσεις, οργανοληπτική ανάλυση

# ABSTRACT

## Comparative study of beer production with the use of commercial yeast of the species *Lachancea thermotolerans* in free and immobilized form

Tsioka Artemis  
Department of Wine, Vine & Beverage Sciences,  
University of West Attica, 2023

Sour beer is a type of beer, often produced with the use of lactic acid bacteria. The risk of cross-contamination, when using lactic acid bacteria, lead to the research of alternative methods for souring. Philly Sour™ (*Lachancea thermotolerans*, Lallemand) is a commercial yeast, which produces higher amount of lactic acid, comparatively to other yeast species, resulting in the production of sour beer with low pH value. The present thesis investigates beer production using: *Lachancea thermotolerans* with free cells and immobilized cells; and the potential of re-using immobilized cells in sequential fermentations. Results showed that *L. thermotolerans* had a similar fermentation range in free and immobilized form, but those were slower (up to 16 days) than the control with classic brewing yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). The pH reduction took place during the first 4 days of the fermentation. *L. thermotolerans* fermentation using immobilized cells had the lowest pH value ranging from 3.38 to 3.56 (in repeated fermentation). *L. thermotolerans* fermentation with free cells had a pH of 3.75. There were no significant differences, for the apparent degree of fermentation (~ 75 %), ethanol yield was ~ 57-58 % (% vol/fermented apparent °P), the colour and the turbidity, regardless of the used yeast strain or fermentation method (free or immobilized cells). *L. thermotolerans* with immobilized cells fermented beers had the lowest pH values. Total titratable acidity ranged from 3.9 to 6.3 g/L. Using an HPLC-DAD system, lactic acid concentrations in beers, produced with *L. thermotolerans* with free cells was 3.60 g/L, with immobilized cells was 5.84 g/L and 2.34 g/L in the repeated fermentation (with a different wort batch). Using GC-MS, more volatile compounds have been found in beers produced with *L. thermotolerans* with free or immobilized cells, in comparison to beer produced with *S. cerevisiae*. In beer produced with *L. thermotolerans* with free cells, volatile compounds have been found in higher concentrations, than in beer produced with immobilized cells, but the difference was not statistically significant. Sensory analysis results showed that beers produced with *L. thermotolerans* with free cells were also graded higher in aroma, but differences were not statistically significant compared than those beers fermented with *L. thermotolerans* in immobilized form. There was a statistically significant difference in sour taste in the beer produced with *L. thermotolerans* with immobilized cells, which gathered the highest grade in sour taste (average: 7.5). No statistically significant difference has been found regarding the rest of the analyzed characteristics and their intensity has been graded as low. The 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> sequential fermentations exhibited a decrease in Plato values at equal or less time, than the 1<sup>st</sup> fermentation. However, pH values for the 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> sequential fermentation were slightly higher. Aparent degree of fermentation was high (~ 78 %) for all sequential fermentations. On the contrary, ethanol yields and total titratable acidity were statistically significant lower, compared to the corresponding values of the 1<sup>st</sup> fermentation.

**Keywords:** *Lachancea thermotolerans*, sour beer, yeast immobilization, sequential fermentation, volatile compounds, sensory analysis

## Αφιέρωση

Αφιερώνω αυτή την εργασία στον Λευτέρη, για την πολύτιμη υποστήριξή του καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησής της και στον παππού μου Χρήστο, ως ένα μεγάλο ευχαριστώ για όσα μου πρόσφερε σε όλα τα χρόνια της ζωής του.

## Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους αυτούς τους ανθρώπους που συνέβαλλαν στην πραγματοποίηση αυτής της εργασίας. Πρώτα από όλα θα ήθελα να ευχαρίστησω τον κ Ταταρίδη Παναγιώτη για την πολύτιμη βοήθειά του, την καθοδήγηση, την γνώση που μοιράστηκε μαζί μου και τον αμέτρητο χρόνο που αφιέρωσε συζητώντας και λύνοντας τους προβληματισμούς μου. Χωρίς αυτόν, αυτή η εργασία δεν θα μπορούσε να είχε ολοκληρωθεί με τον ίδιο τρόπο.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα Κουσίση Ελισάβετ για την βοήθειά της στην πραγματοποίηση της οργανοληπτικής ανάλυσης, την κα Χατζηλαζάρου Αρχοντούλα και Αραπίτσα Παναγιώτη για την βοήθειά τους στις μετρήσεις δειγμάτων με χρήση της HPLC και την κα Δρόσου Φωτεινή για την βοήθειά της στις μετρήσεις των πτητικών συστατικών με χρήση GC-MS.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να πω στους συμφοιτητές μου: τον Χρήστο, τον Παναγιώτη, την Σοφία, τον Ματθαίο και τον Γιώργο, για την πολύτιμη βοήθειά τους όλους αυτούς τους μήνες.



## Πίνακας περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	i
ABSTRACT .....	ii
Αφιέρωση .....	iii
Ευχαριστίες .....	iv
Κατάλογος Πινάκων .....	viii
Κατάλογος Σχημάτων .....	ix
Κατάλογος Εικόνων.....	xi
Συντμήσεις, ακρωνύμια, σύμβολα και ορισμοί.....	xii
1. Εισαγωγή και σκοπός της εργασίας.....	1
2. Βιβλιογραφική ανασκόπηση.....	4
2.1 Οι ξινές μύρες .....	4
2.2 Η χρήση της <i>Lachancea thermotolerans</i> .....	8
2.2.1 Το γένος <i>Lachancea</i> .....	8
2.2.2 Το είδος <i>Lachancea thermotolerans</i> .....	9
2.2.3 Η χρήση της <i>Lachancea thermotolerans</i> στη ζυθοποίηση .....	12
2.3 Η ζύμη Philly Sour™ ( <i>Lachancea thermotolerans</i> ) .....	21
2.4 Η <i>Lachancea thermotolerans</i> στο εμπόριο .....	24
2.5 Ακίνητοποίηση κυττάρων μικροοργανισμών .....	28
2.5.1 Μέθοδοι/τεχνικές ακίνητοποίησης μικροοργανισμών .....	28
2.5.2 Εφαρμογές ακίνητοποίησης κυττάρων ζυμών .....	44
2.5.3 Αλλαγές της φυσιολογίας των κυττάρων ζυμών και διαφορές στα χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος λόγω ακίνητοποίησης .....	47
2.5.4 Πλεονεκτήματα της τεχνικής ακίνητοποίησης στη ζυθοποίηση .....	49
2.5.4 Μειονεκτήματα της τεχνικής ακίνητοποίησης στην ζυθοποίηση .....	50
2.5.5 Εμπορικό παράδειγμα ακίνητοποίησης για χρήση σε ποτά/οίνο .....	51
2.6 Τα πτητικά συστατικά στη μύρα.....	52

2.6.1	Ανώτερες αλκοόλες .....	53
2.6.2	Εστέρες .....	55
2.6.3	Καρβονυλικές ενώσεις .....	58
2.6.4	Θειούχες ενώσεις .....	63
2.6.5	Φαινολικός χαρακτήρας .....	65
<b>3.</b>	<b>Υλικά και μέθοδοι .....</b>	<b>69</b>
3.1	Στελέχη ζυμών και ακινητοποίηση κυττάρων ζυμών .....	69
3.2	Παρασκευή γλεύκους.....	71
3.3	Τεστ μείωσης pH του γλεύκους / έλεγχος επιμόλυνσης.....	73
3.4	Μέθοδοι ανάλυσης.....	73
3.4.1	Μετρήσεις Plato και pH .....	73
3.4.2	Μετρήσεις θολερότητας και χρώματος .....	74
3.4.3	Μέτρηση αλκοόλης .....	75
3.4.4	Μέτρηση ολικής ογκομετρούμενης οξύτητας .....	75
3.4.5	Ποσοτικός προσδιορισμός γαλακτικού οξέος .....	75
3.4.6	Μέτρηση αρωματικών ουσιών .....	77
3.4.7	Οργανοληπτική ανάλυση.....	78
3.5	Στατιστική επεξεργασία.....	79
<b>4.</b>	<b>Αποτελέσματα και συζήτηση .....</b>	<b>80</b>
4.1	Κατανάλωση εκχυλίσματος και πτώση pH .....	80
4.1.1	Μετρήσεις στις ζυμώσεις των 4 L και του 1 L.....	80
4.1.2	Μετρήσεις στις διαδοχικές ζυμώσεις .....	85
4.1.3	Τεστ μείωσης pH του γλεύκους / έλεγχος επιμόλυνσης.....	89
4.2	Μετρήσεις τελικού φαινομενικού εκχυλίσματος, φαινομενικού βαθμού ζύμωσης, αιθανόλης, απόδοσης σε αιθανόλη, pH, ολικής ογκομετρούμενης οξύτητας, χρώματος και θολερότητας.....	90
4.2.1	Μετρήσεις στη μπύρα των ζυμώσεων των 4 L .....	90
4.2.2	Μετρήσεις στη μπύρα των ζυμώσεων του 1 L.....	94
4.2.3	Μετρήσεις στη μπύρα των διαδοχικών ζυμώσεων.....	99

4.3	Αποτελέσματα μέτρησης συγκέντρωσης γαλακτικού οξέος με χρήση συστήματος HPLC .....	103
4.4	Αποτελέσματα μετρήσεων πτητικών ουσιών με χρήση συστήματος GC-MS .....	105
4.5	Αποτελέσματα οργανοληπτικής ανάλυσης.....	115
<b>5.</b>	<b>Συμπεράσματα.....</b>	<b>118</b>
<b>6.</b>	<b>Βιβλιογραφία .....</b>	<b>122</b>

## Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 2.2.3.A. Αποτελέσματα μετρήσεων κύριων χαρακτηριστικών ζύμωσης με <i>Lachancea thermotolerans</i> .....	20
Πίνακας 2.4.A. Εμπορικά στελέχη <i>Lachancea thermotolerans</i> για χρήση στην οινοποίηση ..	24
Πίνακας 2.4.B. Εμπορικά στελέχη <i>Lachancea thermotolerans</i> για χρήση στη ζυθοποίηση ...	25
Πίνακας 2.6.5.A. Φαινολικές ενώσεις .....	67
Πίνακας 4.2.1.A. Μετρήσεις στη μύρα .....	94
Πίνακας 4.2.2.A. Μετρήσεις στη μύρα του 1L (1 <sup>η</sup> και 2 <sup>η</sup> παρτίδα).....	98
Πίνακας 4.2.3.A Μετρήσεις στη μύρα των διαδοχικών ζυμώσεων (1 <sup>η</sup> και 2 <sup>η</sup> παρτίδα).....	102
Πίνακας 4.4.A. Πτητικές ενώσεις με Flavor Unit > 1 .....	108
Πίνακας 4.4.B. Πτητικές ενώσεις στη μύρα από ζύμωση με US-05.....	109
Πίνακας 4.4.Γ. Πτητικές ενώσεις στη μύρα από ζύμωση με Philly Sour σε ελεύθερη μορφή .....	111
Πίνακας 4.4.Δ. Πτητικές ενώσεις στη μύρα από ζύμωση με Philly Sour σε ακινητοποιημένη μορφή.....	113
Πίνακας 4.5.A. Σύνοψη στατιστικών δεδομένων και αποτελεσμάτων της ANOVA .....	117
Πίνακας 4.5.B. Πίνακας μέσων όρων και τυπικής απόκλισης για ξινή γεύση.....	117
Πίνακας 4.5.Γ. Αποτελέσματα τεστ Tukey .....	117

## Κατάλογος Σχημάτων

Σχήμα 2.1.A. Εναλλαγή μικροβιακού πληθυσμού κατά την παραγωγή Lambic μπύρας.....	5
Σχήμα 2.1.B. Τρόποι παραγωγής ξινών ζύθων .....	6
Σχήμα 2.2.1.A. Φυλογενετικό δέντρο του γένους <i>Lachancea</i> .....	8
Σχήμα 2.4.A. Φυλογενετικό δέντρο του γένους <i>Lachancea</i> .....	26
Σχήμα 2.5.1.A. Μέθοδοι ακινητοποίησης κυττάρων μικροοργανισμών.....	29
Σχήμα 2.5.1.4.A. Μηχανισμός συσσωμάτωσης (flocculation) κυττάρων ζυμών .....	36
Σχήμα 2.5.1.4.B. Μηχανισμός συσσωμάτωσης (flocculation) κυττάρων ζυμών.....	37
Σχήμα 2.5.1.4.Γ. Μηχανισμός συσσωμάτωσης (flocculation) κυττάρων ζυμών .....	37
Σχήμα 2.6.A. Διάγραμμα παραγωγής πτητικών ενώσεων στη μπύρα.....	53
Σχήμα 2.6.1.A. Βιοσύνθεση ανώτερων αλκοολών μέσω της οδού Elrich .....	54
Σχήμα 2.6.2.A. Διάγραμμα παραγωγής εστέρων .....	56
Σχήμα 2.6.2.B. Βιοσύνθεση οξικών εστέρων και αιθυλεστέρων .....	57
Σχήμα 2.6.3.2.A. Συζυγείς δικετόνες .....	60
Σχήμα 2.6.3.2.B. Σχηματική αναπαράσταση δημιουργίας, επαναπρόσληψης και απομάκρυνσης των συζυγών δικετόνων μέσω του μεταβολισμού του κυττάρου ζύμης .....	61
Σχήμα 2.6.3.2.Γ. Σχηματική αναπαράσταση δημιουργίας, επαναπρόσληψης και απομάκρυνσης του διακετυλίου μέσω του μεταβολισμού του κυττάρου ζύμης.....	63
Σχήμα 2.6.4.A. Διάγραμμα βιοσύνθεσης H <sub>2</sub> S και SO <sub>4</sub> .....	64
Σχήμα 2.6.5.A. Διάγραμμα παραγωγής 4-βινυλ-γουαϊακόλης και στυρένιου .....	65
Σχήμα 3.4.5.A. Πρότυπη καμπύλη συγκέντρωσης (ppm) γαλακτικού οξέος.....	76
Σχήμα 4.1.1.A. Μέτρηση εκχυλίσματος (°P) .....	82
Σχήμα 4.1.1.B. Μέτρηση παραγωγής CO <sub>2</sub> (gr/L) 1 <sup>ης</sup> παρτίδας.....	83
Σχήμα 4.1.1.Γ. Διάγραμμα ταχυτήτων παραγωγής CO <sub>2</sub> [(gr/L)/h] 1 <sup>ης</sup> παρτίδας .....	83
Σχήμα 4.1.1.Δ. Μέτρηση παραγωγής CO <sub>2</sub> (gr/L) 2 <sup>ης</sup> παρτίδας.....	84
Σχήμα 4.1.1.Ε. Διάγραμμα ταχυτήτων παραγωγής CO <sub>2</sub> [(gr/L)/h] 2 <sup>ης</sup> παρτίδας.....	84
Σχήμα 4.1.1.ΣΤ. Μέτρηση pH.....	85
Σχήμα 4.1.2.A. Διαδοχικές ζυμώσεις 1 <sup>ης</sup> παρτίδας .....	89
Σχήμα 4.1.2.B. Διαδοχικές ζυμώσεις 2 <sup>ης</sup> παρτίδας.....	88
Σχήμα 4.1.3.A. Τεστ μείωσης εκχυλίσματος & pH γλεύκους.....	89
Σχήμα 4.2.1.A. Μετρήσεις τελικού φαινομενικού εκχυλίσματος, αιθανόλης pH, ολικής ογκομετρούμενης οξύτητας .....	91
Σχήμα 4.2.1.B. Τελικός φαινομενικός βαθμός ζύμωσης % και απόδοση σε αιθανόλη %.....	92

Σχήμα 4.2.2.A. Μετρήσεις τελικού φαινομενικού εκχυλίσματος, αιθανόλης pH, ολικής ογκομετρούμενης οξύτητας στις ζυμώσεις του 1 L της 1 <sup>ης</sup> παρτίδας .....	95
Σχήμα 4.2.2.B. Τελικός φαινομενικός βαθμός ζύμωσης % και απόδοση σε αιθανόλη % στις ζυμώσεις του 1 L της 1 <sup>ης</sup> παρτίδας .....	96
Σχήμα 4.2.2.Γ. Μετρήσεις τελικού φαινομενικού εκχυλίσματος, αιθανόλης pH, ολικής ογκομετρούμενης οξύτητας στις ζυμώσεις του 1 L της 2 <sup>ης</sup> παρτίδας .....	96
Σχήμα 4.2.2.Δ. Τελικός φαινομενικός βαθμός ζύμωσης % και απόδοση σε αιθανόλη % στις ζυμώσεις του 1 L της 2 <sup>ης</sup> παρτίδας .....	97
Σχήμα 4.2.3.A. Μετρήσεις τελικού φαινομενικού εκχυλίσματος, αιθανόλης pH, ολικής ογκομετρούμενης οξύτητας στις διαδοχικές ζυμώσεις της 1 <sup>ης</sup> παρτίδας .....	100
Σχήμα 4.2.3.B. Τελικός φαινομενικός βαθμός ζύμωσης % και απόδοση σε αιθανόλη % στις διαδοχικές ζυμώσεις της 1 <sup>ης</sup> παρτίδας .....	100
Σχήμα 4.2.3.Γ. Μετρήσεις τελικού φαινομενικού εκχυλίσματος, αιθανόλης pH, ολικής ογκομετρούμενης οξύτητας στις διαδοχικές ζυμώσεις της 2 <sup>ης</sup> παρτίδας .....	101
Σχήμα 4.2.3.Δ. Τελικός φαινομενικός βαθμός ζύμωσης % και απόδοση σε αιθανόλη % στις διαδοχικές ζυμώσεις της 2 <sup>ης</sup> παρτίδας .....	101
Σχήμα 4.3.A. Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος (g/L) σε δείγματα μύρας .....	104
Σχήμα 4.5.A. Διάγραμμα μέσων όρων αξιολόγησης οργανοληπτικών χαρακτηριστικών.....	115

## Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 2.2.2.A. <i>H Lachancea thermotolerans</i> στο οπτικό μικροσκόπιο .....	11
Εικόνα 2.2.2.B. <i>H Lachancea thermotolerans</i> στο οπτικό μικροσκόπιο .....	11
Εικόνα 2.2.2.Γ. Αποικίες ζυμών σε διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα .....	11
Εικόνα 2.5.1.A. Μέθοδοι ακινητοποίησης κυττάρων μικροοργανισμών.....	30
Εικόνα 2.5.1.2.A. Ακινητοποίηση κυττάρων μέσα σε πορώδες υλικό.....	32
Εικόνα 2.5.1.2.B. Σφαιρίδια ακινητοποιημένης ζύμης για την παραγωγή αφρώδη οίνου.....	32
Εικόνα 2.5.1.2.Γ. Σφαιρίδια ακινητοποιημένης ζύμης με μονή και διπλή ακινητοποίηση.....	32
Εικόνα 2.5.1.2.Δ. Σφαιρίδια ακινητοποιημένης ζύμης και τμήμα του εσωτερικού του .....	33
Εικόνα 2.5.1.3.A. Ακινητοποίηση κυττάρων με συγκράτηση στο εξωτερικό ημιπερατών μεμβρανών.....	33
Εικόνα 2.5.1.3.B. Μεμβράνες κοίλων ινών (hollow membranes).....	34
Εικόνα 2.5.1.3.Γ. Μεμβράνες κοίλων ινών (hollow membranes) με πόρους διαμέτρου 0,45 μm.....	34
Εικόνα 2.5.1.3.Δ. Μεμβράνες διαπίδυσης (dialysis membranes) .....	35
Εικόνα 2.5.1.4.A. Flocculent και non-flocculent κύτταρα ζύμης.....	38
Εικόνα 2.5.1.4.B. Non-flocculent κύτταρα <i>S. cerevisiae</i> και flocculent κύτταρα <i>S. cerevisiae</i> .....	38
Εικόνα 2.5.1.4.Γ. Non-flocculent κύτταρα <i>S. cerevisiae</i> και flocculent κύτταρα <i>S. cerevisiae</i> και λεπτομέρεια της φωτογραφίας .....	39
Εικόνα 2.5.1.5.A. Κύτταρα <i>S. cerevisiae</i> , κύτταρα <i>H. uvarum</i> και συσσωμάτωση μεταξύ κυττάρων <i>S. cerevisiae</i> και <i>H. uvarum</i> .....	41
Εικόνα 3.1.A. Ακινητοποίηση ζύμης σε σφαιρίδια αλγινικού νατρίου.....	70
Εικόνα 3.2.A. Δοχεία ζύμωσης με εμβολιασμένο γλεύκος.....	73
Εικόνα 4.2.1.A. Μπύρες 1 <sup>ης</sup> παρτίδας.....	93
Εικόνα 4.2.1.B. Μπύρες 1 <sup>ης</sup> παρτίδας.....	93

## Συντμήσεις, ακρωνύμια, σύμβολα και ορισμοί

% vol	Ποσότητα της απόλυτης (άνυδρης) αιθανόλης (σε λίτρα) που υπάρχουν σε 100 λίτρα διαλύματος στους 20 °C
ANOVA	Analysis of Variance, Ανάλυση της Διακύμανσης
ASBC	American Society of Brewing Chemists, Αμερικανική Ένωση Ζυθοποιών Χημικών
ATP	Adenosine Triphosphate, Τριφωσφορική Αδενοσίνη
CFU	Colony Forming Units- Μονάδες Σχηματισμού Αποικιών
DMS	Διμεθυλοσουλφίδιο
EBC	European Brewery Convention
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid, Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
FAN	Free Amino Nitrogen, Ελεύθερο Αμινο-άζωτο
FG	Final Gravity, τελική φαινομενική πυκνότητα
GC-MS	Gas Chromatography-Mass spectrometry, Αέρια Χρωματογραφία-Φασματοσκοπία Μάζας
HPLC	High Performance Liquid Chromatography, Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης
IBU	International Bitterness Units, Διεθνείς Μονάδες μέτρησης Πικράδας
MCFA	Medium Chain Fatty Acid, μεσσαίου μήκους αλυσίδας λιπαρό οξύ
OG	Original Gravity, αρχική σχετική πυκνότητα
P.S. Ακ.	Philly Sour σε ακινητοποιημένη μορφή
P.S. Ελ.	Philly Sour σε ελεύθερη μορφή
Plato (°P)	συγκέντρωση του εκχυλίσματος (gr διαλυμένων στερεών/100 gr διαλύματος)
POF	Phenolic Off-Flavour, Φαινολικός χαρακτήρας-
UV	Ultraviolet (radiation), Υπεριώδες (ακτινοβολία)





# 1. Εισαγωγή και σκοπός της εργασίας

Ο ζύθος είναι ένα προϊόν που παράγεται από την ζύμωση βύνης δημητριακών, κυρίως κριθαριού. Η χρήση του λυκίσκου κατά την παραγωγή του ζύθου, προσδίδει στο προϊόν αρωματικά και πικρικά χαρακτηριστικά (Kunze, 2004).

Αρχικά, η παραγωγή του πραγματοποιούνταν με αυθόρμητη ζύμωση, από τους μικροοργανισμούς που ήταν παρόντες στην πρώτη ύλη ή στην ατμόσφαιρα (Steensels & Verstrepen, 2014).

Με το πέρασμα των χρόνων, η χρήση συγκεκριμένων στελεχών κυρίως του γένους *Saccharomyces* (*S. cerevisiae* και *S. pastorianus*) άρχισαν να κυριαρχούν στις ζυμώσεις των τροφίμων, αντικαθιστώντας τις αυθόρμητες ζυμώσεις (Steensels & Verstrepen, 2014).

Αυτό καθιερώθηκε, ώστε να επιτευχθεί η παραγωγή τυποποιημένων προϊόντων με σταθερά ποιοτικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, λόγω των σταθερών και ελεγχόμενων συνθηκών ζύμωσης, καθώς και για μεγαλύτερες αποδόσεις ζύμωσης. Ορισμένα στελέχη από τα παραπάνω είδη κατέκτησαν τον κυρίαρχο ρόλο, λόγω των επιθυμητών χαρακτηριστικών που διαθέτουν. Αυτά τα χαρακτηριστικά είναι η καλή ζυμωτική συμπεριφορά, η απουσία εμφάνισης οργανοληπτικών ελαττωμάτων και η δυνατότητα παραγωγής ουσιών, οι οποίες προσδίδουν επιθυμητά αρώματα και γεύσεις, η μη παραγωγή τοξινών, καθώς και η υψηλή παραγωγή αλκοόλης και η αντοχή τους σε αυτή (Steensels & Verstrepen, 2014).

Όμως, η παραπάνω κυριαρχία ζυμών του γένους *Saccharomyces*, είχε αρνητικό αντίκτυπο σε ότι αφορά την ποικιλομορφία των τελικών παραγόμενων προϊόντων. Το περιορισμένο εύρος οργανοληπτικών χαρακτηριστικών και η τυποποίηση των προϊόντων, οδηγεί σε μείωση της ποικιλομορφίας και της πολυπλοκότητας τους (Steensels & Verstrepen, 2014).

Για τον λόγο αυτό, αναπτύχθηκε μεγάλο ενδιαφέρον για τις non-*Saccharomyces* (ή non-conventional) ζύμες, οι οποίες ξεκίνησαν να χρησιμοποιούνται για την παραγωγή προϊόντων με ιδιαίτερα και μοναδικά χαρακτηριστικά, τα οποία θα διαφοροποιούσαν τα

προϊόντα αυτά από τα υπόλοιπα, αρχικά στην παραγωγή οίνου και σταδιακά και σε άλλα ποτά. Επίσης, η χρήση των non-*Saccharomyces* ζυμών μπορεί να γίνει και για την παραγωγή ζύθου με λίγη ή χωρίς αλκοόλη (Basso et al., 2016).

Στην ζυθοποίηση, οι non-*Sacharomyces* ζύμες που έχουν χρησιμοποιηθεί είναι κυρίως *Torulaspora delbrueckii*, *Brettanomyces* spp., *Saccharomycodes ludwigii*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Candida shehatae*, *Candida tropicalis*, *Pichia kluyveri*, κ.α. (Tataridis et al., 2013a, b; 2014; 2016; Michel et al., 2016 ).

Οι ξινές μύρες είναι ένας τύπος μύρας που χαρακτηρίζεται από χαμηλό pH (3,0 – 3,9) και χαρακτηριστική ξινή γεύση. Τα τελευταία χρόνια αναπτύσσεται μεγάλο ενδιαφέρον για αυτό τον τύπο μύρας (Dysvik et al., 2020).

Πρόσφατα, ξεκίνησε η μελέτη παραγωγής μύρας με στελέχη του είδους *Lachancea thermotolerans* (Tataridis et al., 2013a; 2014; Canonico et al., 2019, 2021; Domizio et al., 2016; Svendsen, 2016; Toh et al., 2020; Zdaniewicz et al., 2020a), τόσο για τη διαφοροποίηση του αρωματικού χαρακτήρα, αλλά τα τελευταία χρόνια, κυρίως λόγω της δυνατότητας που έχουν κάποια στελέχη του παραπάνω είδους να παράγουν γαλακτικό οξύ, με αποτέλεσμα την παραγωγή ξινής μύρας, με χαμηλό pH και χαρακτηριστική ξινή γεύση, χωρίς την χρήση γαλακτικών βακτηρίων, τα οποία χρησιμοποιούνται συνήθως για την παραγωγή αυτού του τύπου μύρας και μπορεί να επιφέρουν τον κίνδυνο διασταυρούμενης επιμόλυνσης στο ζυθοποιείο (Postigo et al., 2023).

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, ερευνήθηκε η παραγωγή ξινής μύρας με χρήση εμπορικής ζύμης (Philly Sour, Lallemand) του είδους *Lachancea thermotolerans* σε ελεύθερη και ακινητοποιημένη μορφή, καθώς και η δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης των ακινητοποιημένων κυττάρων ζύμης σε διαδοχικές ζυμώσεις.

Σκοπός της εργασίας ήταν η εύρεση ή μη διαφορών, που μπορεί να εμφανιστούν τόσο κατά την διάρκεια της ζύμωσης της μύρας με κύτταρα της παραπάνω ζύμης σε ελεύθερη και ακινητοποιημένη μορφή, όσο και στα χαρακτηριστικά της τελικής μύρας που θα παραχθεί.

Ειδικότερα, ο σκοπός της εργασίας, μπορεί να αναλυθεί στους ακόλουθους επιμέρους στόχους. Οι στόχοι αυτοί, αφορούν τις ζυμώσεις με κύτταρα της εμπορικής ζύμης Philly Sour σε ελεύθερη και ακινητοποιημένη μορφή, καθώς και τη ζύμωση με την

εμπορική ζύμη US-05 (Fermentis), ενός στελέχους *Saccharomyces cerevisiae*, ως μάρτυρα.

- Παρακολούθηση κατά την διάρκεια των ζυμώνσεων του ρυθμού πτώσης των βαθμών Plato (°P).
- Παρακολούθηση κατά την διάρκεια των ζυμώνσεων του χρόνου και του ρυθμού πτώσης του pH.
- Σύγκριση των τελικών προϊόντων ως προς τις τιμές τελικού φαινομενικού εκχυλίσματος (°Plato), τελικού φαινομενικού βαθμού ζύμωσης, pH, ολικής ογκομετρούμενης οξύτητας, συγκέντρωσης γαλακτικού οξέος, συγκέντρωσης αιθανόλης, απόδοσης σε αιθανόλη, χρώματος και θολερότητας.
- Αξιολόγηση των παραχθέντων πτητικών ουσιών των τελικών προϊόντων και αναζήτηση διαφορών μεταξύ αυτών.
- Αξιολόγηση οργανοληπτικών χαρακτηριστικών της τελικής μπίρας και εύρεση διαφορών ανάλογα με την μέθοδο παραγωγής.
- Μελέτη δυνατότητας επαναχρησιμοποίησης των σφαιριδίων ακινητοποιημένης ζύμης για διαδοχικές ζυμώνσεις, με παρακολούθηση των διαδοχικών ζυμώνσεων και των χαρακτηριστικών της τελικής μπίρας της κάθε ζύμωσης.

## 2. Βιβλιογραφική ανασκόπηση

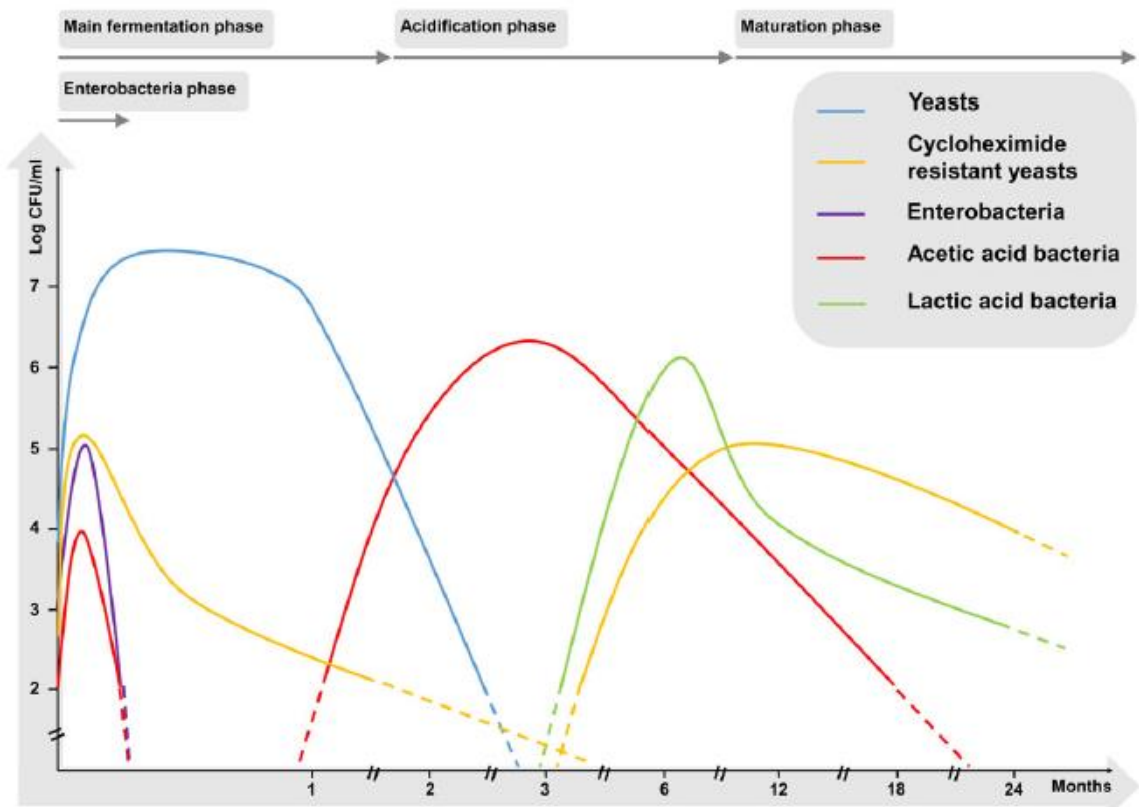
### 2.1 Οι ξινές μύρες

Οι ξινές μύρες είναι ένας τύπος μύρας με υψηλή συγκέντρωση οργανικών οξέων και χαρακτηριστική ξινή γεύση. Οι ξινές μύρες έχουν μικρότερη τιμή pH, από τις συνηθισμένες μύρες και συνήθως κυμαίνεται από 3,0 με 3,5 ως και 3,9 (Dysvik et al., 2020). Κάποια είδη ξινής μύρας είναι οι lambic, kriek, framboise, geuze, faro, flanders ή flemish red ale, old brown ale ή flemish brown beer, που προέρχονται από το Βέλγιο και οι Berliner weisse και Gose που προέρχονται από την Γερμανία (Boulton, 2013; (Dysvik et al., 2020).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η παραγωγή της μύρας πραγματοποιείται με ζύμωση από στελέχη ζυμών που ανήκουν στα είδη *Saccharomyces cerevisiae* ή *Saccharomyces pastorianus*. Όμως, για την παραγωγή της ξινής μύρας, γίνεται χρήση ζυμών αλλά και βακτηρίων για την ζύμωση του γλεύκους. Τα βακτήρια τα οποία συμμετέχουν είναι κυρίως τα γαλακτικά, αλλά σε αυθόρμητες ζυμώσεις μπορεί να υπάρχουν και οξικά βακτήρια, καθώς και διάφορες non-*Saccharomyces* ζύμες, όπως οι *Brettanomyces* (Dysvik et al., 2020).

Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι για την παραγωγή ξινής μύρας. Στην παραδοσιακή μέθοδο, σύμφωνα με την οποία παράγονται και οι lambic μύρες, η παραγωγή τους πραγματοποιείται με αυθόρμητη ζύμωση. Πιο συγκεκριμένα, το γλεύκος, αμέσως μετά τον βρασμό, μεταφέρεται σε ανοιχτά δοχεία μεγάλης επιφάνειας και αφήνεται να κρυώσει μέχρι τους 20 °C, συνήθως με διάρκεια μιας νύχτας. Με αυτόν τον τρόπο, ο εμβολιασμός του γλεύκους πραγματοποιείται από τους μικροοργανισμούς που είναι παρόντες στην ατμόσφαιρα ή στην επιφάνεια του υλικού των δοχείων, στην περίπτωση που αυτά είναι κατασκευασμένα από ξύλο. Όταν η θερμοκρασία του γλεύκους φτάσει τους 20 °C, το γλεύκος μεταφέρεται σε ξύλινα δοχεία για την πραγματοποίηση της ζύμωσης και ωρίμανσης, όπου η συνολική τους διάρκεια κυμαίνεται από 1 – 3 χρόνια (Dysvik et al., 2020).

Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και ωρίμανσης, ο πληθυσμός και η κυριαρχία διάφορων ομάδων μικροοργανισμών εναλλάσσεται (σχήμα 2.1.A). Κατά την πρώτη φάση της ζύμωσης, η οποία μπορεί να έχει διάρκεια έως 1 εβδομάδα, κυριαρχούν τα εντεροβακτήρια, ενώ παρόντες βρίσκονται και οξικά, γαλακτικά βακτήρια και ζύμες. Η δεύτερη φάση, κατά την οποία πραγματοποιείται η κύρια ζύμωση, λαμβάνει χώρα η παραγωγή αιθανόλης και CO<sub>2</sub>. Στην φάση της κύριας ζύμωσης κυριαρχούν ζύμες του γένους *Saccharomyces*. Η φάση αυτή μπορεί να έχει διάρκεια 3 – 4 μήνες. Ακολουθεί η τρίτη φάση, η φάση της οξίνισης, κατά την οποία κυριαρχούν τα γαλακτικά βακτήρια και πραγματοποιείται παραγωγή οργανικών οξέων. Η τελευταία φάση είναι η φάση της ωρίμανσης, στην οποία παράγονται διάφοροι εστέρες. Κυριαρχούν είδη *Brettanomyces*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* και οξικών βακτηρίων. Η φάση της ωρίμανσης έχει διάρκεια από 8 μήνες και μπορεί να διαρκέσει έως κάποια χρόνια (De Roos & De Vuyst, 2019; Dysvik et al., 2020).

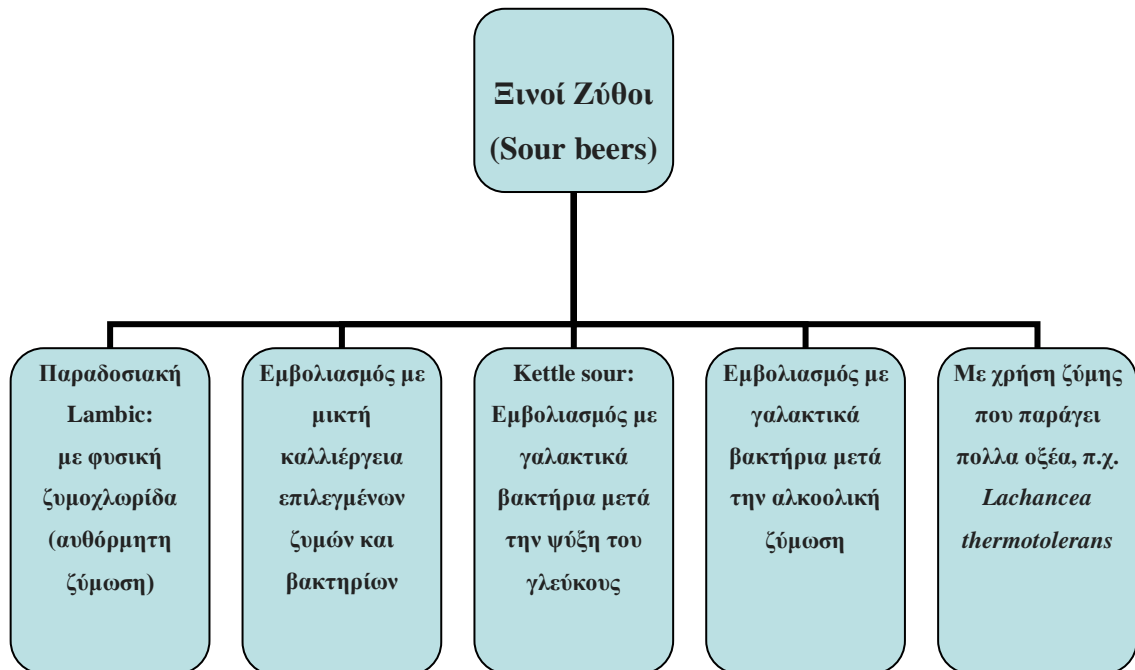


Σχήμα 2.1.A: Εναλλαγή μικροβιακού πληθυσμού κατά την παραγωγή lambic μύρας, πηγή: De Roos & De Vuyst (2019)

Η παραδοσιακή μέθοδος παραγωγής ξινής μύρας είναι χρονοβόρα και λόγω της αυθόρμητης ζύμωσης, η τελική μύρα που θα παραχθεί μπορεί να μην έχει πάντα τα

ίδια οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Για τον λόγο αυτό, συνήθως γίνονται χαρμάνια από τα διάφορα βαρέλια. Στις χειρότερες περιπτώσεις, συμπεριλαμβάνεται η μη πραγματοποίηση της ζύμωσης ή η παραγωγή μύρας με ανεπιθύμητα χαρακτηριστικά, κάτι το οποίο θα οδηγήσει σε οικονομικές απώλειες του ζυθοποιείου, αφού το προϊόν δεν θα μπορεί να πωληθεί (Dysvik et al., 2020).

Για τους παραπάνω λόγους αναπτύχθηκαν κι άλλες μέθοδοι παραγωγής ξινής μύρας με ελεγχόμενη ζύμωση, χρησιμοποιώντας καθαρές καλλιέργειες ζυμών και βακτηρίων (Ciosek et al., 2020; Dysvik et al., 2019; Dysvik et al., 2020; Peyer et al., 2017).



Σχήμα 2.1.B: Τρόποι παραγωγής ξινών ζύθων

Μια από τις εναλλακτικές μέθοδοι (Kettle sour) είναι ο εμβολιασμός του γλεύκους με γαλακτικά βακτήρια, μετά την ψύξη του γλεύκους και διατήρηση της θερμοκρασίας μεταξύ 30 – 40 °C για 2 – 3 ημέρες, πριν την ζύμωση του γλεύκους με ζύμη (Dysvik et al., 2019). Το γλεύκος είναι προτιμότερο να μην περιέχει λυκίσκο, για να μην παρεμποδιστεί η ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων και ο ρυθμός παραγωγής γαλακτικού οξέος. Μετά την οξίνιση ακολουθεί βρασμός του γλεύκους όπου τα γαλακτικά βακτήρια θα θανατωθούν και θα ακολουθήσει εμβολιασμός με ζύμες (Dysvik et al., 2020).

Μια άλλη μέθοδος είναι ο ταυτόχρονος εμβολιασμός του γλεύκους με ζύμη και βακτήρια (Alcine Chan et al., 2019; Ciosek et al., 2020). Και στις δύο παραπάνω περιπτώσεις, ο χρόνος ζύμωσης μπορεί να μειωθεί στις 3 εβδομάδες (Dysvik et al., 2020).

Μια ακόμη μέθοδος είναι ο εμβολιασμός του γλεύκους με γαλακτικά βακτήρια μετά το τέλος της ζύμωσης με ζύμη. Σε αυτή την περίπτωση πρέπει να γίνει προσθήκη κάποιας πηγής σακχάρων για την κατανάλωσή τους από τα βακτήρια, αφού τα περισσότερα σάκχαρα θα έχουν ήδη καταναλωθεί από τις ζύμες (Dysvik, La Rosa, Buffetto, et al., 2020) Η διάρκεια ζύμωσης σε αυτή την περίπτωση μπορεί να είναι περίπου 6 εβδομάδες (Dysvik et al., 2020).

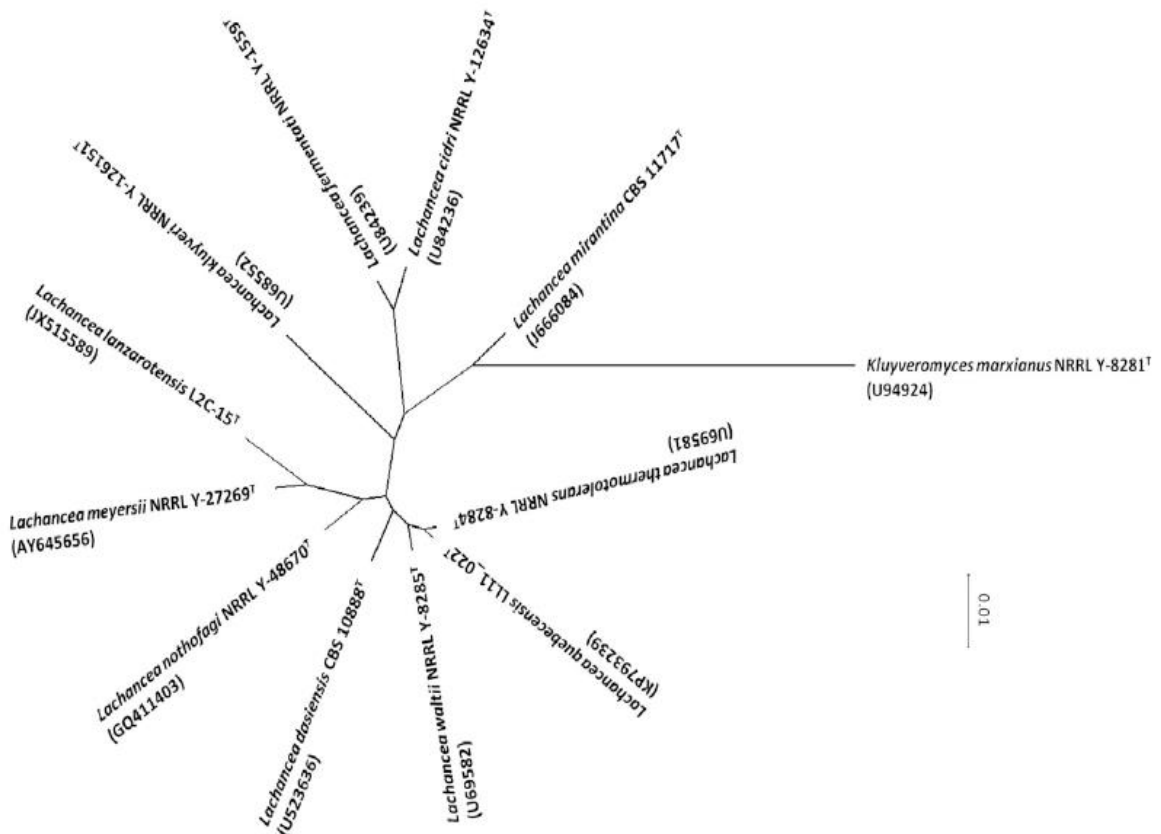
Η χρήση όμως γαλακτικών βακτηρίων, τα οποία χρησιμοποιούνται συνήθως για την παραγωγή αυτού του τύπου μύρας, μπορεί να επιφέρουν τον κίνδυνο διασταυρούμενης επιμόλυνσης στον χώρο του ζυθοποιείου (Postigo et al., 2023), ιδίως σε μικροζυθοποιεία τα οποία δεν διαθέτουν αναπτυγμένα συστήματα επαλήθευσης των απολυμάνσεων. Για αυτό τον λόγο, ξεκίνησε η μελέτη παραγωγής ξινής μύρας με χρήση ζυμών, οι οποίες έχουν την δυνατότητα παραγωγής υψηλής συγκέντρωσης γαλακτικού οξέος, με αποτέλεσμα την παραγωγή μύρας με χαμηλό pH και χαρακτηριστική ξινή γεύση. Κάποια στελέχη του είδους *Lachancea thermotolerans* (παλαιότερα *Kluveromyces thermotolerans*), έχουν αυτή τη δυνατότητα και η χρήση τους στη ζυθοποίηση ξεκίνησε να ερευνάται (Tataridis et al., 2013a;2014; Canonico et al., 2019, 2021; Domizio et al., 2016; Svendsen, 2016; Toh et al., 2020; Zdaniewicz et al., 2020a).



## 2.2 Η χρήση της *Lachancea thermotolerans*

### 2.2.1 Το γένος *Lachancea*

Το 2003 ο Kurtzman, πρότεινε τον σχηματισμό του γένους *Lachancea* και την συμπερίληψη σε αυτό, είδη που μέχρι τότε ανήκαν στα γένη *Kluyveromyces*, *Saccharomyces* και *Zygosaccharomyces* (Kurtzman, 2003). Στις μέρες μας, περιλαμβάνονται στο γένος *Lachancea* 11 είδη, για τα οποία έχει βρεθεί ότι έχουν από 8 χρωμοσώματα. Τα είδη αυτά είναι: *L. thermotolerans*, *L. quebecensis*, *L. waltii*, *L. dasiensis*, *L. nothofagi*, *L. meyersi*, *L. lanzarotensis*, *L. kluyveri*, *L. fermentati*, *L. cidri* και *L. mirantina* (Porter et al., 2019).



Σχήμα 2.2.1.A: Φυλογενετικό δέντρο τους γένους *Lachancea*. Το είδος *Kluyveromyces marxianus* χρησιμοποιήθηκε ως το διαφορετικό είδος (outgroup species) της ομάδας *Lachancea*, πηγή: Porter et al., (2019)

Τα κύτταρα που ανήκουν στο γένος *Lachancea* μπορούν να αναπαραχθούν με κυτταρική διαίρεση, η οποία πραγματοποιείται με πολυμερή εκβλάστηση σε στενή βάση (ασεξουαλική αναπαραγωγή). Τα κύτταρα μπορεί να είναι σφαιρικά, ωοειδή, ελλειψοειδή ή επιμήκη. Μπορεί επίσης να σχηματιστούν ψευδοϋφές. Κατά τη σεξουαλική αναπαραγωγή, η σύζευξη μπορεί ή όχι να προηγηθεί του σχηματισμού του ασκού. Ένα έως τέσσερα ασκοσπόρια σχηματίζονται ανά ασκό. Τα ασκοσπόρια είναι λεία, σφαιρικά και μπορεί να απελευθερωθούν από τον ασκό (Lachance & Kurtzman, 2011).

Όσο αφορά τα βιοχημικά χαρακτηριστικά, τα είδη που ανήκουν στο γένος *Lachancea* ζυμώνουν έντονα τη γλυκόζη, δεν αφομοιώνουν το νιτρικό άλας και χρησιμοποιούν την αιθυλαμίνη ως μοναδική πηγή αζώτου. Το συνένζυμο Q-6 είναι η κύρια ουβικινόνη. Η αντίδραση μπλε του διαζωνίου B είναι αρνητική (Lachance & Kurtzman, 2011). Πιο αναλυτικά, είδη του γένους *Lachancea*, μπορούν να ζυμώσουν τη γλυκόζη και τουλάχιστον ένα άλλο σάκχαρο. Αφομοιώνουν τη ραφινόζη, την αιθανόλη (με εξαίρεση τα *L. dasiensis*, *L. nothofagi* και *L. mirantina*) και τη μαννιτόλη. Δεν μπορούν να αφομοιώσουν τη λακτόζη, το διαλυτό άμυλο, την L- και D- αραβινόζη, την D-ριβόζη (με εξαίρεση την *L. quebecensis*), την L-ραμνόζη, την D-γλυκοζαμίνη, N-ακετυλ-D-γλυκοζαμίνη (με εξαίρεση την *L. mirantina*), την μεθανόλη, την ερυθριτόλη, την γαλακτιτόλη, το κιτρικό οξύ, την ινοσιτόλη και το εξαδεκάνιο (Porter et al., 2019).

Είδη που ανήκουν στο γένος *Lachancea* απαντώνται σχεδόν παντού, τόσο στο φυσικό περιβάλλον, όσο και σε κατοικημένες από ανθρώπους περιοχές (Porter et al., 2019). Επίσης, είδη του γένους *Lachancea* απομονώνονται συχνά στο μικροβίωμα πολλών ζυμώσεων (Porter et al., 2019).

### **2.2.2 Το είδος *Lachancea thermotolerans***

Το είδος *Lachancea thermotolerans* είναι το είδος τύπου (type species) του γένους *Lachancea*. Στελέχη *Lachancea thermotolerans* μπορούν να βρεθούν συχνά σε φρούτα, σε έντομα του είδους *Drosophila* και σε άλλα έντομα που τρέφονται με φυτά. Επίσης, στελέχη *Lachancea thermotolerans*, απομονώνονται συχνά σε τρόφιμα που έχουν

υποστεί ζύμωση (Lachance & Kurtzman, 2011). Επίσης, μπορεί να βρεθεί συχνά σε σταφύλια, στο χόμα, σε φυτά και απαντάται σε ολόκληρο τον κόσμο (Morata et al., 2018).

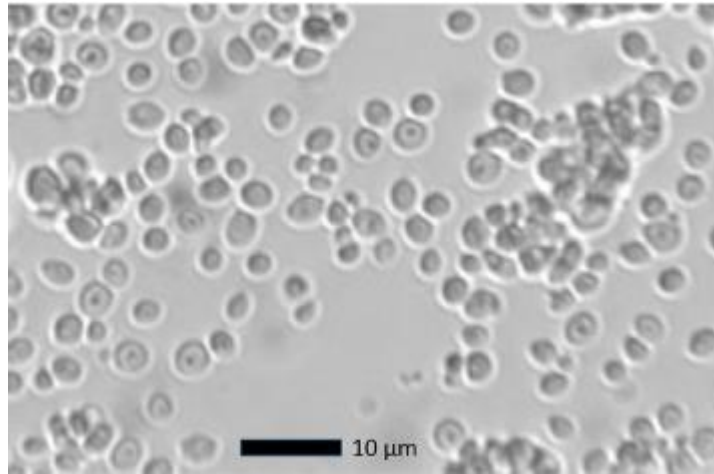
Μετά από 3 ημέρες ανάπτυξης σε YM άγαρ στους 25 °C, τα κύτταρα που σχηματίζονται είναι σφαιρικά ή ελλειψοειδή, μεγέθους περίπου 3 – 6 × 6 – 8 μm και εμφανίζονται μεμονωμένα, σε ζεύγη ή σε μικρές ομάδες (εικόνες 2.2.2.A και 2.2.2.B).

Οι αποικίες που σχηματίζονται έχουν υφή βουτυρώδης, γυαλιστερή και κρεμ χρώματος. Στην εικόνα 2.2.2.Γ απεικονίζονται αποικίες από κάποια είδη ζυμών, μεταξύ αυτών και *Lachancea thermotolerans*, οι οποίες έχουν αναπτυχθεί σε διάφορα είδη υποστρώματος. Η *Lachancea thermotolerans* εάν αναπτυχθεί σε ζωμό εκχυλίσματος γλυκόζης-ζύμης, σχηματίζει ένα ελαφρύ δακτύλιο και μπορεί να έχει υψηλό βαθμό συσσωμάτωσης (flocculation). Με καλλιέργεια σε πλάκα Dalmau με άγαρ καλαμποκιού μπορεί να σχηματιστούν ψευδοϋφές, που κυμαίνονται από κακώς αναπτυγμένες έως πολύ διακλαδισμένες με βλαστοκονίδια. Όμως, δεν σχηματίζονται αληθινές υφές (Lachance & Kurtzman, 2011).

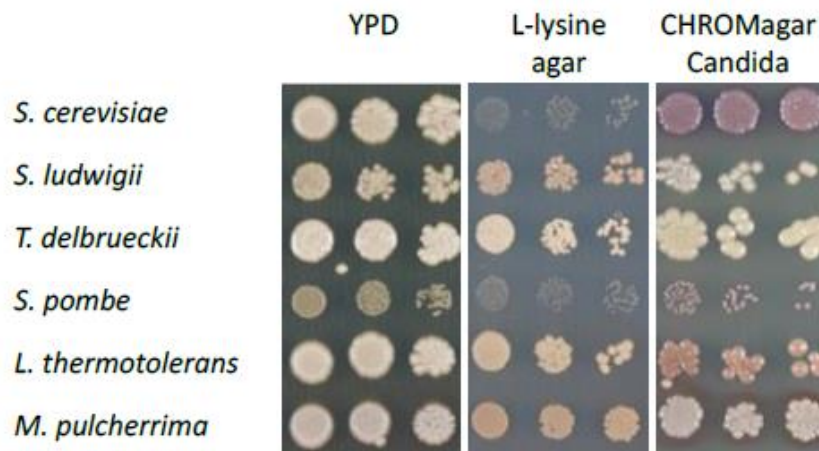
Τα ασκοσπόρια σχηματίζονται είτε με σύζευξη μεταξύ μεμονωμένων κυττάρων, μεταξύ ενός κυττάρου και του οφθαλμού του (bud), ή μπορεί να προέρθουν απευθείας από διπλοειδή κύτταρα. Σχηματίζονται ένα έως τέσσερα σφαιρικά ασκοσπόρια με εμφανή λιπιδικά σφαιρίδια. Τα σπόρια απελευθερώνονται από τον ασκό αμέσως μετά το σχηματισμό και τείνουν να συγκολλούνται. Η σποριογένεση εμφανίζεται στα περισσότερα στελέχη μετά από 2 – 5 ημέρες ανάπτυξης στους 17 – 25 °C σε υποστρώματα YM άγαρ, εκχύλισμα βύνης άγαρ ή όξινο McClary άγαρ (Lachance & Kurtzman, 2011). Κατά την ασεξουαλική αναπαραγωγή, η αναπαραγωγή επιτυγχάνεται με πολυμερή εκβλάστηση (Morata et al., 2018).



Εικόνα 2.2.2.A: Η *Lachancea thermotolerans* στο οπτικό μικροσκόπιο, κλίμακα 10 µm, πηγή: Morata et al., (2018)



Εικόνα 2.2.2.B: Η *Lachancea thermotolerans* στο οπτικό μικροσκόπιο, κλίμακα 10 µm, πηγή: Benito (2018)



Εικόνα 2.2.2.Γ: Αποικίες ζυμών σε διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα, πηγή: Morata et al., (2018)

Η *Lachancea thermotolerans* ζυμώνει τη γλυκόζη, τη σουκρόζη και την ραφινόζη, ενώ κατά περίπτωση μπορεί να ζυμώσει και την μαλτόζη, την γαλακτόζη και την ινουλίνη (Lachance & Kurtzman, 2011).

Μπορεί να αναπτυχθεί σε υγρά ή στερεά θρεπτικά υποστρώματα: γλυκόζης, σουκρόζης, ραφινόζης, τρεχαλόζης, μαλτόζης, μελεξιτόσης, μεθυλ-α-D-γλυκοζίδης, L-σορβόζης, γλυκερόλης. Δεν αναπτύσσεται παρουσία 0,01 % και 0,1 % κυκλοεξαμιδίου. Αναπτύσσεται σε θερμοκρασία 30 °C και κατά περίπτωση στους 37 °C (Lachance & Kurtzman, 2011). Αναπτύσσεται καλύτερα σε θερμοκρασία 20 – 30 °C, ενώ παρουσιάζει αργή ανάπτυξη σε θερμοκρασία μικρότερη των 20 °C (Morata et al., 2018).

Η *Lachancea thermotolerans* έχει παρόμοια απαίτηση σε άζωτο με τον *Saccharomyces cerevisiae* και χρειάζεται για την ανάπτυξή της κατ' ελάχιστον 200 mg/L αφομοιώσιμο άζωτο, ώστε να μην διακοπεί η ζύμωση. Έχει καλή αντοχή στην παρουσία αιθανόλης εώς και συγκέντρωση 9% v/v (Morata et al., 2018).

### **2.2.3 Η χρήση της *Lachancea thermotolerans* στη ζυθοποίηση**

Από τα 11 είδη που συμπεριλαμβάνονται σήμερα στο γένος *Lachancea*, η *Lachancea thermotolerans* είναι αυτό που έχει μελετηθεί περισσότερο, για τον ρόλο που διαδραματίζει στην οξίνιση της μύρας και του κρασιού, ενώ δεύτερο σε ενδιαφέρον έρχεται το είδος *Lachancea fermentati*, για την πιθανή θετική συμβολή που παρουσιάζει στην χημική σύσταση των παραπάνω ποτών (Porter et al., 2019).

Πράγματι, η *Lachancea thermotolerans* μπορεί να μειώσει το pH στο κρασί, παράγοντας γαλακτικό οξύ (Kapsoroulou et al., 2005, 2007). Επιπρόσθετα, συμβάλει θετικά και σε άλλα χαρακτηριστικά του κρασιού, όπως στην ενίσχυση των επιθυμητών αρωματικών ενώσεων, στην αύξηση της γλυκερόλης, στην σταθερότητα του χρώματος (Benito, 2018; Morata et al., 2018; Porter et al., 2019) και στην μείωση της πτητικής οξύτητας (Vilela, 2018).

Τα τελευταία χρόνια ξεκίνησαν να πραγματοποιούνται αρκετές έρευνες πάνω στην χρήση της *Lachancea thermotolerans* στην παραγωγή μύρας. Ορισμένες αρχικές μελέτες με εμπορικό στέλεχος επιλεγμένο για οινοποίηση, έδειξαν μικρή αύξηση ογκομετρούμενης οξύτητας και μικρή ή μηδαμινή πτώση του pH σε κανονικά ζυθογλεύκοι (με χαμηλή συγκέντρωση σε γλυκόζη και σε κανονικές θερμοκρασίες ζύμωσης 18 °C), αλλά έδειξαν διαφοροποίηση στο χρόνο και στις ταχύτητες ζύμωσης, στο βαθμό ζύμωσης, στην παραγωγή αιθανόλης και γλυκερίνης και στο αρωματικό προφίλ (νότες κόκκινων φρούτων και μελιού) σε σχέση με στελέχη του *S. cerevisiae* (Tataridis et al., 2013a; 2014). Άλλες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια διπλωματικών διατριβών (House, 2016; Svensen, 2015) έδειξαν τα πρώτα ενθαρρυντικά σημάδια για τις δυνατότητες που παρουσιάζει η *Lachancea thermotolerans* στην παραγωγή μύρας.

Οι Tataridis et. al., (2013a) χρησιμοποίησαν ένα εμπορικό στέλεχος *Lachancea thermotolerans* (Concerto<sup>TM</sup>, Chr. Hansen), το οποίο χρησιμοποιείται στην οινοποίηση, για να το μελετήσουν (μεταξύ άλλων στελεχών) στην παραγωγή μύρας. Η διάρκεια ζύμωσης ήταν 21 ημέρες και η θερμοκρασία ζύμωσης ήταν 18 °C. Το γλεύκος είχε αρχικό εκχύλισμα 11,5 °P και τελικό 1,7 °P. Η αρχική τιμή pH ήταν 5,2. Ο βαθμός ζύμωσης ήταν 85 %, η τελική ποσότητα σε αλκοόλη ήταν 4,5 % v/v, η ποσότητα γλυκερόλης που παράχθηκε ήταν 2,2 g/L και το τελικό pH ήταν 4,2. Το συγκεκριμένο στέλεχος είχε πιο αργό ρυθμό ανάπτυξης, αλλά τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια με αυτά του *Saccharomyces cerevisiae*, προσθέτοντας στο τελικό προϊόν οργανοληπτικό προφίλ (flavor) κόκκινων φρούτων και μελιού.

Σε παρόμοια έρευνα οι Tataridis et. al., (2014) χρησιμοποίησαν ένα στέλεχος *Lachancea thermotolerans* για την παραγωγή μύρας τύπου Weiss. Η ζύμωση είχε διάρκεια 24 ημέρες και η θερμοκρασία ζύμωσης ήταν 20 °C. Το γλεύκος είχε αρχικό εκχύλισμα 13 °P και τελικό 1,95 °P. Η αρχική τιμή pH ήταν 5,2. Ο βαθμός ζύμωσης ήταν 85 %, η τελική ποσότητα σε αλκοόλη ήταν 5,2 % v/v, η ποσότητα γλυκερόλης που παράχθηκε ήταν 2,4 g/L και το τελικό pH ήταν 4,5. Η ογκομετρούμενη οξύτητα ήταν 1,8 g/L, το χρώμα της μύρας ήταν 10 EBC και η θολρότητα 9,54 EBC. Η μύρα που παράχθηκε με το παραπάνω στέλεχος είχε οργανοληπτικό προφίλ (flavor) κόκκινων φρούτων και μελιού, όπως στην προηγούμενη έρευνα των Tataridis et al., (2013a).

Στα πλαίσια διπλωματικής εργασίας που διεξήχθη από την Svensen (2015), απομονώθηκε ένα στέλεχος *Lachancea thermotolerans* και μελετήθηκε ως προς τα ζυθοποιητικά του χαρακτηριστικά. Ένα από τα πειράματα που πραγματοποίησε με το παραπάνω στέλεχος, ήταν η παραγωγή μύρας τύπου lambic με προσθήκη σιταριού. Η ζύμωση είχε διάρκεια 25 ημέρες. Το τελικό ποσοστό αιθανόλης ήταν 6,8 % v/v. Η παραγωγή γαλακτικού οξέος ήταν 7,33 g/L και η παραγωγή γλυκερόλης 2,37 g/L. Η αρχική τιμή pH του γλεύκους ήταν 5,35 και το στέλεχος *Lachancea thermotolerans* μείωσε το pH στο 3,60. Η μεγάλη μείωση το pH παρατηρήθηκε να συμβαίνει μέχρι την 4<sup>η</sup> ημέρα ζύμωσης και στη συνέχεια η τιμή του έμεινε σχεδόν σταθερή.

Οι Domizio et al., (2016) μελέτησαν τα ζυθοποιητικά χαρακτηριστικά ενός στελέχους *Lachancea thermotolerans*, το οποίο είχαν απομονώσει. Η ζύμωση χρειάστηκε περισσότερο χρόνο για να ολοκληρωθεί (~ 21 ημέρες). Στο τέλος της ζύμωσης είχε καταναλωθεί το 93 – 94 % της ποσότητας της μαλτόζης, ενώ δεν καταναλώθηκε η μαλτοτριόζη. Η παραγωγή αιθανόλης ήταν κατά 6 – 12 % λιγότερη, συγκριτικά με την παραγωγή από τον *Saccharomyces cerevisiae*, ενώ η παραγωγή γλυκερόλης και γαλακτικού οξέος ήταν μεγαλύτερη. Η μεγαλύτερη παραγωγή γαλακτικού οξέος, οδήγησε σε μείωση του pH. Στην τελική μύρα που παράχθηκε, το ποσοστό του διακετυλίου ήταν σε παρόμοιο επίπεδο με αυτά της ζύμωσης με *Saccharomyces cerevisiae*, ενώ το ποσοστό της 2,3-πεντανοδιόνης ήταν μικρότερο. Το οργανοληπτικό προφίλ (flavor) της παραχθείσας μύρας, χαρακτηρίστηκε έπειτα από οργανοληπτική δοκιμή ως φρουτώδες, ανθικό και ξινό. Το άρωμα γαρύφαλλου ήταν αισθητό, ένδειξη ότι το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε είχε POF<sup>+</sup> χαρακτήρα (House, 2016). Επιπρόσθετες δοκιμές στο ίδιο στέλεχος, έδειξαν ότι παρουσίασε μεγάλη βιωσιμότητα ακόμη και μετά από πέντε διαδοχικές επαναχρησιμοποιήσεις, ενώ το ποσοστό των α-οξέων του λυκίσκου δεν επηρέασε την βιωσιμότητα, αλλά ούτε την κινητική ζύμωσης. Το τεστ συσσωμάτωσης (flocculation) κατέταξε το στέλεχος στην κατηγορία non-flocculent (κύτταρα τα οποία δεν δημιουργούν συσσωματώματα μεταξύ τους), αν και στην πραγματικότητα το στέλεχος διαχωριζόταν με ευκολία από το υπόστρωμα. Τέλος, δεν υπήρξε σημαντική διαφορά στην σταθερότητα του αφρού ανάμεσα στην μύρα που παράχθηκε από *Lachancea thermotolerans* και *Saccharomyces cerevisiae*. Αντίστοιχα, η διαφορετική συγκέντρωση του οξυγόνου στην αρχή της ζύμωσης, δεν είχε καμία επίδραση στη ζύμωση.

Οι Gamero et al., (2016) βρήκαν, μεταξύ άλλων non-*Saccharomyces* ζυμών που απομόνωσαν, ένα στέλεχος *Lachancea thermotolerans* που παρήγαγε ανώτερες αλκοόλες μέσω της οδού Ehrlich σε κατά 1,7 – 6 φορές περισσότερη συγκέντρωση από τους *Saccharomyces bayanus* και *Saccharomyces pastorianus*.

Ένα άλλο στέλεχος *Lachancea thermotolerans*, το οποίο απομονώθηκε από δαμάσκηνο, παρήγαγε κατά την ζύμωση στους 20 °C αλκοόλη σε ποσοστό 2,6 % v/v, ενώ δεν παρήγαγε σε σημαντικά επίπεδα αρωματικές ενώσεις (Holt et al., 2018).

Οι Osburn et al., (2018) απομόνωσαν διάφορα στελέχη, μεταξύ αυτών και *Lachancea thermotolerans*. Ο βαθμός ζύμωσης (attenuation) για τα στελέχη αυτά κυμαινόταν στο 40 – 60 % και το pH από 3,21 – 3,42, όμως δεν παρήγαγαν όλα τα στελέχη γαλακτικό οξύ.

Στη διπλωματική του εργασία ο Monteiro (2019), βρήκε πως από τα 6 στελέχη *Lachancea thermotolerans* τα οποία απομόνωσε, τα 3 μόνο μπορούσαν να ζυμώσουν την μαλτόζη, ενώ όλα μπορούσαν να ζυμώσουν την γλυκόζη.

Οι Canonico et al., (2019) μελέτησαν 3 non-*Saccharomyces* στελέχη σε καθαρές αλλά και μεικτές ζυμώσεις με *Saccharomyces cerevisiae*. Ένα από αυτά τα στελέχη ήταν *Lachancea thermotolerans*. Στις μεικτές ζυμώσεις, η αναλογία *Saccharomyces cerevisiae* / *Lachancea thermotolerans* ήταν 1:1, 1:10 και 1:20. Όμως, μόνο στην αναλογία 1:20 κυριάρχησε το στέλεχος *Lachancea thermotolerans*. Η ζύμωση πραγματοποιήθηκε στους 19 °C και είχε διάρκεια 11 ημέρες. Στη ζύμωση με καθαρή καλλιέργεια *Lachancea thermotolerans*, παράχθηκε αλκοόλη σε ποσοστό 3,21 % v/v, και τα υπολλειπόμενα σάκχαρα (μαλτόζη) ήταν σε συγκέντρωση 12,32 g/L. Ο πραγματικός βαθμός ζύμωσης (real attenuation) ήταν σε ποσοστό περίπου 40 %. Το pH μειώθηκε στο 3,88, η πτητική οξύτητα ήταν 0,38 g/L και η ποσότητα γαλακτικού οξέος που παράχθηκε ήταν 1,83 g/L. Όσο αφορά τις μεικτές ζυμώσεις, δεν παρουσίασαν μεγάλη διαφορά στην παραγωγή αλκοόλης (περίπου 4% v/v), ενώ ο πραγματικός βαθμός ζύμωσης ήταν στο 55 %. Το pH στις μεικτές ζυμώσεις ήταν 4,14 – 4,23 και η παραγωγή γαλακτικού οξέος ήταν 0,53 – 0,85 g/L. Στην ζύμωση με *Saccharomyces cerevisiae* το pH ήταν 4,46, ενώ δεν παράχθηκε καθόλου γαλακτικό οξύ. Δεν υπήρχαν διαφορές στην πτητική οξύτητα μεταξύ των ζυμώσεων. Όσο αφορά το αρωματικό



προφίλ της μπύρας, η ζύμωση με *Lachancea thermotolerans* φάνηκε να επηρέασε στατιστικά σημαντικά το άρωμα του τελικού προϊόντος. Στις μεικτές ζυμώσεις σημειώθηκε αύξηση των ανώτερων αλκοολών και μείωση της ακεταλδεΐδης.

Οι Callejo et al., (2019) μελέτησαν την ζύμωση αλλά και την ζύμωση στη φιάλη από κάποια non-*Saccharomyces* στελέχη. Ένα από αυτά ήταν στέλεχος *Lachancea thermotolerans*. Το συγκεκριμένο στέλεχος όμως, δεν ζύμωνε καλά την μαλτόζη, ενώ δε ζύμωνε καθόλου την μαλτοτριόζη. Μετά το τέλος των ζυμώσεων, δεν υπήρξε σημαντική διαφορά στην ποσότητα αλκοόλης που παράχθηκε από το στέλεχος *Lachancea thermotolerans* και από το στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae*. Σε αντίθεση με τα αποτελέσματα άλλων ερευνών, στη ζύμωση που πραγματοποιήθηκε με *Lachancea thermotolerans*, η τιμή του pH ήταν υψηλότερη (4,3) από αυτή της ζύμωσης με στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae* (4,1). Στο πείραμα με την ζύμωση στη φιάλη με το στέλεχος *Lachancea thermotolerans*, βρέθηκε η υψηλότερη ποσότητα διακετυλίου.

Οι Zdaniewicz et al., (2020) σε έρευνά τους με ένα στέλεχος *Lachancea thermotolerans*, το οποίο είχαν απομονώσει από γλεύκος σταφυλιών, βρήκαν πως τα ζυμωτικά χαρακτηριστικά του συγκεκριμένου στελέχους δεν επηρεάστηκαν ούτε από τις διαφορετικές ποικιλίες λυκίσκου, ούτε από την διαφορετική συγκέντρωση των α-οξέων του λυκίσκου. Η μεγαλύτερη παραγωγή CO<sub>2</sub>, συγκριτικά με την παραγωγή CO<sub>2</sub> από τον *Saccharomyces cerevisiae*, έδειξε ότι αρχικά η ζύμωση ήταν πιο έντονη, ενώ μετά την 10<sup>η</sup> μέρα η ποσότητα CO<sub>2</sub> που παραγόταν από τα δύο στελέχη άρχισε να εξισώνεται. Κατά την ζύμωση, καταναλώθηκε όλη η ποσότητα γλυκόζης και το 93 – 94 % της ποσότητας της μαλτόζης. Η παραγωγή αιθανόλης ήταν χαμηλότερη (4,25 - 5,37 % v/v) συγκριτικά με την ποσότητα που παρήγαγε το στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae*, ενώ η ποσότητα γλυκερόλης που παράχθηκε από την *Lachancea thermotolerans* ήταν διπλάσια (9 g/L). Το συγκεκριμένο στέλεχος όμως, δεν παρήγαγε μεγάλο ποσοστό γαλακτικού οξέος (0,01 – 0,06 g/L). Στην ίδια έρευνα, έδειξαν επίσης ότι η απαίτηση σε FAN και μεταλλικά ιόντα ήταν παρόμοια και για τα δύο στελέχη, ενώ στην τελική μπύρα δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στην ποσότητα FAN. Στη ζύμωση με *Lachancea thermotolerans*, η παραγωγή εστέρων και πτητικών ουσιών ήταν μικρότερη. Η ανάλυση των πτητικών ενώσεων, έδειξε ότι η μπύρα που παράχθηκε με *Lachancea thermotolerans*, ήταν στατιστικά διαφορετική, από αυτή που παράχθηκε με *Saccharomyces cerevisiae*.

Οι Toh et al., (2020) χρησιμοποίησαν ένα εμπορικό στέλεχος *Lachancea thermotolerans* (Concerto™, Chr. Hansen). Η ζύμωση είχε διάρκεια 14 ημέρες και υπήρξε αύξηση πληθυσμού μέχρι την 4<sup>η</sup> ημέρα. Σημειώθηκε μεγάλη μείωση του pH μέχρι την 2<sup>η</sup> μέρα κι έπειτα παρατηρήθηκαν μικρές αυξήσεις. Όμως, όπως και το στέλεχος στην έρευνα των Zdaniewicz et al., (2020), δεν παρήγαγε γαλακτικό οξύ σε μεγάλη ποσότητα, ενώ στην συγκεκριμένη έρευνα η ποσότητα του γαλακτικού οξέος ήταν μη ανιχνεύσιμη, αποτελέσματα παρόμοια με των (Tataridis et al., 2013a; 2014). Οι διαφορές που παρουσιάζουν τα διαφορετικά στελέχη *Lachancea thermotolerans* στην παραγωγή γαλακτικού οξέος, οφείλονται σε διαφορές / διακυμάνσεις στην ακολουθία των γονιδίων *ldh*, από το οποίο αποκωδικοποιείται το ένζυμο γαλακτική αφυδρογονάση (lactate dehydrogenase), με αποτέλεσμα να εμφανίζονται φαινοτυπικές διαφορές. Το ένζυμο αυτό, είναι που μετατρέπει το πυροσταφυλικό οξύ, το οποίο είναι το τελικό προϊόν της γλυκόλυσης, σε γαλακτικό οξύ (Gatto et al., 2020). Όσο αφορά το οξικό οξύ, το στέλεχος της Concerto™ έδειξε να το καταναλώνει, χωρίς όμως να το παράγει, τουλάχιστον σε μεγάλη ποσότητα. Το μηλικό οξύ μειώθηκε μέχρι την 4<sup>η</sup> μέρα, ενώ στη συνέχεια σταθεροποιήθηκε (Toh et al., 2020). Το ηλεκτρικό οξύ ήταν το κύριο οξύ σε όλες τις παραχθείσες μπίρες (Toh et al., 2020; Zdaniewicz et al., 2020). Μετά την ζύμωση, υπήρξαν αλλαγές στις πτητικές ενώσεις. Οι αλκοόλες αποτέλεσαν το μεγαλύτερο ποσοστό. Η Concerto™ παρήγαγε σε σημαντικά υψηλό ποσοστό ακεταλδεΐδη (8,58 g/L). Επίσης, παρήγαγε υψηλές ποσότητες από οξικούς εστέρες και αιθυλεστέρες (Toh et al., 2020).

Οι Canonico et al., (2021) μελέτησαν μεταξύ άλλων, στελέχη *Lachancea thermotolerans* τα οποία είχαν απομονώσει από σταφύλια και από βρύα βελανιδιάς. Το επιλεγθέν στέλεχος, σε γλεύκος κατάλληλο για παραγωγή pils μπίρας, παρήγαγε κατά την 1<sup>η</sup> δοκιμή 0,34 g/L CO<sub>2</sub> / ημέρα, για τις πρώτες 3 μέρες. Παρήγαγε 3,14 % v/v αλκοόλη, ενώ η υπολειπόμενη μαλτόζη ήταν σε ποσοστό 11,67 g/L. Σημειώθηκε παραγωγή γαλακτικού οξέος και μείωση του pH. Η ζύμωση είχε διάρκεια 20 ημέρες, αλλά το στέλεχος δεν κατάφερε να την ολοκληρώσει. Έπειτα από 3 μήνες αποθήκευσης σε μπουκάλι η βιωσιμότητα της ζύμης ήταν καλή (  $\geq 6,5 \log$  CFU/ml). Στην δεύτερη δοκιμή, η βιωσιμότητα της ζύμης ήταν 6,98 log CFU/ml, η παραγωγή αιθανόλης 2,80 % v/v και το pH: 3,75. Η υπολειπόμενη μαλτόζη ήταν σε ποσοστό 57,05 g/L. Τα αποτελέσματα της οργανοληπτικής δοκιμής έδειξαν ότι η μπίρα που παράχθηκε από το

στέλεχος *Lachancea thermotolerans*, είχε ξινό προφίλ με φρουτώδη και εστερικό χαρακτήρα.

Οι Postigo et al., (2022), χρησιμοποίησαν μια συλλογή από ιθαγενείς ζύμες του κρασιού, 4 εκ των οποίων ανήκαν στο είδος *Lachancea thermotolerans*, για να ερευνήσουν την ζυθοποιητική τους ικανότητα. Οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν αρχικά σε 100 ml γλεύκος, και στη συνέχεια τα στελέχη που επιλέχθηκαν για τα επόμενα στάδια, σε ζυμώσεις του 1 L γλεύκους. Οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν στους 18 – 20 °C, υπό ανάδευση (120 rpm) και είχε διάρκεια 5 – 6 ημέρες. Η κινητική της ζύμωσης ήταν παρόμοια και για τις δύο ζυμώσεις. Το 1 από τα 4 στελέχη δεν μπορούσε να ζυμώσει την μαλτόζη και τα 2 από τα 4 στελέχη μπορούσαν να παράξουν γαλακτικό οξύ σε συγκεντρώσεις 2,75 – 3,28 g/L, ενώ τα άλλα δύο παρήγαγαν σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις (0,230 – 0,277 g/L). Η συγκέντρωση αιθανόλης στην μύρα που ζυμώθηκε με το στέλεχος το οποίο δεν ζύμωνε την μαλτόζη ήταν 1,10 % v/v, ενώ με τα άλλα στελέχη 3,85 % v/v , 5,6 % v/v και 5,7 % v/v, αντίστοιχα. Το χρώμα των μπυρών κυμάνθηκε από 9,5 – 16,5 EBC και πικράδα από 15,5 – 26,50 IBU. Οι μύρες που παράχθηκαν με τα στελέχη *Lachancea thermotolerans*, έπειτα από οργανοληπτική δοκιμή, χαρακτηρίστηκαν με εστερικό και φρουτώδη αρωματικό προφίλ και με άρωμα μήλου/μηλίτη. Επίσης, οι μύρες αυτές είχαν την υψηλότερη συγκέντρωση εστέρων και μέση συγκέντρωση ανώτερων αλκοολών.

Οι Postigo et al., (2023) σε πρόσφατη έρευνά τους μελέτησαν 10 στελέχη του γένους *Lachancea thermotolerans*, σε ζυμώσεις των 100 ml, του 1 L και των 100 L. Οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 18 – 20 °C, υπό ανάδευση (120 rpm), εκτός από την περίπτωση των ζυμώσεων των 100 L γλεύκους, όπου επικρατούσαν στατικές συνθήκες. Η διάρκεια ζύμωσης ήταν 5 – 6 ημέρες, στις ζυμώσεις των 100 ml και του 1 L και 19 – 20 ημέρες στις ζυμώσεις των 100 L. Η παραγωγή γαλακτικού οξέος κυμάνθηκε σε εύρος 1,5 – 2,5 g/L και η συγκέντρωση αλκοόλης από 3,85 – 5,35 % v/v. Το χρώμα τους ήταν από 10 – 13,5 EBC, πικράδα από 10 – 16,10 IBU και υπολειπόμενα σάκχαρα από 17,5 – 19,0 g/L. Από τα 10 στελέχη, επιλέχθηκε ένα από αυτά για ζύμωση σε 1 L και στη συνέχεια σε 100 L. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε και ένα στέλεχος *Lachancea thermotolerans* (CLI 1232), το οποίο είχε απομονωθεί από προηγούμενη έρευνα των Postigo et al., (2022). Παρατηρήθηκαν διαφορές, κυρίως στο αρωματικό προφίλ των παραχθέντων μπυρών, καθώς η ποσότητα του ως προς ζύμωση

γλεύκους αυξανόταν (scale-up). Η μύρα που παράχθηκε με το στέλεχος CLI 1232 είχε ισορροπημένη οξύτητα και άρωμα φρουτώδες με νότες μελιού. Η μύρα που παράχθηκε με το άλλο στέλεχος (1-8B) είχε ισορροπημένη οξύτητα, αλλά είχε λιγότερο άρωμα φρούτων και εσπεριδοειδών. Αξίζει να σημειωθεί, ότι ενώ βρέθηκαν κάποιες αρωματικές ενώσεις κατά την ανάλυση της αέριας χρωματογραφίας, αυτές δεν έγιναν αντιληπτές κατά την οργανοληπτική δοκιμή από τους δοκιμαστές. Διαφορές παρουσιάστηκαν και στην συγκέντρωση αιθανόλης και γαλακτικού οξέος, ανάμεσα στις μύρες που παράχθηκαν στις ζυμώσεις των 100 ml και του 1 L, καθώς σημειώθηκε μείωση της ποσότητάς τους. Οι συγγραφείς υπέθεσαν ότι αυτό μπορεί να οφείλεται στην εστεροποίηση του γαλακτικού οξέος με την αιθανόλη και την παραγωγή γαλακτικού αιθυλεστέρα (Vanderhaegen et al., 2007), κατά την ωρίμανση της μύρας, διότι πραγματοποίησαν τις μετρήσεις των ζυμώσεων των 100 ml μετά το τέλος της ζύμωσης, ενώ του 1 L μετά το τέλος της ωρίμανσης. Στις ζυμώσεις του 1 L και των 100 L, δεν εμφανίστηκαν μεγάλες διαφορές, με εξαίρεση το στέλεχος 1-8B και το control (*S. cerevisiae*), στις συγκεντρώσεις αιθανόλης, ανώτερων αλκοολών και εστέρων.

Οι Iturritxa et al., (2023) απομόνωσαν 76 στελέχη από διάφορα περιβάλλοντα στην Ισπανία κι έπειτα από δοκιμές ενζυματικής δραστηριότητας και ζυθοποίησης σε μικρή κλίμακα, κατέληξαν σε 6 στελέχη, τα οποία είχαν την καλύτερη ζυθοποιητική ικανότητα. Τα 6 αυτά στελέχη, ανήκαν όλα στο είδος *Lachancea thermotolerans* και χρησιμοποιήθηκαν στη ζύμωση για παραγωγή 3 διαφορετικών τύπων μύρας: α) European Lager (Coopers), με αρχική τιμή Plato 15 °P και pH 5,43, β) English IPA (India Pale Ale, BrewFerm), με αρχική τιμή Plato 16 °P και pH 5,47, γ) Belgian Dubbel (BrewFerm), με αρχική τιμή Plato 18 °P και pH 5,39. Η ζύμωση είχε διάρκεια 7 ημέρες και η θερμοκρασία ζύμωσης ήταν 20 °C. Από τα 6 στελέχη, τα 3 ήταν αυτά που ζύμωσαν καλύτερα και τα 3 γλεύκη, αν και ο βαθμός ζύμωσης ήταν χαμηλότερος συγκριτικά με τον βαθμό ζύμωσης των ζυμώσεων με τα εμπορικά στελέχη – μάρτυρες. Σε όλες τις περιπτώσεις, η τιμή του pH ήταν μεγαλύτερη του 3,5 και είχε μέσο όρο ~ 4,0.

Στον παρακάτω πίνακα (2.2.3.A), αναγράφονται τα αποτελέσματα των κύριων χαρακτηριστικών ζύμωσης, κάποιων από των παραπάνω ερευνών.

Πίνακας 2.2.3.Α: Αποτελέσματα μετρήσεων κύριων χαρακτηριστικών ζύμωσης με *Lachancea thermotolerans*

Στέλεχος	<i>L. thermotolerans</i> Concerto <sup>TM</sup> (Chr. Hansen).	Δ.α.	NCSU, απομόνωση Βόρεια Καρολίνα (ΗΠΑ)	101, απομόνωση από κρασί (Ιταλία)	322, συλλογή DiSVA (Ιταλία)	MN477031, απομόνωση από μούστο (Ελσβακία)	<i>L. thermotolerans</i> Concerto <sup>TM</sup> (Chr. Hansen).	B13, απομόνωση από βρύα δρυός (Ιταλία)	CLI 1232 και 1-8B, συλλογή (Ισπανία)
Διάρκεια ζύμωσης (ημέρες)	21	24	25	21	11	14	14	20	20
Θερμοκρασία ζύμωσης (°C)	18	20	18 – 22	14	19	20	20	20	18 – 20
Αρχικό εκχύλισμα (°P)	11,5	13	14,0	12,75	12,3	12,0	14,6 (μετατροπή από Brix)	12,2	11,92
Τελικό εκχύλισμα (°P)	1,7	1,95	1,28	1,46	5,82	5,46 και 5,41 (πραγματικό εκχύλισμα)	7,9 (μετατροπή από Brix)	Δ.α	3,06 και 3,82
Βαθμός ζύμωσης %	85	85	90	88,54	48,95 (39,80 πραγματικός βαθμός ζύμωσης)	67,38 και 67,31	45,8	Δ.α	74,3 και 67,8
Αλκοόλη % (v/v)	4,5	5,2	6,8	5,72-6,08	3,12	4,3-4,25	3,82	2,80-3,14	3,88 – 3,38
Απόδοση σε αλκοόλη % vol/fermented °P	0,46	0,46	0,53	0,50	0,48	0,65 και 0,64	0,57	Δ.α	0,43 και 0,41
Τελικό pH	4,2	4,5	3,60	4,17 - 4,30	3,88	4,39 - 4,67	4,85	3,75	Δ.α.
Γαλακτικό οξύ (g/L)	Δ.α.	Δ.α.	7,33	0,24	1,83	0,01-0,06	Μ.α.π.	Δ.α.	1,5 – 2,5
Ολική ογκομετρούμενη οξύτητα (g/L)	Δ.α.	1,8 (σε γαλακτικό οξύ)	Δ.α	Δ.α	0,38 (πηκτική οξύτητα σε οξικό οξύ)	Δ.α	Δ.α	Δ.α	Δ.α
Γλυκερόλη (g/L)	2,2	2,4	2,37	1,5	Δ.α.	9,0	Δ.α.	Δ.α.	3,97 και 4,20
Κατανάλωση μαλτόζης	Ναι	Ναι	Δ.α.	93-94%	88%	93-94%	100%	43%	Ναι
Κατανάλωση μαλτοτριόζης	Δ.α.	Δ.α.	Ναι	Όχι	Δ.α.	Δ.α.	Δ.α.	Δ.α.	Όχι
Επίδραση α-οξέων	Δ.α.	Δ.α.	Δ.α.	Κ.ε.	Δ.α.	Κ.ε.	Δ.α.	Δ.α.	Δ.α.
Αρωματικός χαρακτήρας	Μέλι, κόκκινα φρούτα	Μέλι, κόκκινα φρούτα	Δ.α	Φρουτώδες, ανθικό, ξινό, γαρύφαλλο, πεπόνι, φράουλα	Δ.α	Δ.α	Δ.α	Φρουτώδες, εσπεριδοειδή, εστερικός, βύνη, δημητριακά	Ισορροπημένη οξύτητα, άρωμα φρουτώδες με νότες μελιού (CLI 1232) ισορροπημένη οξύτητα, αλλά λιγότερο άρωμα φρούτων και εσπεριδοειδών (1-8B)
Πηγή	Tataridis et al., 2013a	Tataridis et al., 2014	Svensen, 2015	Domizio et al., 2016	Canonico et al., 2019	Zdaniewicz et al., 2020	Toh et al., 2020	Canonico et al., 2021	Postigo et al., 2023

Δ.α. Δεν αναφέρεται, Κ.ε. Καμμία επίδραση, Μ.α.π. Μη ανιχνεύσιμη ποσότητα

## 2.3 Η ζύμη Philly Sour™ (*Lachancea thermotolerans*)

Η Philly Sour (*Lachancea thermotolerans*) είναι μια εμπορική ζύμη που προορίζεται για χρήση στην παραγωγή μύρας. Έχει το χαρακτηριστικό να παράγει γαλακτικό οξύ, με αποτέλεσμα την παραγωγή μύρας με χαρακτηριστική ξινή γεύση.

Μέχρι στιγμής δεν υπάρχει κάποιο δημοσιευμένο άρθρο για χρήση της Philly Sour στην παραγωγή μύρας. Όμως, η εταιρεία Lallemand, από την οποία κυκλοφορεί εμπορικά η ζύμη Philly Sour έχει δημοσιεύσει στο διαδίκτυο βίντεο σχετικά με την χρήση και τα χαρακτηριστικά της Philly Sour. Οι σύνδεσμοι για τα βίντεο είναι:

- <https://www.youtube.com/watch?v=ERrI0ktxRp0&t=32s>
- <https://www.youtube.com/watch?v=g5OTdRKnNvo>.
- [https://www.youtube.com/watch?v=VBtHKe0Sw\\_A&t=2000s](https://www.youtube.com/watch?v=VBtHKe0Sw_A&t=2000s)
- <https://www.youtube.com/watch?v=jz-Rwwk0xKg>

Επιπρόσθετα, υπάρχουν πολλά ερασιτεχνικά βίντεο σχετικά με την χρήση της Philly Sour.

Επιπλέον στην παρακάτω ιστοσελίδα μπορούν να βρεθούν πληροφορίες σχετικά με τα αποτελέσματα ερασιτεχνικής παραγωγής μύρας με Philly Sour.

- <https://sui generis brewing.com/index.php/2021/02/12/diving-deep-in-to-philly-sour/>

Σύμφωνα με τις πληροφορίες που δίνουν τα παραπάνω βίντεο και η ιστοσελίδα, μπορούν να εξαχθούν κάποια συμπεράσματα σχετικά με τα χαρακτηριστικά της Philly Sour, την κινητική της ζύμωσης και τα χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος που θα παραχθεί. Τα συμπεράσματα είναι τα ακόλουθα:

- Η μείωση του pH πραγματοποιείται κατά τις πρώτες 2 – 4 ημέρες ζύμωσης
- Το pH στη μύρα κυμαίνεται από 3,2 – 3,5

- Η τελική ογκομετρούμενη οξύτητα κυμαίνεται από 3 – 8 g/L γαλακτικού οξέος
- Η μείωση της τιμής της πυκνότητας πραγματοποιείται σε 10 ημέρες ζύμωσης
- Ο βαθμός ζύμωσης κυμαίνεται από 70 – 85 % (η διακύμανση οφείλεται μάλλον στην πολύ δυνατή συσσωμάτωση (flocculation))
- Η Philly Sour έχει πολύ δυνατή συσσωμάτωση
- Η βέλτιστη θερμοκρασία ζύμωσης κυμαίνεται στο εύρος 22 – 27 °C
- Για καλύτερα αποτελέσματα, ο εμβολιασμός να γίνεται σε γλεύκος θερμοκρασίας 30 °C (ζεστό γλεύκος)
- Η βέλτιστη συγκέντρωση εμβολίου (pitching rate) είναι 1 – 1,5 g/L (μπορεί να ζυμώσει και με χαμηλότερη συγκέντρωση εμβολίου, αλλά μπορεί να μην μπορεί να παραχθεί αρκετή ποσότητα γαλακτικού οξέος)
- Δεν προτείνεται η επαναχρησιμοποίησή της
- Εάν γίνει επαναχρησιμοποίησή της, θα πρέπει να γίνει καταμέτρηση του πληθυσμού/ βιωσιμότητας
- Δεν πρέπει να γίνεται ταυτόχρονος εμβολιασμός στο γλεύκος με Philly Sour και κάποια άλλη ζύμη
- Εάν είναι επιθυμητό να εμβολιαστεί το γλεύκος με κάποια άλλη ζύμη, πρέπει να γίνει μετά από 4 – 5 ημέρες ζύμωσης του γλεύκους με την Philly Sour, δηλαδή να έχει πρώτα πραγματοποιηθεί η μείωση της τιμής του pH
- Δεν συνιστάται η χρήση της Philly Sour για τη ζύμωση στη φιάλη διότι η γλυκόζη θα μετατραπεί σε γαλακτικό οξύ, αιθανόλη και CO<sub>2</sub> κι έτσι είναι δύσκολο να υπολογιστεί η ποσότητα που θα παραχθεί από το καθένα από τα 3 αυτά προϊόντα
- Τα κύτταρα της Philly Sour έχουν πολύ μικρότερη βιωσιμότητα μετά την 10<sup>η</sup> ημέρα ζύμωσης, συγκριτικά με τα κύτταρα της εμπορικής ζύμης US-05 (*Saccharomyces cerevisiae*, Fermentis)
- Βοηθά στην προστασία από την οξειδωση
- Η Philly Sour δεν ζυμώνει την λακτόζη
- Ζυμώνει τη σουκρόζη
- Δεν ζυμώνει περισσότερο από ότι πρέπει (overattunate)
- Πιο ευαίσθητη στην πίεση, συγκριτικά με άλλες ζύμες
- Χρειάζεται καλή οξυγόνωση, 3 L/λεπτό (oxygenation standard)
- Η προσθήκη γλυκόζης μπορεί να επηρεάσει το οργανοληπτικό προφίλ (flavor)

- Περισσότερη περιεκτικότητα σε γλυκόζη, οδηγεί σε μεγαλύτερη παραγωγή γαλακτικού οξέος
- Εάν το προς ζύμωση γλεύκος περιέχει σε μεγάλη συγκέντρωση δεξτρίνες, τότε θα υπάρχει μικρότερη παραγωγή γαλακτικού οξέος
- Η φάση προσαρμογής, ο συνολικός χρόνος ζύμωσης, ο βαθμός ζύμωσης και το οργανοληπτικό προφίλ εξαρτώνται από τη συγκέντρωση εμβολίου, τον χειρισμό της ζύμης, τη θερμοκρασία ζύμωσης και τη σύσταση του γλεύκους
- Έχει αντοχή σε αλκοόλη έως και 9 % v/v
- Η Philly Sour είναι POF
- Ο χρόνος προσθήκης φρούτων επηρεάζει την ποσότητα του γαλακτικού οξέος που θα παραχθεί
- Η Philly Sour είναι καλή για χρήση στην παραγωγή μύρας τύπου Berliner Weisse, Gose, lambic-style, American Wild και Sour IPA
- Η Philly Sour είναι καλή για χρήση στην παραγωγή υδρόμελου και μηλίτη
- Η χρήση της Philly Sour στην παραγωγή μύρας τύπου IPA, προσδίδει νότες ροδάκινου
- Η Philly Sour δίνει στη μύρα αρώματα «ξινού», κόκκινου μήλου, stone fruit και ροδάκινου



## 2.4 Η *Lachancea thermotolerans* στο εμπόριο

Στο εμπόριο κυκλοφορούν στελέχη *Lachancea thermotolerans*, εκ των οποίων τα περισσότερα προορίζονται για χρήση στην οινοποίηση. Στον παρακάτω πίνακα, παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα στελέχη αυτά, με την εμπορική και ταξινομική τους ονομασία που δίνουν οι εταιρείες, καθώς και την εταιρεία παραγωγής ή/και πώλησής τους.

Πίνακας 2.4.A: Εμπορικά στελέχη *Lachancea thermotolerans* για χρήση στην οινοποίηση

Εταιρεία	Εμπορική ονομασία	Ταξινομική ονομασία	Ιστοσελίδα
Lallemand	LEVEL2 LAKTIA™	<i>Lachancea thermotolerans</i>	<a href="https://www.lallemandwine.com/en/central-europe/products/catalogue/wine-yeasts/109/level2-laktia/">https://www.lallemandwine.com/en/central-europe/products/catalogue/wine-yeasts/109/level2-laktia/</a>
LAFFORT	ZYMAFLORE ® OMEGA <sup>LT</sup>	<i>Lachancea thermotolerans</i>	<a href="https://laffort.com/en/bioacidification/">https://laffort.com/en/bioacidification/</a>
CHR. Hansen	CONCERTO™	<i>Lachancea thermotolerans</i>	<a href="https://www.chr-hansen.com/en/food-cultures-and-enzymes/fermented-beverages/cards/product-cards/concerto">https://www.chr-hansen.com/en/food-cultures-and-enzymes/fermented-beverages/cards/product-cards/concerto</a>
CHR. Hansen	OCTAVE	<i>Lachancea thermotolerans</i>	<a href="https://www.chr-hansen.com/en/food-cultures-and-enzymes/fermented-beverages/cards/product-cards/octave">https://www.chr-hansen.com/en/food-cultures-and-enzymes/fermented-beverages/cards/product-cards/octave</a>
The Australian Wine Research Institute (awri)	AWRI 861	<i>Lachancea thermotolerans</i>	<a href="https://www.awri.com.au/research_and_development/wine-microorganism/winemaking-yeast-and-bacterial-strains/">https://www.awri.com.au/research_and_development/wine-microorganism/winemaking-yeast-and-bacterial-strains/</a>
AEB	LEVULIA® ALCOMENO	<i>Lachancea thermotolerans</i>	<a href="https://www.aeb-group.com/us/levulia-alcomeno-11428">https://www.aeb-group.com/us/levulia-alcomeno-11428</a>
Angel	CVE-7	<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>	<a href="https://en.angelyeast.com/products/distilled-spirits-and-biofuels/wine/wine-yeast-cve-7.html">https://en.angelyeast.com/products/distilled-spirits-and-biofuels/wine/wine-yeast-cve-7.html</a>
LAMOTHE-ABIET	EXCELLENCE ® X-FRESH	<i>Lachancea thermotolerans</i>	<a href="https://lamothe-abiet.com/en/yeasts/excellence-x-fresh/">https://lamothe-abiet.com/en/yeasts/excellence-x-fresh/</a>
ENOLOGICA VASON	VIW® SHIELD LT	<i>Lachancea thermotolerans</i>	<a href="https://www.vason.com/index.cfm/en/products/lieviti-viw-shield-lt-288/">https://www.vason.com/index.cfm/en/products/lieviti-viw-shield-lt-288/</a>

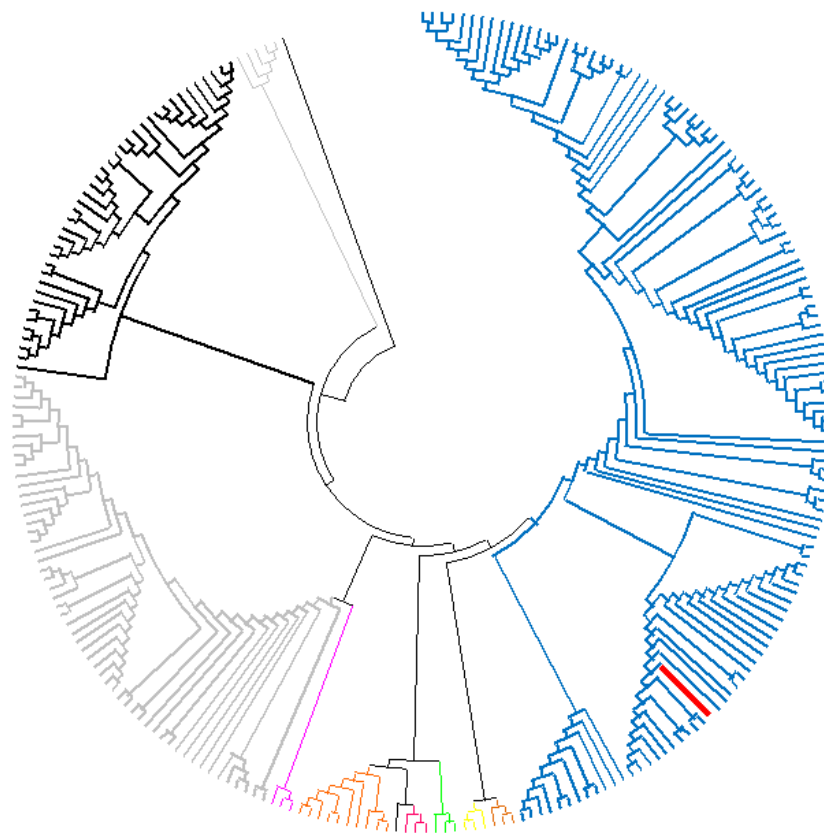
Πίνακας 2.4.Β: Εμπορικά στελέχη *Lachancea thermotolerans* για χρήση στη ζυθοποίηση

Εταιρεία	Εμπορική ονομασία	Ταξινόμική ονομασία	Ιστοσελίδα
Lallemand	WILDBREW PHILLY SOUR™	<i>Lachancea thermotolerans</i>	<a href="https://www.lallemantbrewing.com/en/canada/product-details/wildbrew-philly-sour/">https://www.lallemantbrewing.com/en/canada/product-details/wildbrew-philly-sour/</a>
Escarpment laboratories	Lactic Magic	<i>Lachancea thermotolerans</i>	<a href="https://escarpmentlabs.com/collections/newcomers/products/lactic-magic">https://escarpmentlabs.com/collections/newcomers/products/lactic-magic</a>
Lachancea	LACHANCEA LLC.	<i>Lachancea thermotolerans</i>	<a href="https://lachancea.com/yeast">https://lachancea.com/yeast</a>
Propagate Lab	Lachancea Thermotolerans YH-72	<i>Lachancea thermotolerans</i>	<a href="https://propagatelab.com/product/lachancea-thermotolerans-3/">https://propagatelab.com/product/lachancea-thermotolerans-3/</a>
AEB	FERMO Brew Acid	<i>Lachancea thermotolerans</i>	<a href="https://www.aeb-group.com/en/fermo-brew-acid-17711">https://www.aeb-group.com/en/fermo-brew-acid-17711</a>
White Labs	Berkeley Hills Sour Yeast Blend WLP4663	<i>Lachancea thermotolerans</i> strains	<a href="https://www.whitelabs.com/yeast-single?id=306&amp;type=YEAST">https://www.whitelabs.com/yeast-single?id=306&amp;type=YEAST</a>

Μέχρι στιγμής υπάρχουν 2 πατέντες σχετικές με την παραγωγή μύρας, οι οποίες αναφέρουν και τη χρήση στελεχών *Lachancea thermotolerans*. Η πρώτη πατέντα με αριθμό WO2016187021A1 αφορά μεταξύ άλλων στην παραγωγή ποτών, συμπεριλαμβανομένης και μύρας, με στέλεχος *Lachancea thermotolerans* [το οποίο χρησιμοποιήθηκε από την Svensen (2015)] και κυκλοφορεί εμπορικά από την εταιρεία Lachancea LLC. Η πατέντα, κατοχυρώθηκε στους Sheppard et al., (2016). Η δεύτερη πατέντα με αριθμό WO 2019/018803 A1, αφορά στην παραγωγή ξινής μύρας χωρίς τη χρήση γαλακτικών βακτηρίων, αλλά μόνο με την χρήση στελέχους *Lachancea thermotolerans*, το οποίο κυκλοφορεί ως εμπορική ζύμη Wildbrew Philly Sour™, από την εταιρεία Lallemand. Η πατέντα έχει κατοχυρωθεί στον Farber (2019).

Έχει υπάρξει μια συζήτηση με αφορμή την δεύτερη πατέντα, που αφορά την εμπορική ζύμη Philly Sour (<https://sui generisbrewing.com/index.php/2020/12/08/lachancea-patent-wars/>). Ο Matthew J. Farber, στην πατέντα, ισχυρίζεται ότι πρόκειται για “ένα νέο στέλεχος ζύμης, με όνομα GY7B, το οποίο σχετίζεται, αλλά είναι γενετικά και φαινοτυπικά διαφορετικό από τη *Lachancea thermotolerans*”. Σύμφωνα όμως με μια άποψη, το συγκεκριμένο στέλεχος δεν μπορεί να πατενταριστεί, διότι έχει απομονωθεί

από την φύση και ανήκει στο είδος *Lachancea thermotolerans*. Πιο συγκεκριμένα, ο αρθρογράφος του ιστοτόπου <https://suigenerisbrewing.com/index.php/2020/12/08/lachancea-patent-wars/>, χρησιμοποιώντας μια μεγάλη βάση δεδομένων, πραγματοποίησε δική του έρευνα και έδειξε ότι το συγκεκριμένο στέλεχος (GY7B) είναι σε πολύ μεγάλο βαθμό ενσωματωμένο μέσα στον κλάδο της *Lachancea thermotolerans*, μέσα σε έναν μεγάλο υποκλάδο στενά συγγενών στελεχών (σχήμα 2.4.A) Επιπλέον, έδειξε ότι όχι μόνο φυλογενετικά, αλλά και βιοχημικά το στέλεχος GY7B, ανήκει στο είδος *Lachancea thermotolerans*.



Σχήμα 2.4.A: Φυλογενετικό δέντρο, *L. thermotolerans* (μπλε), *L. nothofagi* (καφέ), *L. walitii* (κίτρινο), *L. dasiensis* (πράσινο), *L. lanzarotensis* (ροζ), *L. meyersii* (πορτοκαλί), *L. mirantina* (μωβ), *L. kluyveri* (σκούρο γκρι), *L. fermentati* (έντονο μαύρο), *L. cidri* (ανοιχτό γκρι). Συγκεχυμένα είδη παρουσιάζονται με λεπτές μαύρες γραμμές. Το στέλεχος GY7B απεικονίζεται με κόκκινο χρώμα, πηγή: <https://suigenerisbrewing.com/index.php/2020/12/08/lachancea-patent-wars/>

Θέτει ως επιχειρήματα για την αμφισβήτηση της ισχύος της πατέντας, τα αποτελέσματα της παραπάνω δικής του έρευνας και επιπρόσθετα τον ισχυρισμό ότι ο Matthew J. Farber, επέλεξε σκόπιμα το στέλεχος CBS 6340 (*Lachancea thermotolerans*, απομονωμένο στη Ρωσία) ως στέλεχος σύγκρισης, ώστε να μεγιστοποιηθούν οι διαφορές ανάμεσα στα στελέχη CBS 6340 και GY7B, προς διευκόλυνση εδραίωσης του ισχυρισμού ότι το στέλεχος GY7B είναι ένα άγριο στέλεχος που σχετίζεται, αλλά δεν ανήκει στο είδος *Lachancea thermotolerans*.

Από την άλλη πλευρά, θα μπορούσε κάποιος να ισχυριστεί ότι σύμφωνα με τον τίτλο των πατεντών, αυτό που πατεντάρεται δεν είναι ο μικροοργανισμός, αλλά η διαδικασία / μέθοδος παρασκευής κάποιων προϊόντων, όπως ξινή μύρα ή ποτών, στην οποία διαδικασία συμπεριλαμβάνεται και ο μικροοργανισμός.

## 2.5 Ακίνητοποίηση κυττάρων μικροοργανισμών

### 2.5.1 Μέθοδοι/τεχνικές ακίνητοποίησης μικροοργανισμών

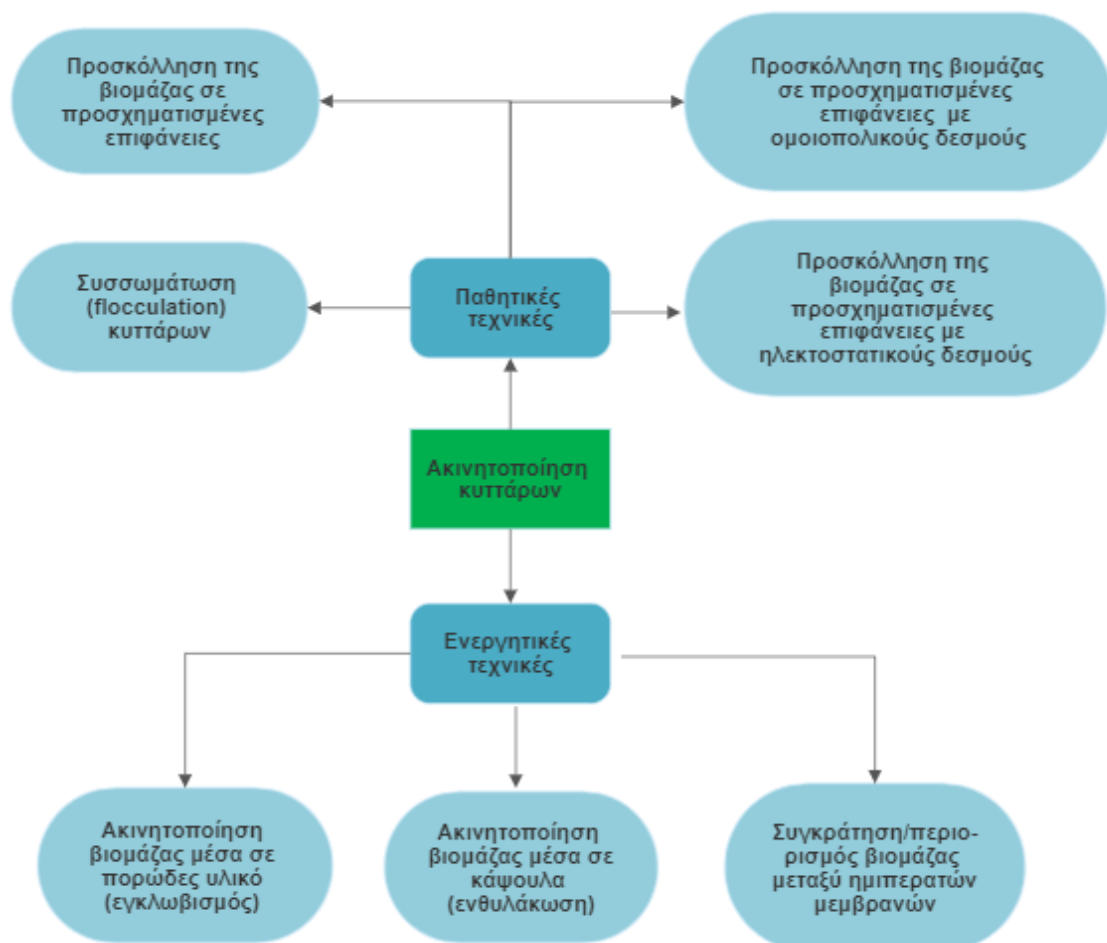
Η τεχνική της ακίνητοποίησης μπορεί να εφαρμοστεί σε ολόκληρα κύτταρα μικροοργανισμών, σε κύτταρα ζωικής και φυτικής προέλευσης, καθώς και σε ένζυμα ή κυτταρικά οργανίδια (Peinado et al., 2006). Στην ζυθοποίηση, ακίνητοποιούνται σε ένα σύστημα, ακέραια κύτταρα ζυμών. Ένας ορισμός για την ακίνητοποίηση ολόκληρων κυττάρων, δόθηκε από τους Karel et al., (1985) και ορίζει ότι: “ Η ακίνητοποίηση ολόκληρων κυττάρων είναι ο φυσικός περιορισμός ή τοπικοποίηση ακέραιων κυττάρων σε μια συγκεκριμένη και οριοθετημένη περιοχή του χώρου με τη διατήρηση κάποιων επιθυμητών καταλυτικών δραστηριοτήτων” (του κυττάρου). Κατά την ακίνητοποίηση, πρέπει να διατηρείται η μεταβολική δραστηριότητα των κυττάρων, καθώς και η βιωσιμότητα και ζωτικότητα τους (Araujo et al., 2021).

Η ακίνητοποίηση των κυττάρων πραγματοποιείται με φυσικά ή χημικά μέσα (Araujo et al., 2021). Ένα σύστημα ακίνητοποίησης αποτελείται από τρία μέρη: την βιομάζα, τον φορέα υποστήριξης (matrix), ο οποίος συνήθως είναι σταθερός αλλά μπορεί να είναι και με τη μορφή τζελ και το υλικό το οποίο πληρώνει τον χώρο μεταξύ της βιομάζας και του φορέα υποστήριξης (Araujo et al., 2021; Karel et al., 1985).

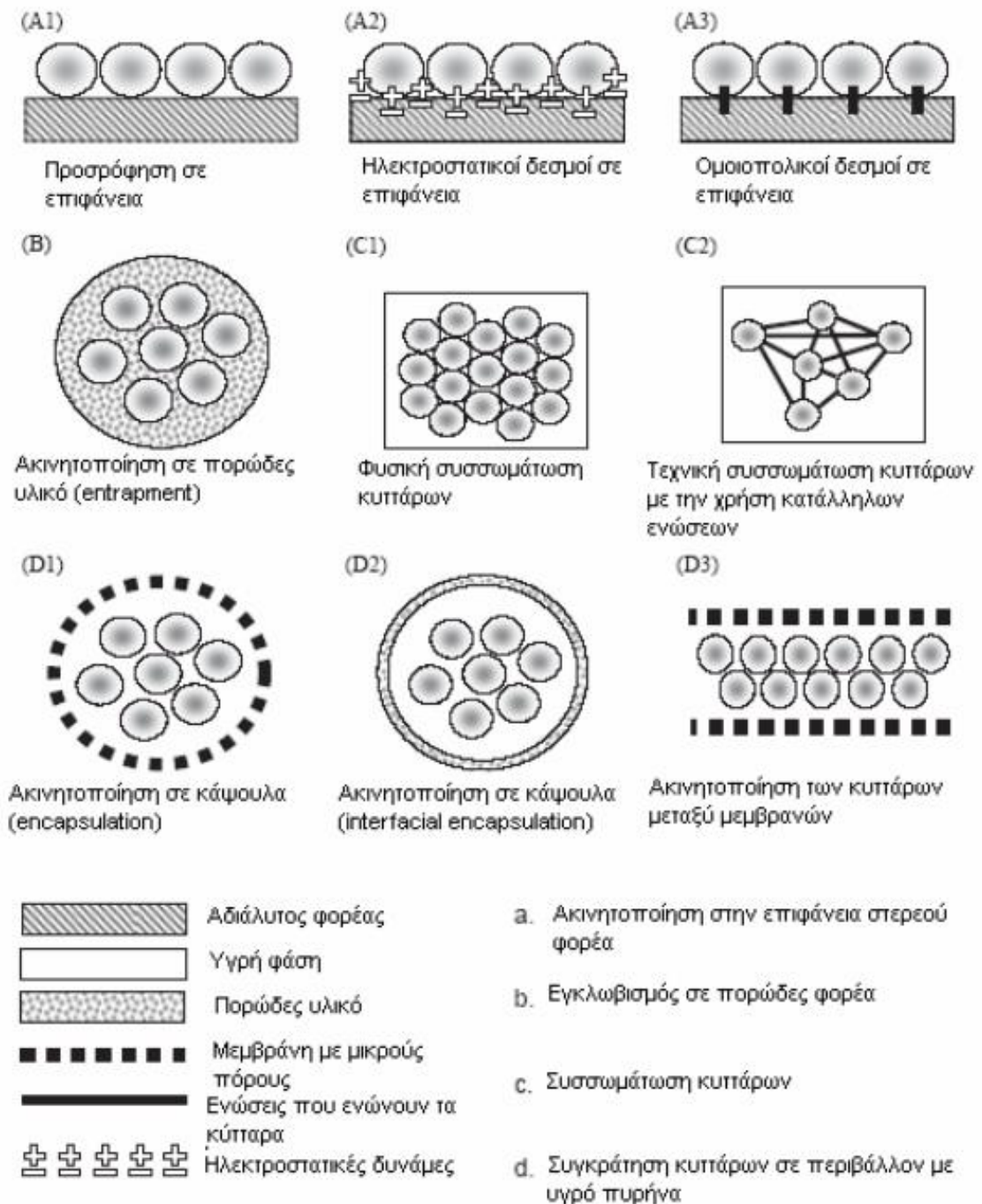
Η ακίνητοποίηση μπορεί να χωριστεί στην ενεργητική και παθητική ακίνητοποίηση. Στην ενεργητική ακίνητοποίηση τα κύτταρα του μικροοργανισμού ακίνητοποιούνται με επεξεργασία του μικροοργανισμού ή του υποστρώματος, συνήθως με την προσθήκη κάποιας χημικής ουσίας. Στην παθητική ακίνητοποίηση, τα κύτταρα του μικροοργανισμού σχηματίζουν μεταξύ τους συσσωματώματα με φυσικό τρόπο, χωρίς ανθρώπινη παρέμβαση και υπάρχει η περίπτωση σχηματισμού βιοφίλμ στην επιφάνεια ή στο εσωτερικού ενός υλικού (Black et al., 1984; Masschelein et al., 1994).

Οι μέθοδοι ακινητοποίησης των κυττάρων, μπορούν να χωριστούν σε 4 γενικές κατηγορίες με βάση τον μηχανισμό με τον οποίο επιτυγχάνεται η ακινητοποίηση. Αυτές είναι:

- i. Ακινητοποίηση με προσκόλληση της βιομάζας στην επιφάνεια ενός σταθερού φορέα
- ii. Ακινητοποίηση μέσα σε ένα πορώδες υλικό (entrapment)
- iii. Ακινητοποίηση της βιομάζας με περιορισμό/συγκράτηση αυτής μεταξύ ημιπερατών μεμβρανών
- iv. Ακινητοποίηση σε συμπλέγματα κυττάρων (cell-flocculation/cell-aggregation) (Karel et al., 1985)



Σχήμα 2.5.1.Α: Μέθοδοι ακινητοποίησης κυττάρων μικροοργανισμών



Εικόνα 2.5.1.Α: Μέθοδοι ακίνητοποίησης κυττάρων μικροοργανισμών, τροποποιημένη εικόνα από Kourkoutas et al., (2004)

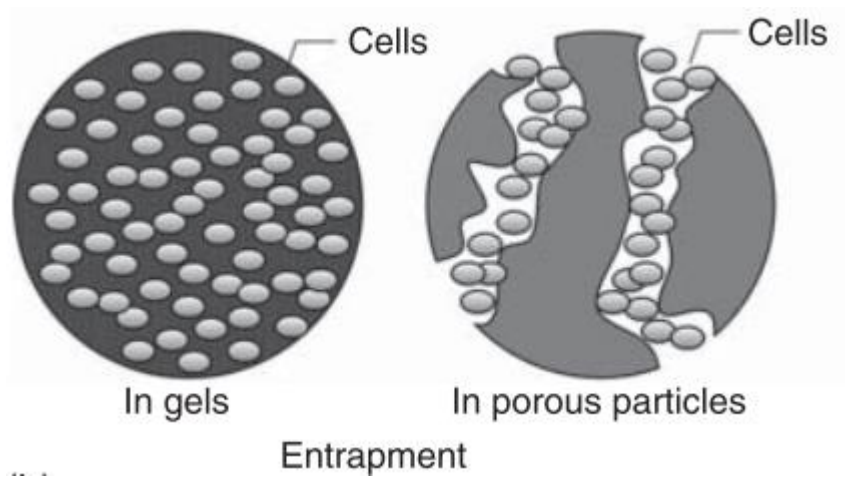
### ***2.5.1.1 Ακίνητοποίηση με προσκόλληση της βιομάζας στην επιφάνεια ενός σταθερού φορέα***

Σε αυτή την περίπτωση, τα κύτταρα του μικροοργανισμού προσκολλώνται σε μια σταθερή επιφάνεια ενός φορέα, μέσω ηλεκτροστατικών δυνάμεων ή με ομοιοπολικούς δεσμούς, ή σχηματίζοντας ένα βιοφίλμ. Οι φορείς μπορεί να είναι διεθυλαμινοεθλοκυτταρίνη (DEAE), ξύλο, πορώδες πορσελάνη ή γυαλί, μέχρι πριονίδι και αποξηραμένα φρούτα. Αυτή η μέθοδος είναι πολύ ευαίσθητη στις περιβαλλοντικές συνθήκες και υπάρχει αυξημένος κίνδυνος αποκόλλησης του βιοφίλμ από τον φορέα. Δεν προτείνεται για εφαρμογή στην περίπτωση που απαιτείται ένα υπόστρωμα εντελώς απαλλαγμένο από κύτταρα (Araujo et al., 2021). Εικόνα 2.5.1.A (A1, A2, A3).

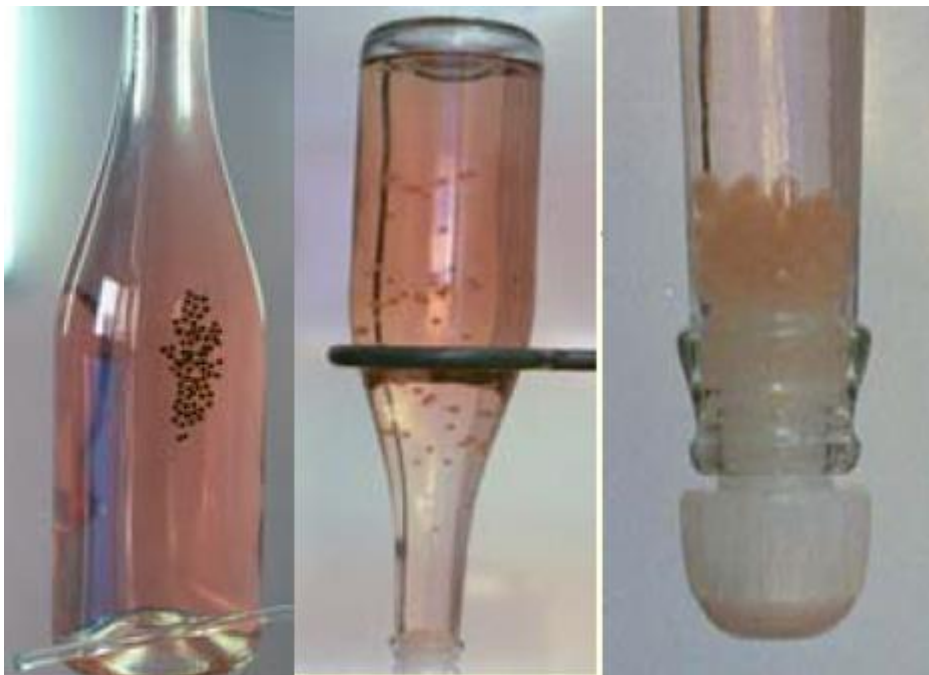
### ***2.5.1.2 Ακίνητοποίηση μέσα σε ένα πορώδες υλικό (entrapment)***

Αυτή η μέθοδος ακίνητοποίησης έχει μελετηθεί περισσότερο για την εφαρμογή της στη ζυθοποίηση. Περιλαμβάνει τον φυσικό περιορισμό των κυττάρων μέσα σε μια φυσική δομή, όπως μέσα σε έναν πορώδες φυσικό φορέα ή σε πολυμερικές γέλες (τζελ). Στην πρώτη περίπτωση, ποσότητα βιομάζας “εμβολιάζεται” σε ένα πορώδες υλικό, το οποίο αποτελεί τον φυσικό φορέα. Καθώς τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται, προσκολλώνται στην επιφάνεια του φορέα αλλά και μεταξύ τους, με αποτέλεσμα να γεμίσουν το κενό που υπάρχει εντός των πόρων και να ακίνητοποιηθούν με αυτόν τον φυσικό τρόπο. Στην δεύτερη περίπτωση, η ακίνητοποίηση επιτυγχάνεται με τον πολυμερισμό υλικού στο οποίο περιέχεται μια ποσότητα βιομάζας, όπως στην περίπτωση χρήσης πολυσακχαρικών γελών, όπως αλγινικών, κ-καραγεννάνης και χιτοσάνης. Τα κύτταρα τα οποία βρίσκονται στην επιφάνεια του φορέα θα δώσουν θυγατρικά κύτταρα τα οποία θα απελευθερωθούν στο υγρό. Ένα από τα προβλήματα που παρουσιάζει η συγκεκριμένη μέθοδος, είναι ότι αν η συγκέντρωση βιομάζας ξεπεράσει τα όρια χωρητικότητας του φορέα, τότε μέρος της βιομάζας θα ελευθερωθεί στο υπόστρωμα. Το πρόβλημα αυτό μπορεί να αντιμετωπιστεί με διπλή ακίνητοποίηση, δηλαδή με διπλή εξωτερική στρώση του φορέα χωρίς κύτταρα (Tataridis et al., 2005). Άλλα μειονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι ότι είναι δύσκολο να εφαρμοστεί σε μεγάλη κλίμακα και το μικροπεριβάλλον που δημιουργείται εντός των πόρων ή των σωματιδίων γέλης επηρεάζουν το κύτταρο (Araujo et al., 2021) , όπως π.χ. μειωμένη διαπερατότητα/διαλυτότητα οξυγόνου και άλλων μεταβολιτών.





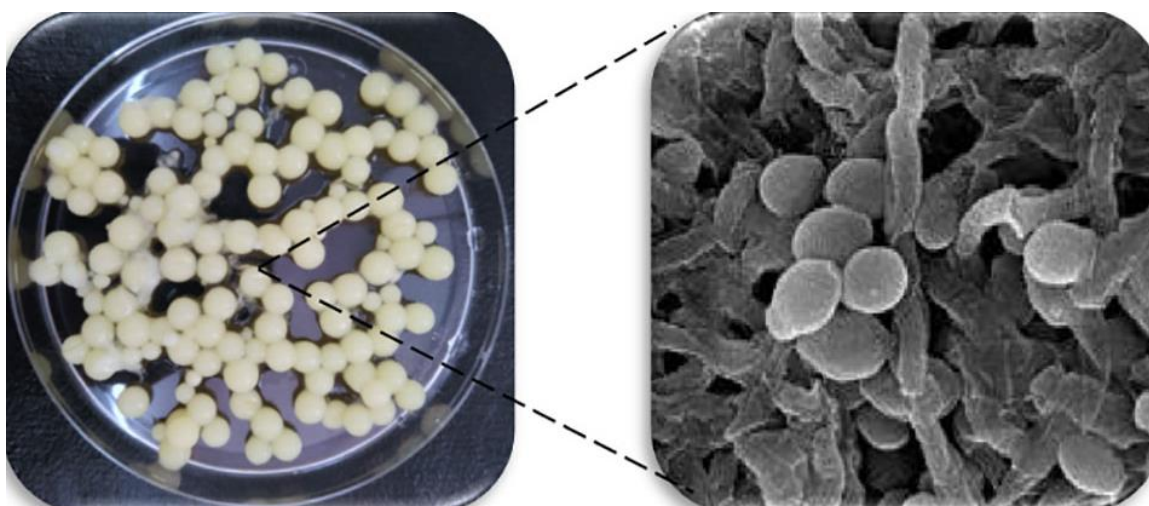
Εικόνα 2.5.1.2.Α: Ακίνητοποίηση κυττάρων μέσα σε πορώδες υλικό, πηγή: Ge et al., (2017)



Εικόνα 2.5.1.2.Β: Σφαιρίδια ακίνητοποιημένης ζύμης για την παραγωγή αφρώδους οίνου, πηγή: Tataridis et al., 2005



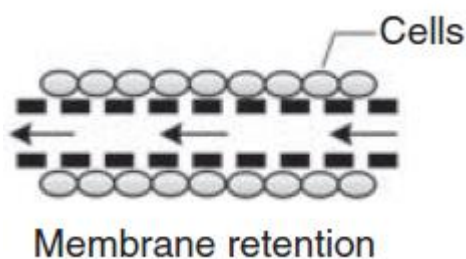
Εικόνα 2.5.1.2.Γ: Σφαιρίδιο ακίνητοποιημένης ζύμης με μονή (αριστερά) και διπλή (δεξιά) ακίνητοποίηση, πηγή: Karaklis et al., (2005)



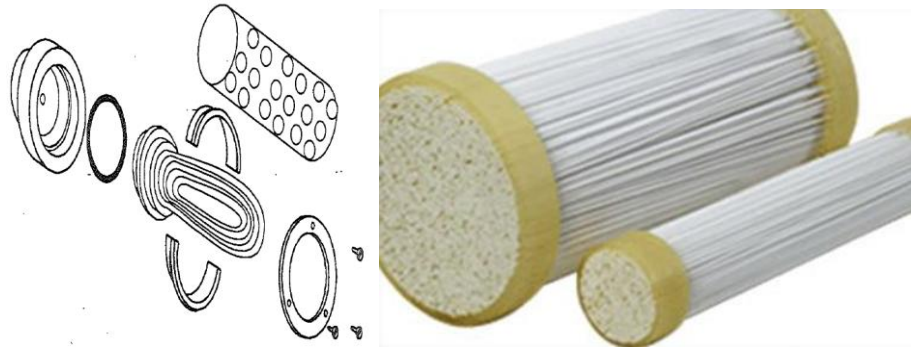
Εικόνα 2.5.1.2.Α: Σφαιρίδια ακινητοποιημένης ζύμης (αριστερά) και τμήμα του εσωτερικού του σφαιριδίου (δεξιά), πηγή: Moreno-García et al., (2018)

### 2.5.1.3 Ακινητοποίηση της βιομάζας με περιορισμό/συγκράτηση αυτής μεταξύ ημιπερατών μεμβρανών

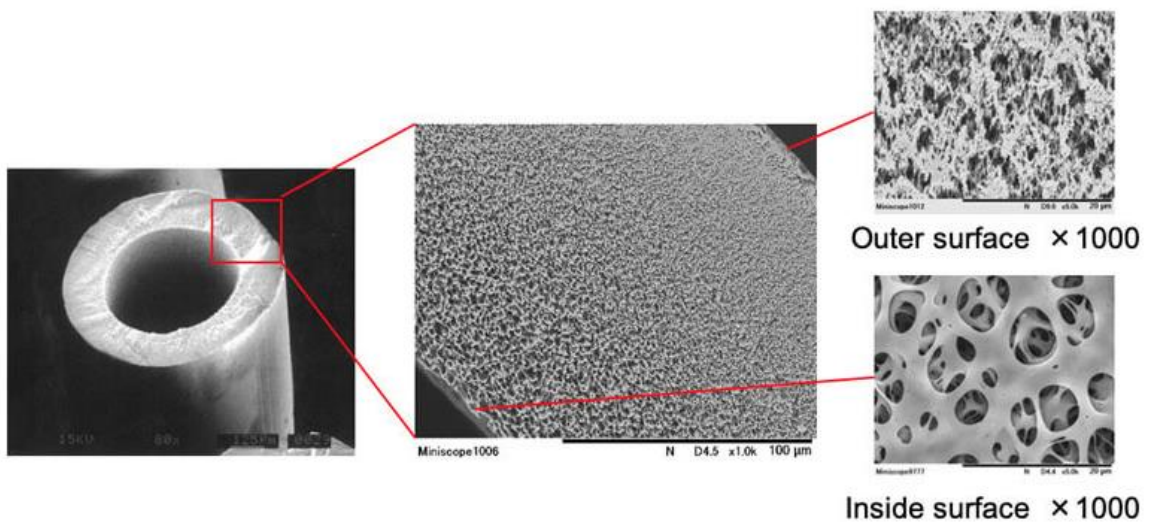
Σε αυτή την μέθοδο η βιομάζα περιορίζεται μεταξύ ημιπερατών μεμβρανών ή μεταξύ δύο μη αναμειξιμων υγρών. Με αυτόν τον τρόπο, η βιομάζα συγκρατείται μεταξύ αυτών των “φραγμών” και δεν διαφεύγει στο υπόστρωμα. Από την άλλη πλευρά, οι ουσίες που υπάρχουν στο υπόστρωμα, καθώς και τα προϊόντα μεταβολισμού των κυττάρων μπορούν να διαπεράσουν τα “φράγματα”. Ένα μεγάλο πρόβλημα για αυτό το σύστημα, είναι ότι μπορεί εύκολα να φράξει λόγω της υπερφόρτωσης βιομάζας και να σταματήσει η ανταλλαγή ουσιών μεταξύ του συστήματος αυτού (Araujo et al., 2021).



Εικόνα 2.5.1.3.Α: Ακινητοποίηση κυττάρων με συγκράτηση στο εξωτερικό ημιπερατών μεμβρανών πηγή: Ge et al., (2017)



**Εικόνα 2.5.1.3.Β: Μεμβράνες κοίλων ινών (hollow fibers), πηγή: Tataridis (2001) & Vandekar (2015)**



**Εικόνα 2.5.1.3.Γ: Μεμβράνες κοίλων ινών (hollow fibers) με πόρους διαμέτρου 0,45 μm, πηγή: <https://yms.gs-yuasa.com/en/technology/about/fiber/>**



Εικόνα 2.5.1.3.Δ: μεμβράνες διαπίδυσης (dialysis membranes) πηγή:

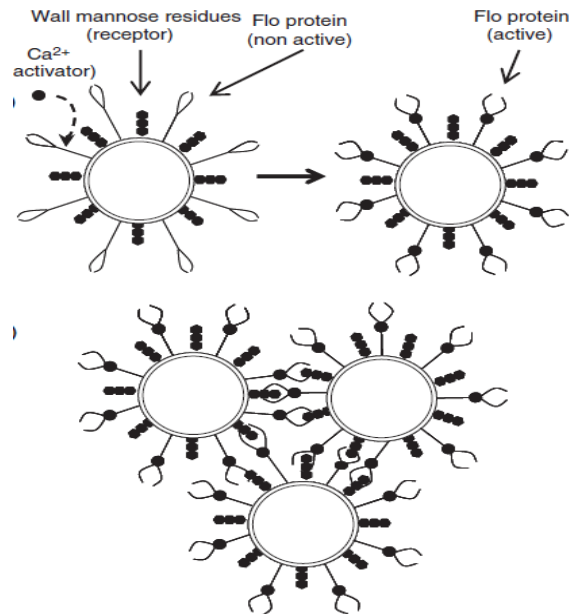
<https://www.fishersci.ie/shop/products/spectra-por-6-pre-wetted-dialysis-tubing-1/11455889>

#### 2.5.1.4 Ακινητοποίηση σε συμπλέγματα κυττάρων (*cell-flocculation/cell-aggregation*)

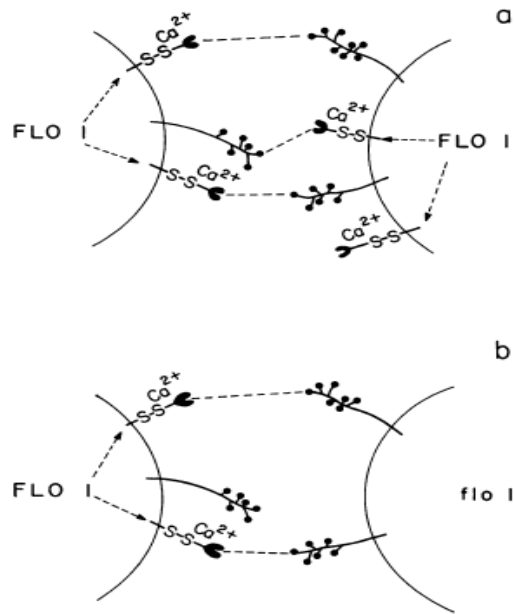
Αυτή η μέθοδος σχετίζεται με το φαινόμενο της συσσωμάτωσης (*flocculation*) μεταξύ των κυττάρων, κατά το οποίο τα κύτταρα ζυμών (ή βακτηρίων, αλλά και μυκήτων), ενώνονται μεταξύ τους. Έχει αποδειχθεί ότι υπεύθυνα για τη συσσωμάτωση είναι κάποια γονίδια, τα οποία ονομάστηκαν *FLO genes* (Jin & Speers, 1998). Τα *FLO genes* αποκωδικοποιούν πρωτεΐνες, οι οποίες σχετίζονται με την συγκόλληση και τη συσσωμάτωση των κυττάρων (Pires & Brányik, 2015b). Μέχρι στιγμής στον *S. cerevisiae* και *S.pastorianus* έχουν ανακαλυφθεί τα παρακάτω *FLO* γονίδια: *FLO1*, *FLO5*, *FLO8*, *FLO9*, *FLO10*, *FLO11*, *FLONL*, *FLONS*, *LgFLO*. Οι δύο κυρίαρχοι φαινότυποι είναι ο *Flo1* και ο *NewFlo* (Stewart, 2017a).

Οι πρωτεΐνες που συνδέονται με το φαινόμενο της συσσωμάτωσης (ονομάζονται επίσης και φλοκουλίνες/*floculines*) είναι οι λεκτίνες, οι οποίες βρίσκονται στα κυτταρικά τοιχώματα των ζυμών. Οι λεκτίνες ενώνονται με την μαννόζη που υπάρχει στο κυτταρικό τοίχωμα των γειτονικών κυττάρων ζύμης (σχήματα 2.5.1.4.A, 2.5.1.4.B και

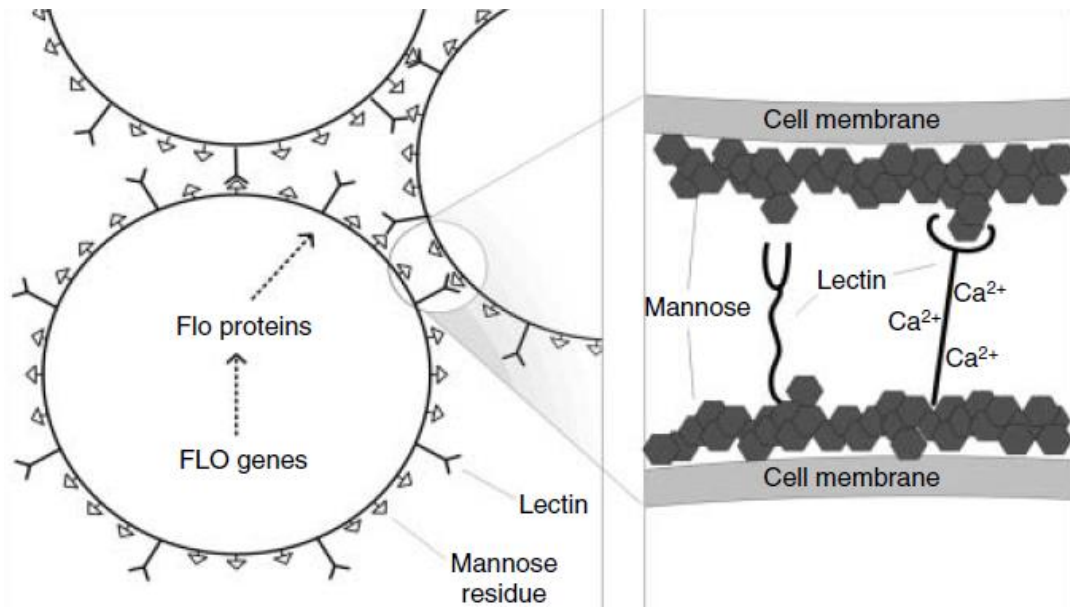
2.5.1.4.Γ). Αυτή η αλυσιδωτή αντίδραση μεταξύ των κυττάρων, έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό μεγάλων συμπλεγμάτων κυττάρων ζύμης. Η μαννόζη στα κυτταρικά τοιχώματα λειτουργεί ως υποδοχέας των λεκτινοπρωτεϊνών (Miki et al., 1982; Pires & Brányik, 2015b; Stewart, 2017a). Οι λεκτινοπρωτεΐνες απαντώνται στα κυτταρικά τοιχώματα μόνο των flocculent στελεχών (κύτταρα τα οποία δημιουργούν συσσωματώματα μεταξύ τους), ενώ οι υποδοχείς, δηλαδή τα μόρια μαννόζης, βρίσκονται τόσο σε flocculent όσο και σε non-flocculent στελέχη (κύτταρα τα οποία δεν δημιουργούν συσσωματώματα μεταξύ τους), αφού είναι μέρος της δομής του κυτταρικού τοιχώματος του *S.cerevisiae* (Stewart, 2017a).



Σχήμα 2.5.1.4.A: Μηχανισμός συσσωμάτωσης (flocculation) κυττάρων ζυμών, πηγή: Soares ( 2011)



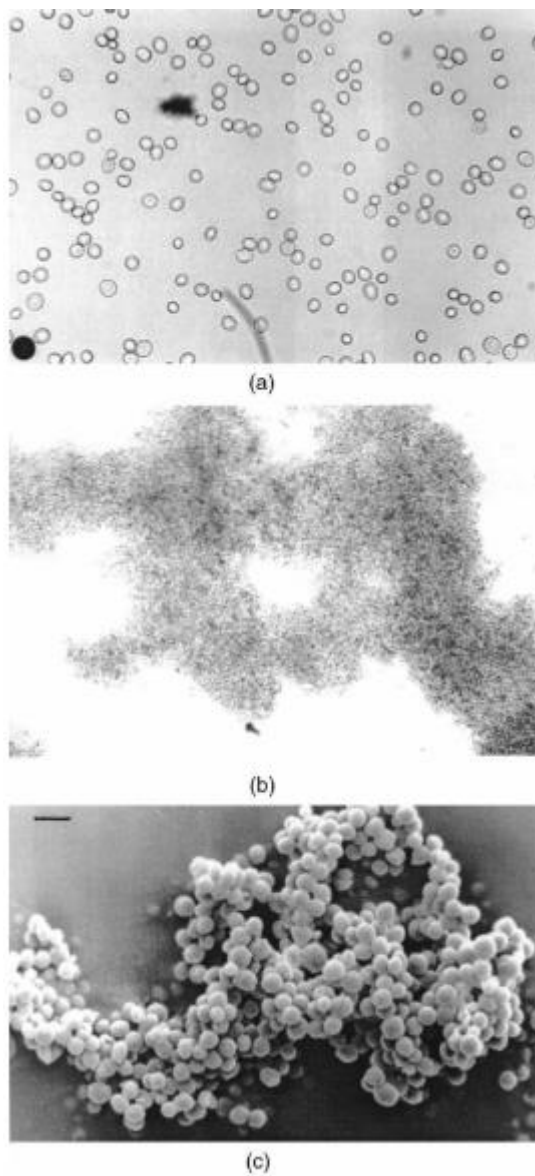
Σχήμα 2.5.1.4.Β: Μηχανισμός συσσωμάτωσης (flocculation) κυττάρων ζυμών, πηγή: Miki et al., (1982)



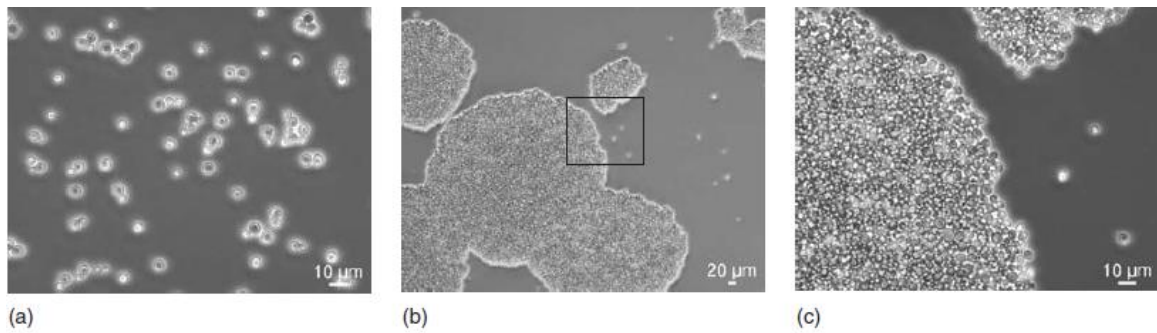
Σχήμα 2.5.1.4.Γ: Μηχανισμός συσσωμάτωσης (flocculation) κυττάρων ζυμών, πηγή: Ge et al., (2017)



Εικόνα 2.5.1.4.A: Floculent (αριστερά) και non-floculent (δεξιά) κύτταρα ζύμης, πηγή: Ge et al., (2017)



Εικόνα 2.5.1.4.B: a) Non-floculent κύτταρα *S. cerevisiae*, b) και c) floculent κύτταρα *S. cerevisiae*, πηγή: Domingues et al., (2000)



Εικόνα 2.5.1.4.Γ: a) Non-flocculent κύτταρα *S. cerevisiae*, b) flocculent κύτταρα *S. cerevisiae* c) λεπτομέρεια της φωτογραφίας (b), πηγή: Soares (2011)

### 2.5.1.5 Ακίνητοποίηση σε συμπλέγματα κυττάρων μεταξύ κυττάρων διαφορετικών ειδών, γενών και μικροοργανισμών (co-flocculation)

Το co-flocculation είναι ένας τύπος συσσωμάτωσης ανάμεσα σε δύο διαφορετικά στελέχη ζυμών. Το ένα στέλεχος μπορεί να είναι non-flocculent και το άλλο να έχει πάρα πολύ μικρό flocculent χαρακτήρα. Αυτά τα δύο στελέχη όταν βρίσκονται ξεχωριστά είναι non-flocculent, αλλά όταν βρεθούν στο ίδιο υπόστρωμα, δημιουργούν συσσωματώματα. Το φαινόμενο αυτό έχει παρατηρηθεί μεταξύ στελεχών *S. cerevisiae*, αλλά όχι μεταξύ *S. pastorianus* (Stewart, 2017a).

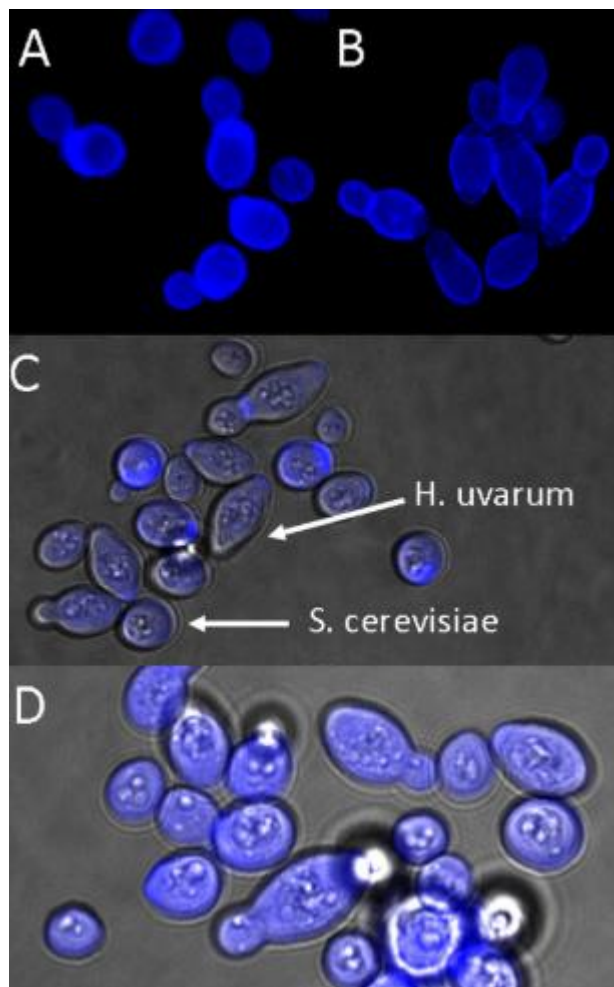
Επίσης, άλλος ένας τύπος co-flocculation είναι μεταξύ κυττάρων ζύμης (*Saccharomyces* και non-*Saccharomyces*) και βακτηρίων (Peng, et al., 2001, 2001a, 2001b). Τα αποτελέσματα των παραπάνω ερευνών, δείχνουν την μεγάλη σημασία που έχει η δομική σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος της ζύμης ή του βακτηρίου.

Παρατηρείται, η ύπαρξη (ή/και συνύπαρξη) λεκτινοπρωτεϊνών που έχουν διαφορετικές “προτιμήσεις” πρόσδεσης σε σάκχαρα, όπως την μαννόζη, την γαλακτόζη και άλλα σάκχαρα. Για παράδειγμα, αν οι λεκτινοπρωτεΐνες προσδέονται ειδικά με το σάκχαρο μαννόζη του κυτταρικού τοιχώματος του γειτονικού μικροοργανισμού, σημαίνει πως αν στο κυτταρικό τοίχωμα κάποιου μικροοργανισμού υπάρχει γαλακτόζη, τότε δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί το co-flocculation.



Ακόμη ένας τύπος co-flocculation είναι μεταξύ στελεχών *Saccharomyces* και non-*Saccharomyces* (Rossouw et al., 2015; Saito et al., 1990; Sosa et al., 2008; Stratford & Pearson, 1992; Tofalo et al., 2010), με αρκετές μελέτες να έχουν γίνει σχετικά με το co-flocculation σε είδη *Kluyveromyces* spp. (Bellal et al., 1995; Bilanz et al., 1996; Coulon et al., 2007; El-Behhari et al., 2000; Fernandes et al., 1993; Géhin et al., 2001; Hussain et al., 1986; Sousa et al., 1992).

Οι Rossouw et al., (2015) έδειξαν ότι non-*Saccharomyces* στελέχη μπορούν να πραγματοποιήσουν co-flocculation με flocculent και non-flocculent στελέχη *Saccharomyces cerevisiae*. Επιπλέον έδειξαν ότι διαφορετικά FLO γονίδια επιδρούν διαφορετικά στον εκάστοτε φαινότυπο του στελέχους, με αποτέλεσμα να ενισχύουν το co-flocculation μεταξύ κάποιων ειδών ζυμών, όπως *Saccharomyces cerevisiae* με ένα είδος non-*Saccharomyces*, ενώ παράλληλα να εμποδίζουν το flocculation (πχ του *S. cerevisiae*) με άλλα είδη. Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι από τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παραπάνω έρευνα, τα περισσότερα από τα non-*Saccharomyces* στελέχη, εμφάνισαν μεγαλύτερο flocculent χαρακτήρα από τα control στελέχη *S. cerevisiae*. Επίσης, τα περισσότερα στελέχη εμφάνισαν μεγαλύτερο flocculent χαρακτήρα όταν βρισκόταν σε μεικτές καλλιέργειες (στελέχη *Saccharomyces* και non-*Saccharomyces*), αν και δεν συνδέεται πάντα η flocculent συμπεριφορά ή ο βαθμός της συσσωμάτωσης που έχουν τα στελέχη σε μια μονοκαλλιέργεια με την συμπεριφορά τους σε μεικτές καλλιέργειες (εξαρτάται από το στέλεχος) (Rossouw et al., 2015).



Εικόνα 2.5.1.5.A: A) κύτταρα *S. cerevisiae* and B) κύτταρα *H. uvarum*, C) και D) συσσωμάτωση μεταξύ κυττάρων *S. cerevisiae* και *H. uvarum*, πηγή: Rossouw et al., (2015)

### 2.5.1.6 Παράγοντες που επηρεάζουν τη συσσωμάτωση (floculation)

Χημικοί παράγοντες έχουν σημαντικό ρόλο στην πραγματοποίηση του φαινομένου. Η παρουσία ιόντων ασβεστίου  $\text{Ca}^{2+}$  είναι μια πολύ σημαντική παράμετρος διότι συμμετέχει στην ένωση των υδρογονανθράκων με τις λεκτινοπρωτεΐνες (Goossens et al., 2015; Mill, 1964). Πιο συγκεκριμένα τα  $\text{Ca}^{2+}$  συμβάλλουν στην κατάλληλη διάταξη/διαμόρφωση των λεκτινοπρωτεϊνών (Miki et al., 1982) και σχετίζεται άμεσα με τον δεσμό της μαννόζης (Veelders et al., 2010). Άλλα ιόντα όπως το  $\text{Mg}^{2+}$  και  $\text{Mn}^{2+}$ , μπορούν να μιμηθούν την δράση του  $\text{Ca}^{2+}$ , ή να συμβάλλουν έμμεσα στην έναρξη της συσσωμάτωσης (Stratford, 1989), αλλά η συσσωμάτωση δεν πραγματοποιείται με την ίδια ένταση (Stewart & Goring, 1976; Stratford, 1989). Παρ' όλα αυτά, έχουν βρεθεί

είδη τα οποία πραγματοποιούν συσσωμάτωση ακόμη και απουσία  $\text{Ca}^{2+}$  (διαφορετικός φαινότυπος) (Rossouw et al., 2015).

Αντιθέτως, τα σάκχαρα, έχουν βρεθεί να παρεμποδίζουν το φαινόμενο της συσσωμάτωσης. Η παρεμπόδιση της συσσωμάτωσης από τα σάκχαρα του υποστρώματος, συμβαίνει διότι τα σάκχαρα αυτά ανταγωνίζονται/αντικαθιστούν την μαννόζη του κυτταρικού τοιχώματος της ζύμης (Pires & Brányik, 2015b).

Οι φυσικοχημικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη συσσωμάτωση είναι το pH (Stratford, 1996), η συγκέντρωση αιθανόλης, η ιοντική ισχύς του υποστρώματος (Jin & Speers, 2000), η θερμοκρασία (González et al., 1996; Jin & Speers, 2000), τα σάκχαρα που μπορεί να υπάρχουν στο υπόστρωμα (Eddy, 1955) και οι συνθήκες αποθήκευσης των ζυμών (θερμοκρασία, ανάδευση, χρονική διάρκεια) (Rhymes & Smart, 2001). Επιπρόσθετα, έχει παρατηρηθεί μείωση της συσσωμάτωσης στις ξηρές ζύμες (dried yeasts) και ειδικότερα σε στελέχη *Saccharomyces pastorianus* από ότι σε στελέχη *Saccharomyces cerevisiae* (Finn & Stewart, 2002).

Πιο συγκεκριμένα οι González et al., (1996) μελέτησαν την επίδραση της θερμοκρασίας εφαρμόζοντας τη δοκιμή Helm (Helm's test) σε 6 διαφορετικά στελέχη *Saccharomyces pastorianus*. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μείωση της θερμοκρασίας οδηγεί σε αύξηση της συσσωμάτωσης. Αντιθέτως, οι Jin & Speers, (2000) παρατήρησαν ότι σε στελέχη *Saccharomyces cerevisiae*, η αύξηση της θερμοκρασίας οδήγησε σε πιο δυνατή συσσωμάτωση. Αυτό μπορεί να οδηγήσει στην υπόθεση ότι η θερμοκρασία είναι ένας παράγοντας όπου η επίδρασή του εξαρτάται από το στελέχος (Rhymes & Smart, 2001).

Επιπλέον, οι Jin & Speers, (2000) ερεύνησαν την επίδραση που έχουν μια σειρά απο περιβαλλοντικούς παράγοντες στη συσσωμάτωση δύο στελεχών *Saccharomyces cerevisiae*. Το ένα στέλεχος ανήκε στην κατηγορία του Flo1 φαινότυπου, ενώ το άλλο στέλεχος ανήκε στν φαινότυπο NewFlo. Η υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης δεν είχε επίδραση στον flocculent χαρακτήρα του στελέχους που ανήκε στον φαινότυπο Flo1, ενώ είχε θετική επίδραση (αύξησε τον flocculent χαρακτήρα) στο στέλεχος με τον φαινότυπο NewFlo. Σε τιμές pH 4,5 - 5,8 η συσσωμάτωση αυξήθηκε και για τα δύο στελέχη συγκριτικά με τιμές pH 3,8 - 4,0. Αυξάνοντας την ιοντική ισχύς του

διαλύματος, η συσσωμάτωση μειώθηκε και για τα δύο στελέχη. Γενικότερα για την σχέση ανάμεσα στο pH και τη συσσωμάτωση ισχύει ότι: η συσσωμάτωση μπορεί να πραγματοποιηθεί σε εύρος pH 2,5 - 9,0, με βέλτιστες τιμές pH μεταξύ 3,0 – 5,0 (Stewart, 2017a).

Η επίδραση των διαφόρων παραγόντων φαίνεται να επιδρά διαφορετικά από στέλεχος σε στέλεχος, καθώς σε μια άλλη έρευνα από τους Claro et al., (2007) η παρουσία αιθανόλης και ισοπροπανόλης, η θερμοκρασία και το ωσμωτικό στρες δεν ενίσχυσε την έναρξη της συσσωμάτωσης ενός στελέχους *S. cerevisiae*.

Επιπλέον, “παράγοντες που ενισχύουν τον υδροφοβικό χαρακτήρα του κυτταρικού τοιχώματος των ζυμών (υδροφοβικότητα κυτταρικού τοιχώματος) και παράγοντες που μειώνουν την απωστική δύναμη του αρνητικού ηλεκτροστατικού φορτίου των κυτταρικών τοιχωμάτων (φορτίο κυτταρικού τοιχώματος), προκαλούν μεγαλύτερη συσσωμάτωση, διότι διευκολύνει την επαφή μεταξύ των κυττάρων” (Stewart, 2017a).

Η συσσωμάτωση φαίνεται να έχει επίσης, τον ρόλο ενός αμυντικού μηχανισμού (Pires & Brányik, 2015b; Veelders et al., 2010), μέσω του οποίου τα κύτταρα των ζυμών μπορούν να “ξεφύγουν” από τις δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες μέσω της καθίζησης (Di Gianvito et al., 2017). Επιπρόσθετα, με τη δημιουργία των συσσωματωμάτων τα κύτταρα που βρίσκονται στο εσωτερικό μέρος του συσσωματώματος προστατεύονται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες (Goossens et al., 2015).

Την παραπάνω υπόθεση, φαίνεται να αποδεικνύουν και κάποιες έρευνες, όπως η έρευνα που διεξάχθηκε από τους Smukalla et al., (2008). Έδειξαν ότι τα flocculent στελέχη ζυμών *Saccharomyces cerevisiae* τα οποία είχαν υποβληθεί σε στρεσογόνους παράγοντες όπως οξειδωτικό στρες, αιθανόλη, αντιμυκητιακή ουσία, παρουσίασαν μεγαλύτερη βιωσιμότητα συγκριτικά με τα non-flocculent στελέχη, ενώ δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά όταν ο στρεσογόνος παράγοντας ήταν η κατάψυξη και η απόψυξη των ζυμών. Σε άλλη έρευνα, κύτταρα ζυμών τα οποία βρέθηκαν σε έλλειψη πηγής αζώτου και σακχάρων αντίστοιχα, παρουσίασαν δυνατή συσσωμάτωση. Όταν η έλλειψη των παραπάνω θρεπτικών συστατικών εξαλείφθηκε, τότε η συσσωμάτωση μειώθηκε (Soares & Duarte, 2002).

Τέλος, η ηλικία των κυττάρων των ζυμών είναι ένας ακόμη παράγοντας. Όσο μεγαλύτερη ηλικία έχουν οι ζύμες, τόσο πιο μεγάλη αύξηση της υδροφοβικότητας και του flocculent χαρακτήρα παρατηρήθηκε (Powell et al., 2003). Αυτό μπορεί να συμβαίνει διότι το κυτταρικό τοίχωμα των ζυμών, πάνω στο οποίο βρίσκονται οι λεκτινοπρωτεΐνες αλλά και οι υποδοχείς (πχ μαννόζη), δεν είναι στατικό, αλλά μεταβάλλεται καθ' όλο τον κύκλο ζωής του κυττάρου (Jin & Speers, 1998).

Από τις παραπάνω έρευνες φαίνεται ότι η πλειοψηφία αυτών πραγματοποιήθηκε για στελέχη του γένους *Saccharomyces* και παράλληλα προκύπτει η ανάγκη μελέτης της επίδρασης των διαφόρων παραγόντων στο φαινόμενο της συσσωμάτωσης non-*Saccharomyces* στελεχών.

## **2.5.2 Εφαρμογές ακινητοποίησης κυττάρων ζυμών**

Από έρευνες που έχουν γίνει, η χρήση ακινητοποιημένων κυττάρων ζυμών στη ζυθοποίηση, δείχνουν ότι η εφαρμογή ενός τέτοιου συστήματος είναι πιο πιθανό να εφαρμοστεί για την ωρίμανση της μύρας και για την παραγωγή μύρας χωρίς αλκοόλης, καθώς σε αυτές τις περιπτώσεις δεν πραγματοποιείται μεγάλη παραγωγή αρωματικών ενώσεων, όπως πραγματοποιείται κατά την κύρια ζύμωση. Αυτό διότι, η ακινητοποίηση τις περισσότερες φορές επιφέρει αλλαγές στον σχηματισμό των αρωματικών ενώσεων, με αποτέλεσμα να υπάρχουν διαφορές στα χαρακτηριστικά του προϊόντος που παράχθηκε με ελεύθερα κύτταρα, από αυτό που παράχθηκε με ακινητοποιημένα (Brányik et al., 2012). Επιπρόσθετα, έχουν γίνει και κάποιες δοκιμές χρήσης ακινητοποιημένων κυττάρων ζυμών για την ζύμωση γλεύκους υψηλής πυκνότητας. Ανάλογα όμως με την τεχνική και το σύστημα ακινητοποίησης που χρησιμοποιήθηκε στην εκάστοτε έρευνα, προέκυψαν διαφορετικά αποτελέσματα, κυρίως για τις αρωματικές ενώσεις (Puligundla et al., 2020).

Η παραγωγή μύρας με συνεχή συστήματα έχει πλεονεκτήματα κυρίως οικονομικά, αφού μειώνεται ο χρόνος παραγωγής του προϊόντος, δεν απαιτούνται μεγάλες εγκαταστάσεις, μειώνονται τα έξοδα καθαρισμού, ενέργειας και ανθρώπινου

δυναμικού. Επίσης, παράγεται μύρα με σταθερά χαρακτηριστικά. Το μεγαλύτερο όμως μειονέκτημα είναι ότι η μύρα που παράγεται δεν είναι ίδια με αυτή που παράγεται με την κλασική μέθοδο παραγωγής, με παρτίδες, κυρίως στο οργανοληπτικό της προφίλ. Στα συστήματα αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο ελεύθερα κύτταρα ζύμης όσο και ακινητοποιημένα (Müller-Auffermann & Fritz, 2012; Virkajärvi, 2001).

Τα πλεονεκτήματα χρήσης ακινητοποιημένων κυττάρων σε συστήματα συνεχής ζύμωσης είναι η χρήση μικρότερου μεγέθους αντιδραστήρων, λιγότερη παραγόμενη βιομάζα και η χρήση απλών συστημάτων. Στα μειονεκτήματα συμπεριλαμβάνονται το μακροπρόθεσμο στρες των ζυμών, το γεγονός ότι κύτταρα ζυμών μεγάλης ηλικίας παραμένουν στο σύστημα και ο κίνδυνος μόνιμης επιμόλυνσης του συστήματος (Müller-Auffermann & Fritz, 2012).

Οι βιοαντιδραστήρες που χρησιμοποιούνται για παραγωγή μύρας με ακινητοποιημένα κύτταρα μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις κατηγορίες, ανάλογα με τη θέση των ακινητοποιημένων κυττάρων: i) αναμεμειγμένοι με αιωρούμενους φορείς, ii) με σταθερούς φορείς που μπορεί να είναι σωματίδια ή μεγάλες επιφάνειες και iii) κινούμενες επιφάνειες φορέα (Nedović et al., 2005).

Η μελέτη αυτών των συστημάτων με ακινητοποιημένα κύτταρα ξεκίνησε από το 1971. Ονομαστικά αναφέρονται κάποια από αυτά: Kirin Brewery system, Labatt Breweries system, Meura Delta system, VIT system, Sinebrychoff Brewery, Sapporo Breweries system και Bavaria system (Araujo et al., 2021; Virkajärvi, 2001; Willaert & Nedovic, 2006).

Όλα όμως τα παραπάνω συστήματα παραγωγής μύρας δεν έχουν εδραιωθεί, διότι είτε η παραγόμενη μύρα δεν πληρούσε τα επιθυμητά κριτήρια, είτε λόγω τεχνικών/λειτουργικών προβλημάτων, αν και υπήρξαν και κάποιες εξαιρέσεις σε κάποια από αυτά τα συστήματα (πχ Labatt Breweries system), καθώς η μύρα που παράχθηκε είχε οργανοληπτικά χαρακτηριστικά παρόμοια με αυτά που είχε η μύρα παραγόμενη με την κλασική μέθοδο (Araujo et al., 2021; Virkajärvi, 2001; Willaert & Nedovic, 2006). Εξάιρεση επίσης έχει αποτελέσει η ζυθοποιεία Morton Couatts (<https://www.roadshow.org/content/resources/NZscientists/mortonCouatts.php>) και η

ζυθοποιεία Dominion στη Νέα Ζηλανδία που έχουν χρησιμοποιήσει σύστημα συνεχούς ζύμωσης πάνω από 40 χρόνια (Nedović et al., 2005).

Η δυσκολία πρόβλεψης των χαρακτηριστικών της μύρας που θα παραχθεί από ένα σύστημα συνεχούς ζύμωσης, έγκειται στο μεγάλο πλήθος παραγόντων που επηρεάζουν το τελικό αποτέλεσμα. Κάποιοι από τους παράγοντες είναι: η μέθοδος ακινητοποίησης, η γεωμετρία του αντιδραστήρα, το σύστημα συνεχούς ζύμωσης, το στέλεχος της ζύμης και η σύσταση του γλεύκους (Araujo et al., 2021).

Το γενικό συμπέρασμα είναι ότι δεν υπάρχει δυνατότητα πρόβλεψης των χαρακτηριστικών του τελικού προϊόντος, ούτε η δυνατότητα πρόβλεψης παρουσίας ή/και συγκέντρωσης κάποιων ουσιών (ή ομάδας ουσιών πχ εστέρες), αφού στη μία έρευνα μπορεί να αυξάνεται η παραγωγή τους, ενώ σε κάποια άλλη έρευνα όχι (Virkaajärvi, 2001; Willaert & Nedovic, 2006).

Επιπρόσθετα, η χρήση ακινητοποιημένων ζυμών έχει ερευνηθεί και για την παραγωγή οίνου (Moreno-García et al., 2018), αφρώδους οίνου (P. Tataridis et al., 2005), για την πραγματοποίηση της μηλογαλακτικής ζύμωσης (Guzzon et al., 2009), για την αντιμετώπιση της ζύμωσης που έχει “κολλήσει” (Ramon-Portugal et al., 2003), υδρόμελου (Pereira et al., 2014), μηλίτη, αιθανόλης (Kourkoutas et al., 2004) και βιοαιθανόλης (Karaklis et al., 2005).

Επίσης, έχουν ξεκινήσει πιο καινοτόμες έρευνες, οι οποίες αφορούν την εφαρμογή της ακινητοποίησης με χρήση αποβλήτων ως φορέα ακινητοποίησης. Οι Ganatsios et al., (2021) χρησιμοποίησαν πούλπα πορτοκαλιών ως φορέα ακινητοποίησης και τα χρησιμοποίησαν για την παραγωγή μύρας. Το τελικό προϊόν βρέθηκε να έχει εμπλουτιστεί αρωματικά και να έχει πιο περίπλοκο αρωματικό προφίλ από την μύρα που παράχθηκε με ελεύθερα κύτταρα. Επιπλέον, μετά το τέλος των ζύμωσεων, το σύστημα ακινητοποίησης (πούλπα και κύτταρα ζυμών), χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα για την παραγωγή εκχυλίσματος ζύμης (Ganatsios et al., 2021).

Οι Ogawa et al., (2022) εφάρμοσαν μια εναλλακτική μέθοδο ακινητοποίησης ζυμών για την παραγωγή μύρας τύπου IPA. Αντί για φορέα παρασκευασμένο με διάλυμα αλγινικού, παρασκεύασαν ένα σφαιρικό σύστημα ακινητοποίησης ζυμών, στο οποίο τα

κύτταρα ζυμών ήταν ενθυλακωμένα και συνδεδεμένα μέσα σε ένα ανενεργό, κοίλο νηματώδη μυκηλιακό πέλлет. Ονόμασαν αυτό το σύστημα βιοκάψουλες ζύμης (yeast biocapsules). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το σύστημα με τις βιοκάψουλες ζύμης είναι μια καλύτερη επιλογή από τα συστήματα με αλγινικό, για την επαναχρησιμοποίησή τους. Η μύρα που παράχθηκε με αυτό το σύστημα δεν είχε καλή διαύγεια, διέφερε στην συγκέντρωση πέντε αρωματικών ενώσεων και σε τρία οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Επίσης, η πικράδα μειώθηκε στην μύρα που παράχθηκε με τις βιοκάψουλες ζύμης (Ogawa et al., 2022).

### **2.5.3 Αλλαγές της φυσιολογίας των κυττάρων ζυμών και διαφορές στα χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος λόγω ακινητοποίησης**

Η τελική μύρα που παράγεται με ακινητοποιημένα κύτταρα ζυμών, παρουσιάζει διαφορές στα χαρακτηριστικά της, συγκριτικά με την αντίστοιχη μύρα που παράγεται με ζύμωση με ελεύθερα κύτταρα (Araujo et al., 2021; Willaert & Nedovic, 2006). Αυτό συμβαίνει λόγω της αλλαγής στη φυσιολογία, μορφολογία και στα μεταβολικά χαρακτηριστικά των κυττάρων των ζυμών. Η ίδια η μέθοδος ακινητοποίησης και το μικροπεριβάλλον που δημιουργεί, αλλά και ο τύπος του βιοαντιδραστήρα και οι συνθήκες που επικρατούν σε αυτόν, επηρεάζουν την ζυμωτική ικανότητα των ζυμών και κατ' επέκταση το τελικό προϊόν (Willaert & Nedovic, 2006).

Υπάρχουν διάφοροι παράμετροι που συμβάλλουν στην αλλαγή που πραγματοποιείται στη φυσιολογία, μορφολογία και στην μεταβολική δραστηριότητα των ζυμών κατά την ακινητοποίηση. Οι παράμετροι αυτοί, όπως συνοψίζονται από τους Kourkoutas et al., (2004) είναι οι ακόλουθοι:

- ο περιορισμός στη μεταφορά μάζας μέσω έκχυσης
- διαταραχές στην πορεία ανάπτυξης των κυττάρων
- η επίδραση της επιφανειακής τάσης και της οσμωτικής πίεσης στα κύτταρα
- η μικρή ενεργότητα νερού
- η αλληλεπίδραση μεταξύ των κυττάρων



- οι αλλαγές στα μορφολογικά χαρακτηριστικά των κυττάρων
- η αλλαγή στην διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης
- η διαθεσιμότητα και ικανότητα πρόσληψης των συστατικών που βρίσκονται στο υπόστρωμα (Kourkoutas et al., 2004)

Οι παραπάνω παράμετροι οδηγούν σε αλλαγές στα κύτταρα. Οι αλλαγές αυτές μπορεί να είναι αύξηση στην αποθήκευση γλυκογόνου και δομικών πολυσακχαριδίων, αλλαγές στον ρυθμό ανάπτυξης, αυξημένη δραστηριότητα ιμπερτάσης, αλλαγές στον ρυθμό πρόσληψης των ουσιών του υποστρώματος και της παραγωγής προϊόντων μεταβολισμού (Norton & D'Amore, 1994).

Όλες οι παραπάνω μεταβολές στα κύτταρα των ζυμών, οδηγούν σε διαφορές στα χαρακτηριστικά της ζύμωσης και κατ' επέκταση στο τελικό προϊόν. Από τις πιο σημαντικές αλλαγές, είναι αυτή στο αρωματικό προφίλ της μύρας. Σπάνια το αρωματικό προφίλ της μύρας από ζύμωση με ακινητοποιημένα κύτταρα, θα μοιάζει με αυτό από ζύμωση με ελεύθερα κύτταρα, το οποίο έχει τον επιθυμητό οργανοληπτικό χαρακτήρα (Araujo et al., 2021).

## 2.5.4 Πλεονεκτήματα της τεχνικής ακινητοποίησης στη ζυθοποίηση

- Μείωση του χρόνου ζύμωσης
- Μείωση του χρόνου παραγωγής του προϊόντος και κατ' επέκταση αύξηση της παραγωγικότητας
- Μείωση του χρόνου μεσολάβησης μεταξύ των κύκλων παραγωγής, λόγω ευκολότερου και ταχύτερου καθαρισμού των συστημάτων παραγωγής
- Αυξημένη κατανάλωση ουσιών του υποστρώματος
- Μεγαλύτερη παραγωγή αλκοόλης
- Μείωση του χρόνου ωρίμανσης
- Ευκολότερος διαχωρισμός της βιομάζας από το τελικό προϊόν
- Ευκολότερη παραλαβή βιομάζας για επαναχρησιμοποίησή της
- Μείωση της πιθανότητας επιμόλυνσης από άλλους μικροοργανισμούς λόγω της υψηλής συγκέντρωσης βιομάζας, εφόσον κατά την διαδικασία της ακινητοποίησης δεν εγκλωβίστηκαν ανεπιθύμητοι μικροοργανισμοί στο σύστημα ακινητοποίησης
- Προστασία των κυττάρων από κάποιους παράγοντες που προκαλούν στρες στα κύτταρα των ζυμών, π.χ. υψηλή συγκέντρωση αλκοόλης, pH, θερμοκρασία κλπ
- Δυνατότητα εγκατάστασης ενός συνεχούς συστήματος ζύμωσης
- Υψηλή συγκέντρωση βιομάζας σε μικρότερο όγκο
- Δυνατότητα χρήσης μικρότερου μεγέθους βιοαντιδραστήρων, λόγω της υψηλής συγκέντρωσης βιομάζας
- Δυνατότητα χρήσης διαφορετικών στελεχών ζύμης με μεγαλύτερη ευκολία διαχείρησής τους, παραλαβής και επαναχρησιμοποίησής τους
- Δυνατότητα μη φιλτραρίσματος του τελικού προϊόντος, λόγω της μικρής συγκέντρωσης των ελεύθερων κυττάρων
- Μείωση του κόστους παραγωγής, μείωση χρήσης καθαριστικών/απολυμαντικών
- Μείωση κατανάλωσης ενέργειας (Araujo et al., 2021; Kourkoutas et al., 2004)

## 2.5.4 Μειονεκτήματα της τεχνικής ακινητοποίησης στην ζυθοποίηση

- Περιορισμός/δυσκολία μεταφοράς διαλυμένων ουσιών από το υπόστρωμα προς το εσωτερικό του συστήματος ακινητοποίησης και μεταφορά των προϊόντων μεταβολισμού των ζυμών από το εσωτερικό του συστήματος ακινητοποίησης προς το υπόστρωμα (τον περιβάλλοντα χώρο του συστήματος)
- Αλλαγή στην μορφολογία, φυσιολογία και μεταβολισμό των κυττάρων
- Μικρή δυνατότητα πρόβλεψης της ζύμωσης, λόγω της ετερογένειας που παρουσιάζει το σύστημα
- Διαφορά στον οργανοληπτικό χαρακτήρα του τελικού προϊόντος, κυρίως στη γεύση και στο αρωματικό προφίλ
- Μεγαλύτερη παραγωγή α-ακετοϋδροξέων
- Δυσκολία μέτρησης της συγκέντρωσης βιομάζας κατά τη ζύμωση, λόγω της ανομοιογενούς κατανομής των κυττάρων μέσα στα σωματίδια
- Δυσκολία στην ανίχνευση επιμόλυνσης
- Η παραγωγή του φορέα ακινητοποίησης σε μεγάλη/βιομηχανική κλίμακα μπορεί να είναι ακριβή και να μην μπορεί να αναπτυχθεί εύκολα
- Η παραγωγή ζύθου σε μεγάλη/βιομηχανική κλίμακα με την χρήση ακινητοποιημένων ζυμών παρουσίασε τις περισσότερες φορές προβλήματα, τόσο κατά της διαδικασίας παραγωγής (επιμολύνσεις), όσο και στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος
- Προβλήματα διαχείρισης της μεταφοράς θερμότητας και της θερμοκρασίας στην δεξαμενή ζύμωσης
- Προβλήματα στον μηχανολογικό εξοπλισμό λόγω της παραγωγής CO<sub>2</sub>
- Προβλήματα συμφόρησης/απόφραξης του συστήματος (Araujo et al., 2021)
- Σε περίπτωση ζύμωσης υψηλών συγκεντρώσεων σάκχαρων, αυξάνει πολύ η βιομάζα και η έκλυση του CO<sub>2</sub> με αποτέλεσμα το σπάσιμο των σφαιριδίων (Tataridis et al., 2005)

### 2.5.5 Εμπορικό παράδειγμα ακινητοποίησης για χρήση σε ποτά/οίνο

Στο εμπόριο κυκλοφορούν 4 προϊόντα ζύμης σε ακινητοποιημένη μορφή, από την εταιρεία PROENOL (<https://www.proenol.com/web/produtos/leveduras-encapsuladas>).

- PROELIF: είναι ένα προϊόν για χρήση στην παραγωγή αφρώδους οίνου, χωρίς να χρειάζεται η αφαίρεση των ακινητοποιημένων ζυμών από την φιάλη, κατά το τέλος της ζύμωσης (<https://www.proenol.com/web/produtos/leveduras-encapsuladas/proelif-1-detail>).
- PRORESTART: είναι ένα προϊόν που βοηθά στην επανεκκίνηση της σταματημένης ή αργής ζύμωσης. Περιέχει ακινητοποιημένα κύτταρα ζύμης τα οποία είναι εγκλιματισμένα στην παρουσία αλκοόλης (<https://www.proenol.com/web/produtos/leveduras-encapsuladas/prorestart-detail>).
- PROMALIC: αυτό το προϊόν περιέχει ακινητοποιημένα κύτταρα ζύμης που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την μετατροπή του μηλικού οξέος σε αλκοόλη και αποτελεί εναλλακτική λύση στην μηλογαλακτική ζύμωση ή/και χημική οξίνιση του γλεύκους (<https://www.proenol.com/web/produtos/leveduras-encapsuladas/promalic-detail>).
- PRODESSERT: είναι ένα προϊόν για χρήση στην παραγωγή κρασιών με υψηλή υπολειμματική ζάχαρη. Η χρήση ακινητοποιημένων ζυμών επιτρέπει την εύκολη απομάκρυνσή τους από το κρασί και έτσι διευκολύνει τη διακοπή της αλκοολικής ζύμωσης (<https://www.proenol.com/web/produtos/leveduras-encapsuladas/prodessert-detail>).

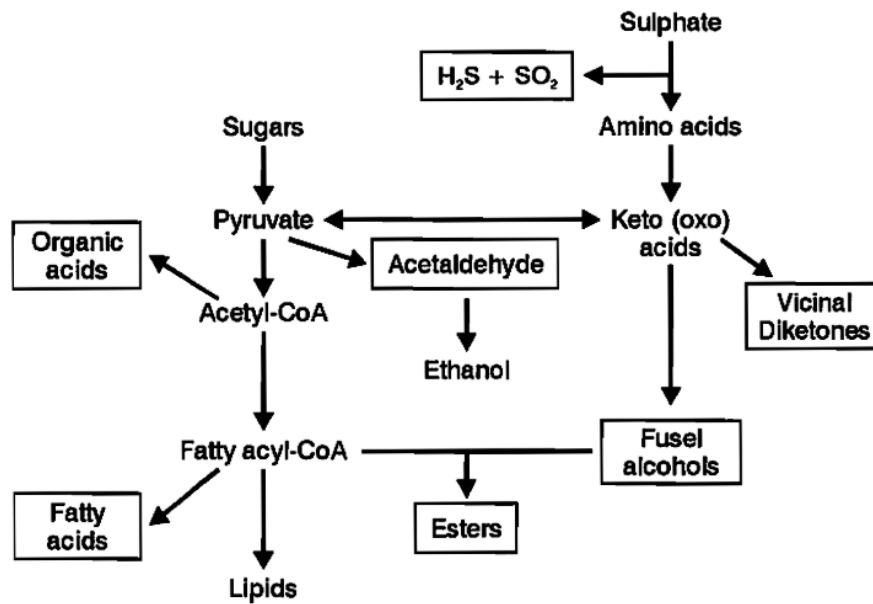
## 2.6 Τα πτητικά συστατικά στη μύρα

Τα κύρια προϊόντα που παράγονται από τις ζύμες κατά την αλκοολική ζύμωση είναι η αιθανόλη, το διοξείδιο του άνθρακα και η γλυκερόλη (πρωτογενείς μεταβολίτες). Όμως, αυτές οι ενώσεις επηρεάζουν σε μικρό βαθμό το άρωμα και την γεύση (flavor) της μύρας. Αντιθέτως, οι ενώσεις οι οποίες επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό το flavor της μύρας είναι οι δευτερογενείς μεταβολίτες. Οι κύριοι δευτερογενείς μεταβολίτες είναι: οι ανώτερες αλκοόλες, οι εστέρες, οι καρβονυλικές, οι θειούχες ενώσεις κ.α. Τόσο το είδος, όσο και η συγκέντρωση των δευτερογενών μεταβολιτών επηρεάζουν τον συνολικό γευστικό και αρωματικό χαρακτήρα της μύρας (Stewart, 2017b).

Οι ενώσεις αυτές, πρέπει να βρίσκονται μέσα σε συγκεκριμένο εύρος συγκέντρωσης, καθώς εάν κάποια ένωση ή ομάδα ενώσεων υπερισχύσει, μπορεί να καταστρέψει την γευστική και αρωματική ισορροπία της μύρας. Προσοχή πρέπει να δοθεί και σε κάποιες ουσίες, οι οποίες αν και βρίσκονται κάτω από το όριο αντίληψης, μπορούν να δράσουν συνεργιστικά με άλλες ουσίες και να γίνουν αντιληπτές (Stewart, 2017b). Επίσης, ο κάθε τύπος μύρας έχει τον δικό του επιθυμητό αρωματικό χαρακτήρα, με αποτέλεσμα κάποιες ουσίες που θεωρούνται ανεπιθύμητες σε έναν τύπο μύρας (πχ lager), η παρουσία τους σε κάποιον άλλον τύπο μύρας να μην επηρεάζει αρνητικά το flavor ή ακόμη να είναι και επιθυμητές (Pires & Brányik, 2015a).

Η παραγωγή και η συγκέντρωση των δευτερογενών μεταβολιτών εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως το στέλεχος της ζύμης, τη θερμοκρασία ζύμωσης, τη γεωμετρία της δεξαμενής ζύμωσης, το pH και την πυκνότητα του γλεύκους, τη συγκέντρωση του αφομοιώσιμου αζώτου, τις τυχόν προσθήκες και το είδος τους (Stewart & Russell, 2009), καθώς και την ποικιλία, την ποσότητα και το χρόνο προσθήκης λυκίσκου (π.χ. την εφαρμογή dry hopping ή αλλής τεχνικής) και άλλους παράγοντες (Stewart, 2017b).

Στο παρακάτω σχήμα (2.6.A), απεικονίζεται ο σχηματισμός των βασικών αρωματικών ενώσεων μεταβολισμού της ζύμης.



Σχήμα 2.6.A: Διάγραμμα παραγωγής πτητικών ενώσεων στη μύρα, Πηγή: Stewart & Russell (2009)

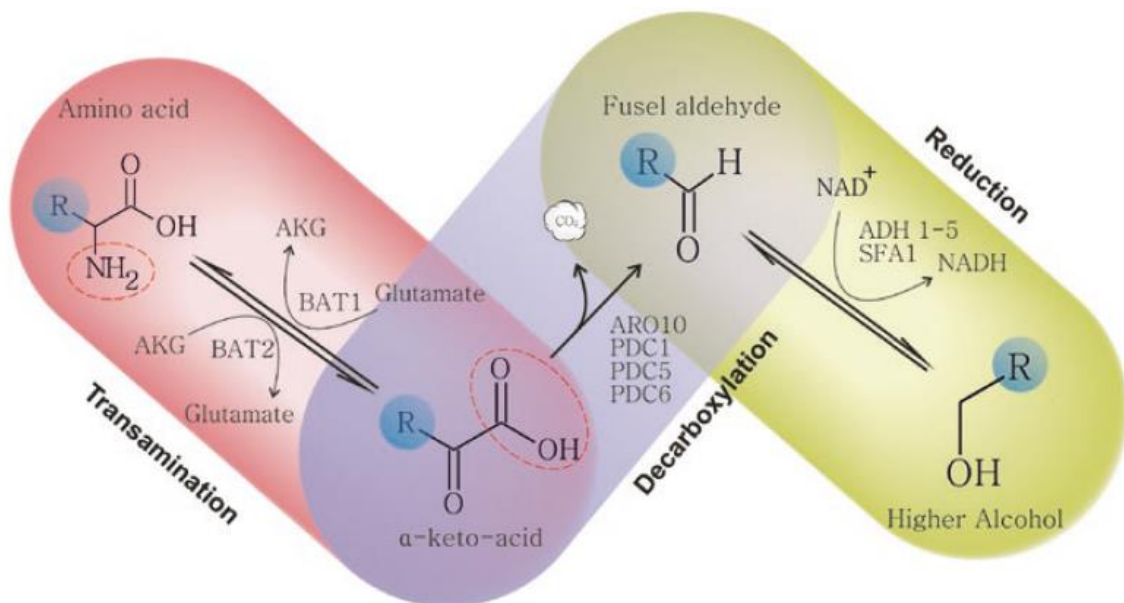
### 2.6.1 Ανώτερες αλκοόλες

Από τις ενώσεις με σημαντική οργανοληπτική σημασία, οι ανώτερες αλκοόλες είναι αυτές που βρίσκονται σε μεγαλύτερη αφθονία στην μύρα (Pires & Brányik, 2015a) και ιδιαίτερα στις ale. Οι ανώτερες αλκοόλες ονομάστηκαν έτσι, λόγω του ότι έχουν υψηλότερο αριθμό ατόμων άνθρακα από την αιθανόλη. Έχουν αναγνωριστεί πάνω από 40 ανώτερες αλκοόλες στην μύρα. Οι ανώτερες αλκοόλες μπορούν να δημιουργηθούν ως υποπροϊόντα κατά τον μεταβολισμό των αμινοξέων ή μέσω του πυροσταφυλικού οξέος κατά τον μεταβολισμό των υδρογονανθράκων (Pires & Brányik, 2015a).

Οι ανώτερες αλκοόλες συνεισφέρουν στον ανθικό, φρουτώδη και βοτανικό αρωματικό χαρακτήρα ή και στο χαρακτήρα διαλύτη της μύρας, ανάλογα με την συνεργιστική δράση που θα παρουσιάσουν μαζί με άλλες αρωματικές ενώσεις. Σημαντικές ανώτερες αλκοόλες στην μύρα είναι οι: n-προπανόλη, ισοβουτανόλη, ισοαμυλική αλκοόλη και η 2-φαινυλαιθανόλη. Η n-προπανόλη έχει γλυκό άρωμα αλκοόλης και το κατώφλι αντίληψης είναι 600 mg/L. Η ισοβουτανόλη με κατώφλι αντίληψης 100 mg/L και η αμυλική αλκοόλη με κατώφλι αντίληψης 50 - 70 mg/L, έχουν άρωμα διαλύτη. Η ισοαμυλική αλκοόλη έχει άρωμα μπανάνας και αιθανόλης και κατώφλι αντίληψης 50 -

60 mg/L και η 2-φαινυλαιθανόλη έχει κατώφλι αντίληψης 40 mg/L και άρωμα ζαχαρωτού/τριαντάφυλλου (Michel et al., 2016).

Κατά τον καταβολισμό των αμινοξέων, η ζύμη αφαιρεί την αμινομάδα από τα αμινοξέα ή τα μικρά πεπτίδια που υπάρχουν στο γλεύκος (Ehrlich Pathway), έτσι ώστε να την χρησιμοποιήσει για να συνθέσει νέες ενώσεις και νέα αμινοξέα, τα οποία χρειάζεται (Stewart, 2017b). Ένζυμα που λαμβάνουν χώρα κατά την διαδικασία αυτή είναι οι τρανσφεράσες, αποκαρβοξυλάσες και αλκοολικές αφυδραγονάσες (Pires & Brányik, 2015a). Κατά την διαδικασία αυτή, έπειτα από την αφαίρεση της αμινομάδας, παράγεται ένα α-κετό-οξύ, το οποίο αποκαρβοξυλιώνεται σε αλδεΐδη κι έπειτα με αναγωγή της αλδεΐδης, σχηματίζεται μια αλκοόλη. Για παράδειγμα, η ισοβουτανόλη μπορεί να παραχθεί από την βαλίνη, η 3-μεθυλ-1-βουτανόλη από την λευκίνη και η 2-μεθυλ-1-βουτανόλη από την ισολευκίνη (Stewart & Russell, 2009).



Σχήμα 2.6.1.A: Βιοσύνθεση ανώτερων αλκοολών μέσω της οδού Ehrlich, πηγή Pires & Brányik (2015a)

Με παρόμοιο τρόπο, σχηματίζονται ανώτερες αλκοόλες και κατά τον αναβολισμό των αμινοξέων, δηλαδή την βιοσύνθεσή τους. Κατά κύριο λόγο, ο καταβολισμός των αμινοξέων λαμβάνει χώρα κατά την φάση ανάπτυξης των ζυμών, όταν υπάρχουν αρκετά αμινοξέα στο γλεύκος, ενώ ο αναβολισμός πραγματοποιείται κατά τα τελευταία στάδια της ζύμωσης, όταν τα αμινοξέα στο γλεύκος είναι σε έλλειψη (Stewart & Russell, 2009). Περίπου το 80 % των ανώτερων αλκοολών σχηματίζεται κατά την

κύρια ζύμωση. Σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 100 mg/L επηρεάζεται αρνητικά το οργανοληπτικό προφίλ και η αποδοχή της μπύρας, διότι προσδίδουν βαριά αρώματα στη μπύρα (Kunze, 2004).

Στη ζύμωση με ελεύθερα κύτταρα, έχει βρεθεί να ισχύουν τα παρακάτω, σε ότι αφορά την παραγωγή των ανώτερων αλκοολών. Η συνολική συγκέντρωση των ανώτερων αλκοολών σχετίζεται γραμμικά με την βαθμό ανάπτυξης των ζυμών. Ως εκ τούτου, παράγοντες οι οποίοι επιδρούν θετικά στην ανάπτυξη των ζυμών, θα προκαλέσουν αύξηση στην παραγωγή των ανώτερων αλκοολών (Stewart & Russell, 2009). Η παραγωγή των ανώτερων αλκοολών αυξάνεται από την αύξηση της θερμοκρασίας ζύμωσης, την ανάδευση του ζυθογλεύκους, την μικρή συγκέντρωση αμινοξέων στο γλεύκος και τον έντονο αερισμό του γλεύκους. Αντιθέτως, η παραγωγή ανώτερων αλκοολών μειώνεται με αύξηση της συγκέντρωσης εμβολίου (pitching rate), με μικρότερη θερμοκρασία εμβολιασμού αλλά και ζύμωσης, με αύξηση της πίεσης, με την αποφυγή αερισμού κατά τον εμβολιασμό και με την επαρκή ποσότητα αμινοξέων στο γλεύκος (Kunze, 2004).

Στις ζυμώσεις με ακινητοποιημένα κύτταρα, στις περισσότερες περιπτώσεις κατά την κύρια ζύμωση, η παραγωγή ανώτερων αλκοολών ήταν μικρότερη από ότι στις ζυμώσεις με ελεύθερα κύτταρα. Όμως, έχουν παρατηρηθεί και περιπτώσεις όπου κάποιες από τις ανώτερες αλκοόλες ήταν σε ίδιο ποσοστό ή και μεγαλύτερο. Είναι δύσκολο να εκτιμηθεί το ποσοστό παραγωγής τους, καθώς παράγοντες όπως το στέλεχος, η σύσταση του γλεύκους, οι συνθήκες ζύμωσης, το σύστημα ακινητοποίησης, ο βιοαντιδραστήρας του συστήματος, καθώς και οι μεταξύ των παραγόντων αυτών αλληλεπιδράσεις, επηρεάζουν την παραγωγή τους (Willaert & Nedovic, 2006).

## **2.6.2 Εστέρες**

Συγκριτικά με άλλες αρωματικές ενώσεις μεταβολισμού, οι εστέρες απαντώνται σε πολύ μικρή ποσότητα, όμως είναι οι πιο σημαντικές αρωματικές ενώσεις στην μπύρα κι αυτό διότι έχουν πολύ μικρό κατώφλι αντίληψης (Pires & Brányik, 2015a). Στην μπύρα έχουν βρεθεί πάνω από 90 διαφορετικοί εστέρες. Οι εστέρες είναι επιθυμητές ενώσεις

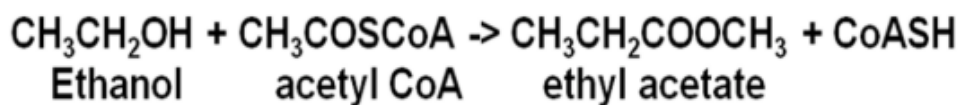


οι οποίες προσδίδουν ανθικά και φρουτώδη αρώματα. Όμως, η υπερπαραγωγή εστέρων και η συγκέντρωσή τους σε υψηλά επίπεδα, μπορούν να δημιουργήσουν ένα αρνητικό αποτέλεσμα στο αρωματικό προφίλ της μύρας (Stewart & Russell, 2009). Πιο συγκεκριμένα, σε υψηλές συγκεντρώσεις προσδίδουν μια μη ευχάριστη πικρή, φρουτώδη γεύση. Επίσης, η συγκέντρωσή τους διαφοροποιείται από τον τύπο της μύρας (Kunze, 2004).

Στην μύρα, οι εστέρες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε δύο ομάδες: τους οξικούς εστέρες, οι οποίοι σχηματίζονται από ένα οξικό οξύ και μια αλκοόλη (αιθανόλη ή ανώτερη αλκοόλη) και τους αιθυλεστέρες ή MCFA (medium chain fatty acid) αιθυλεστέρες. Οι δεύτεροι σχηματίζονται από ένα μεσσαίου μήκους αλυσίδας λιπαρό οξύ και μια αλκοόλη (Stewart, 2017b).

Οι οξικοί εστέρες βρίσκονται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στην μύρα από ότι οι αιθυλεστέρες (Michel et al., 2016).

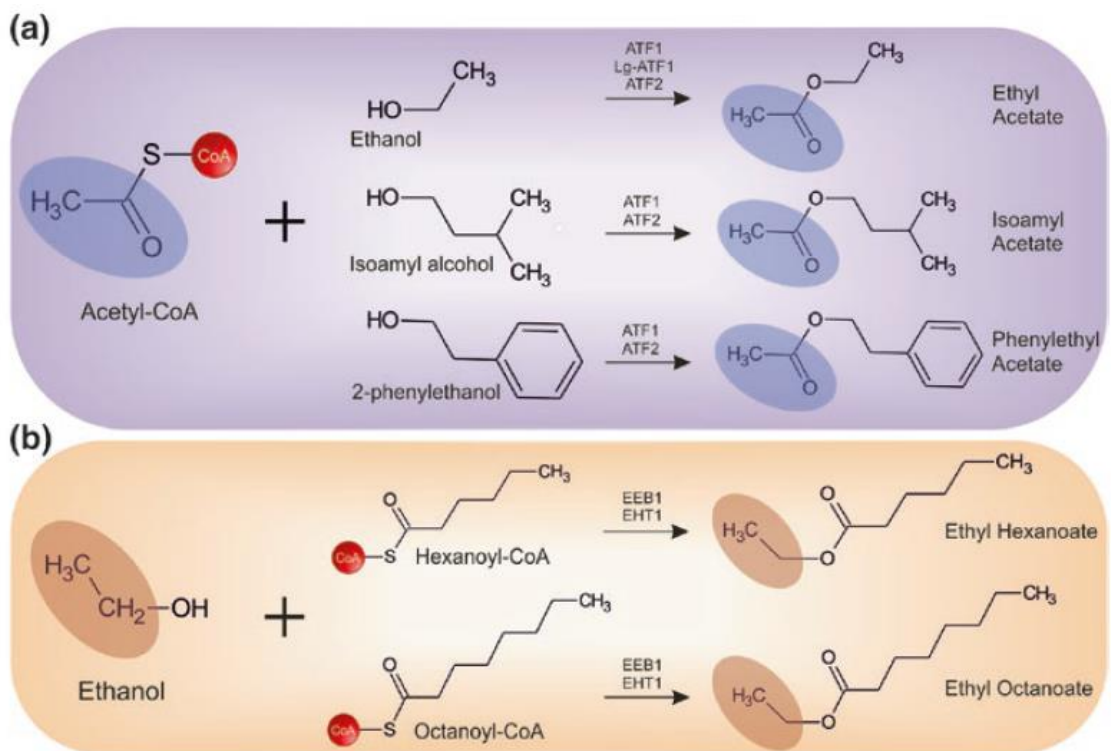
Οι εστέρες παράγονται κυρίως κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης των ζυμών στην κύρια ζύμωση. Ο οξικός αιθυλεστέρας είναι ο εστέρας που παράγεται πιο συχνά από τον μεταβολισμό της ζύμης κατά την αλκοολική ζύμωση (Σχήμα 2.6.2.A) (Stewart, 2017b).



Σχήμα 2.6.2.A: Διάγραμμα παραγωγής εστέρων, Πηγή: Stewart (2017)

Αυτό συμβαίνει γιατί η αιθανόλη είναι η πιο συνηθισμένη αλκοόλη που απαντάται στην ζύμη, η οποία είναι πρόδρομος ουσία των αιθυλεστέρων (G. G. Stewart & Russell, 2009). Η εστεροσύνθεση περιλαμβάνει την σύνδεση του οργανικού οξέος με το συνένζυμο A και την δημιουργία του ακετυλο-συνένζυμου-A (acetyl-CoA). Η πλειοψηφία του ακετυλο-συνένζυμου-A προέρχεται από την οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού οξέος. Εάν επικρατούν αερόβιες συνθήκες τα ακετυλο-συνένζυμα-A θα εισέρθουν στον κύκλο του Krebs για την δημιουργία ATP.

Υπό αναερόβιες όμως συνθήκες, το ακετυλο-συνένζυμο-A θα εστεροποιηθεί ενζυμικά με μια αλκοόλη προς δημιουργία οξικού εστέρα. Στην περίπτωση που το οξύ είναι ένα μεσαίου μήκους λιπαρό οξύ (MCFA) το ένζυμο που θα σχηματιστεί θα είναι το ακετυλο-συνένζυμο-A (acetyl-CoA), το οποίο θα ενωθεί με μια αλκοόλη προς δημιουργία αιθυλεστέρων (Pires & Brányik, 2015a; Stewart, 2017b).



Σχήμα 2.6.2.B: a) Βιοσύνθεση οξικών εστέρων, b) βιοσύνθεση αιθυλεστέρων, πηγή: Pires & Brányik (2015a)

Το είδος των εστέρων που θα σχηματιστούν εξαρτάται από το στέλεχος της ζύμης που θα χρησιμοποιηθεί κι αυτό ίσως να σχετίζεται με τα διαφορετικά ένζυμα τα οποία μπορεί να διαθέτει το κάθε στέλεχος. Επίσης, σημαντικό ρόλο παρουσιάζει και η διαθεσιμότητα διαφόρων συστατικών στο υπόστρωμα, καθώς πολλά ένζυμα ειδικεύονται σε διαφορετικά συστατικά υποστρώματος (Pires & Brányik, 2015a; Stewart, 2017b).

Η ποσότητα των εστέρων που θα παραχθεί εξαρτάται από την θερμοκρασία της ζύμωσης, την μέθοδο ζύμωσης (συνεχής ή ασυνεχής ζύμωση), τη συγκέντρωση εμβολίου, τον βαθμό αερισμού και πιο συγκεκριμένα την ποσότητα του οξυγόνου στο

γλεύκος, την πυκνότητα του γλεύκους, την πίεση και το εύρος των ιόντων που υπάρχουν στο γλεύκος (Pires & Brányik, 2015a; Stewart, 2017b).

Η επίδραση της πίεσης πιθανόν σχετίζεται με την αυξημένη συγκέντρωση του διοξειδίου του άνθρακα, η οποία προκαλεί μείωση του ενδοκυτταρικού pH με αποτέλεσμα την διακοπή της ενζυματικής δραστηριότητας, με επακόλουθο την μείωση τόσο της ανάπτυξης των ζυμών, όσο και της παραγωγής εστέρων (Pires & Brányik, 2015a; Stewart, 2017b).

Όμως, ο βαθμός παραγωγής των εστέρων δεν εξαρτάται μόνο από την διαθεσιμότητα των πρόδρομων ουσιών στο υπόστρωμα, αλλά και από την ενζυματική ισορροπία της σύνθεσης και αποδόμησης των εστέρων από τις εστεράσες (Pires & Brányik, 2015a).

Η παραγωγή εστέρων αυξάνεται με αύξηση της πυκνότητας του γλεύκους, με αύξηση του βαθμού ζύμωσης, του αερισμού, της θερμοκρασίας και την ανάδευση τόσο κατά την ζύμωση, όσο και κατά την ωρίμανση. Η παραγωγή εστέρων μειώνεται με μείωση του αερισμού, της θερμοκρασίας και με αύξηση της πίεσης (Kunze, 2004). Επίσης, η συγκέντρωση και το είδος των μικροσωματιδίων που μπορεί να υπάρχουν στο γλεύκος (trub) αποδείχθηκε να επηρεάζει τη συγκέντρωση των εστέρων (Stewart, 2017b).

Το αρωματικό προφίλ των εστέρων μπορεί να αλλάξει σημαντικά κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, είτε από την δράση των ζυμών, είτε από αυθόρμητες χημικές αντιδράσεις μεταξύ των οργανικών οξέων και της αιθανόλης (Pires & Brányik, 2015a). Κατά την φάση της ωρίμανσης το επίπεδό τους μπορεί να αυξηθεί ή ακόμη και να διπλασιαστεί (Kunze, 2004).

### **2.6.3 Καρβονυλικές ενώσεις**

Οι καρβονυλικές ενώσεις που έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον στην μύρα είναι i) η ακεταλδεΐδη και ii) οι συζυγείς δικετόνες: 2,3 βουτανοδιόνη (διακετύλιο) και 2,3 πεντανοδιόνη. Η ακεταλδεΐδη προσδίδει στη μύρα άρωμα πράσινου/ώριμου μήλου, ενώ το διακετύλιο προσδίδει βουτυρώδη χαρακτήρα στη μύρα. Άλλες καρβονυλικές

ενώσεις παράγονται από τον μεταβολισμό των ζυμών κατά την ζύμωση και επηρεάζουν σημαντικά το οργανοληπτικό προφίλ της μπύρας και ειδικότερα τα αρώματα που σχετίζονται με την σταθερότητα του προϊόντος. Σε υψηλές συγκεντρώσεις προσδίδουν ταγγισμένη γεύση στην μπύρα και άρωμα χαρτονιού (Stewart & Russell, 2009).

### **2.6.3.1 Ακεταλδεΐδη**

Το άρωμα των αλδεΐδων χαρακτηρίζεται ως χορτώδες/πράσινο αλλά και ως άρωμα χαρτονιού. Από τις αλδεΐδες η πιο σημαντική είναι η ακεταλδεΐδη, η οποία βρίσκεται και σε μεγαλύτερη ποσότητα. Προσδίδει στην μπύρα άρωμα πράσινου/ώριμου μήλου και είναι υπεύθυνη για το άρωμα της πράσινης (που δεν έχει ωριμάσει) μπύρας. Η ακεταλδεΐδη παράγεται κατά την διαδικασία παραγωγής αιθανόλης, με αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού οξέος κατά την γλυκόλυση, καθώς και με οξείδωση της αιθανόλης. Την μεγαλύτερη συγκέντρωση, παρουσιάζει κατά την εκθετική φάση της ζύμωσης, ενώ συνήθως το επίπεδο συγκέντρωσής της μειώνεται κατά τα τελευταία στάδια, λόγω επαναχρησιμοποίησής της από την ζύμη (Stewart & Russell, 2009). Εάν κατά την ζύμωση υπάρξει πρόωμη συσσωμάτωση των κυττάρων, τότε δεν θα μπορεί να πραγματοποιηθεί επαναχρησιμοποίηση της ακεταλδεΐδης από την ζύμη, λόγω έλλειψης αιωρούμενων κυττάρων στο γλεύκος (Stewart, 2017b).

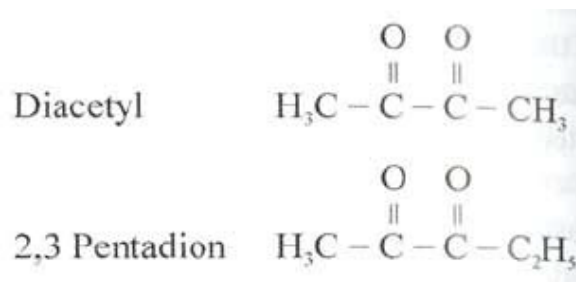
Η συγκέντρωσή της στην πράσινη μπύρα κυμαίνεται στα 10 – 15 mg/L (Stewart, 2017b) ή ακόμη και στα 20 – 40 mg/L (Kunze, 2004). Στην τελική μπύρα η συγκέντρωσή της μειώνεται στα 8 – 10 mg/L (Kunze, 2004). Το κατώφλι αντίληψης είναι τα 10 mg/L (Michel et al., 2016; Stewart, 2017b).

Η συγκέντρωση της ακεταλδεΐδης αυξάνεται με γρήγορη ζύμωση, αύξηση της θερμοκρασίας, αύξηση της συγκέντρωσης εμβολίου (pitching rate), ζύμωση υπό πίεση, μειωμένο αερισμό, επιμόλυνση του γλεύκους. Αντίθετα, η συγκέντρωσή της μειώνεται με παραμέτρους οι οποίες ενισχύουν την έντονη δεύτερη ζύμωση και ωρίμανση, με αύξηση της θερμοκρασίας ωρίμανσης, με επαρκή αερισμό και αύξηση της συγκέντρωσης της ζύμης κατά το στάδιο της ωρίμανσης (Kunze, 2004).

Εκτός από τις συνθήκες ζύμωσης και ωρίμανσης το στέλεχος φαίνεται να είναι από τους πιο σημαντικούς παράγοντες. Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε 86 στελέχη *Saccharomyces cerevisiae* σε συνθετικό υπόστρωμα και σε οινογλεύκος, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην παραγωγή ακεταλδεΐδης ανάμεσα στα δύο υποστρώματα και αποδείχθηκε ότι η παραγωγή της εξαρτώνταν από το στέλεχος. Επιπλέον, αύξηση της θερμοκρασίας στους 30 °C, αύξησε την παραγωγή ακεταλδεΐδης (Romano et al., 1994).

### 2.6.3.2 Συζυγείς δικετόνες

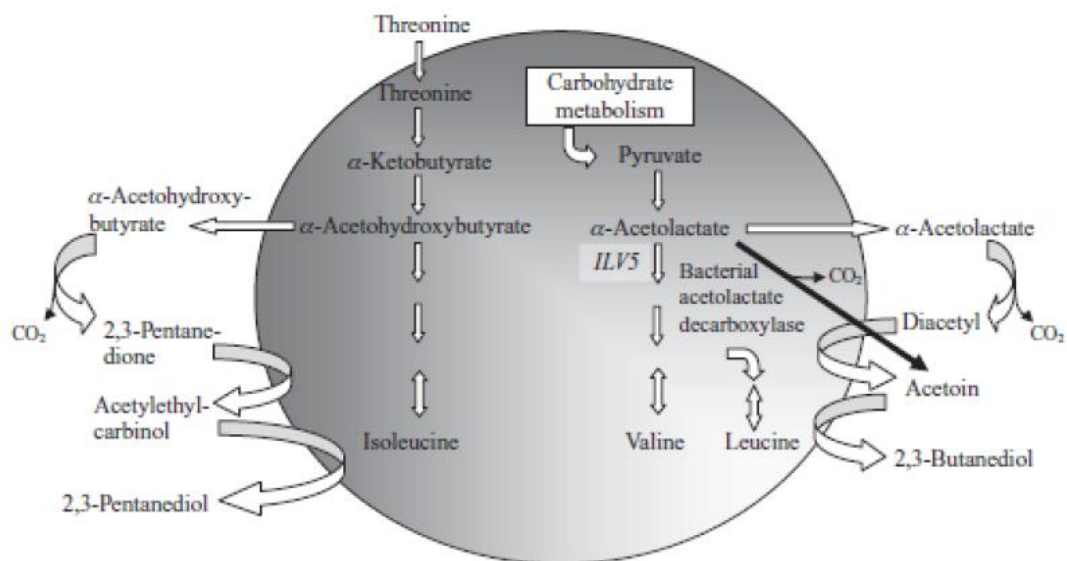
Άλλες δύο σημαντικές αλδεΐδες είναι συζυγείς δικετόνες: 2,3 βουτανοδιόνη (διακετύλιο) και 2,3 πεντανοδιόνη. Ονομάζονται συζυγείς δικετόνες, επειδή και οι δύο ενώσεις είναι δικετόνες με παρακείμενες/διπλανές κετονομάδες (σχήμα 2.6.3.2A) (Kunze, 2004).



Σχήμα 2.6.3.2.A: Συζυγείς δικετόνες, πηγή Kunze (2004)

Και οι δύο ουσίες προσδίδουν στην μύρα γεύση και άρωμα βουτύρου, όμως το διακετύλιο είναι πιο σημαντικό επειδή έχει πολύ χαμηλό όριο αντίληψης, περίπου 10 mg/L, το οποίο είναι περίπου 10 φορές πιο χαμηλό από το όριο αντίληψης της 2,3 πεντανοδιόνης και συνήθως βρίσκεται και σε μεγαλύτερη συγκέντρωση από τη 2,3 πεντανοδιόνη. Σε ορισμένες ale μύρες οι συζυγείς δικετόνες ενδέχεται να συμβάλλουν στον συνολικό γευστικό χαρακτήρα και εντός κάποιων ορίων δεν δημιουργούν πρόβλημα. Στις lager όμως μύρες, δημιουργούν δυσάρεστο flavor και είναι ανεπιθύμητες. Η μείωση των συζυγών δικετόνων κάτω από το όριο αντίληψης είναι ένας από τους δείκτες για το τέλος της διαδικασίας ωρίμανσης (Stewart & Russell, 2009).

Το διακετύλιο και η 2,3 πεντανοδιόνη σχηματίζονται κατά τη δημιουργία των αμινοξέων βαλίνη και ισολευκίνη αντίστοιχα. Πιο αναλυτικά, οι ζύμες παράγουν μέσω του μεταβολισμού τους, μόνο τις πρόδρομες ουσίες των συζυγών δικετόνων και όχι τις συζυγείς δικετόνες. Οι πρόδρομες ουσίες ονομάζονται ακετοϋδροξέα (acetoxy acids) και δεν έχουν άρωμα και γεύση. Παράγονται από το πυροσταφυλικό οξύ και εκκρίνονται από τα κύτταρα της ζύμης μέσα στο γλεύκος. Τα ακετοϋδροξέα παράγουν τις συζυγείς δικετόνες εξωκυτταρικά και ανεξάρτητα των ζυμών, με αυθόρμητη οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση τους.



Σχήμα 2.6.3.2.B: Σχηματική αναπαράσταση δημιουργίας, επαναπρόσληψης και απομάκρυνσης των συζυγών δικετόνων μέσω του μεταβολισμού του κυττάρου της ζύμης (Willaert, 2011)

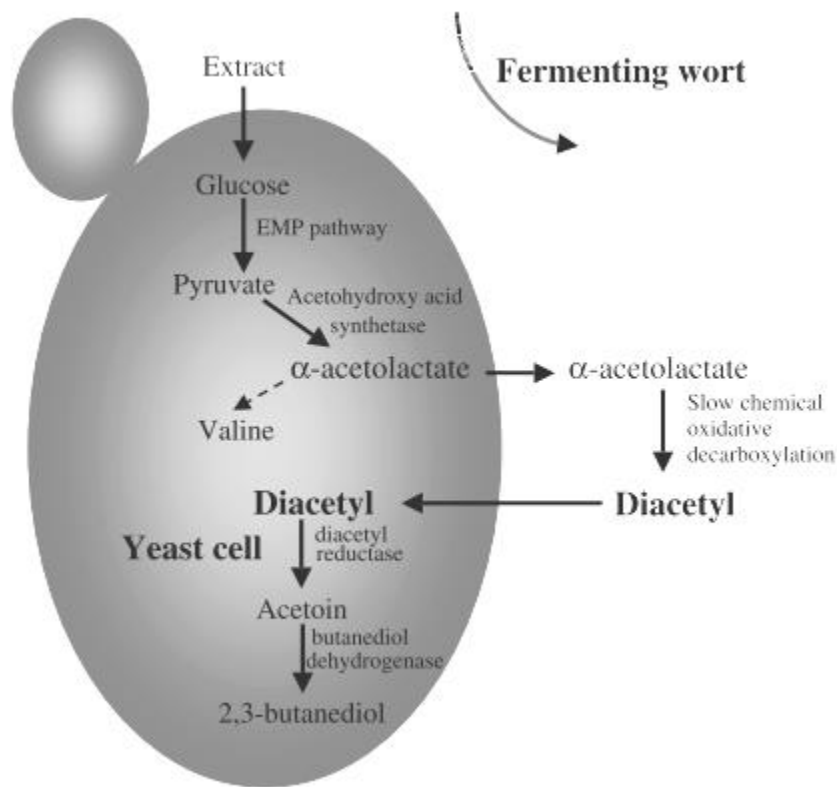
Η μείωση/αφαίρεση των συζυγών δικετόνων από το γλεύκος ή την πράσινη μύρα, μπορεί να πραγματοποιηθεί από τις ζύμες. Οι ζύμες απορροφούν τις συζυγείς δικετόνες και ενδοκυτταρικά, με την βοήθεια των αφυδρογονασών, τις ανάγουν σε ακετοΐνη κι έπειτα σε βουτανοδιόλη και πεντανοδιόλη, αντίστοιχα. Η βουτανοδιόλη και η πεντανοδιόλη έχουν πολύ υψηλό κατώφλι αντίληψης και σε συνδυασμό με την πολύ μικρή συγκέντρωση στην οποία απαντώνται στην μύρα, δε γίνονται αντιληπτές (Kunze, 2004; Stewart & Russell, 2009) .

Από τα παραπάνω, γίνεται αντιληπτό ότι η ποσότητα των ακετοϋδροξέων, καθορίζει την ποσότητα των συζυγών δικετόνων που θα παραχθούν. Για αυτό τον λόγο, η μέτρηση της συνολικής περιεκτικότητας των συζυγών δικετόνων στην μύρα ή στο

γλεύκος, γίνεται με προσμέτρηση των συζυγών δικετόνων αλλά και των πρόδρομων ουσιών τους (Kunze, 2004).

Η μεγαλύτερη συγκέντρωση διακετυλίου παρατηρείται στο τέλος της εκθετικής φάσης ανάπτυξης των ζυμών, ενώ η μείωση της συγκέντρωσής του πραγματοποιείται κατά τα τελευταία στάδια της ζύμωσης. Η συγκέντρωση διακετυλίου στο γλεύκος είναι μια συνάρτηση του ρυθμού παραγωγής των πρόδρομων ουσιών (ακετοϋδροξέων), της μετατροπής τους σε διακετύλιο, του ρυθμού μετατροπής του διακετυλίου σε ακετοΐνη και ακολούθως σε βουτανοδιόλη. Αυτές οι αντιδράσεις μετατροπών εξαρτώνται από το στέλεχος της ζύμης, τόσο βιοχημικά όσο και τεχνολογικά, σε συνδυασμό με την σύσταση του γλεύκους, τις συνθήκες ζύμωσης (π.χ. θερμοκρασία, συγκέντρωση βιομάζας) και τον τύπο του δοχείου ζύμωσης. Αυξημένη συγκέντρωση ακετοϋδροξέων, δεν συνεπάγει αυστηρά υψηλή συγκέντρωση διακετυλίου, καθώς τα κύτταρα των ζυμών μπορούν να μετατρέψουν το διακετύλιο σε βουτανοδιόλη (Stewart & Russell, 2009).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το διακετύλιο παράγεται με αυθόρμητη μη ενζυμική μετατροπή των ακετοϋδροξέων. Αυτή η μετατροπή μπορεί να συμβεί απουσία ζυμών. Για την μετ' έπειτα όμως μετατροπή του διακετυλίου σε βουτανοδιόλη είναι απαραίτητη η παρουσία ζυμών. Σε περιπτώσεις όμως που τα κύτταρα ζύμης είναι σε κακή φυσιολογική κατάσταση ή είναι πολύ λίγα ή και καθόλου, κατά τα τελευταία στάδια ζύμωσης ή κατά την ωρίμανση ή ακόμη και στο τελικό προϊόν, όπως στην περίπτωση πρόωμης συσσωμάτωσης των κυττάρων, φιλτραρίσματος ή παστερίωσης, δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί η μετατροπή του διακετυλίου σε βουτανοδιόλη (παρά μόνο με την προσθήκη ενζύμου). Σε αυτές τις περιπτώσεις πρέπει να δίνεται μεγάλη προσοχή στην ρύθμιση όλων των παραγόντων που διαμορφώνουν την συγκέντρωση του διακετυλίου (Stewart & Russell, 2009).



Σχήμα 2.6.3.2.Γ: Σχηματική αναπαράσταση δημιουργίας, επαναπρόσληψης και απομάκρυνσης του διακετυλίου μέσω του μεταβολισμού του κυττάρου της ζύμης, πηγή Willaert & Nedovic (2006)

## 2.6.4 Θειούχες ενώσεις

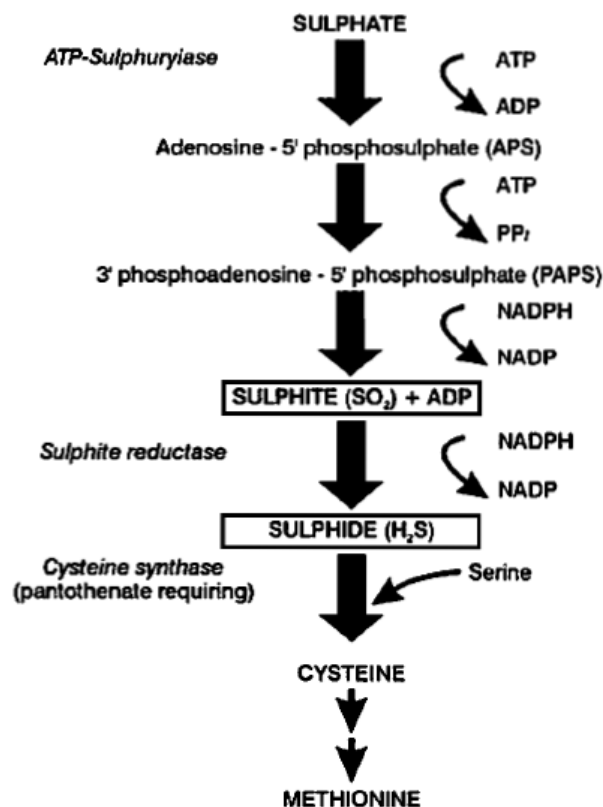
Οι θειούχες ενώσεις είναι δευτερογενή προϊόντα μεταβολισμού ζυμών. Σε μικρές συγκεντρώσεις μπορούν να γίνουν αποδεκτές, αλλά σε υψηλά επίπεδα δίνουν στην μύρα δυσάρεστη γεύση και άρωμα (Stewart, 2017b). Οι ενώσεις αυτές χαρακτηρίζονται από πολύ έντονο άρωμα και γεύση και στην μύρα μπορούν να δώσουν την γεύση της ανώριμης, φρέσκιας μύρας (Kunze, 2004). Κάποιες από τις θειούχες ενώσεις προέρχονται από τις πρώτες ύλες παρασκευής της μύρας, όπως από την βύνη και τον λυκίσκο, πχ το διμεθυλοσουλφίδιο (DMS). Ενώσεις όπως το υδρόθειο, το διοξείδιο του θείου και οι θειόλες προέρχονται από τον μεταβολισμό των ζυμών.



Η παραγωγή και συγκέντρωση υδρόθειου και διοξειδίου του θείου εξαρτώνται από το στέλεχος της ζύμης, την σύσταση του γλεύκους και τις συνθήκες ζύμωσης (Stewart, 2017b).

Το υδρόθειο και το διοξείδιο του θείου δημιουργούνται ως υποπροϊόντα κατά την βιοσύνθεση των αμινοξέων κυστεΐνη και μεθειονίνη (σχήμα 2.6.4.A). Η βιοσύνθεσή τους από την ζύμη, ξεκινά όταν τα αμινοξέα στο γλεύκος βρεθούν υπό έλλειψη (Stewart & Russell, 2009).

Η υψηλή συγκέντρωση υδρόθειου και διοξειδίου του θείου κατά την ζύμωση σχετίζεται με περιορισμό της ανάπτυξης των ζυμών. Για αυτό τον λόγο, παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των ζυμών, αυξάνουν την παραγωγή των δύο παραπάνω θειικών ενώσεων. Επίσης, ένας παράγοντας είναι και η γεωμετρία του δοχείου ζύμωσης (Stewart, 2017b).

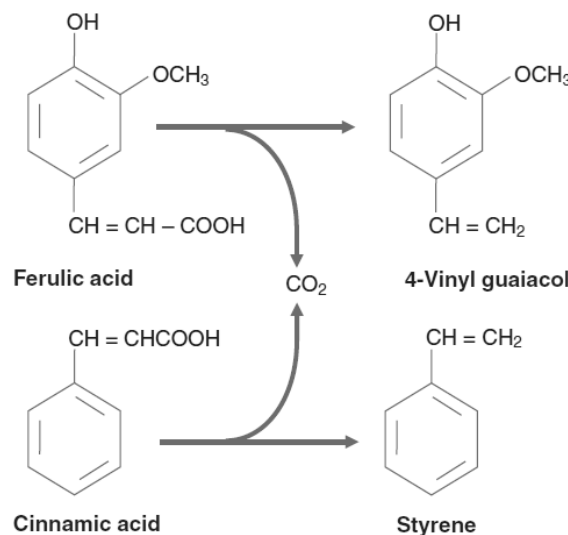


Σχήμα 2.6.4.A: Διάγραμμα βιοσύνθεσης H<sub>2</sub>S και SO<sub>4</sub>, Πηγή: Stewart & Russell (2009)

## 2.6.5 Φαινολικός χαρακτήρας

Ο φαινολικός χαρακτήρας (POF, Phenolic off-flavour) χαρακτηρίζεται ως άρωμα και γεύση γαρύφαλλου, πικάντικου, φαρμακευτικού ή καμένου. Είναι χαρακτηριστικό άρωμα των wheat beers, αλλά μπορεί να βρεθεί και σε Belgian lambic και τύπου Belgian Abbey (μοναστηριακές). Όμως, συνήθως είναι ανεπιθύμητο σε άλλους τύπους μύρας, όπως lager (Boulton, 2013; Michel et al., 2016), χωρίς αυτό να σημαίνει ότι φαινολικές πτητικές ενώσεις δεν μπορούν να βρεθούν σε άλλου τύπου μύρες, καθώς η παραγωγή των ενώσεων αυτών είναι στενά συνδεδεμένες με τον τύπο ζύμης που θα χρησιμοποιηθεί (Scholtes et al., 2014).

Η δημιουργία των αρωμάτων αυτών οφείλεται σε κάποια στελέχη ζυμών, τα οποία κατέχουν ένα γονίδιο, το POF gene, το οποίο αποκωδικοποιεί το ένζυμο αποκαρβοξυλάση φερουλικού οξέος. Το ένζυμο αυτό αποκαρβοξυλιώνει φαινολικά οξέα τα οποία βρίσκονται στο γλεύκος, όπως το φερουλικό και κινναμικό οξύ σε 4-βινυλ-γουαϊακόλη και στυρένιο αντίστοιχα (σχήμα 2.6.5.A) (Boulton, 2013).



Σχήμα 2.6.5.A: Διάγραμμα παραγωγής 4-βινυλ-γουαϊακόλης και στυρένιου, Πηγή: Boulton (2013)

Τα στελέχη που κατέχουν το POF gene χαρακτηρίζονται ως POF<sup>+</sup>, ενώ αυτά που δεν το κατέχουν ως POF<sup>-</sup>. Η πλειοψηφία των ζυμών φαίνεται να είναι POF<sup>+</sup>, όπως έδειξε και η μελέτη των Shinohara et al., (2000) πάνω σε συνολικά 213 στελέχη. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν ότι το 81 – 95 % των 116 εξεταζόμενων στελεχών που χρησιμοποιούνται στην οινοποίηση είναι POF<sup>+</sup>. Επιπρόσθετα, από τα 74 στελέχη *Saccharomyces*

*cerevisiae* το 85 – 97 % ήταν POF<sup>+</sup>, καθώς και το 78 – 83 % από τα 23 non-*Saccharomyces* στελέχη. Συνήθως, τα στελέχη για μύρες lager και συνήθεις ale επιλέγονται να είναι POF<sup>-</sup>, ενώ τα στελέχη για μύρες Weiss επιλέγονται να είναι POF<sup>+</sup>. Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα POF<sup>+</sup> στελεχών ανήκουν στα γένη *Brettanomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Hansenula*, *Pichia*, *Rhodotorula* (Shinohara et al., 2000), καθώς και κάποια είδη του γένους *Klebsiella* (Boulton, 2013).

Το φερουλικό οξύ είναι ένα υδροξυκιναμικό οξύ που περιέχεται στο κριθάρι και το σιτάρι σε αναλογία περίπου 35 – 60 mg/100g (Hernanz et al., 2001; Zupfer et al., 1998) και 50 – 75 mg/100g (Abdel-Aal et al., 2001) ξηρού βάρους, αντίστοιχα. Η αναλογία του μεταβάλλεται ανάλογα με την ποικιλία του σιτηρού κι έχει βρεθεί ότι στους μη σπασμένους κόκκους του κριθαριού, η περιεκτικότητα τόσο του φερουλικού όσο και του κουμαρικού οξέος είναι 5 φορές υψηλότερη συγκριτικά με τους αλεσμένους κόκκους (Hernanz et al., 2001). Η περιεκτικότητα του φερουλικού οξέος στο βυνογλεύκος εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως τον τύπο της βύνης, το πρόγραμμα πολτοποίησης, το pH, τον βαθμό άλεσης της βύνης την προσθήκη αβυνοποίητων σιτηρών κ.α. (Vanbeneden et al., 2008).

Τα POF<sup>+</sup> στελέχη παράγουν πτητικές φαινολικές ενώσεις, όπως την 4-βινυλ-γουαϊακόλη μέσω αποκαρβοξυλίωσης του φερουλικού οξέος. Με τον ίδιο τρόπο σχηματίζονται από το κουμαρικό οξύ, η 4-βινυλ-φαινόλη (πίνακας 2.6.5.A). Οι ουσίες αυτές είναι υπεύθυνες για τα αρώματα που προσδίδουν στην μύρα τον φαινολικό χαρακτήρα (Shinohara et al., 2000).

Σε μύρες που προέρχονται από ζύμωση μόνο από στελέχη *S. cerevisiae*, απαντώνται συνήθως οι ενώσεις 4-βινυλ-γουαϊακόλη και 4-βινυλ-φαινόλη και αυτό διότι ο *S. cerevisiae* μπορεί μόνο να αποκαρβοξυλιώσει τα φαινολικά οξέα προς δημιουργία των παραπάνω ουσιών. Όμως, στελέχη *Brettanomyces* μπορούν και ανάγουν περαιτέρω τις παραπάνω ενώσεις σε 4-αιθυλ-γουαϊακόλη και 4-αιθυλ-φαινόλη (Michel et al., 2016; Shinohara et al., 2000), το ίδιο μπορούν να κάνουν και ορισμένα βακτήρια. Τα στελέχη του *Brettanomyces* είναι επίσης υπεύθυνα και για τη δημιουργία ουσιών που προσδίδουν φαρμακευτικό και ζωικό χαρακτήρα στη μύρα.

Πίνακας 2.6.5.A: Φαινολικές ενώσεις, Πηγή: Michel et al., (2016)

Ένωση	Κατώφλι αντίληψης	Άρωμα
4-βινυλ-γουαϊακόλη	0,3 mg/L	Φαινολικό, Γαρούφαλλο, πικρό
4-βινυλ-φαινόλη	0,2 mg/L	Φαινολικό, καπνιστό/πικάντικο
4-αιθυλ-γουαϊακόλη	0,13 mg/L	Φαινολικό, γλυκό
4-αιθυλ-φαινόλη	0,9 mg/L	Φαινολικό, στυφό

Άλλες συνηθισμένες ενώσεις που προσδίδουν φαινολικά αρώματα είναι οι: 4-βινυλ-συρινγκόλη, στυρένιο, ευγενόλη και βανιλίνη (Michel et al., 2016).

Αξίζει να σημειωθεί ότι η αποκαρβοξυλίωση του φερουλικού οξέος μπορεί να επιτευχθεί και με θερμική διεργασία (Fiddler et al., 1967; McMurrugh et al., 1996). Έτσι, μπορεί να παρατηρηθεί παραγωγή 4-βινυλ-γουαϊακόλης και κατά τον βρασμό, ακόμη και σε ποσότητα κοντά στο όριο αντίληψης (0,3 mg/L). Στην πολτοποίηση όπου η θερμοκρασία είναι μικρότερη των 70 C°, δεν επαρκεί για θερμική αποκαρβοξυλίωση (Coghe et al., 2004). Το μεγαλύτερο όμως ποσοστό αυτών των πτητικών αρωματικών ενώσεων στην μύρα, παράγονται με ενζυματική αποκαρβοξυλίωση από τα POF<sup>+</sup> στελέχη ζυμών κατά την ζύμωση, παρά από την θερμική αποκαρβοξυλίωση (Carvalho & Guido, 2022; Coghe et al., 2004; Fiddler et al., 1967)

Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή 4-βινυλ-γουαϊακόλης, εκτός της ζύμης, είναι οι συνθήκες ζύμωσης, όπως η θερμοκρασία, αλλά και το ποσοστό περιεκτικότητας φερουλικού οξέος. Όμως, το υψηλό επίπεδο φερουλικού οξέος δεν οδηγεί πάντα σε υψηλό ποσοστό 4-βινυλ-γουαϊακόλης (Coghe et al., 2004). Επιπρόσθετα, υπάρχουν παράγοντες που μπορούν να εμποδίσουν την παραγωγή της 4-βινυλ-γουαϊακόλης. Ο λυκίσκος δεν φαίνεται να επηρεάζει το ποσοστό της 4-βινυλ-γουαϊακόλης (Coghe et al., 2004), πιθανόν λόγω της μικρής του περιεκτικότητας στην οποία βρίσκεται, συγκριτικά π.χ. με την ποσότητα της βύνης, αν και συμβάλει στην αύξηση των φαινολικών οξέων κατά 20 – 30 % (Carvalho & Guido, 2022).

Άλλοι παράγοντες ζύμωσης που έχουν συνεργιστικό ρόλο για το ποσοστό 4-βινυλ-γουαϊακόλης που θα παραχθεί είναι ο τύπος και η ποιότητα του σιτηρού, οι συνθήκες πολτοποίησης (λόγω ότι διαμορφώνουν το ποσοστό των φαινολικών οξέων στο γλεύκος), ο τύπος και η φυσιολογική κατάσταση της ζύμης, ο τύπος και το μέγεθος του δοχείου (Coghe et al., 2004).

Τέλος, να αναφερθεί ότι οι πτητικές φαινολικές ενώσεις δεν μένουν σταθερές καθ' όλη την διάρκεια ζωής του προϊόντος. Κατά την αποθήκευση της μύρας, έχουν παρατηρηθεί μεταβολές σε αυτές (Scholtes et al., 2014).

### 3. Υλικά και μέθοδοι

Για την εκτέλεση του πειραματικού μέρους της παρούσας πτυχιακής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα υλικά και εφαρμόστηκαν οι ακόλουθες μέθοδοι.

#### 3.1 Στελέχη ζυμών και ακινητοποίηση κυττάρων ζυμών

Οι ζύμες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι:

- Philly Sour (*Lachancea thermotolerans*, Lallemand),  
<https://www.lallemandbrewing.com/wp-content/uploads/2020/06/Philly-Sour-TDS-ENG-A4-Print-WildBrew.pdf> και [https://www.lallemandbrewing.com/wp-content/uploads/2021/10/LAL-bestpractices-Philly\\_Sour-ENG-A4.pdf](https://www.lallemandbrewing.com/wp-content/uploads/2021/10/LAL-bestpractices-Philly_Sour-ENG-A4.pdf)
- US-05 (*Saccharomyces cerevisiae*, Fermentis),  
<https://fermentis.com/en/product/safale-us-05/>

Οι παραπάνω σύνδεσμοι οδηγούν σε ιστοσελίδες με τα χαρακτηριστικά των ζυμών.

Πραγματοποιήθηκε παρασκευή εμβολίου για την ζύμη US-05 για συγκέντρωση εμβολίου (pitching rate) 0,58 g/L.

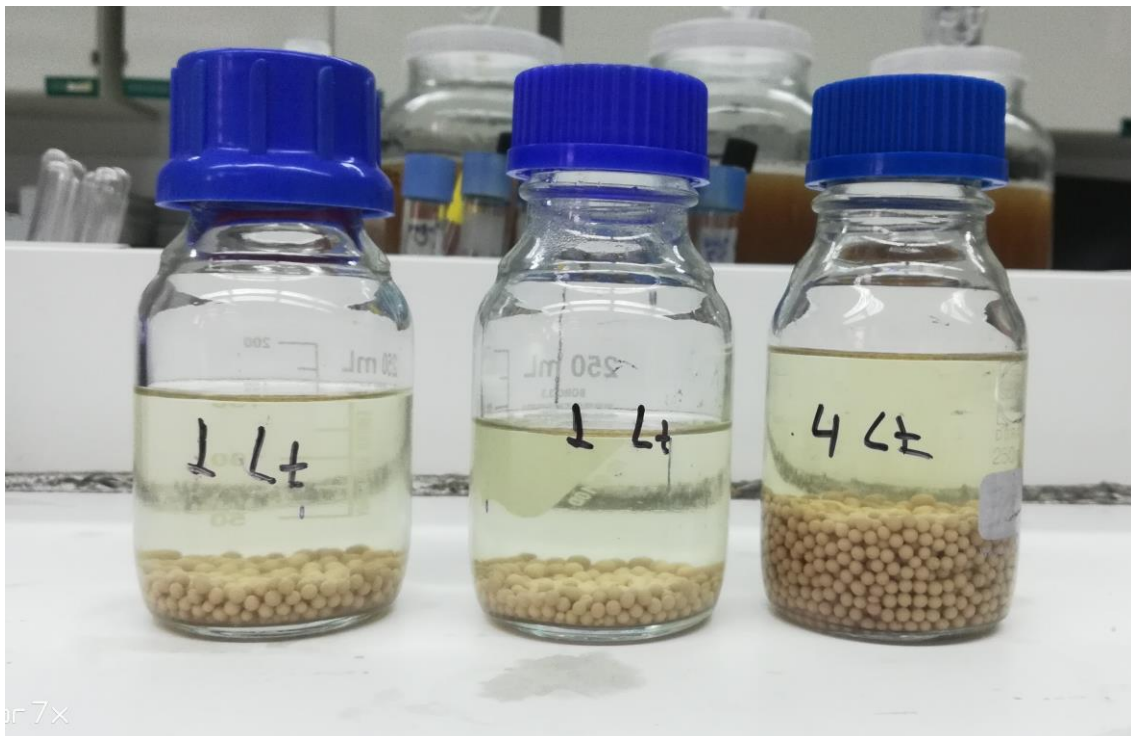
Η ακινητοποίηση των ζυμών (παρασκευή σφαιριδίων) έγινε με τροποποίηση της μεθόδου των Tataridis et al., (2005). Ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

- Παρασκευή και αποστείρωση διαλυμάτων:  
Χλωριούχου ασβεστίου (sds) περιεκτικότητας 2 % και 0,2 % w/v  
Αλγινικού νατρίου (AppliChem) περιεκτικότητας 2,5 % w/v
- Παρασκευή εμβολίου με ζύμη Philly Sour για συγκέντρωση εμβολίου 1,5 g/L.

- Ενυδάτωση της ξηρής ζύμης σε 25 ml αποστειρωμένο νερό + προσθήκη 85 ml διαλύματος αλγινικού νατρίου 2,5 % w/v. Ομογενοποίηση της ενυδατωμένης ζύμης και του διαλύματος αλγινικού νατρίου με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα.

Στη συνέχεια, μετά από υπολογισμό βρέθηκε η ποσότητα (ml) του παραπάνω διαλύματος, που αντιστοιχεί στην κατάλληλη ποσότητα ζύμης για τον εμβολιασμό και μεταφέρθηκαν σε μια αποστειρωμένη πλαστική σύριγγα. Στην σύριγγα τοποθετήθηκε αποστειρωμένη μεταλλική βελόνα διαμέτρου 17G. Χειροκίνητα, παρασκευάστηκαν τα σφαιρίδια μονής ακινητοποίησης, αφήνοντας να πέσουν σταγόνες διαλύματος ζύμης – αλγινικού νατρίου, από ύψος 3 cm, σε υπό ανάδευση διάλυμα  $\text{CaCl}_2$  περιεκτικότητας 2%.

Μετά την παρασκευή τους, και μετά από ~ 1 ώρα τα σφαιρίδια τοποθετήθηκαν σε διάλυμα  $\text{CaCl}_2$  περιεκτικότητας 0,2 % για 24 ώρες, πριν τον εμβολιασμό τους στο γλεύκος (εικόνα 3.1.A).



Εικόνα 3.1.A: Ακινητοποιημένη ζύμη σε σφαιρίδια αλγινικού νατρίου

## 3.2 Παρασκευή γλεύκους

Για την παρασκευή γλεύκους ποσότητας 20 L χρησιμοποιήθηκαν 5 Kg αλεσμένης βύνης στις παρακάτω αναλογίες:

- 80% τύπου Pils, Vergina Thracian Pale Ale, <https://www.thracianmalt.com/malts/thracian-pale-ale/>
- 10% wheat malt, Vergina Thracian wheat, <https://www.thracianmalt.com/malts/thracian-wheat/>
- 5% oat flakes, <https://www.beeramatistirio.gr/product/flaked-oats/>
- 5% Vergina Thracian FBA, <https://www.thracianmalt.com/malts/thracian-f-b-a/>

Το πρόγραμμα πολτοποίησης που ακολουθήθηκε ήταν:

Θερμοκρασία ανάμιξης νερού (Strike water temperature) 68 °C.

- 1 ώρα στους 65 °C
- Σε 7 λεπτά αύξηση της θερμοκρασίας στους 72 °C
- Παραμονή για 15 λεπτά στους 72 °C
- Σε 5 λεπτά αύξηση της θερμοκρασίας στους 77 °C για απενεργοποίηση των ενζύμων

Ακολούθησε η διήθηση και η έκπλυση.

Ο βρασμός του γλεύκους είχε διάρκεια 1 ώρα. Η προσθήκη 15 g λυκίσκου Centennial με α-οξέα 10,6 % έγινε στα 30 λεπτά του βρασμού και ακολούθησε προσθήκη επιπλέον 15 g του ίδιου λυκίσκου στο τέλος του βρασμού (flame out).

Έπειτα εφαρμόστηκε η τεχνική της περιδίνησης (whirlpool) στο γλεύκος, για 15 λεπτά. Τέλος, πραγματοποιήθηκε η ψύξη του γλεύκους, με χρήση εναλλακτών. Εν συνεχεία, το γλεύκος τοποθετήθηκε σε 3 γυάλινα δοχεία ζύμωσης. Στο κάθε δοχείο ζύμωσης



τοποθετήθηκαν 4 L γλεύκος. Το πρώτο δοχείο ζύμωσης εμβολιάστηκε με ζύμη US-05, το δεύτερο με ζύμη Philly Sour σε ελεύθερη μορφή και το τρίτο δοχείο με ζύμη Philly Sour σε ακινητοποιημένη μορφή.

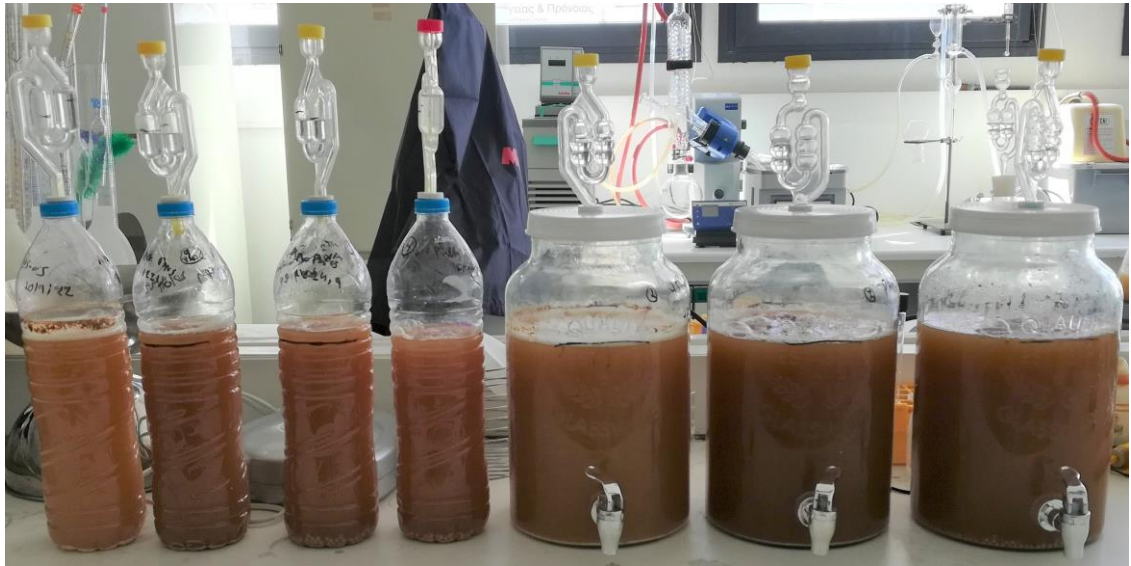
Για την παρακολούθηση της παραγωγής CO<sub>2</sub>, έγινε καταγραφή της μεταβολής του βάρους του εν ζυμώσει γλεύκους. Για τον σκοπό αυτό, τοποθετήθηκε από 1 L γλεύκος σε 3 αποστειρωμένες πλαστικές φιάλες χωρητικότητας 1,5 L και εμβολιάστηκαν όπως τα 3 δοχεία ζύμωσης, αντίστοιχα.

Για την μελέτη των διαδοχικών ζυμώσεων, τοποθετήθηκε 1 L γλεύκος σε αποστειρωμένη πλαστική φιάλη χωρητικότητας 1,5 L και έγινε εμβολιασμός του με ακινητοποιημένη ζύμη. Όλα τα παραπάνω δοχεία σφραγίστηκαν με πλαστικά πώματα και τοποθετήθηκαν αεροπαγίδες με διάλυμα αλκοόλης 70%.

Η ζύμωση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία  $25 \pm 2$  °C, υπό στατικές συνθήκες. Η θερμοκρασία του περιβάλλοντα χώρου ρυθμιζόταν με σύστημα κλιματισμού. Μέτρηση της θερμοκρασίας ζύμωσης πραγματοποιούνταν με ψηφιακό θερμόμετρο, καθημερινά κατά την δειγματοληψία. Μεταβολή στη θερμοκρασία, που πιθανόν έλαβε χώρα κάποια άλλη χρονική στιγμή, δεν μπόρεσε να παρατηρηθεί και να καταγραφεί.

Μετά το τέλος της ζύμωσης, ακολούθησε ψύξη του γλεύκους για 7 ημέρες σε θερμοκρασία 2 °C για την καθίζηση των σωματιδίων και των κυττάρων ζύμης, ώστε να πραγματοποιηθεί διαύγαση (απολάσπωση).

Ακολούθησε προσθήκη δεξτρόζης σε αναλογία 6 g/L για την πραγματοποίηση της δεύτερης ζύμωσης στην φιάλη, ωρίμανση στους 20-25 °C για 30 ημέρες και αποθήκευση υπό ψύξη.



Εικόνα 3.2.A: Δοχεία ζυμώσεων με εμβολιασμένο γλεύκος

### 3.3 Τεστ μείωσης pH του γλεύκους / έλεγχος επιμόλυνσης

Για να να αποκλειστεί η πιθανότητα μείωσης της τιμής του pH από τα συστατικά παρασκευής των σφαιριδίων έγινε παρασκευή ενός μάρτυρα. Για την παρασκευή του μάρτυρα παρασκευάστηκαν σφαιρίδια όπως περιγράφηκε παραπάνω, χωρίς την προσθήκη της ζύμης. Έπειτα, τοποθετήθηκαν σε γυάλινη φιάλη τύπου duran των 250 ml, προστέθηκαν 100 ml γλεύκος και αποστειρώθηκε στους 125 °C για 15 λεπτά. Η αποστείρωση πραγματοποιήθηκε έτσι ώστε να αποκλειστεί και ο παράγοντας της επιμόλυνσης, ως αιτία μείωσης του pH.

### 3.4 Μέθοδοι ανάλυσης

#### 3.4.1 Μετρήσεις Plato και pH

Καθημερινά, καθ' όλη την διάρκεια των ζυμώσεων, καθώς και πριν την εμφιάλωση στις φιάλες και μετά το τέλος της ωρίμανσης, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις τιμών Plato (ASBC Method beer-2B & 3) και pH (ASBC Method beer-9). Για την μέτρηση Plato χρησιμοποιήθηκε το ψηφιακό πυκνόμετρο DMA 35 (Anton Paar), ενώ για τη

μέτρηση του pH χρησιμοποιήθηκε το pHμετρο HI 8010 (HANNA Instruments). Τα Plato ορίζονται ως: η συγκέντρωση του εκχυλίσματος σε gr διαλυμένων στερεών / 100 gr διαλύματος και μονάδα μέτρησης είναι το °P (Plato).

Πριν την μέτρηση Plato και pH, σε ποσότητα δείγματος ~ 30 ml πραγματοποιούνταν απαέρωση με ανακίνηση και φυγοκέντρωση στα 3.500 rpm για 10 λεπτά. Μετά την ολοκλήρωση των παραπάνω μετρήσεων περίπου 20 ml δείγματος τοποθετούνταν σε πλαστικά φιαλίδια και αποθηκευόταν υπό κατάψυξη για περαιτέρω μελλοντική ανάλυση.

### **3.4.2 Μετρήσεις θολερότητας και χρώματος**

Πριν την εμφιάλωση στις φιάλες και στις μπόρες μετά την ωρίμανσή τους, πραγματοποιήθηκε μέτρηση θολερότητας (ASBC Method beer-26) με το μηχάνημα HI88703-Turbidimeter (HANNA Instruments) και χρώματος (ASBC Method beer-10) με το φασματοφωτόμετρο UV mini 1240 (SHIMADZU). Οι μονάδες μέτρησεις θολερότητας και χρώματος είναι εκφρασμένες σε μονάδες EBC.

Πριν τη μέτρηση χρώματος πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στις 3.500 rpm και φιλτράρισμα του δείγματος με φίλτρο 0,45 μm. Στη συνέχεια το δείγμα φωτομετρήθηκε σε μήκος κύματος 430 nm και 700 nm, αντίστοιχα. Για να ελεγχθεί αν το δείγμα ήταν διαυγές, γίνονταν οι παρακάτω υπολογισμοί:

Αν η τιμή της μέτρησης σε μήκος κύματος 700 nm ( $A_{700nm}$ ) ήταν μικρότερη ή ίση από την τιμή της μέτρησης σε μήκος κύματος 430 nm ( $A_{430nm}$ ) x 0,039 τότε το δείγμα ήταν διαυγές. Το ίδιο θα μπορούσε να διαπιστωθεί και με θολερόμετρο. Αν η θολερότητα του δείγματος ήταν μικρότερη από 1 EBC, τότε το δείγμα θα θεωρούνταν διαυγές, ενώ αν ήταν μεγαλύτερη από 1 EBC, θα έπρεπε να γίνει διαύγαση του δείγματος.

Για τον υπολογισμό της τιμής του χρώματος σε μονάδες EBC, χρησιμοποιήθηκε ο παρακάτω τύπος:

Χρώμα μπύρας EBC:  $25 \times A_{430\text{nm}} \times D$ , όπου  $D = \text{o συντελεστής αραίωσης (αν έχει πραγματοποιηθεί αραίωση του δείγματος)}$ .

### 3.4.3 Μέτρηση αλκοόλης

Πραγματοποιήθηκε μέτρηση αλκοόλης σε δείγματα πριν την εμφιάλωση και μετά την ωρίμανση. Η μέτρηση αλκοόλης (ASBC Method beer-4) πραγματοποιήθηκε με το μηχάνημα Alex 500 (Anton Paar). Πριν τη μέτρηση πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 3.500 rpm και φιλτράρισμα του δείγματος με φίλτρο 0,45 μm.

Για τον υπολογισμό του βαθμού ζύμωσης και της απόδοσης σε αιθανόλη χρησιμοποιήθηκε το φαινομενικό τελικό εκχύλισμα σε °P.

### 3.4.4 Μέτρηση ολικής ογκομετρούμενης οξύτητας

Η μέτρηση της ολικής ογκομετρούμενης οξύτητας (ASBC Method beer-8) πραγματοποιήθηκε με τιτλοδότηση με διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) 0,1N, σε δείγματα πριν την εμφιάλωση και μετά την ωρίμανση.

Η ολική ογκομετρούμενη οξύτητα εκφράστηκε σε g/L γαλακτικού οξέος ( $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$ ), χρησιμοποιώντας τον τύπο:

Ολική ογκομετρούμενη οξύτητα, εκφρασμένη σε g/L γαλακτικού οξέος:

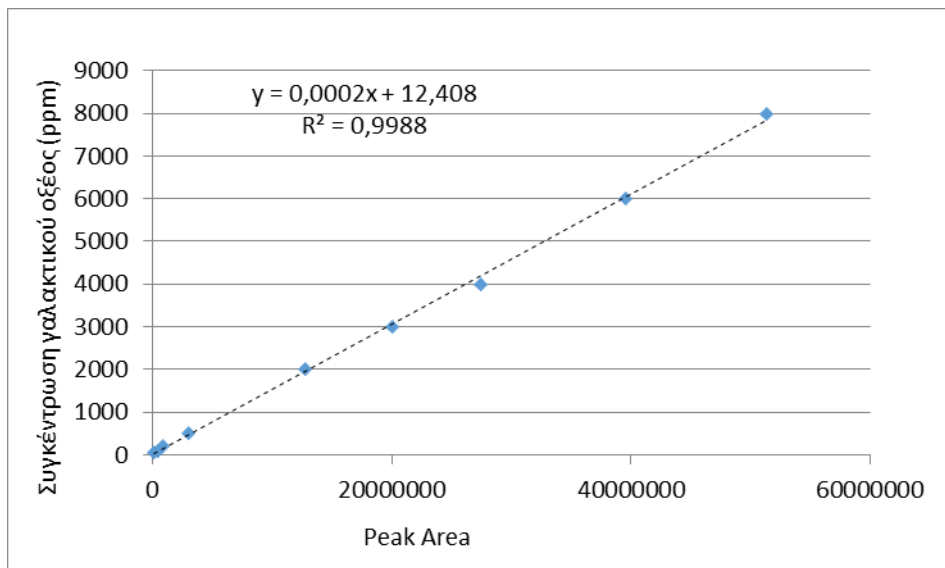
$$= \frac{n \times 0,9 \times 10}{\text{ml δείγματος}}, \text{ όπου } n \text{ τα ml NaOH } 0,1\text{N που καταναλώθηκαν.}$$

### 3.4.5 Ποσοτικός προσδιορισμός γαλακτικού οξέος

Για την ποσοτικοποίηση της περιεκτικότητας σε γαλακτικό οξύ, χρησιμοποιήθηκε σύστημα Υψηλής Απόδοσης Υγρής Χρωματογραφίας HPLC, HITACHI, ELITE LaChrom, L-2130, συδεδεμένο με αυτόματο δειγματολήπτη HITACHI, ELITE LaChrom, L-2200 και ανιχνευτή HITACHI, ELITE LaChrom, Diode Array Detector L-

2455. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Ultra Aqueous C18 (RESTEK), με μήκος 250 mm, εσωτερική διάμετρο 4,6 mm, μέγεθος σωματιδίων 5 μm και μέγεθος πόρων 100 Å. Η μέθοδος διαχωρισμού πραγματοποιήθηκε ισοκρατικά, με διαλύτη H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,005 M και ροή 0,4 ml/min.

Η πρότυπη καμπύλη του γαλακτικού οξέος κατασκευάστηκε με χρήση 9 διαφορετικών συγκεντρώσεων διαλυμάτων γαλακτικού οξέος (8.000, 6.000, 4.000, 3.000, 2.000, 500, 200, 100 και 50 ppm). Η εξίσωση της πρότυπης καμπύλης είναι:  $y = 0,0002x + 12,408$  και  $R^2 = 0,9988$  (σχήμα 3.4.5.A).



Σχήμα 3.4.5.A: Πρότυπη καμπύλη συγκέντρωσης (ppm) γαλακτικού οξέος

Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στα γλεύκη και στα δείγματα μύρας των ζυμώσεων των 4 L (μετά την ωρίμανση).

Η προετοιμασία των δειγμάτων διεξάχθηκε με τον ακόλουθο τρόπο:

Για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών παρασκευάστηκαν τα διαλύματα:

Θειϊκού ψευδαργύρου (ZnSO<sub>4</sub>) 5 %

Υδροξείδιο του βαρίου [Ba(OH)<sub>2</sub>] 0,3 N

Στη συνέχεια, 4 ml δείγματος τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια falcon χωρητικότητας 15 ml και έγινε προσθήκη 0,5 ml διαλύματος  $ZnSO_4$  5 % και 0,5 ml διαλύματος  $Ba(OH)_2$  0,3 N. Ακολούθησε ανάδευση των δειγμάτων με αναστροφή των φιαλιδίων κι έπειτα παραμονή σε ηρεμία για 10 λεπτά. Έπειτα, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στις 3.500 rpm. Το διηθημένο δείγμα μεταφέρθηκε σε νέα φιαλίδια falcon και με τη βοήθεια πιπέτας, ποσότητα δείγματος μεταφέρθηκε σε vial, με ενσωματωμένο φίλτρο 0,45  $\mu m$ .

### 3.4.6 Μέτρηση αρωματικών ουσιών

Η μέτρηση των αρωματικών ουσιών διεξάχθηκε στις μύτερες της πρώτης παρτίδας (των 4 L). Η μέτρηση των αρωματικών ουσιών πραγματοποιήθηκε με χρήση συστήματος αέριας χρωματογραφίας – φασματοφωτόμετρου μάζας, GC-MS SHIMADZU QP2020NX. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η MEGA-WAX MS (MEGA), με μήκος 30 m, εσωτερική διάμετρο 0,25mm και film thickness 0,25  $\mu m$ . Το φέρον αέριο ήταν το ήλιο (He), με παροχή 1 ml/min. Η έγχυση του δείγματος στον χρωματογράφο πραγματοποιήθηκε splitless. Το πρόγραμμα θερμοκρασίας ήταν το ακόλουθο:

- 50 °C, παραμονή για 2,5 λεπτά
- 50 °C έως 180 °C, με ρυθμό αύξησης 2,5 °C / min
- 180 °C έως 230 °C, με ρυθμό αύξησης 2 °C / min
- 230 °C έως 250 °C, με ρυθμό αύξησης 6 °C /min
- 250 °C, παραμονή για 11 λεπτά

Η ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης των ουσιών, έγινε με την χρήση εσωτερικού προτύπου (3-οκτανόλης).

Η προετοιμασία των δειγμάτων περιγράφεται παρακάτω και πραγματοποιήθηκε με τροποποίηση της μεθόδου που περιγράφηκε από τους (Dourtoglou et al., 2014; Drosou, 2022).

Απομάκρυνση του CO<sub>2</sub> με διήθηση της μπύρας εις διπλούν. Ανάδευση για 10 λεπτά, 50 ml δείγματος και 50 ml διχλωρομεθάνιου (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) ως διαλύτη, με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα. Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 3.500 rpm. Συλλογή της οργανικής φάσης (διαλύτης), τέλος πρώτης εκχύλισης. Επανάληψη της διαδικασίας με το δείγμα της πρώτης εκχύλισης και νέο διαλύτη.

Μετά το τέλος και της δεύτερης εκχύλισης, η συνολική ποσότητα της οργανικής φάσης τοποθετείται σε χοάνη με μικρή ποσότητα απιονισμένου νερού, γίνεται ανάδευση, εκτόνωση και συλλογή της οργανικής φάσης. Εν συνεχεία, τοποθετείται σε ανάδευση (3 – 5 λεπτά) με μαγνητικό αναδευτήρα και γίνεται προσθήκη άνυδρου θειικού νατρίου (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) για απορρόφηση του νερού. Έπειτα, πραγματοποιείται διήθηση και προσθήκη 10 ml 3-οκτανόλης συγκέντρωσης 2.500 ppm, ως εσωτερικό πρότυπο. Τέλος, το δείγμα τοποθετείται στο rotary για απομάκρυνση του διαλύτη. Η τελική ποσότητα δείγματος τοποθετείται σε vial και αποθηκεύτηκε υπό κατάψυξη.

### 3.4.7 Οργανοληπτική ανάλυση

Η οργανοληπτική ανάλυση των έτοιμων προϊόντων (μπύρες) πραγματοποιήθηκε από εκπαιδευμένο πάνελ 10 ατόμων (4 άνδρες και 6 γυναίκες). Πραγματοποιήθηκε δοκιμή περιγραφικής ανάλυσης, σε μη βαθμονομημένη κλίμακα 0 έως 10. Το 0 αντιστοιχούσε στην απουσία του χαρακτηριστικού, ενώ το 10 στο μέγιστό του.

Η οργανοληπτική δοκιμή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο οργανοληπτικού ελέγχου, η θερμοκρασία του χώρου ήταν 23 – 25 °C. Τα δείγματα δώθηκαν στους δοκιμαστές σε θερμοκρασία 3 – 4 °C και μαζί με τα δείγματα τους δώθηκε και ένα ποτήρι νερό.

Η περιγραφική ανάλυση έγινε ως προς τα ακόλουθα χαρακτηριστικά: γλυκιά γεύση, πικρή γεύση, ξινή γεύση, διακετύλιο, ακεταλδεΰδη, DMS, άρωμα δημητριακών, φαινολικές ενώσεις, άρωμα καπνιστού, θειούχες ενώσεις, βουτυρικό οξύ, άρωμα λυκίσκου, φρουτώδη αρώματα - τροπικά φρούτα, φρουτώδη αρώματα - εσπεριδοειδή, φρουτώδη αρώματα - ροδάκινο, βερύκοκο, ανθικά αρώματα, άρωμα μελιού, άρωμα ζύμωσης/ζύμη, άρωμα ξυδιού, στυπτικότητα, τσίμπημα CO<sub>2</sub>, ένταση επίγευσης, διάρκεια επίγευσης.

### 3.5 Στατιστική επεξεργασία

Όλες οι μετρήσεις στα δείγματα πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν, εκτός από τις μετρήσεις της Αέριας Χρωματογραφίας και της οργανοληπτικής ανάλυσης, οι οποίες πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν. Για την δημιουργία των διαγραμμάτων, την εύρεση του μέσου όρου και της τυπικής απόκλισης χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Microsoft Excel Spreadsheets. Για τον υπολογισμό της τυπικής απόκλισης χρησιμοποιήθηκε η συνάρτηση STDEV.S, που χρησιμοποιεί τον ακόλουθο τύπο:

$$s = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}$$

Όπου  $s$ = η τυπική απόκλιση του δείγματος,  $N$ = το πλήθος των δειγμάτων,  $x_i$ = οι τιμές των δειγμάτων,  $\bar{x}$ = ο μέσος όρος των τιμών των δειγμάτων.

Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων, χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό κριτήριο Μονοπαραγοντική Ανάλυση της Διακύμανσης (ANOVA) και Tukey's test, σε επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha=0,05$ . Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με χρήση του στατιστικού λογισμικού προγράμματος Minitab 19.



## 4. Αποτελέσματα και συζήτηση

### 4.1 Κατανάλωση εκχυλίσματος και πτώση pH

Σημειώνεται ότι οι ζυμώσεις με τη ζύμη US-05 διεξήχθησαν (αν και δεν ενδείκνυται για την ποιότητα της μπύρας) στην ίδια υψηλή θερμοκρασία των  $25 \pm 2^\circ \text{C}$ , ώστε να μπορεί να γίνει καλύτερη σύγκριση με την Philly Sour.

#### 4.1.1 Μετρήσεις στις ζυμώσεις των 4 L και του 1 L

Καθημερινά, καθ' όλη την διάρκεια των ζυμώσεων πραγματοποιούνταν μετρήσεις κατανάλωσης του εκχυλίσματος σε βαθμούς Plato ( $^\circ\text{P}$ ) και pH. Στα διαγράμματα που ακολουθούν, απεικονίζονται αυτές οι μετρήσεις τόσο για την πρώτη σειρά ζυμώσεων (1<sup>η</sup> παρτίδα), όσο και για την επαναληπτική (2<sup>η</sup> παρτίδα).

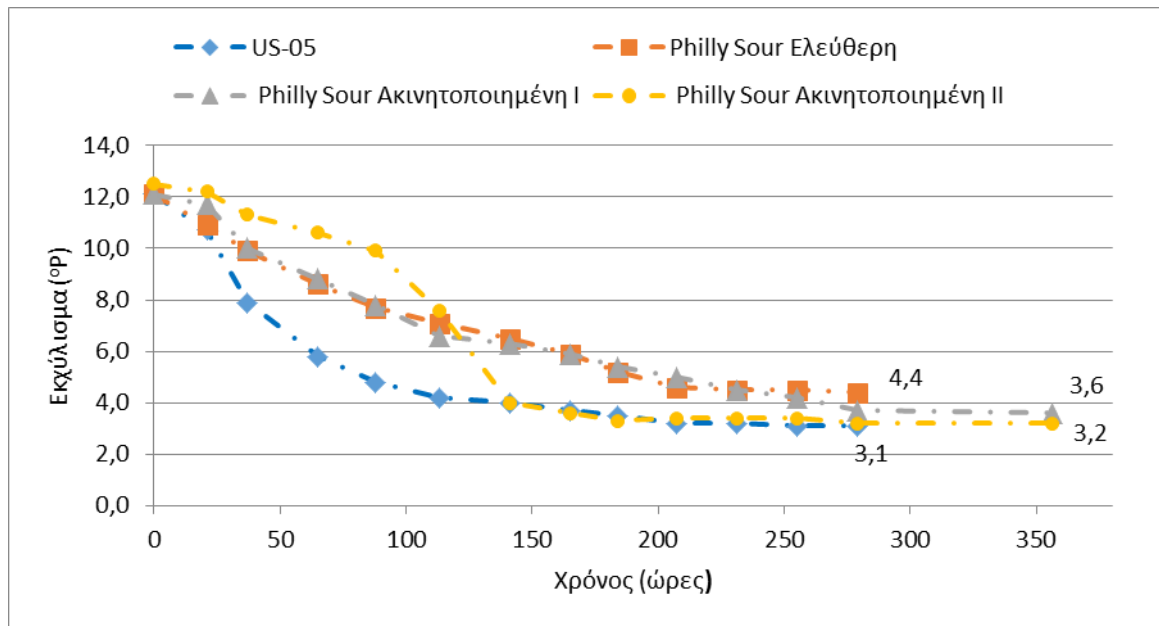
Όσο αφορά την 1<sup>η</sup> παρτίδα, στη ζύμωση με US-05, η μείωση των βαθμών Plato ήταν πιο γρήγορη. Η Philly Sour τόσο σε ελεύθερη, όσο και σε ακινητοποιημένη μορφή, μείωσε τους βαθμούς Plato σχεδόν με τον ίδιο ρυθμό. Σχετικά με την επαναληπτική ζύμωση (2<sup>η</sup> παρτίδα), κατά τις πρώτες 3 ημέρες ζύμωσης, η Philly Sour σε ακινητοποιημένη μορφή, ζύμωνε με αργό ρυθμό. Στη συνέχεια, μείωσε τους βαθμούς Plato από  $7,6^\circ\text{P}$  την 5<sup>η</sup> μέρα ζύμωσης, σε  $4,0^\circ\text{P}$  κατά την 6<sup>η</sup> μέρα. Από την 8<sup>η</sup> ημέρα (~ 189 ώρες) κι έπειτα υπήρξε σταθεροποίηση της καμπύλης. Η ολοκλήρωση της ζύμωσης πραγματοποιήθηκε κατά την 12<sup>η</sup> ημέρα, καθώς όπως δείχνουν οι μετρήσεις, η τιμή Plato παρέμεινε σταθερή για τις επόμενες 4 ημέρες ( $3,2^\circ\text{P}$ ) (σχήμα 4.1.1.A). Η πιο αργή έναρξη της κατανάλωσης του εκχυλίσματος ίσως να οφείλεται στην πιο αργή προσαρμογή των κυττάρων να μεταβολίσουν το εκχύλισμα, στην ποσότητα του διαλυμένου οξυγόνου, ή την πραγματοποίηση κάποιας τυχαίας μεταβολής στην θερμοκρασία ζύμωσης, που την μετατόπισε από αυτή της βέλτιστης.

Και στις 4 περιπτώσεις, από την 9<sup>η</sup> ημέρα ζύμωσης (~ 200 ώρες) κι έπειτα, υπάρχει σταθεροποίηση της καμπύλης για όλες τις ζυμώσεις. Η συνολική διάρκεια ζύμωσης

ήταν 12 ημέρες για τις ζυμώσεις με US-05 και Philly Sour σε ελεύθερη μορφή, ενώ 16 ημέρες για την Philly Sour σε ακινητοποιημένη μορφή.

Κάποιες διαφορές, παρουσιάστηκαν κατά το τέλος των ζυμώσεων. Στη ζύμωση με US-05, η τελική τιμή Plato ήταν 3,1 °P, με Philly Sour σε ακινητοποιημένη μορφή ήταν 3,6 °P και 3,2 °P στην επαναληπτική ζύμωση, ενώ στη ζύμωση με Philly Sour σε ελεύθερη μορφή ήταν 4,4 °P, λόγω διακοπής της ζύμωσης. Η πραγματοποίηση διακοπής της ζύμωσης διαπιστώνεται με τις μετρήσεις Plato στις ζυμώσεις με Philly Sour σε ελεύθερη μορφή, τόσο στην φιάλη του 1 L που χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση παραγωγής CO<sub>2</sub> παράλληλα με την ζύμωση της 1<sup>ης</sup> παρτίδας, όσο και στη φιάλη του 1 L της επαναληπτικής παρτίδας, όπου η τελική τιμή Plato κατά το τέλος της πρώτης ζύμωσης κυμάνθηκε από 3,2 – 3,3 °P.

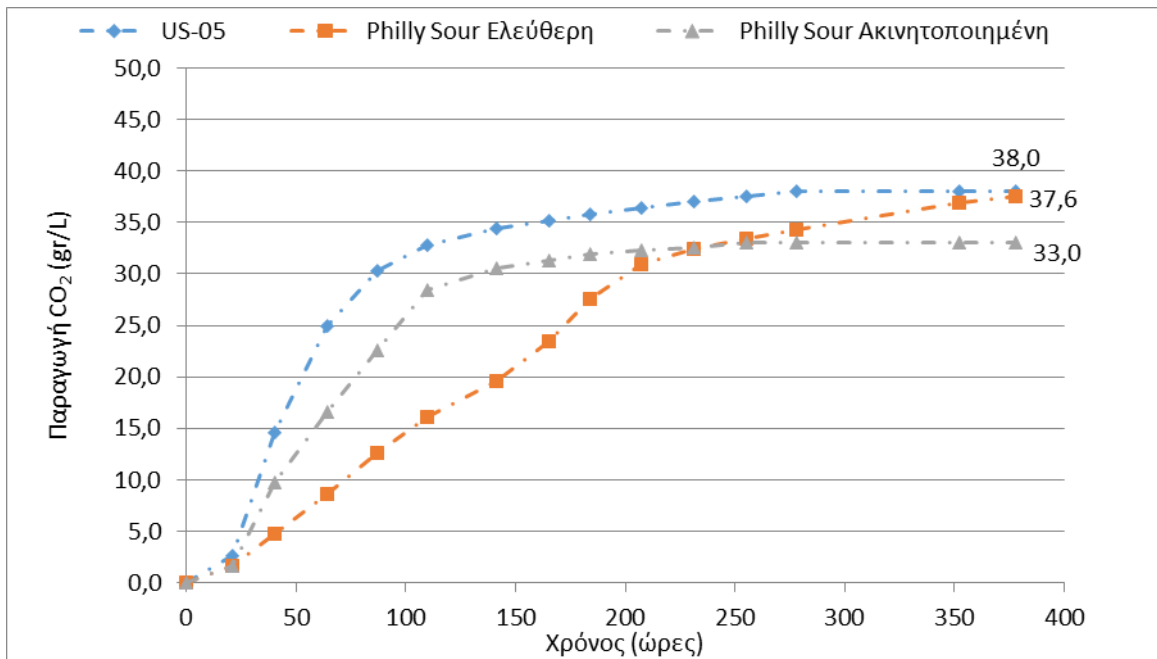
Η διακοπή της ζύμωσης μπορεί να οφείλεται σε κάποια μεταβολή της θερμοκρασίας ζύμωσης, το οποίο όμως δεν είναι αρκετά πιθανό, διότι μια τέτοια μεγάλη αλλαγή της θερμοκρασίας, ικανή να προκαλέσει διακοπή της ζύμωσης, θα επηρέαζε και τις άλλες ζυμώσεις. Το πιο πιθανό είναι να έλαβε χώρα κάποια αλλαγή στον μεταβολισμό των κυττάρων της ζύμης, καθώς υπάρχει το ενδεχόμενο η συγκεκριμένη ζύμη να χρειάζεται ένα μικρό χρόνο προσαρμογής όταν πραγματοποιείται μεταβολή του μεταβολισμού της, ανάλογα με το είδος του σακχάρου που θα μεταβολίσει. Υπάρχει μεγάλη πιθανότητα, η ζύμωση να συνεχιζόταν κανονικά, έπειτα από κάποιες μέρες και ίσως να ολοκληρωνόταν στις 16 ημέρες ζύμωσης, όπως στην περίπτωση της ζύμωσης με Philly Sour σε ακινητοποιημένη μορφή. Ένα ερώτημα που προκύπτει είναι γιατί δε συνέβη το ίδιο και στις άλλες ζυμώσεις με Philly Sour. Η απάντηση είναι ότι μπορεί να συνέβη το ίδιο, αλλά όχι σε τόσο έντονο βαθμό ώστε να παρατηρηθεί διακοπή της ζύμωσης.



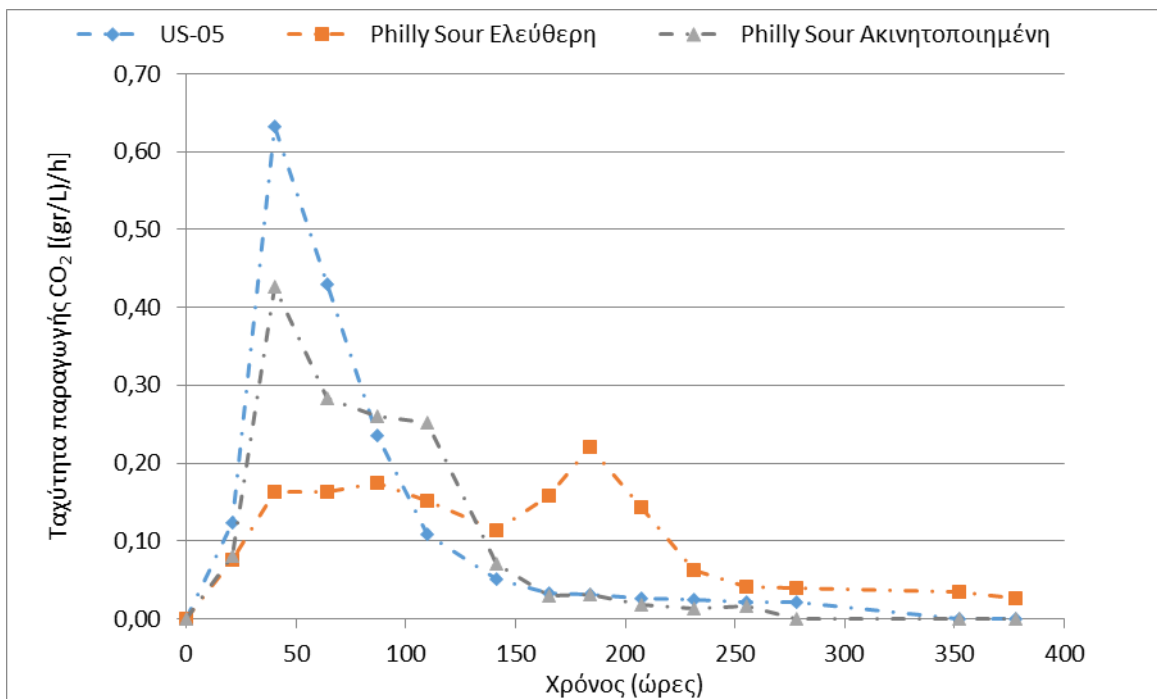
Σχήμα 4.1.1.A: Μέτρηση εκχυλίσματος (°P), τυπική απόκλιση < 0,1

Στο σχήμα 4.1.1.B απεικονίζεται η παραγωγή CO<sub>2</sub> (gr/L) και στο σχήμα 4.1.1.Γ η ταχύτητα παραγωγής CO<sub>2</sub> [(gr/L)/h]. Και σε αυτά τα διαγράμματα φαίνεται ότι η πιο γρήγορη ζύμωση είναι με την US-05. Ακολουθεί η ζύμωση με Philly Sour ακίνητοποιημένη, με λίγο μικρότερη ταχύτητα παραγωγής CO<sub>2</sub>. Η US-05 και η Philly Sour σε ακίνητοποιημένη μορφή, είχαν την βέλτιστη ταχύτητα, την ίδια σχεδόν χρονική στιγμή. Στη ζύμωση με Philly Sour σε ελεύθερη μορφή, παράγεται CO<sub>2</sub> με πιο αργό ρυθμό, αλλά η τελική ποσότητα παραγωγής είναι σχεδόν όμοια με αυτή της ζύμωσης με US-05, σε αντίθεση με την ζύμωση με Philly Sour ακίνητοποιημένη, όπου η τελική ποσότητα CO<sub>2</sub> είναι μικρότερη.

Κάτι το οποίο μπορεί να παρατηρηθεί στο διάγραμμα ταχυτήτων είναι ότι υπήρξαν χρονικές περιόδους για την Philly Sour σε ελεύθερη και ακίνητοποιημένη μορφή, όπου η ταχύτητα παραγωγής CO<sub>2</sub> παρέμεινε σχεδόν σταθερή και εν συνεχεία υπήρξε μείωση της ταχύτητας για την Philly Sour σε ακίνητοποιημένη μορφή, ενώ για την Philly Sour σε ελεύθερη μορφή υπήρξε αύξηση. Αξίζει να σημειωθεί ότι για την Philly Sour σε ελεύθερη μορφή, η ταχύτητα απέκτησε την μέγιστη τιμή στις 184 ώρες ζύμωσης, όταν οι άλλες 2 ζυμώσεις είχαν σχεδόν ολοκληρωθεί. Αυτό μπορεί να αποτελεί ακόμα μια ένδειξη ότι η Philly Sour σε ελεύθερη μορφή είχε πιο αργό ρυθμό ζύμωσης, ίσως λόγω χρόνου προσαρμογής των κυττάρων σε αλλαγές του μεταβολισμού τους, και ότι θα μπορούσε να ολοκληρώσει την ζύμωση και στις κανονικές ζυμώσεις των 4 L, αλλά σε μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.



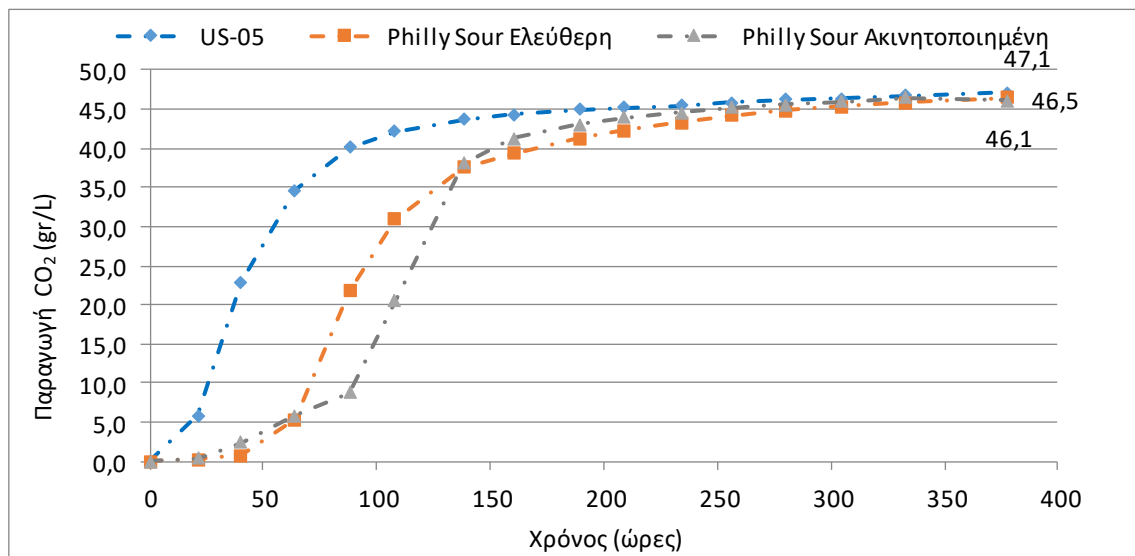
Σχήμα 4.1.1.Β: Μέτρηση παραγωγής CO<sub>2</sub> (gr/L) 1<sup>ης</sup> παρτίδας, τυπική απόκλιση 0,00



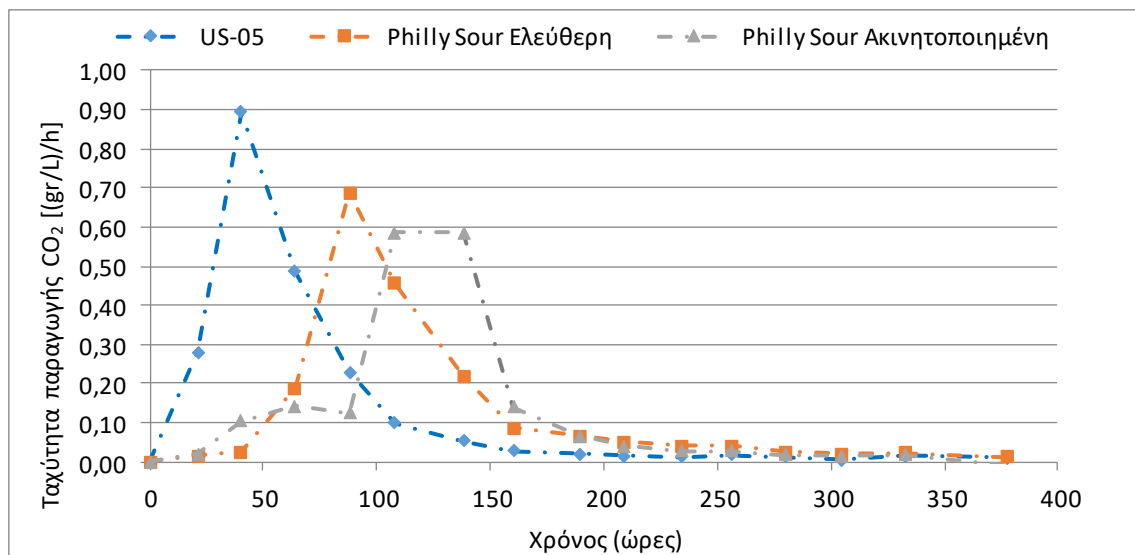
Σχήμα 4.1.1.Γ: Διάγραμμα ταχυτήτων παραγωγής CO<sub>2</sub> [(gr/L)/h] 1<sup>ης</sup> παρτίδας, τυπική απόκλιση 0,00

Στις ζυμώσεις της 2<sup>ης</sup> παρτίδας, όπως διακρίνεται στα σχήματα 4.1.1.Δ και 4.1.1.Ε, στη ζύμωση με US-05 η παραγωγή CO<sub>2</sub> ήταν πιο γρήγορη, όπως και στην 1<sup>η</sup> παρτίδα. Ακολουθεί η Philly Sour σε ελεύθερη μορφή κι έπειτα σε ακίνητοποιημένη. Στο τέλος της ζύμωσης της 2<sup>ης</sup> παρτίδας και στις 3 ζυμώσεις παράχθηκε η ίδια ποσότητα CO<sub>2</sub>.

Στις ζυμώσεις της 2<sup>ης</sup> παρτίδας παρατηρείται ότι οι ζυμώσεις με Philly Sour είχαν πιο αργό ρυθμό στην αρχή της ζύμωσης από ότι η US-05 και απέκτησαν την μέγιστη ταχύτητά τους πιο μετά από την US-05, η οποία και στις 2 παρτίδες, αποκτά την μέγιστη ταχύτητα περίπου στις 50 ώρες ζύμωσης. Αυτό δείχνει ότι η Philly Sour έχει διαφορετικό ρυθμό μεταβολισμού των σακχάρων από την US-05.



Σχήμα 4.1.1.Α: Μέτρηση παραγωγής CO<sub>2</sub> (gr/L) 2<sup>ης</sup> παρτίδας, τυπική απόκλιση 0,00

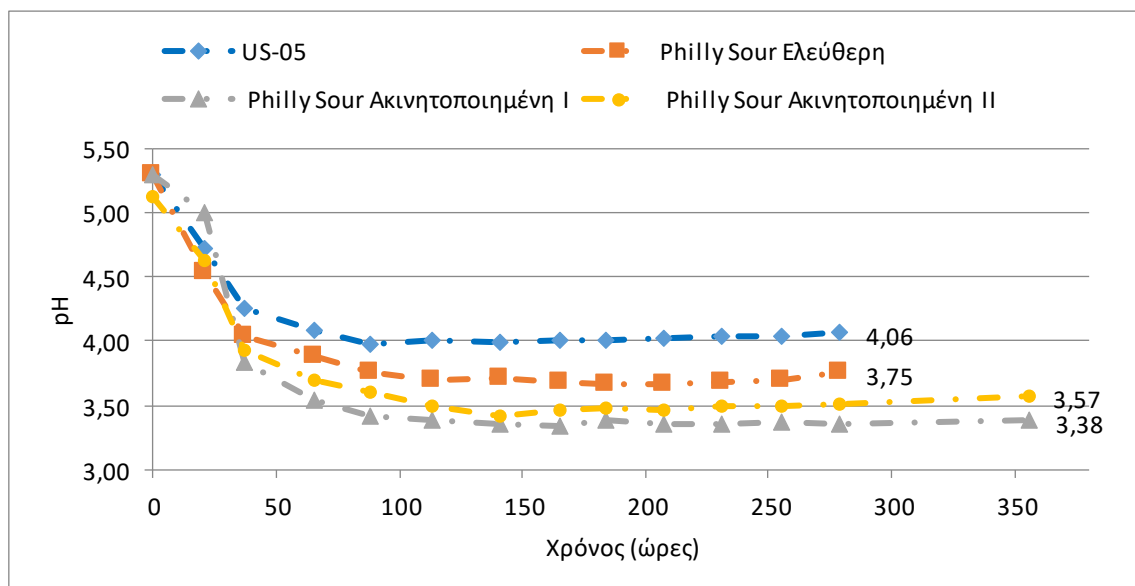


Σχήμα 4.1.1.Ε: Ταχύτητες παραγωγής CO<sub>2</sub> [(gr/L)/h] 2<sup>ης</sup> παρτίδας, τυπική απόκλιση 0,00

Μεγάλη πτώση της τιμής του pH σημειώθηκε κατά τις πρώτες 4 ημέρες ζύμωσης και για τις δύο παρτίδες. Η ζύμωση με την χαμηλότερη τιμή pH ήταν και στις δύο παρτίδες αυτή με την Philly Sour σε ακίνητοποιημένη μορφή, με τιμή pH 3,38 στην 1<sup>η</sup> παρτίδα

και 3,56 στην 2<sup>η</sup> παρτίδα. Για την 1<sup>η</sup> παρτίδα, ακολουθεί η ζύμωση με Philly Sour σε ελεύθερη μορφή, η οποία είχε τιμή pH 3,75 και τέλος η ζύμωση με την US-05 με pH 4,06 (σχήμα 4.1.1.ΣΤ).

Η μεγαλύτερη πτώση της τιμής του pH στις ζυμώσεις με Philly Sour σε ακινητοποιημένη μορφή ίσως να οφείλεται στην ακινητοποίηση των κυττάρων. Λόγω της ακινητοποίησης, επηρεάζεται η φυσιολογία, η μορφολογία και η μεταβολική δραστηριότητα των κυττάρων των ζυμών (Willaert & Nedovic, 2006) και μπορεί να οδηγήσει μεταξύ άλλων και σε αλλαγές στον ρυθμό πρόσληψης των ουσιών του υποστρώματος και της παραγωγής προϊόντων μεταβολισμού (Norton & D'Amore, 1994). Για τους παραπάνω λόγους, μπορεί να παράχθηκε μεγαλύτερη ποσότητα γαλακτικού οξέος (ή και άλλων οξέων) από τα ακινητοποιημένα κύτταρα ζύμης συγκριτικά με τα ελεύθερα.



Σχήμα 4.1.1.ΣΤ: Μέτρηση pH, τυπική απόκλιση < 0,02

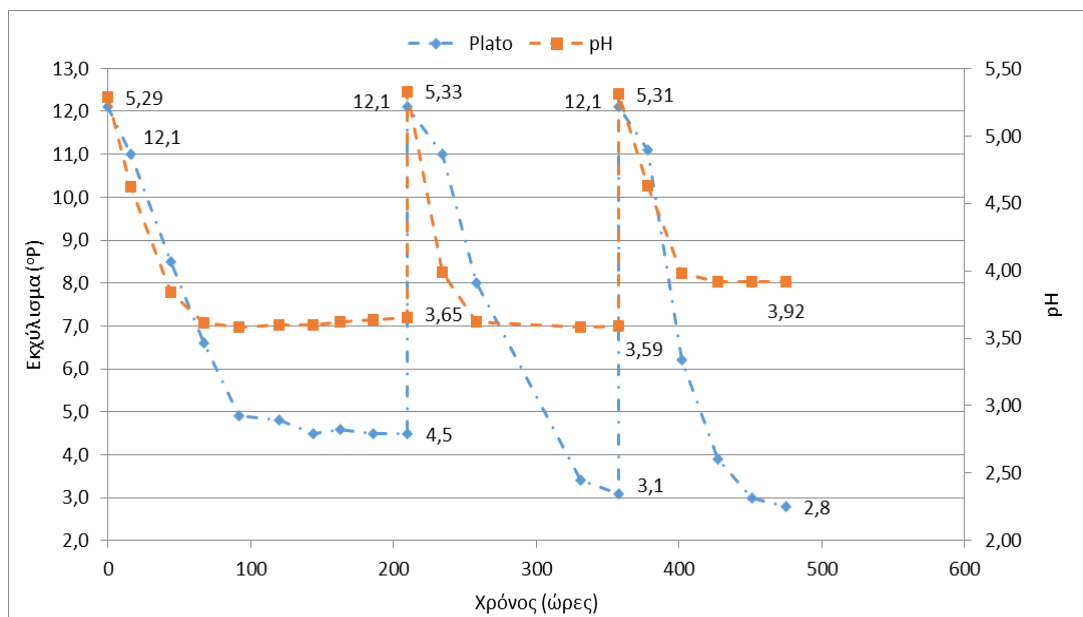
#### 4.1.2 Μετρήσεις στις διαδοχικές ζυμώσεις

Στην 1<sup>η</sup> παρτίδα, η μείωση της τιμής Plato πραγματοποιήθηκε με παρόμοιο ρυθμό για την 1<sup>η</sup> και 2<sup>η</sup> διαδοχική ζύμωση, ενώ στην 3<sup>η</sup> διαδοχική υπήρξε απότομη πτώση του Plato κατά την 2<sup>η</sup> ημέρα, από 11,1 °P στα 6,2 °P. Παρατηρείται ότι η ζύμωση ολοκληρώνεται σε ίσο ή μικρότερο χρονικό διάστημα από την 1<sup>η</sup> διαδοχική, στην 2<sup>η</sup> και στην 3<sup>η</sup> διαδοχική ζύμωση αντίστοιχα.

Πιθανή αιτία για αυτό, είναι το ενδεχόμενο ότι τα κύτταρα ζύμης ενδεχομένως είναι περισσότερα και έχουν ήδη προσαρμοστεί στην παρουσία του γλεύκους και στον μεταβολισμό των σακχάρων, με αποτέλεσμα τον χρόνο μείωσης της κατανάλωσης του εκχυλίσματος.

Αυτό που μπορεί να παρατηρηθεί είναι ότι υπήρξε διακοπή της ζύμωσης στην 1<sup>η</sup> διαδοχική ζύμωση, καθώς η τιμή Plato παρέμεινε στο 4,5 °P, κάτι ανάλογο που παρατηρήθηκε και στην ζύμωση των 4 L με Philly Sour σε ελεύθερη μορφή, με τις πιθανές αιτίες που αναφέρθηκαν παραπάνω για την διακοπή της ζύμωσης, να ισχύουν και σε αυτή την περίπτωση (υποκεφάλαιο 4.1.1).

Όσο αφορά την πτώση του pH, στην 2<sup>η</sup> διαδοχική ζύμωση σημειώθηκε πιο γρήγορη πτώση συγκριτικά με την 1<sup>η</sup> ζύμωση. Πιο συγκεκριμένα, στην 1<sup>η</sup> ζύμωση, κατά την 1<sup>η</sup>, την 2<sup>η</sup> και 3<sup>η</sup> ημέρα οι τιμές pH ήταν 4,62, 3,84 και 3,61 αντίστοιχα. Στην 2<sup>η</sup> διαδοχική ζύμωση οι τιμές ήταν 3,99 και 3,62 κατά την 1<sup>η</sup> και 2<sup>η</sup> ημέρα αντίστοιχα. Στη συνέχεια, η τιμή pH σταθεροποιήθηκε και για τις δύο ζυμώσεις περίπου στο 3,60. Σε αντίθεση, στην 3<sup>η</sup> διαδοχική ζύμωση, η πτώση του pH κυμάνθηκε κατά της πρώτες 2 ημέρες όπως στην 1<sup>η</sup> ζύμωση, όμως παρέμεινε σε υψηλότερη τιμή (3,92), συγκριτικά με τις άλλες 2 ζυμώσεις.



Σχήμα 4.1.2.Α: Διαδοχικές ζυμώσεις 1<sup>ης</sup> παρτίδας, τυπική απόκλιση < 0,1 (°P) και < 0,02 (pH)

Η πιο γρήγορη πτώση της τιμής του pH ίσως να οφείλεται στην προσαρμογή των κυττάρων στην παραγωγή του γαλακτικού οξέος, ήδη από την 1<sup>η</sup> ζύμωση, όμοια με την προσαρμογή στην πιο γρήγορη κατανάλωση των σακχάρων. Σχετικά με την 3<sup>η</sup> διαδοχική ζύμωση, όπου σημειώθηκε πιο αργή πτώση του pH, συγκριτικά με την 2<sup>η</sup> διαδοχική ζύμωση, αλλά και τελική τιμή pH υψηλότερη από τις 2 προηγούμενες ζυμώσεις, υπάρχουν τρεις πιθανοί λόγοι που μπορεί να συμβάλλουν σε αυτά.

Ο πρώτος λόγος είναι η πιθανή αλλαγή του μεταβολισμού των κυττάρων. Είναι πιθανό, τα κύτταρα κατά την αρχή της ζύμωσης να μεταβολίζουν την γλυκόζη και να παράγουν κυρίως γαλακτικό οξύ και CO<sub>2</sub>, για αυτό και η μεγάλη πτώση του pH πραγματοποιείται κατά την πρώτες 3 – 4 ημέρες ζύμωσης. Αυτό αναφέρεται και από την εταιρεία Lallemand σε σχετικά βίντεο (σύνδεσμοι για τα βίντεο στο υποκεφάλαιο 2.3). Στη συνέχεια, ο μεταβολισμός των κυττάρων αλλάζει, όταν ξεκινά να καταναλώνει την μαλτόζη και να την μεταβολίζει ως προς CO<sub>2</sub>, αιθανόλη και άλλα προϊόντα μεταβολισμού. Ο αργός ρυθμός ζύμωσης που παρατηρείται για κάποια χρονικά διαστήματα στη ζύμη Philly Sour, ίσως να οφείλεται σε αυτή την αλλαγή του μεταβολισμού, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω. Έτσι, όταν τα κύτταρα έχουν αλλάξει μεταβολισμό και από τον μεταβολισμό της γλυκόζης περάσουν στον μεταβολισμό της μαλτόζης, μπορεί να είναι δύσκολο, όταν εμβολιάζονται στο νέο γλεύκος (της 2<sup>ης</sup> και 3<sup>ης</sup> διαδοχικής ζύμωσης) να μεταβολίσουν με τον ίδιο τρόπο την γλυκόζη και να παράξουν αποτελεσματικά γαλακτικό οξύ, με αποτέλεσμα να μην μειώνεται στον ίδιο βαθμό η τιμή του pH. Όμως, χρειάζεται παραπάνω διερεύνηση, διότι δεν υπάρχει μέχρι στιγμής, κάποια δημοσιευμένη έρευνα που να αποδεικνύει την παραπάνω πιθανή αιτία.

Ο δεύτερος πιθανός λόγος είναι τυχόν διαφοροποίηση στη συγκέντρωση εμβολίου, κατά τον εμβολιασμό των σφαιριδίων ζύμης στο νέο γλεύκος. Λόγω πολλαπλασιασμού, στην 2<sup>η</sup> και 3<sup>η</sup> διαδοχική ζύμωση θα υπάρχουν περισσότερα κύτταρα από ότι στην 1<sup>η</sup> ζύμωση. Στην παρούσα εργασία είχαν πραγματοποιηθεί δειγματοληπτικά μετρήσεις πληθυσμού και βιωσιμότητας των ακινητοποιημένων κυττάρων (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται), αλλά τα αποτελέσματα των μετρήσεων μπορεί να διαφέρουν σημαντικά από σφαιρίδιο σε σφαιρίδιο.

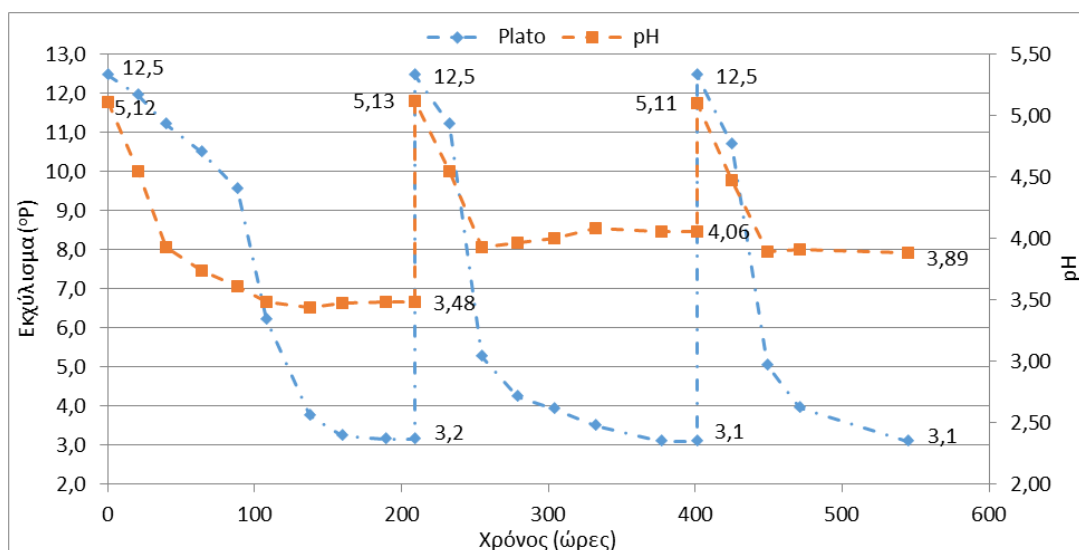


Ένας τρίτος λόγος που μπορεί να επηρεάζει την παραγωγή γαλακτικού οξέος είναι η ηλικία των κυττάρων, καθώς μπορεί να παραμένουν εντός των σφαιριδίων μεγάλος αριθμός ηλικιωμένων κυττάρων, με αποτέλεσμα την μη ικανοποιητική παραγωγή γαλακτικού οξέος ή/και αιθανόλης, καθώς όπως θα αναφερθεί στο παρακάτω υποκεφάλαιο, παρατηρείται μείωση της απόδοσης σε αιθανόλη από διαδοχική σε διαδοχική ζύμωση.

Στην 2<sup>η</sup> παρτίδα πραγματοποιήθηκε πιο γρήγορη και απότομη πτώση Plato στην 2<sup>η</sup> και στην 3<sup>η</sup> διαδοχική, από ότι στην 1<sup>η</sup> ζύμωση. Πιο συγκεκριμένα, στην 1<sup>η</sup> ζύμωση η τιμή Plato κατά την 2<sup>η</sup> μέρα ήταν 11,2 °P, ενώ στην 2<sup>η</sup> και 3<sup>η</sup> διαδοχική ζύμωση, η τιμή Plato κατά την 2<sup>η</sup> μέρα ήταν 5,3 °P και 5,0 °P αντίστοιχα.

Διαφορές με την 1<sup>η</sup> παρτίδα υπήρξαν και στην πτώση του pH. Κατά τις πρώτες περίπου 24 ώρες η τιμή του pH μειώθηκε από 5,13 στο 4,55, 4,53 και 4,48 για την 1<sup>η</sup>, 2<sup>η</sup> και 3<sup>η</sup> ζύμωση. Κατά την 1<sup>η</sup> ζύμωση η τιμή του pH συνεχίστηκε να μειώνεται, με την τελική τιμή να είναι 3,48. Στην 2<sup>η</sup> ζύμωση, από την 2<sup>η</sup> μέρα της ζύμωσης μέχρι και την ολοκλήρωσή της, η τιμή του pH κυμάνθηκε στο 4,0. Όμοια, στην 3<sup>η</sup> διαδοχική ζύμωση, μετά την 2<sup>η</sup> μέρα η τιμή του pH άρχισε να σταθεροποιείται, με την τελική να είναι 3,89.

Οι πιθανές αιτίες για τις διαφορές στον ρυθμό κατανάλωσης του εκχυλίσματος, του pH και της μη μείωσης του pH στην 2<sup>η</sup> και 3<sup>η</sup> διαδοχική ζύμωση, παραμένουν οι ίδιες όπως αναλύθηκαν παραπάνω για τα αποτελέσματα των διαδοχικών ζυμώσεων της 1<sup>ης</sup> παρτίδας.



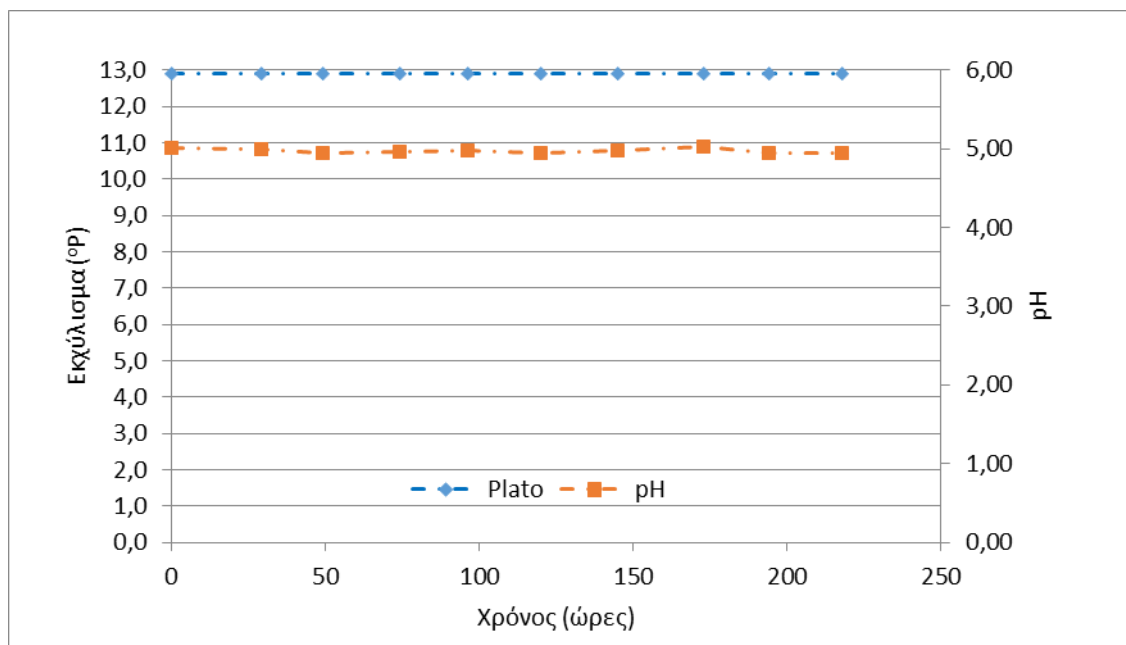
Σχήμα 4.1.2.Β: Διαδοχικές ζυμώσεις 2<sup>ης</sup> παρτίδας, τυπική απόκλιση < 0,1 (°P) και < 0,02 (pH)

Συμπερασματικά, και στις 2 παρτίδες των διαδοχικών ζυμώσεων, η ζύμη Philly Sour συμπεριφέρθηκε με παρόμοιο τρόπο, παρουσιάζοντας ίση ή πιο γρήγορη κατανάλωση των σακχάρων στην 2<sup>η</sup> και 3<sup>η</sup> διαδοχική ζύμωση, συγκριτικά με την 1<sup>η</sup> ζύμωση. Η τιμή του pH δεν μειώνεται στον ίδιο βαθμό στην 2<sup>η</sup> και 3<sup>η</sup> διαδοχική ζύμωση, παραμένοντας σε υψηλότερη τιμή από ότι αυτή της 1<sup>ης</sup> ζύμωσης.

### 4.1.3 Τεστ μείωσης pH του γλεύκους / έλεγχος επιμόλυνσης

Στο σχήμα 4.1.3.A παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από το τεστ μείωσης pH του γλεύκους.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν υπήρξε αλλαγή στην τιμή του Plato, άρα δεν υπήρξε ζύμωση λόγω κάποιας επιμόλυνσης του γλεύκους, ούτε πτώση στην τιμή του pH. Αυτό δείχνει ότι το υλικό από το οποίο κατασκευάστηκαν τα σφαιρίδια, δεν επηρεάζει την μεταβολή του pH. Η μικρή διακύμανση της τάξης του 0,01 – 0,07 που παρατηρείται στην τιμή του pH, μπορεί να αποδοθεί στην ακρίβεια μέτρησης του οργάνου.



Σχήμα 4.1.3.A: Τεστ μείωσης εκχυλίσματος & pH γλεύκους, τυπική απόκλιση < 0,1 (°P) και < 0,02 (pH)

## 4.2 Μετρήσεις τελικού φαινομενικού εκχυλίσματος, φαινομενικού βαθμού ζύμωσης, αιθανόλης, απόδοσης σε αιθανόλη, pH, ολικής ογκομετρούμενης οξύτητας, χρώματος και θολερότητας

### 4.2.1 Μετρήσεις στη μύρα των ζυμώνσεων των 4 L

Οι τιμές Plato στις τελικές μύρες κυμάνθηκαν στο 3,0 – 3,2 °P, με εξαίρεση την μύρα από ζύμωση με Philly Sour σε ελεύθερη μορφή, όπου η τιμή Plato ήταν 3,9 °P λόγω διακοπής της ζύμωσης.

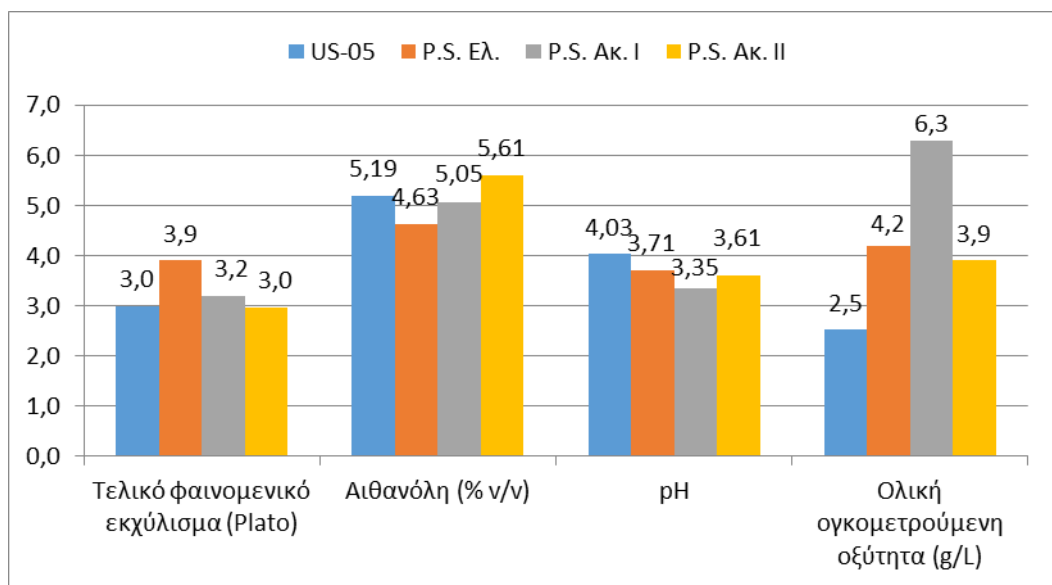
Ο φαινομενικός βαθμός ζύμωσης (%) κυμάνθηκε από 67,50 – 76,27 %, με την χαμηλότερη τιμή (67,50 %) να αντιστοιχεί στην ζύμωση στην οποία πραγματοποιήθηκε διακοπή. Ο μέσος όρος του φαινομενικού βαθμού ζύμωσης των υπόλοιπων 2 ζυμώνσεων με Philly Sour ήταν 74,8 %, κάτι το οποίο είναι σε συμφωνία με την τιμή που δίνει η εταιρεία για τον βαθμό ζύμωσης της συγκεκριμένης ζύμης (74 – 82 %) (σχήμα 4.2.1.B).

Όπως παρατηρείται από τις μετρήσεις της τιμής του pH στην 1<sup>η</sup> παρτίδα, στις μύρες που παράχθηκαν με ζύμωση με την Philly Sour, το pH ήταν χαμηλότερο από αυτή που ζυμώθηκε με την US-05. Πιο συγκεκριμένα, το pH στην μύρα που παράχθηκε με US-05 ήταν 4,03, σε αυτή με την χρήση της Philly Sour σε ελεύθερη μορφή ήταν 3,71 και στην μύρα με χρήση της Philly Sour σε ακινητοποιημένη μορφή ήταν 3,35. Στην επαναληπτική ζύμωση όμως με Philly Sour σε ακινητοποιημένη μορφή, η τιμή του pH ήταν 3,61, λίγο πιο υψηλή από ότι στην 1<sup>η</sup> ζύμωση. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε κάποια μικρή διαφοροποίηση της σύστασης του γλεύκους της 2<sup>ης</sup> παρτίδας, που μπορεί να επηρέασε την παραγωγή του γαλακτικού οξέος.

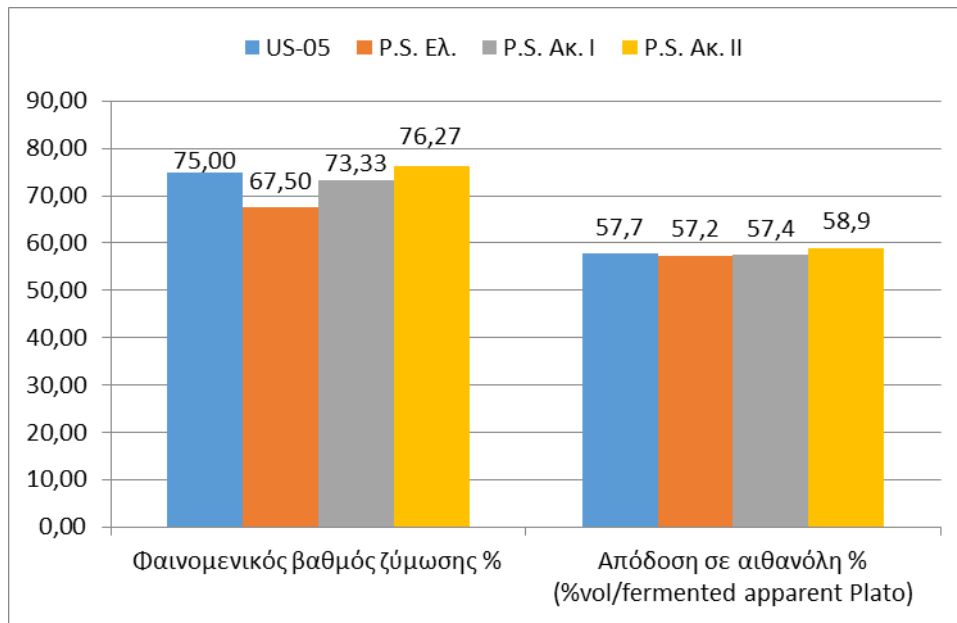
Οι μύρες από ζύμωση με Philly Sour είχαν μεγαλύτερη ολική ογκομετρούμενη οξύτητα εκφρασμένη σε g/L γαλακτικού οξέος (από 3,9 g/L έως 6,3 g/L), από ότι είχαν οι μύρες από ζύμωση με US-05 (2,5 g/L).

Η παραγωγή αιθανόλης στις μύρες της 1<sup>ης</sup> παρτίδας ήταν: με χρήση της US-05: 5,19 % v/v, με χρήση της Philly Sour σε ελεύθερη μορφή: 4,63 % v/v (χαμηλότερη τιμή λόγω

της διακοπής της ζύμωσης), με χρήση της Philly Sour σε ακινητοποιημένη μορφή 5,05 % v/v. Στην επαναληπτική ζύμωση, λόγω της υψηλότερης αρχικής τιμής Plato στο γλεύκος (12,5 °P), ήταν υψηλότερη και η τελική συγκέντρωση αιθανόλης, 5,61 % v/v. Όπως προκύπτει από τις τιμές απόδοσης σε αιθανόλη (%) σε σύγκριση με τη μείωση των βαθμών Plato (σχήμα 4.2.1.B), η απόδοση σε αιθανόλη ήταν σχεδόν ίδια σε όλες τις μπύρες, ανεξάρτητα με το στέλεχος της ζύμης ή την μέθοδο ζύμωσης (σε ελεύθερη ή ακινητοποιημένη μορφή).



**Σχήμα 4.2.1.A: Μετρήσεις τελικού φαινομενικού εκχυλίσματος, αιθανόλης, pH, ολικής ογκομετρούμενης οξύτητας, τυπική απόκλιση < 0,06 (°P), < 0,01 (αιθανόλη), < 0,01 (pH), < 0,04 (ολική οξύτητα)**



**Σχήμα 4.2.1.B: Τελικός φαινομενικός βαθμός ζύμωσης % και απόδοση σε αιθανόλη %, τυπική απόκλιση < 0,06 και < 0,01 αντίστοιχα**

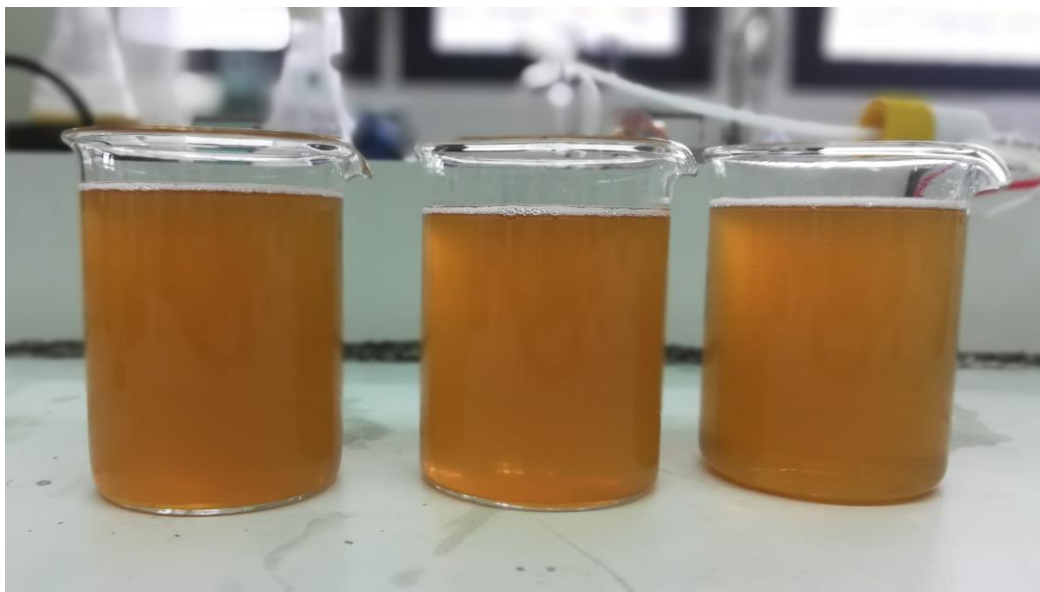
Οι μετρήσεις για το χρώμα σε μονάδες EBC, έδειξαν τιμή χρώματος 11,1 – 11,9 EBC, τιμές που αντιστοιχούν στο κίτρινο-πορτοκαλί χρώμα, σύμφωνα με την κλίμακα EBC. Οι τιμές αυτές είναι τυπικές για τις ανοιχτόχρωμες μύρες. Αυτό δείχνει ότι δεν υπάρχει κάποια σημαντική διαφορά στο χρώμα, ανεξάρτητα από το στέλεχος ζύμης που χρησιμοποιήθηκε ή/και την μορφή της ζύμης (ελεύθερη ή ακινητοποιημένη). Οι εικόνες 4.2.1.A και 4.2.1.B είναι φωτογραφίες από τις μύρες της 1<sup>ης</sup> παρτίδας, όπου γίνεται αντιληπτό ότι η τιμή χρώματος είναι σύμφωνη με το πραγματικό χρώμα της μύρας.

Οι τιμές για την θολερότητα εκφρασμένη σε μονάδες EBC, για την μύρα κυμάνθηκαν 16,5 – 26,9 EBC, με εξαίρεση την χαμηλή τιμή 5,6 στην μύρα με ζύμωση με Philly Sour σε ελεύθερη μορφή. Όμως, αν και η δειγματοληψία για την μέτρηση της θολερότητας στη μύρα έγινε με σωστό τρόπο, οι τιμές αυτές μπορούν να είναι μόνο ενδεικτικές και όχι αντιπροσωπευτικές, διότι λόγω της δεύτερης ζύμωσης στην φιάλη, ο πληθυσμός των κυττάρων ζύμης μπορεί να διαφέρει από φιάλη σε φιάλη, με αποτέλεσμα να επηρεάζει την τιμή της θολερότητας. Για αυτό τον λόγο, στον πίνακα 4.2.1.A, αναγράφονται και οι τιμές της θολερότητας μετά την απολάσπωση και πριν την εμφιάλωση, οι οποίες είναι πιο αντιπροσωπευτικές, αν και σε όλες τις μετρήσεις θολερότητας υπάρχει αυξημένη τυπική απόκλιση. Οι τιμές για την θολερότητα, δείχνουν ότι οι μύρες που παράχθηκαν έχουν μεγάλη θολερότητα. Σε αυτό, συνέβαλλε

η χρήση σιταριού και βρώμης στην παρασκευή του γλεύκους, αυξάνοντας έτσι το πρωτεϊνικό θόλωμα, αλλά και η δεύτερη ζύμωση στη φιάλη, όπου τα κύτταρα ζυμών συνεισφέρουν στην αύξηση της θολερότητας (διαφοροποίηση ανά φιάλη).



**Εικόνα 4.2.1.A: Μπύρες 1<sup>ης</sup> παρτίδας, από αριστερά προς τα δεξιά: US-05, Philly Sour ελεύθερη μορφή, Philly Sour ακινητοποιημένη μορφή**



**Εικόνα 4.2.1.B: Μπύρες 1<sup>ης</sup> παρτίδας, από αριστερά προς τα δεξιά: US-05, Philly Sour ελεύθερη μορφή, Philly Sour ακινητοποιημένη μορφή**

Πίνακας 4.2.1.A: Μετρήσεις στη μύρα

	US -05	Philly Sour Ελεύθερη	Philly Sour Ακίνητοποιημένη I	Philly Sour Ακίνητοποιημένη II
Τελικό φαινομενικό εκχύλισμα (°P)	3,0 ±0,00	3,9 ±0,00	3,2 ±0,00	3,0 ±0,06
Τελικός φαινομενικός βαθμός ζύμωσης %	75,00 ±0,00	67,5 ±0,00	73,33 ±0,00	76,27 ±0,06
Αιθανόλη (% v/v)	5,19 ±0,01	4,63 ±0,01	5,05 ±0,01	5,61 ±0,01
Απόδοση σε αιθανόλη % (%vol/fermented apparent °P)	57,7 ±0,01	57,2 ±0,01	57,4 ±0,01	58,9 ±0,01
pH	4,03 ±0,01	3,71 ±0,01	3,35 ±0,01	3,61 ±0,01
Ολική ογκομετρούμενη οξύτητα*	2,5 ±0,03	4,2 ±0,04	6,3 ±0,04	3,9 ±0,04
Χρώμα (EBC)	11,6 ±0,01	11,4 ±0,01	11,1 ±0,03	11,9 ±0,00
Θολρότητα (EBC) (προ εμφιάλωσης)	113,3 ±0,58	58,1 ±0,06	141,3 ±0,58	97,6 ±1,21
Θολρότητα (EBC) (μύρα)	16,5 ±1,13	5,6 ±0,04	17,3 ±0,06	26,9 ±1,31

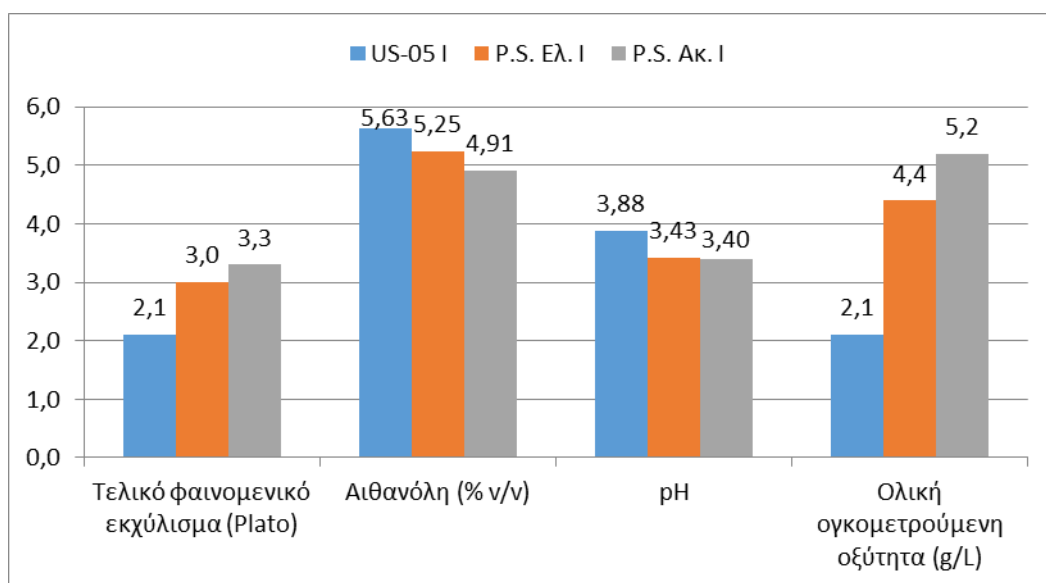
\* Εκφρασμένη σε g/L γαλακτικού οξέος.

## 4.2.2 Μετρήσεις στη μύρα των ζυμώσεων του 1 L

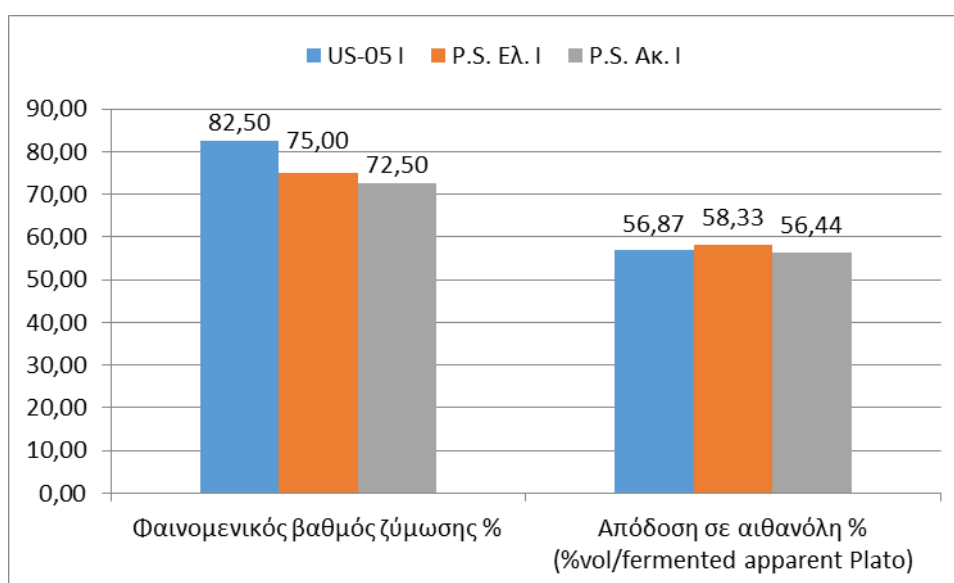
Οι ζυμώσεις του 1 L σε φιάλες διεξάχθηκαν παράλληλα με τις ζυμώσεις των 4 L. Οι ζυμώσεις του 1 L διεξάχθηκαν για την παρακολούθηση παραγωγής CO<sub>2</sub>, χωρίς δειγματοληψία και διεξαγωγή μετρήσεων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Μετρήσεις έγιναν μόνο κατά την αρχή και το τέλος της ζύμωσης, καθώς και στην μύρα. Αν και οι συνθήκες ζύμωσης ήταν ίδιες για τις ζυμώσεις των 1 και 4 L για την 1<sup>η</sup> παρτίδα και αντίστοιχα για την 2<sup>η</sup> παρτίδα, παρουσιάστηκαν μικρές διαφορές μεταξύ τους.

Η πιο αξιοσημείωτη παρατήρηση είναι αυτή στην τιμή pH για την ζύμωση με Philly Sour στην ζύμωση του 1 L της 1<sup>η</sup> παρτίδας. Η τιμή του pH στην ζύμωση με Philly Sour σε ελεύθερη και ακίνητοποιημένη μορφή ήταν 3,43, και 3,40 αντίστοιχα, αρκετά πιο χαμηλή συγκριτικά με τις τιμές pH στις υπόλοιπες ζυμώσεις. Όμως και η τιμή pH για την μύρα από ζύμωση με US-05 ήταν μικρότερη από αυτή της τιμής pH από την ζύμωση των 4 L (4,03 έναντι 3,88). Αυτό, ίσως να οφείλεται σε σφάλμα μέτρησης του οργάνου (άλλη χρονική στιγμή μετρήθηκε το pH στις μύρες των 4 L και άλλη στις μύρες του 1 L).

Όσο αφορά τον φαινομενικό βαθμό ζύμωσης (%) και την απόδοση σε αιθανόλη (%), οι τιμές ήταν λίγο μικρότερες από τις αντίστοιχες τιμές από τις μπύρες των ζυμώσεων των 4 L και κυμάνθηκαν σε όμοια επίπεδα και στις μπύρες από ζύμωση με Philly Sour σε ελεύθερη και ακινητοποιημένη μορφή.



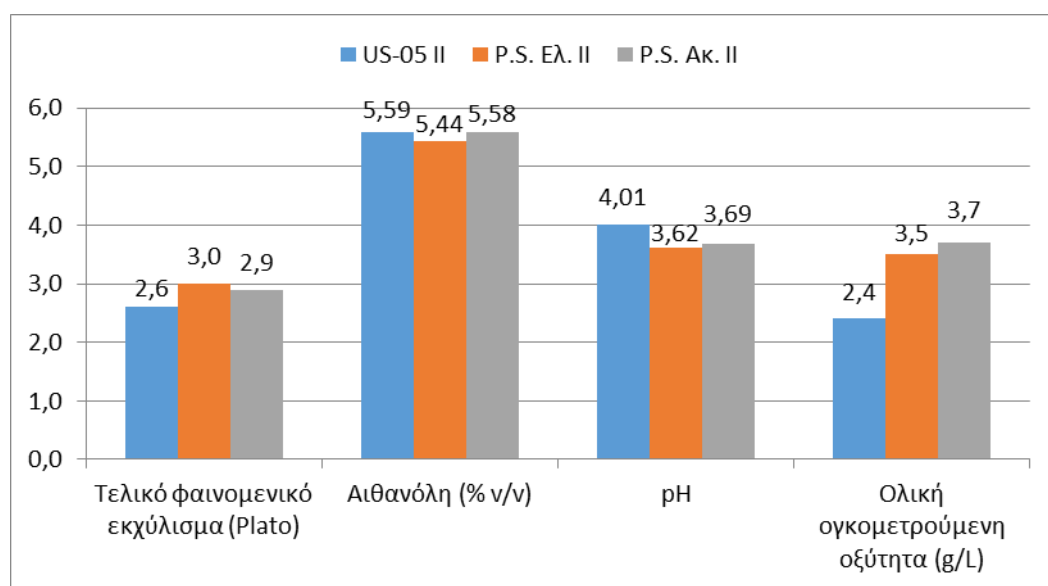
**Σχήμα 4.2.2.Α: Μετρήσεις τελικού φαινομενικού εκχυλίσματος, αιθανόλης, pH, ολικής ογκομετρούμενης οξύτητας στις ζυμώσεις του 1 L της 1<sup>ης</sup> παρτίδας, τυπική απόκλιση < 0,06 (°P), < 0,01 (αιθανόλη), < 0,02 (pH), < 0,08 (ολική οξύτητα)**



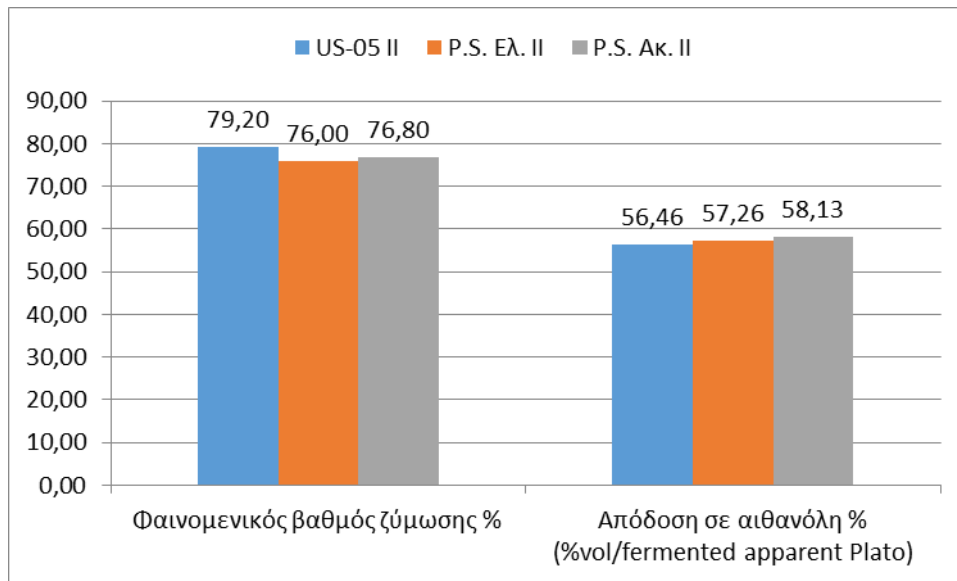


**Σχήμα 4.2.2.Β: Τελικός φαινομενικός βαθμός ζύμωσης % και απόδοση σε αιθανόλη % στις ζυμώσεις του 1 L της 1<sup>ης</sup> παρτίδας, τυπική απόκλιση < 0,06 και < 0,01 αντίστοιχα**

Στις ζυμώσεις του 1 L της 2<sup>ης</sup> παρτίδας, οι τιμές pH ήταν μεγαλύτερες από αυτές τις 1<sup>ης</sup> παρτίδας και πιο κοντά στις τιμές pH της μύρας από ζύμωση των 4 L. Ο φαινομενικός βαθμός ζύμωσης ήταν καλύτερος από αυτόν της 1<sup>ης</sup> παρτίδας, ενώ η απόδοση σε αιθανόλη κυμάνθηκε σε παρόμοιες τιμές. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση αιθανόλης οφείλεται στη μεγαλύτερη συγκέντρωση εκχυλίσματος του γλεύκους της 2<sup>ης</sup> παρτίδας.



**Σχήμα 4.2.2.Γ: Μετρήσεις τελικού φαινομενικού εκχυλίσματος, αιθανόλης, pH, ολικής ογκομετρούμενης οξύτητας στις ζυμώσεις του 1 L της 2<sup>ης</sup> παρτίδας, τυπική απόκλιση < 0,06 (°P), < 0,02 (αιθανόλη), < 0,01 (pH), < 0,08 (ολική οξύτητα)**



**Σχήμα 4.2.2.Α: Τελικός φαινομενικός βαθμός ζύμωσης % και απόδοση σε αιθανόλη % στις ζυμώσεις του 1 L της 2<sup>ης</sup> παρτίδας, τυπική απόκλιση < 0,06 και < 0,02 αντίστοιχα**

Οι τιμές για το χρώμα κυμάνθηκαν σε παρόμοιο επίπεδο και στις 2 παρτίδες. Επίσης, ήταν παρόμοιες με τις τιμές για τις μύρες των ζυμώσεων των 4 L. Οι τιμές για την θολερότητα, έχουν μεγάλη διακύμανση μεταξύ τους, αλλά σε όλες τις περιπτώσεις υποδεικνύουν μια μύρα με αυξημένη θολερότητα. Όλα τα αποτελέσματα των μετρήσεων των ζυμώσεων του 1 L παρουσιάζονται στον πίνακα 4.2.2.Α.

Οι διαφορές που υπάρχουν ανάμεσα στις μύρες της 1<sup>ης</sup> παρτίδας στις ζυμώσεις των 4 L και του 1 L, μπορεί να οφείλονται σε τυχαίους παράγοντες, κυρίως στα μορφοφυσιολογικά χαρακτηριστικά των ζυμών και του μεταβολισμού τους. Αυτό, διότι οι μύρες της 1<sup>ης</sup> παρτίδας προήλθαν από ζύμωση του ίδιου γλεύκους, όλες οι ζυμώσεις της 1<sup>ης</sup> παρτίδας πραγματοποιήθηκαν στον ίδιο χώρο, όπως και η ωρίμανση και αποθήκευσή τους.

Διαφορές μεταξύ των μυρών της 1<sup>ης</sup> και 2<sup>ης</sup> παρτίδας, μπορεί να οφείλονται σε παράγοντες όμοιους με παραπάνω, όπως σε μορφοφυσιολογικά και μεταβολικά χαρακτηριστικά των ζυμών, καθώς επίσης και σε περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως μεταβολές στη θερμοκρασία ζύμωσης, ωρίμανσης και αποθήκευσης, αλλά και στη μικρή διαφορετική σύσταση του γλεύκους της 2<sup>ης</sup> παρτίδας.

Άλλες πιθανές αιτίες των διαφορών στις μετρήσεις ανάμεσα στις μύρες των ζυμώσεων των 4 L και του 1 L είναι: διαφορετική γεωμετρία του δοχείου ζύμωσης, διαφορετική

ποσότητα (όγκος) γλεύκους, καθώς επίσης και η τυχόν διαφορετική συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου και ζυμώσιμου εκχυλίσματος.

Πίνακας 4.2.2.Α: Μετρήσεις στη μπίρα του 1 L (1<sup>η</sup> και 2<sup>η</sup> παρτίδα)

	US -05 I	P.S. Ελ. I	P.S. Ακ. I	US -05 II	P.S. Ελ. II	P.S. Ακ. II
Τελικό φαινομενικό εκχύλισμα (°P)	2,1 ±0,06	3,0 ±0,00	3,3 ±0,06	2,6 ±0,06	3,0 ±0,06	2,9 ±0,06
Τελικός φαινομενικός βαθμός ζύμωσης %	82,50 ±0,06	75,00 ±0,00	72,50 ±0,06	79,20 ±0,06	76,00 ±0,06	76,80 ±0,06
Αιθανόλη (% v/v)	5,63 ±0,01	5,25 ±0,01	4,91 ±0,01	5,59 ±0,01	5,44 ±0,00	5,58 ±0,02
Απόδοση σε αιθανόλη % (%vol/fermented apparent °P)	56,87 ±0,01	58,33 ±0,01	56,44 ±0,01	56,46 ±0,01	57,26 ±0,00	58,13 ±0,02
pH	3,88 ±0,01	3,43 ±0,02	3,40 ±0,02	4,01 ±0,00	3,62 ±0,00	3,69 ±0,01
Ολική ογκομετρούμενη οξύτητα*	2,1 ±0,02	4,4 ±0,06	5,2 ±0,08	2,4 ±0,05	3,5 ±0,08	3,7 ±0,01
Χρώμα (EBC)	12,1 ±0,01	11,2 ±0,01	10,8 ±0,01	12,1 ±0,00	10,8 ±0,00	12,6 ±0,01
Θολρότητα (EBC) (προ εμφιάλωσης)	27,8 ±0,06	50,7 ±0,00	69,3 ±0,58	68,4 ±1,61	83,8 ±0,91	74,6 ±0,55
Θολρότητα (EBC) (μπίρα)	2,3 ±0,01	2,9 ±0,03	18,4 ±0,12	26,1 ±0,46	31,2 ±0,38	51,5 ±0,36

\* Εκφρασμένη σε g/L γαλακτικού οξέος

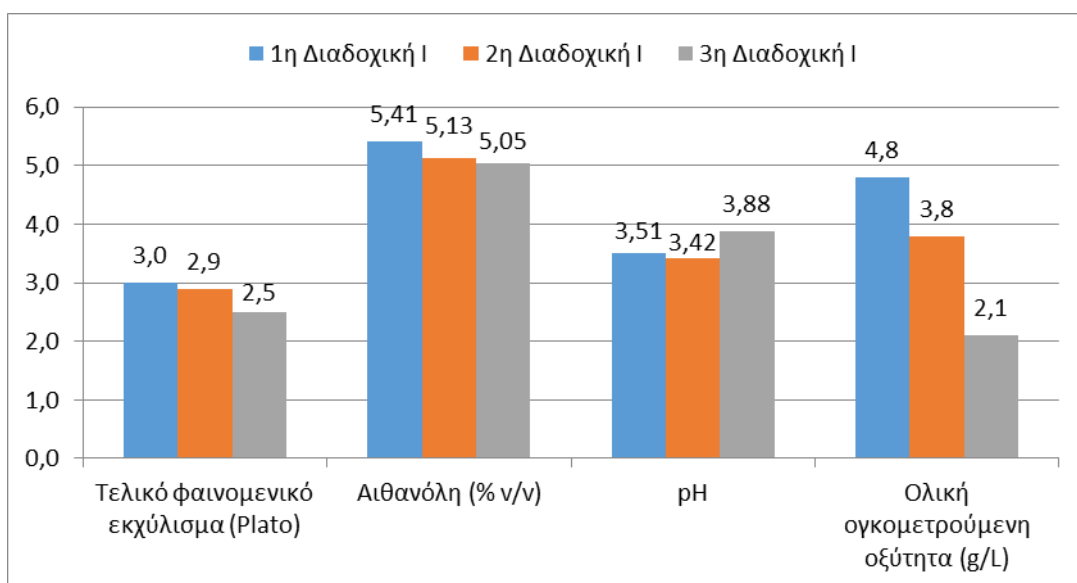
### 4.2.3 Μετρήσεις στη μύρα των διαδοχικών ζυμώσεων

Οι μετρήσεις στις μύρες των διαδοχικών ζυμώσεων έδειξαν ότι η Philly Sour μπορεί να ολοκληρώσει την ζύμωση τουλάχιστον για 3 συνεχόμενες φορές και να παράξει αλκοόλη έως και 5,76 % v/v (σχήματα 4.2.3.A και 4.2.3.Γ). Ο φαινομενικός βαθμός ζύμωσης ήταν αρκετά υψηλός σε όλες τις μύρες των διαδοχικών ζυμώσεων και των 2 παρτίδων. Αντίθετα, η απόδοση σε αιθανόλη μειώνεται στατιστικά σημαντικά από διαδοχική σε διαδοχική ζύμωση και στις 2 παρτίδες (σχήματα 4.2.3.B και 4.2.3.Δ). Οι πιθανές αιτίες για την μείωση της απόδοσης σε αιθανόλη, ίσως είναι ίδιες με αυτές που συμβάλλουν στη μη μείωση της τιμής του pH (υποκεφάλαιο 4.1.2).

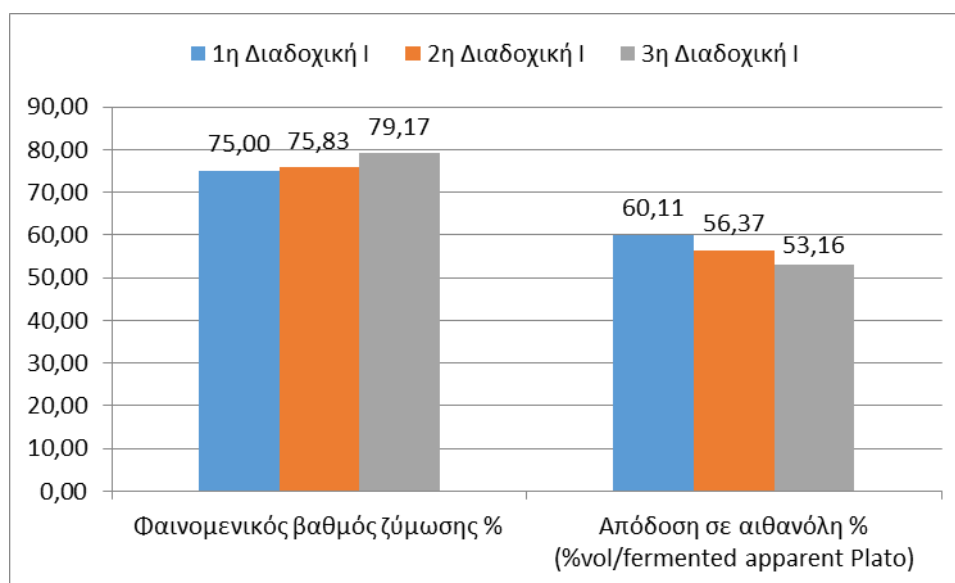
Μετά την ολοκλήρωση της 1<sup>ης</sup> ζύμωσης παρατηρείται ότι το pH της μύρας που παράχθηκε δεν είχε μειωθεί στον βαθμό που μειώθηκε στην μύρα της 1<sup>ης</sup> ζύμωσης, με εξαίρεση την μύρα της 2<sup>ης</sup> διαδοχικής ζύμωσης της 1<sup>ης</sup> παρτίδας όπου το pH μειώθηκε κατά 0,1 περισσότερο από ότι της μύρας της 1<sup>ης</sup> ζύμωσης (3,42 και 3,51 αντίστοιχα). Οι πιθανές αιτίες που συμβαίνει αυτό έχουν αναλυθεί στο υποκεφάλαιο 4.1.2. Η τιμή της ολικής ογκομετρούμενης οξύτητας μειώνεται και στις 2 παρτίδες, από διαδοχική σε διαδοχική ζύμωση με στατιστικά σημαντική διαφορά (πίνακας 4.2.3.A).

Η μη μείωση του pH ήταν ορατή και στην γεύση της μύρας. Αν και στις διαδοχικές ζυμώσεις δεν πραγματοποιήθηκε οργανοληπτικός έλεγχος, διεξάχθηκε μια ανεπίσημη δοκιμή στις μύρες. Οι μύρες των 1<sup>ων</sup> ζυμώσεων είχαν την χαρακτηριστική ξινή γεύση που έχουν οι μύρες που παράγονται με την Philly Sour. Οι μύρες των 2<sup>ων</sup> και 3<sup>ων</sup> διαδοχικών ζυμώσεων δεν είχαν τόσο έντονη ξινή γεύση και αυτές με pH ~ 4,00, δεν είχαν καθόλου ξινή γεύση.

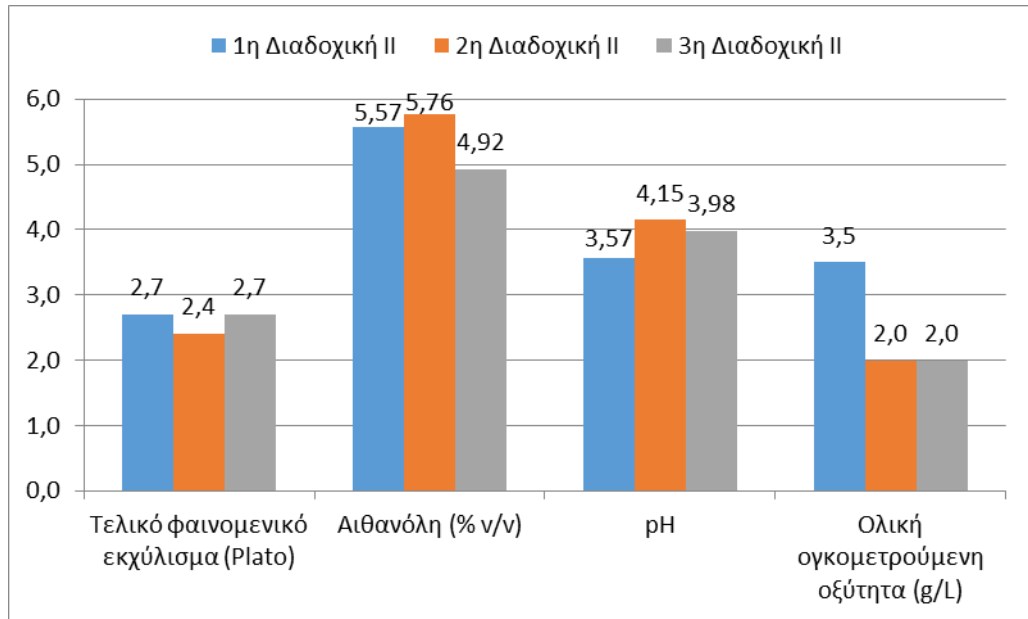
Οι τιμές για το χρώμα κυμάνθηκαν στα ίδια επίπεδα όπως και στις κανονικές ζυμώσεις (9,2 - 12,5 EBC). Οι τιμές για τη θολερότητα ήταν παρόμοιες με τις άλλες ζυμώσεις, αλλά αρκετές από αυτές είχαν μεγάλη τυπική απόκλιση. Όλα τα αποτελέσματα των μετρήσεων των διαδοχικών ζυμώσεων παρουσιάζονται στον πίνακα 4.2.3.A.



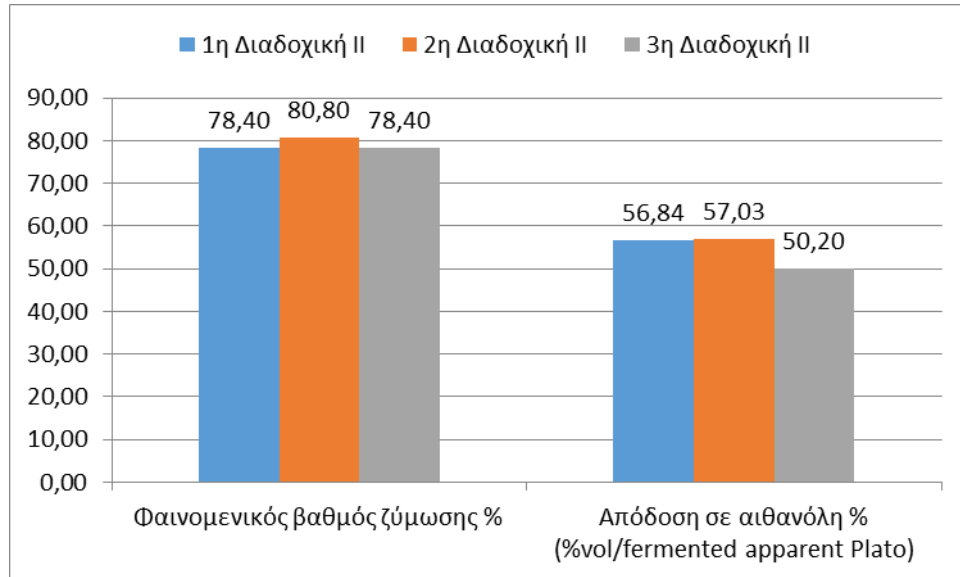
**Σχήμα 4.2.3.A: Μετρήσεις τελικού φαινομενικού εκχυλίσματος, αιθανόλης, pH, ολικής ογκομετρούμενης οξύτητας στις διαδοχικές ζυμώσεις της 1<sup>ης</sup> παρτίδας, τυπική απόκλιση < 0,06 (°P), < 0,04 (αιθανόλη), < 0,03 (pH), < 0,01 (ολική οξύτητα)**



**Σχήμα 4.2.3.B: Τελικός φαινομενικός βαθμός ζύμωσης % και απόδοση σε αιθανόλη % στις διαδοχικές ζυμώσεις της 1<sup>ης</sup> παρτίδας, τυπική απόκλιση < 0,06 και < 0,04 αντίστοιχα**



**Σχήμα 4.2.3.Γ: Μετρήσεις τελικού φαινομενικού εκχυλίσματος, αιθανόλης, pH, ολικής ογκομετρούμενης οξύτητας στις διαδοχικές ζυμώσεις της 2<sup>ης</sup> παρτίδας, τυπική απόκλιση < 0,06 (°P), < 0,02 (αιθανόλη), < 0,01 (pH), < 0,01 (ολική οξύτητα)**



**Σχήμα 4.2.3.Δ: Τελικός φαινομενικός βαθμός ζύμωσης % και απόδοση σε αιθανόλη % στις διαδοχικές ζυμώσεις της 2<sup>ης</sup> παρτίδας, τυπική απόκλιση < 0,06 και < 0,02 αντίστοιχα**

Πίνακας 4.2.3.Α: Μετρήσεις στη μπύρα των διαδοχικών ζυμώσεων (1<sup>η</sup> και 2<sup>η</sup> παρτίδα)

	1 <sup>η</sup> Διαδοχική I	2 <sup>η</sup> Διαδοχική I	3 <sup>η</sup> Διαδοχική I	1 <sup>η</sup> Διαδοχική II	2 <sup>η</sup> Διαδοχική II	3 <sup>η</sup> Διαδοχική II
Τελικό φαινομενικό εκχύλισμα (°P)	3,0 ±0,06	2,9 ±0,06	2,5 ±0,06	2,7 ±0,06	2,4 ±0,06	2,7 ±0,00
Τελικός φαινομενικός βαθμός ζύμωσης %	75,00 ±0,06	75,83 ±0,06	79,17 ±0,06	78,40 ±0,06	80,80 ±0,06	78,40 ±0,00
Αιθανόλη (% v/v)	5,41 ±0,01	5,13 ±0,02	5,05 ±0,04	5,57 ±0,00	5,76 ±0,00	4,92 ±0,02
Απόδοση σε αιθανόλη % (%vol/ apparent fermented °P)	60,11 ±0,01	56,37 ±0,02	53,16 ±0,04	56,84 ±0,00	57,03 ±0,00	50,20 ±0,02
pH	3,51 ±0,01	3,42 ±0,03	3,88 ±0,03	3,57 ±0,00	4,15 ±0,01	3,98 ±0,01
Ολική ογκομετρούμενη οξύτητα*	4,8 ±0,01	3,8 ±0,01	2,1 ±0,01	3,5 ±0,01	2,0 ±0,01	2,0 ±0,01
Χρώμα (EBC)	10,5 ±0,00	10,4 ±0,01	9,2 ±0,03	11,8 ±0,03	11,4 ±0,00	12,5 ±0,00
Θολερότητα (EBC) (προ εμφιάλωσης)	-	-	-	85,4 ±0,53	98,5 ±1,37	167,3 ±1,53
Θολερότητα (EBC) (μπύρα)	56,0 ±0,60	14,3 ±0,21	6,9 ±0,08	31,3 ±1,0	33,8 ±0,15	49,0 ±0,49

\* Εκφρασμένη σε g/L γαλακτικού οξέος

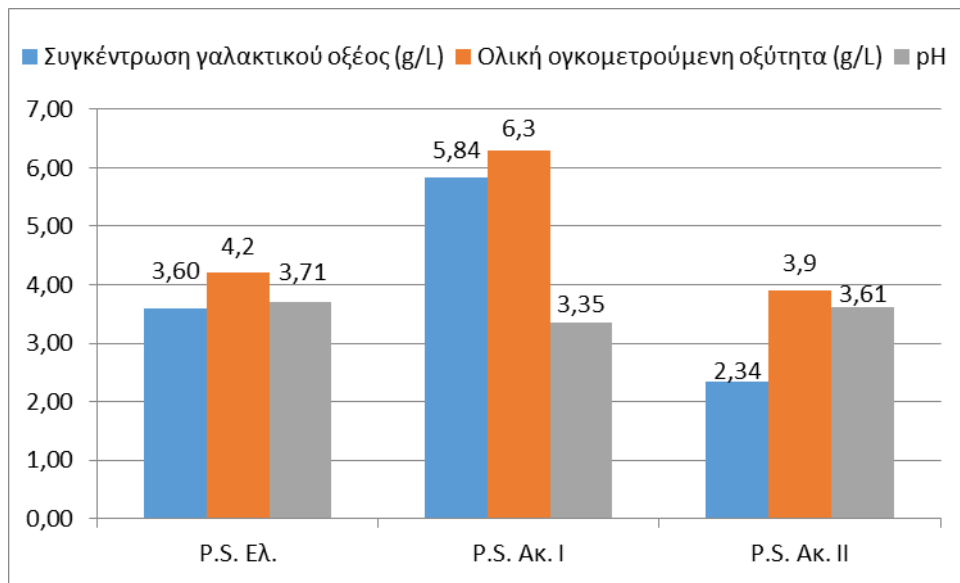
### 4.3 Αποτελέσματα μέτρησης συγκέντρωσης γαλακτικού οξέος με χρήση συστήματος HPLC

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του γαλακτικού οξέος πραγματοποιήθηκε στα γλεύκοι και σε δείγματα μύρας των 4 L (μετά την ωρίμανση). Στα γλεύκη και στη μύρα από ζύμωση με US-05, δεν υπήρξε διακριτή κορυφή στον χρόνο έκλουσης του γαλακτικού οξέος και κατά συνέπεια δεν ήταν δυνατό να ποσοτικοποιηθεί.

Στη ζύμωση με Philly Sour σε ελεύθερη μορφή παράχθηκαν 3,60 g/L γαλακτικό οξύ, συγκέντρωση μικρότερη κατά 2,24 g/L, από ότι στη ζύμωση σε ακινητοποιημένη μορφή, όπου η συγκέντρωση ήταν 5,84 g/L. Η διαφορά αυτή στην παραγωγή του γαλακτικού οξέος μπορεί να οφείλεται σε αλλαγή του μεταβολισμού των κυττάρων της ζύμης εξαιτίας της ακινητοποίησης. Λόγω ότι η μέτρηση πραγματοποιήθηκε σε δείγματα μιας επανάληψης για την Philly Sour σε ελεύθερη μορφή (το δείγμα της επαναληπτικής ζύμωσης αφορά μόνο την ζύμωση με Philly Sour σε ακινητοποιημένη μορφή), δεν μπορεί να διεξαχθεί κάποιο ασφαλές συμπέρασμα για το αν ισχύει πάντα αυτό. Στην επαναληπτική ζύμωση με Philly Sour σε ακινητοποιημένη μορφή παράχθηκαν 2,34 g/L γαλακτικό οξύ. Παρατηρείται, ότι στην επαναληπτική ζύμωση, παράχθηκε μικρότερη ποσότητα γαλακτικού οξέος, συγκριτικά με την αντίστοιχη μύρα της ζύμωσης της 1<sup>ης</sup> παρτίδας και της μύρας που παράχθηκε με Philly Sour σε ελεύθερη μορφή. Όμως, λόγω ζύμωσης διαφορετικού γλεύκους στην επαναληπτική ζύμωση, αλλά και του γεγονότος ότι οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε διαφορετικές χρονικές περιόδους (άρα ίσως διαφορετικές τυχαίες μεταβολές στη θερμοκρασία ζύμωσης ή στο αρχικό διαλυμένο οξυγόνο), μπορεί αυτή η διαφορά στη συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος να οφείλεται σε αυτούς τους παράγοντες.

Όσο αφορά την διαφορετική σύσταση του γλεύκους της 2<sup>ης</sup> παρτίδας, αν και ακολουθήθηκαν τα ίδια βήματα παρασκευής των γλευκών, μια μικρή διαφοροποίηση που μπορεί τυχαία να πραγματοποιήθηκε στο πρόγραμμα πολτοποίησης, μπορεί να είχε ως αποτέλεσμα την διαφοροποίηση της αναλογίας των σακχάρων στο γλεύκος. Άρα, είναι πιθανό το γλεύκος της 1<sup>ης</sup> παρτίδας να περιείχε σε μεγαλύτερη συγκέντρωση γλυκόζη, από ότι το γλεύκος της 2<sup>ης</sup> παρτίδας και για αυτό να παράχθηκε μεγαλύτερη ποσότητα γαλακτικού οξέος. Όπως έχει ξαναφερθεί, η συγκέντρωση της γλυκόζης επηρεάζει αναλογικά την παραγωγή γαλακτικού οξέος από την ζύμη Philly Sour.





**Σχήμα 4.3.Α: Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος (g/L) σε δείγματα μύρας**

#### 4.4 Αποτελέσματα μετρήσεων πτητικών ουσιών με χρήση συστήματος GC-MS

Στους παρακάτω πίνακες, παρουσιάζονται οι πτητικές ενώσεις, οι οποίες βρέθηκαν στις μύρες. Τα όρια ανίχνευσης των ουσιών αυτών στην μύρα, καθώς και η περιγραφή του αρώματός τους βρέθηκαν από την βάση δεδομένων του ASBC και από το άρθρο των Romero-Rodríguez et al., (2022).

Στην μύρα που παράχθηκε από ζύμωση με US-05 βρέθηκαν οι εστέρες: οκτανοϊκός αιθυλεστέρας, δεκανοϊκός αιθυλεστέρας και οξικός φαινυλαιθυλεστέρας, χωρίς όμως η συγκέντρωσή τους να ξεπερνά το κατώφλι αντίληψης.

Στη μύρα που παράχθηκε με Philly Sour σε ελεύθερη μορφή βρέθηκαν περισσότεροι εστέρες, με τον οξικό φαινυλαιθυλεστέρα να έχει συγκέντρωση υψηλότερη από το κατώφλι αντίληψης (0,6687 mg/L) και flavor unit (F.U.) (συγκέντρωση ουσίας / συγκέντρωση κατωφλιού αντίληψης της ουσίας): 3,34. Ο οξικός φαινυλαιθυλεστέρας δίνει στην μύρα άρωμα τριαντάφυλλου, μήλου, μελιού και λουλουδιών.

Στην μύρα από ζύμωση με Philly Sour σε ακινητοποιημένη μορφή δεν βρέθηκαν τόσο σημαντικοί εστέρες όσο στη μύρα παραχθείσα με Philly Sour σε ελεύθερη μορφή και κανένας από αυτούς δεν ξεπερνούσai το κατώφλι αντίληψης. Ο οξικός φαινυλαιθυλεστέρας είχε συγκέντρωση 0,1425 mg/L, περίπου 5 φορές μικρότερη συγκέντρωση με την αντίστοιχη συγκέντρωση στην μύρα παραχθείσα με Philly Sour σε ελεύθερη μορφή.

Όσο αφορά τα λιπαρά οξέα, βρέθηκαν σχεδόν τα ίδια και στα 3 δείγματα. Στην μύρα με Philly Sour σε ελεύθερη μορφή βρέθηκε επιπλέον το ολεϊκό οξύ, σε συγκέντρωση 1,4747 mg/L, μεγαλύτερη από αυτή που συνήθως απαντάται στην μύρα. Επίσης, στο ίδιο δείγμα, το δωδεκανοϊκό οξύ βρέθηκε σε συγκέντρωση μεγαλύτερη από το κατώφλι αντίληψης (1,1122 mg/L) και F.U. 2,2. Το δωδεκανοϊκό οξύ δίνει άρωμα καπρυλικό, κεριού και σαπουνιού.

Σχεδόν οι ίδιες σημαντικές αλκοόλες βρέθηκαν και στα 3 δείγματα, με την φαινυλαιθυλική αλκοόλη να ξεπερνά κατά πολύ το κατώτερο όριο του κατώφλιού αντίληψης. Η φαινυλαιθυλική αλκοόλη, δίνει στην μύρα άρωμα αλκοόλης, λουλουδιών και μελιού.

Πιο συγκεκριμένα, οι συγκεντρώσεις και τα flavor units για την φαινυλαιθυλική αλκοόλη, στα 3 δείγματα ήταν: 10,5948 mg/L, F.U. 2648,69 για την μύρα παραχθείσα με US-05, 5,4789 mg/L, F.U. 1369,73 για την μύρα παραχθείσα με Philly Sour σε ελεύθερη μορφή, 9,4405 mg/L και F.U. 2360,12 για την μύρα από ζύμωση με Philly Sour σε ακινητοποιημένη μορφή.

Στις μύρες που παράχθηκαν με Philly Sour σε ελεύθερη και ακινητοποιημένη μορφή βρέθηκε η 3-οκτανόνη, σε συγκέντρωση όμως κάτω από το κατώφλι αντίληψης.

Επίσης, στις μύρες που παράχθηκαν με Philly Sour σε ελεύθερη και ακινητοποιημένη μορφή βρέθηκε η 5-υδροξυμεθυλοφουρουράλη (χαρακτήρας βουτύρου, καραμέλας), ενώ στη μύρα παραχθείσα με Philly Sour σε ακινητοποιημένη μορφή βρέθηκε και η φαινολική αλδεΰδη βανιλίνη (χαρακτήρας βανίλιας, γλυκός, βαλσαμικός, ευχάριστος). Οι συγκεντρώσεις όμως, ήταν κάτω από το κατώφλι αντίληψης.

Στη μύρα από ζύμωση με US-05 βρέθηκαν τα τερπένια λιναλόλη με συγκέντρωση 0,0638 mg/L και F.U. 455,45 και η 2,7-οκτανοδιεν-1,6-διολ,2,6-διμεθυλ. Τα ίδια τερπένια βρέθηκαν και στις μύρες από ζύμωση με Philly Sour. Η λιναλόλη στην μύρα με Philly Sour σε ελεύθερη μορφή είχε συγκέντρωση 0,4083 mg/L και F.U. 2916,60, ενώ στην ακινητοποιημένη μορφή 0,0711 mg/L και F.U. 507,69. Η λιναλόλη δίνει στη μύρα άρωμα ανθικό, φρουτώδες, εσπεριδοειδών, τριαντάφυλλου και γλυκάνισου. Στην μύρα παραχθείσα με Philly Sour σε ελεύθερη και ακινητοποιημένη μορφή βρέθηκε επιπλέον η γερανιόλη (0,6243 mg/L, F.U. 62,43 και 0,0379 mg/L, F.U. 3,79 αντίστοιχα). Η γερανιόλη δίνει άρωμα ανθικό, εσπεριδοειδών και τριαντάφυλλου. Στη μύρα παραχθείσα με Philly Sour σε ακινητοποιημένη μορφή βρέθηκε και η α-τερπινεόλη (0,0485 mg/L), χωρίς όμως η συγκέντρωσή της να ξεπερνά το κατώφλι αντίληψης. Η συγκέντρωση των ουσιών των αιθερίων ελαίων του λυκίσκου επηρεάζεται σημαντικά και από την βιομετατροπή τους από τις ζύμες.

Σε όλες τις μπύρες βρέθηκε η φαινόλη 4-βινύλ-γουαϊακόλη (2-methoxy-4-vinylphenol) σε συγκέντρωση μεγαλύτερη από το κατώφλι αντίληψης. Η 4-βινύλ-γουαϊακόλη δίνει στην μύρα τον φαινολικό χαρακτήρα κι έχει άρωμα καπνιστού, πικάντικου, γαρύφαλλου, βανίλιας, φαινολικό και πικρό. Στις μπύρες που παράχθηκαν με US-05 και Philly Sour σε ακινητοποιημένη μορφή η συγκέντρωση ήταν σχεδόν όμοια: 0,2909 mg/L, F.U. 2,42 και 0,3216 mg/L, F.U. 2,68, αντίστοιχα. Στην μύρα όμως με Philly Sour σε ελεύθερη μορφή η συγκέντρωση ήταν υψηλότερη, έφτανε τα 1,0580 mg/L και F.U. 8,82.

Σε όλα τα δείγματα βρέθηκε η φουρανεόλη, όμως μόνο στην μύρα παραχθείσα με Philly Sour σε ελεύθερη μορφή, η συγκέντρωση ήταν αρκετά υψηλή για να ξεπερνά το κατώφλι αντίληψης, 0,7867 mg/L και F.U. 4,92. Στα άλλα 2 δείγματα τα F.U. ήταν σχεδόν ίσα: 0,54 για την μύρα παραχθείσα με US-05 και 0,58 για την μύρα παραχθείσα με Philly Sour ακινητοποιημένη. Η φουρανεόλη δίνει στη μύρα άρωμα γλυκό, καραμέλας, ανανά και καραμέλας βουτύρου (toffee).

Στις μπύρες παραχθείσες με US-05 και Philly Sour σε ακινητοποιημένη μορφή βρέθηκε η πυραζίνη μαλτόλη, σχεδόν σε όμοιες συγκεντρώσεις, 0,0520 mg/L και 0,0630 mg/L αντίστοιχα, χωρίς όμως να ξεπερνούν το κατώφλι αντίληψης.

Συνοψίζοντας, γίνεται αντιληπτό ότι στην μύρα που παράχθηκε με Philly Sour δημιουργήθηκαν κάποιες επιπλέον πτητικές ενώσεις, συγκριτικά με την μύρα που παράχθηκε με US-05. Στην μύρα παραχθείσα με Philly Sour σε ελεύθερη μορφή, κάποιες σημαντικές ενώσεις είχαν μεγαλύτερη συγκέντρωση από ότι στην μύρα παραχθείσα με Philly Sour σε ακινητοποιημένη μορφή, χωρίς όμως στατιστικά σημαντική διαφορά.

Οι διαφορές που παρουσιάζονται στο αρωματικό προφίλ στις μπύρες από ζύμωση με Philly Sour είναι πολύ πιθανό, σύμφωνα με την βιβλιογραφία, να οφείλονται και στην ακινητοποίηση των κυττάρων των ζυμών (υλικό και βιομάζα), διότι η ακινητοποίηση επηρεάζει και την φυσιολογία και τον μεταβολισμό των κυττάρων (Willaert & Nedovic, 2006). Οι πτητικές ενώσεις είναι προϊόντα (ή παραπροϊόντα) μεταβολισμού, άρα είναι δυνατό η παραγωγή τους αλλά και η ποσότητα στην οποία παράγονται, να συνδέεται στενά με την μορφή στην οποία βρίσκονται τα κύτταρα στην ζύμωση, ελεύθερα ή

ακίνητοποιημένα. Για τη επιβεβαίωση της ποσοτικοποίησης των πτητικών ουσιών απαιτείται σύγκριση με καμπύλες αναφοράς για τις πρότυπες ουσίες και υπολογισμός για το κατώφλι αντίληψης, το κατώφλι ποσοτικοποίησης και την τυπική απόκλιση. Ενδιαφέρον επίσης θα έχει να μελετηθεί η πιθανή προσρόφηση/απορόφηση στο μέσο ακίνητοποίησης.

Πίνακας 4.4.A: Πτητικές ενώσεις με Flavor Unit > 1

Χημική ομάδα	Όνομα	Threshold in beer (mg/L)	Flavour Unit US-05	Flavor Unit P.S Ελ.	Flavor Unit P.S Ακ.	Περιγραφή
<b>Εστέρες</b>	Acetic acid, 2-phenylethyl ester	0,2		3,34		τριαντάφυλλο, μήλο, μέλι, γλυκό, λουλουδιών
<b>Οξέα</b>	Dodecanoic acid	0,5		2,22		σαπούνι, κερί, καπρυλικό
<b>Αλκοόλες</b>	Phenylethyl Alcohol	0,004	2648,69	1369,73	2360,12	αλκοόλ, λουλουδιών, μέλι, τριαντάφυλλο, γλυκό
<b>Τερπένια</b>	Linalool	0,00014	455,45	2916,60	507,69	ανθικό, φρουτώδες, εσπεριδοειδών, τριαντάφυλλο, γλυκάνισος
	Geraniol	0,01		62,43	3,79	ανθικό, εσπεριδοειδή, τριαντάφυλλο
<b>Φαινόλες</b>	2-Methoxy-4-vinylphenol	0,12	2,42	8,82	2,68	καπνιστό, πικάντικο, γαρύφαλλο, βανίλια, φαινολικό, πικρό
<b>Φουράνια</b>	Furaneol	0,16		4,92		γλυκό, καραμέλα, ανανάς, toffee

Πηγή: ASBC flavor database

Πίνακας 4.4.Β: Πτητικές ενώσεις στη μύρα από ζύμωση με US-05

Χημική ομάδα	Όνομα	Μ.Ο Συγκέντρωσης (mg/L)	Τυπική απόκλιση (±)	Threshold in beer (mg/L) κατ.	Threshold in beer (mg/L) ανωτ.	Flavor Unit κατ.	Flavor Unit ανωτ.	Περιγραφή
Εστέρες	Octanoic acid, ethyl ester *	0,1573	0,05	0,9	1	0,17	0,16	μήλο, γλυκάνισος, τυρί
	Decanoic acid, ethyl ester	0,0398	0,03	0,57	10	0,07	0,00	καπρυλικό, φρουτώδεις, μήλο
	Acetic acid, 2-phenylethyl ester	0,0910	0,04	0,2	3,8	0,45	0,02	τριαντάφυλλο, μήλο, μέλι, γλυκό, λουλουδιών
Οξέα	Butanoic acid	0,0370	0,00	1,9	2,2	0,02	0,02	
	Nonanoic acid	0,0447	0,01					
	Propanoic acid, 2-methyl-	0,1880	0,04	30		0,01		ιδρώτας, πικρό, ζινό
	Hexanoic acid	0,6834	0,14	8	10,7	0,09	0,06	λιπαρά οξέα, ελαιόλαδο, ιδρώτας
	Octanoic acid	2,0473	0,12	13	15	0,16	0,14	λιπαρά οξέα, ελαιόλαδο
	n-Decanoic acid	0,3330	0,07	5	10	0,07	0,03	καπρυλικό
	Dodecanoic acid	0,0598	0,01	0,5	6	0,12	0,01	σαπούνι, κερί, καπρυλικό
	Benzeneacetic acid	0,2763	0,16	2,5		0,11		γλυκό, μέλι, τριαντάφυλλο
Αλκοόλες	1-Hexanol	0,0160	0,00	4		0,00		αλκοόλη, διαλύτης
	1-Propanol, 3-ethoxy-1-Hexanol, 2-ethyl-	0,0523 0,0088	0,01 0,00	600	800	0,00	0,00	
	1-Octanol	0,0117	0,00	0,9		0,01		καρύδα, φουντούκι, έλαιο αμύγ / μαγειρεμένες πατάτες
	1-Propanol, 3-(methylthio)-	0,2802	0,23	2		0,14		
	Benzyl alcohol	0,0206	0,01	900		0,00		αμύγδαλο, πικρό
	Phenylethyl Alcohol	10,5948	0,31	0,004	125	2648,69	0,08	αλκοόλ, λουλουδιών, μέλι, τριαντάφυλλο, γλυκό
	Tryptophol	3,2462	0,16	10	414	0,32	0,01	αμύγδαλο, διαλύτης, δυσάρεστο άρωμα

Πίνακας 4.4.B (συνέχεια)

Χημική ομάδα	Όνομα	Μ.Ο Συγκέντρωσης (mg/L)	Τυπική απόκλιση (±)	Threshold in beer (mg/L) κατ.	Threshold in beer (mg/L) ανωτ.	Flavor Unit κατ.	Flavor Unit ανωτ.	Περιγραφή
Τερπένια	Linalool	0,0638	0,01	0,00014	0,008	455,45	7,97	ανθικό, φρουτώδες, εσπεριδοειδών, τριαντάφυλλο, γλυκάνισος
	2,7-Octadiene-1,6-diol, 2,6-dimethyl-	0,0233	0,01					
Φαινόλες	2-Methoxy-4-vinylphenol	0,2909	0,11	0,12	0,3	2,42	0,97	καπνιστό, πικάντικο, γαρύφαλλο, βανίλια, φαινόλικό, πικρό
	Furaneol	0,0858	0,03	0,16		0,54		γλυκό, καραμέλα, ανανάς, toffee
Πυραζίνες	Maltol	0,0520	0,03	60		0,00		καραμέλα, βινώδες, γλυκό, ψημένο, καβουρδισμένο
Άλλες ενώσεις	4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-	0,0771	0,04					καραμέλα

Πηγή: ASBC flavor database, \*πηγή: Romero-Rodríguez et al., (2022)

Πίνακας 4.4.Γ: Πτητικές ενώσεις στη μύρα από ζύμωση με Philly Sour σε ελεύθερη μορφή

Χημική ομάδα	Όνομα	Μ.Ο Συγκέντρωσης (mg/L)	Τυπική απόκλιση (±)	Threshold in beer (mg/L) κατ.	Threshold in beer (mg/L) ανωτ.	Flavor Unit κατ.	Flavor Unit ανωτ.	Περιγραφή
<b>Εστέρες</b>	Hexanoic acid, ethyl ester *	0,1761	0,14	0,2	0,23	0,88	0,77	μήλο, φρουτώδες
	Octanoic acid, ethyl ester *	0,3147	0,35	0,9	1	0,35	0,31	μήλο, γλυκάνισος, τυρί
	Decanoic acid, ethyl ester	0,4927	0,56	0,57	10	0,86	0,05	καπρυλικό, φρουτώδες, μήλο
	Acetic acid, 2-phenylethyl ester	0,6687	0,66	0,2	3,8	3,34	0,18	τριαντάφυλλο, μήλο, μέλι, γλυκό, λουλουδιών
	Dodecanoic acid, ethyl ester *	0,6265	0,81					
	Hexadecanoic acid, ethyl ester *	0,9793	1,11					
	Octadecanoic acid, ethyl ester	1,0209	1,40	2		0,51		λιπαρό οξύ
<b>Οξέα</b>	Hexanoic acid	0,8093	0,57	8	10,7	0,10	0,08	λιπαρά οξέα, ελαιόλαδο, ιδρώτας
	Octanoic acid	1,2783	0,33	13	15	0,10	0,09	λιπαρά οξέα, ελαιόλαδο
	n-Decanoic acid	1,1300	0,93	5	10	0,23	0,11	καπρυλικό
	Dodecanoic acid	1,1122	1,32	0,5	6	2,22	0,19	σαπούνι, κερι, καπρυλικό
	Benzeneacetic acid	1,1513	1,38	2,5		0,46		γλυκό, μέλι, τριαντάφυλλο
	Oleic Acid	1,4747	1,94					
	Propanoic acid, 2-methyl-	0,5153	0,38	30		0,02		ιδρώτας, πικρό, ξινό
<b>Αλκοόλες</b>	1-Butanol	0,1162	0,09	450		0,00		αλκοόλη
	1-Pentanol	4,2622	5,67	50	800	0,09	0,01	αλκοόλη, διαλύτης, φαρμακευτικό
	1-Propanol, 3-ethoxy-	0,2624	0,28	600	800	0,00	0,00	αλκοόλη, διαλύτης
	1-Propanol, 3-(methylthio)-	0,6097	0,54	2		0,30		ομές / μαγειρεμένες πατάτες
	Benzyl alcohol	0,6320	0,85	900		0,00		αμύγδαλο, πικρό αλκοόλ, λουλουδιών, μέλο, τριαντάφυλλο,
	Phenylethyl Alcohol	5,4789	5,93	0,004	125	1369,73	0,04	αμύγδαλο, διαλύτης, δυσάρεστο άρωμα
	Tryptophol	2,0545	1,40	10	414	0,21	0,00	
<b>Κετόνες</b>	3-Octanone	0,1610	0,19	0,5		0,32		κετόνη, βερνίκι, πικάντικο
	5-Hydroxymethylfurfural	1,0976	1,32	1000		0,00		ταγκός, μπαγάτσος, ελαιόλαδο, χαρτόνι, λαχανικά, ψωμί, καραμέλα



Πίνακας 4.4.Γ (συνέχεια)

Χημική ομάδα	Όνομα	Μ.Ο Συγκέντρωσης (mg/L)	Τυπική απόκλιση (±)	Threshold in beer (mg/L) κατ.	Threshold in beer (mg/L) ανωτ.	Flavor Unit κατ.	Flavor Unit ανωτ.	Περιγραφή
Τερπένια	Linalool	0,4083	0,48	0,00014	0,008	2916,60	51,04	ανθικό, φρουτώδες, εσπεριδοειδών, τριαντάφυλλο, γλυκάνισος
	Geraniol	0,6243	0,82	0,01	0,07	62,43	8,92	ανθικό, εσπεριδοειδή, τριαντάφυλλο
	2,7-Octadiene-1,6-diol, 2,6-dimethyl-	0,9333	1,27					
Φαινόλες	2-Methoxy-4-vinylphenol	1,0580	0,86	0,12	0,3	8,82	3,53	καπνιστό, πικάντικο, γαρόφαλλο, βανίλια, φανολικό, πικρό
	Furaneol	0,7867	0,95	0,16		4,92		γλυκό, καραμέλα, ανανάς, toffee
Άλλες ενώσεις	4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-	0,9421	1,15					καραμέλα
	Benzofuran, 2,3-dihydro- *	1,0351	1,24					

Πηγή: ASBC flavor database, \*πηγή: Romero-Rodríguez et al., (2022)

Πίνακας 4.4.Δ: Πηκτικές ενώσεις στη μπόρα από ζύμωση με Philly Sour σε ακινητοποιημένη μορφή

Χημική ομάδα	Όνομα	Μ.Ο Συγκέντρωσης (mg/L)	Τυπική απόκλιση (±)	Threshold in beer (mg/L) κατ.	Threshold in beer (mg/L) ανωτ.	Flavor Unit κατ.	Flavor Unit ανωτ.	Περιγραφή
<b>Εστέρες</b>	Hexanoic acid, ethyl ester	0,0466	0,01	0,17	0,25	0,27	0,19	ξινό μήλο, γλυκάνισος, φρουτώδες, γλυκό, εστέρας, μήλο, διαλύτης, λιπαρό οξύ
	Octanoic acid, ethyl ester *	0,0552	0,02	0,9	1	0,06	0,06	μήλο, γλυκάνισος, τυρί
	Decanoic acid, ethyl ester	0,0494	0,03	0,57	10	0,09	0,00	καπρυλικό, φρουτώδες, μήλο
	Acetic acid, 2-phenylethyl ester	0,1425	0,02	0,2	3,8	0,71	0,04	τριαντάφυλλο, μήλο, μέλι, γλυκό, λουλουδιών
<b>Οξέα</b>	Hexanoic acid	0,3090	0,05	8	10,7	0,04	0,03	λιπαρά οξέα, ελαιόλαδο, ιδρώτας
	Octanoic acid	0,6482	0,05	13	15	0,05	0,04	λιπαρά οξέα, ελαιόλαδο
	n-Decanoic acid	0,3517	0,06	5	10	0,07	0,04	καπρυλικό
	9-Decenoic acid	0,0366	0,00					
	Dodecanoic acid	0,0495	0,01	0,5	6	0,10	0,01	σαπούνι, κερί, καπρυλικό
	Benzeneacetic acid	0,2058	0,10	2,5		0,08		γλυκό, μέλι, τριαντάφυλλο
	Propanoic acid, 2-methyl-	0,1468	0,04	30		0,00		ιδρώτας, πικρό, ξινό
<b>Αλκοόλες</b>	1-Pentanol	8,7836	1,50	50	800	0,18	0,01	αλκοόλη, διαλύτης, φαρμακευτικό
	1-Hexanol	0,0177	0,00	4		0,00		καρύδα, πράσινα φύλλα, δυσάρεστο
	1-Propanol, 3-ethoxy-	0,0801	0,01	600	800	0,00	0,00	αλκοόλη, διαλύτης
	1-Propanol, 3-(methylthio)-	0,3282	0,04	2		0,16		ωμές / μαγειρεμένες πατάτες
	Benzyl alcohol	0,0162	0,02	900		0,00		αμύγδαλο, πικρό αλκοόλ,
	Phenylethyl Alcohol	9,4405	1,72	0,004	125	2360,12	0,08	λουλουδιών, μέλο, τριαντάφυλλο, γλυκό
<b>Κετόνες</b>	Tryptophol	0,9925	0,17	10	414	0,10	0,00	αμύγδαλο, διαλύτης, δυσάρεστο άρωμα
	3-Octanone	0,0244	0,01	0,5		0,05		κετόνη, βερνίκια, πικάντικο

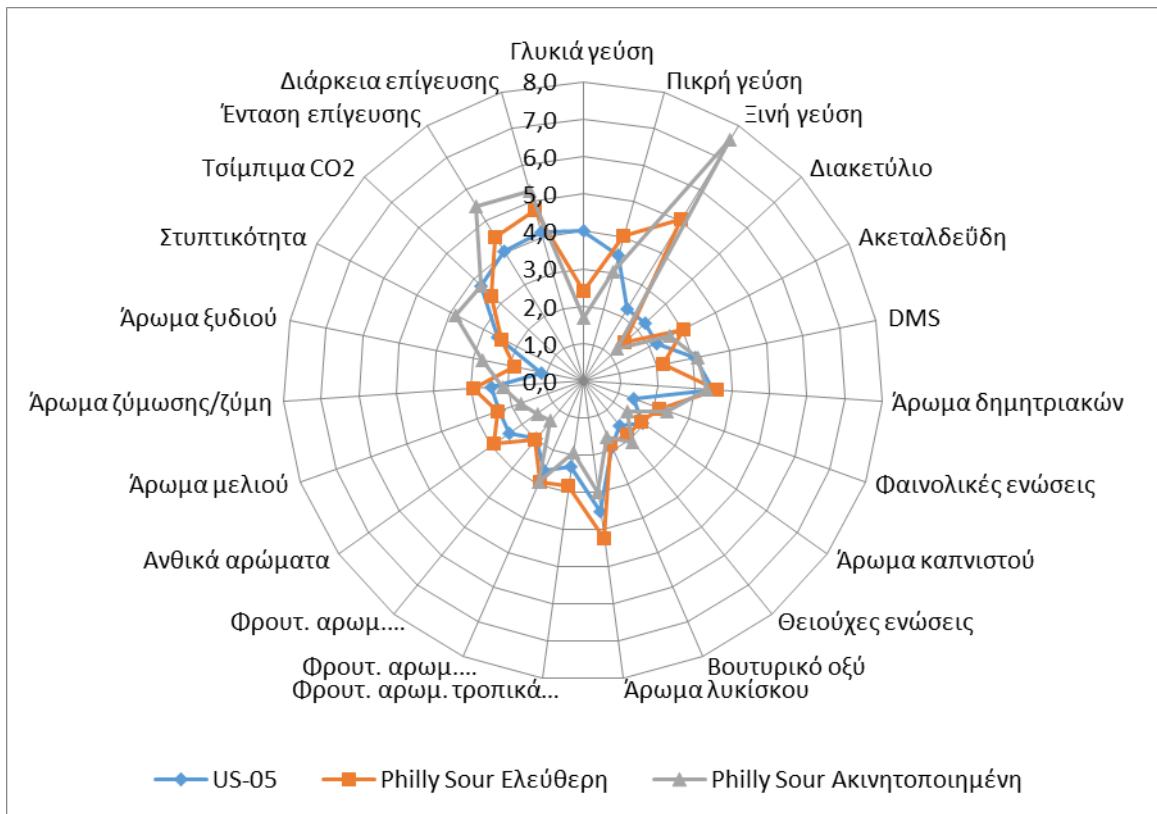
Πίνακας 4.4.Δ (συνέχεια)

Χημική ομάδα	Όνομα	Μ.Ο Συγκέντρωσης (mg/L)	Τυπική απόκλιση (±)	Threshold in beer (mg/L) κατ.	Threshold in beer (mg/L) ανωτ.	Flavor Unit κατ.	Flavor Unit ανωτ.	Περιγραφή
Αλδεΐδες	Vanillin	0,0271	0,00	0,03	0,05	0,90	0,54	βανίλια, γλυκό, απαλό, ζεστό
	5-Hydroxymethylfurfural	0,1400	0,02	1000		0,00		ταγκός, μπαγιάτικος, ελαιόλαδο, χαρτόνι, λαχανικά, ψωμί, καραμέλα
Τερπένια	Linalool	0,0711	0,01	0,00014	0,008	507,69	8,88	ανθικό, φρουτώδες, εσπεριδοειδών, τριαντάφυλλο, γλυκάνισος
	$\alpha$ -Terpineol	0,0485	0,02	0,33	2	0,15	0,02	ξύλο, πείκο, ανθικό, lime, τερπενοειδή, πασχαλιά, καυνοφόρο δέντρο
	Geraniol	0,0379	0,01	0,01	0,07	3,79	0,54	ανθικό, εσπεριδοειδή, τριαντάφυλλο
	2,7-Octadiene-1,6-diol, 2,6-dimethyl-	0,0271	0,01					
Φαινόλες	2-Methoxy-4-vinylphenol	0,3216	0,07	0,12	0,3	2,68	1,07	καπνιστό, πικάντικο, γαρούφαλλο, βανίλια, φανολικό, πικρό
Φουράνια	Furaneol	0,0930	0,03	0,16		0,58		γλυκό, καραμέλα, ανανάς, toffee
Πυραζίνες	Maltol	0,0630	0,01	60		0,00		καραμέλα, βυνώδες, γλυκό, ψημένο, καβουρδισμένο
Άλλες ενώσεις	4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-	0,1089	0,07					καραμέλα
	Benzofuran, 2,3-dihydro- *	0,1291	0,03					

Πηγή: ASBC flavor database, \*πηγή: Romero-Rodríguez et al., (2022)

## 4.5 Αποτελέσματα οργανοληπτικής ανάλυσης

Μετά την συλλογή των απαντήσεων των δοκιμαστών, πραγματοποιήθηκε η μέτρηση της βαθμολογίας που δόθηκε από τους δοκιμαστές, για κάθε ένα χαρακτηριστικό. Το 0 αντιστοιχούσε στην απουσία του χαρακτηριστικού, ενώ το 10 στο μέγιστό του. Η μέτρηση στην μη βαθμονομημένη κλίμακα έγινε με χρήση χάρακα. Στη συνέχεια, τα νούμερα καταγράφηκαν σε φύλλα Microsoft Excel και υπολογίστηκε ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση για το κάθε χαρακτηριστικό ξεχωριστά. Στο διάγραμμα 4.5.A παρουσιάζονται οι μέσοι όροι όλων των χαρακτηριστικών για τα οποία αξιολογήθηκαν τα 3 δείγματα.



Σχήμα 4.5.A: Διάγραμμα μέσων όρων αξιολόγησης οργανοληπτικών χαρακτηριστικών

Όπως είναι διακριτό και από το διάγραμμα, η μύρα παραχθείσα με Philly Sour σε ακίνητοποιημένη μορφή, έχει μεγαλύτερο μέσο όρο βαθμολογίας από τις άλλες δύο μύρες στα εξής χαρακτηριστικά: ξινή γεύση: 7,5, DMS (άρωμα καλαμποκιού): 3,1 (ισοβαθμία με την US-05), φαινολικές ενώσεις: 2,4, θειούχες ενώσεις: 2,1, άρωμα εσπεριδοειδών: 2,9 (ισοβαθμία με Philly Sour ελεύθερη), άρωμα ξυδιού: 2,8,

στυπτικότητα: 3,8, τσίμπημα CO<sub>2</sub>: 3,7 (ισοβαθμία με την US-05), ένταση επίγευσης: 5,5 και διάρκεια επίγευσης: 5,3. Όμως, για όλα τα παραπάνω χαρακτηριστικά, με εξαίρεση αυτό της ξινή γεύσης, δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά από τα άλλα 2 δείγματα.

Οι μέσοι όροι ήταν αρκετά χαμηλοί (~3,0 – 4,0) σχεδόν για όλα τα χαρακτηριστικά σχετικά με το άρωμα των δειγμάτων. Σύμφωνα με τις πτητικές ενώσεις που βρέθηκαν με την χρήση GC-MS, στις μύρες υπάρχουν ουσίες που δίνουν αρώματα λουλουδιών, ανθικά, μελιού, τραντάφυλλου, εσπεριδοειδών, γαρύφαλλου και φαινολικά. Επίσης, σύμφωνα με την εταιρεία παραγωγής της, η Philly Sour δίνει αρώματα «ξινού», κόκκινου μήλου, stone fruit και ροδάκινου. Επίσης, τα αποτελέσματα της Αέριας Χρωματογραφίας έδειξαν ότι στην μύρα παραχθείσα με Philly Sour σε ελεύθερη μορφή, κάποιες σημαντικές ενώσεις είχαν μεγαλύτερη συγκέντρωση από ότι στην μύρα παραχθείσα με Philly Sour σε ακινητοποιημένη μορφή, αν και χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά. Σε συμφωνία ήταν και τα αποτελέσματα της οργανοληπτικής ανάλυσης, καθώς η μύρα που παράχθηκε με Philly Sour σε ελεύθερη μορφή συγκέντρωσε στα περισσότερα αρωματικά χαρακτηριστικά υψηλότερη βαθμολογία από την μύρα από ζύμωση με Philly Sour σε ακινητοποιημένη μορφή, με μικρή όμως διαφορά μεταξύ τους και χωρίς να είναι στατιστικά σημαντική. Σε κανένα από αυτά τα χαρακτηριστικά, ο μέσος όρος της βαθμολογίας των δοκιμαστών δεν ήταν υψηλός. Αυτό σημαίνει, ότι αν και τα αρώματα έγιναν αντιληπτά, δεν είχαν μεγάλη ένταση.

Το χαρακτηριστικό στο οποίο υπερίσχυσε η μύρα παραχθείσα με Philly Sour σε ακινητοποιημένη μορφή, είναι αυτό της ξινή γεύσης με μέσο όρο 7,5, έναντι 2,3 και 5,0 για τις μύρες παραχθείσες με US-05 και Philly Sour σε ελεύθερη μορφή, αντίστοιχα. Για το συγκεκριμένο χαρακτηριστικό, η διαφορά με τις άλλες μύρες ήταν στατιστικά σημαντική. Στον πίνακα 4.5.Α συνοψίζονται τα δεδομένα της Ανάλυσης της Διακύμανσης, όπως αυτά έχουν εξαχθεί από την χρήση του στατιστικού προγράμματος Minitab. Για επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha = 0,05$ , η τιμή F ισούται με 22,29 ( $F = 22,29$ ) και η τιμή του  $P=0,000$ , που σημαίνει ότι τα δείγματα διαφέρουν μεταξύ τους. Στον πίνακα 4.5.Γ παρουσιάζονται και τα αποτελέσματα από το Tukey test. Τα δείγματα που δεν μοιράζονται το ίδιο γράμμα, σημαίνει ότι διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους.

Πίνακας 4.5.A: Σύνοψη στατιστικών δεδομένων και αποτελεσμάτων της ANOVA

### Analysis of Variance

Source	DF	Seq SS	Contribution	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	2	277,5	43,88%	277,5	138,737	22,29	0,000
Error	57	354,8	56,12%	354,8	6,225		
Total	59	632,3	100,00%				

Πίνακας 4.5.B: Πίνακας μέσων όρων και τυπικής απόκλισης για ξινή γεύση

### Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
Ξινή γεύση US-05	20	2,270	2,326	(1,153; 3,387)
Ξινή γεύση P.S. Ελ.	20	5,045	2,845	(3,928; 6,162)
Ξινή γεύση P.S. Ακ.	20	7,535	2,274	(6,418; 8,652)

Pooled StDev = 2,49497

Πίνακας 4.5.Γ: Αποτελέσματα τεστ Tukey

### Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
Ξινή γεύση P.S. Ακ.	20	7,535	<b>A</b>
Ξινή γεύση P.S. Ελ.	20	5,045	<b>B</b>
Ξινή γεύση US-05	20	2,270	<b>C</b>

Means that do not share a letter are significantly different.

Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι παρατηρήθηκε μεγάλη τυπική απόκλιση μεταξύ των επαναλήψεων. Λόγω της μικρής ποσότητας παραγωγής καθώς και διαφοροποιήσεων που παρατηρούνται από φιάλη σε φιάλη κατά τη δεύτερη ζύμωση σε φιάλες (bottle conditioning), για την εξαγωγή ασφαλέστερων συμπερασμάτων θα πρέπει να επαναληφθούν οργανοληπτικές δοκιμές σε μεγαλύτερους όγκους παραγωγής και σε περισσότερες φιάλες δειγμάτων.

## 5. Συμπεράσματα

Η χρήση της ζύμης του είδους *Lachancea thermotolerans* και συγκεκριμένα της εμπορικής ζύμης Philly Sour είναι μια εναλλακτική μέθοδος παραγωγής ξινής μύρας, έναντι της χρήσης γαλακτικών βακτηρίων, τα οποία μπορεί να επιφέρουν τον κίνδυνο διασταυρούμενης επιμόλυνσης του εξοπλισμού του ζυθοποιείου.

Η Philly Sour τόσο σε ελεύθερη, όσο και σε ακινητοποιημένη μορφή, μείωσε τους βαθμούς Plato σχεδόν με τον ίδιο ρυθμό, αλλά πιο αργά από την US-05 (*Saccharomyces cerevisiae*) και χρειάστηκαν ως 16 ημέρες για να ολοκληρωθεί η ζύμωση. Παρατηρήθηκαν χρονικές περιόδους για την Philly Sour σε ελεύθερη και ακινητοποιημένη μορφή, όπου η ταχύτητα ζύμωσης παρέμεινε σχεδόν σταθερή και ίσως να οφείλεται σε αλλαγή του μεταβολισμού των κυττάρων, από την κατανάλωση της γλυκόζης στην κατανάλωση της μαλτόζης. Η μεγάλη πτώση της τιμής του pH σημειώθηκε κατά τις πρώτες 4 ημέρες ζύμωσης. Η ζύμωση με την χαμηλότερη τιμή pH ήταν με την Philly Sour σε ακινητοποιημένη μορφή. Η μεγαλύτερη πτώση της τιμής του pH στις ζυμώσεις με Philly Sour σε ακινητοποιημένη μορφή ίσως να οφείλεται στην ακινητοποίηση των κυττάρων.

Οι τιμές για τον φαινομενικό βαθμό ζύμωσης (~75 %), την απόδοση σε αιθανόλη ανά φαινομενικό βαθμό Plato που ζυμώθηκε (~ 57-58 %), το χρώμα και τη θολερότητα ήταν σχεδόν ίδιες σε όλες τις μύρες, ανεξάρτητα με το στέλεχος της ζύμης ή την μέθοδο ζύμωσης (σε ελεύθερη ή ακινητοποιημένη μορφή). Η μύρα με την χαμηλότερη τιμή pH ήταν με την Philly Sour σε ακινητοποιημένη μορφή (με μια εξαίρεση όπου η τιμή pH είναι κατά 0,7 υψηλότερη από ότι στην μύρα με Philly Sour σε ελεύθερη μορφή) και ακολουθεί η Philly Sour σε ελεύθερη μορφή με μικρή τις περισσότερες φορές διαφορά. Η ολική ογκομετρούμενη οξύτητα κυμάνθηκε από 3,9 έως 6,3 g/L. Η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος στη μύρα από ζύμωση με Philly Sour σε ελεύθερη μορφή ήταν 3,60 g/L, ενώ στις ζυμώσεις με Philly Sour σε ακινητοποιημένη μορφή ήταν 5,84 g/L και 2,34 g/L στην επαναληπτική ζύμωση.

Στις μπύρες που παράχθηκαν με Philly Sour δημιουργήθηκαν κάποιες επιπλέον σημαντικές πτητικές ενώσεις, συγκριτικά με την μύρα που παράχθηκε με US-05. Βρέθηκαν σχεδόν οι ίδιες πτητικές ουσίες τόσο στις μπύρες που παράχθηκαν με την Philly Sour σε ελεύθερη μορφή, όσο και σε αυτές που παράχθηκαν με την Philly Sour σε ακινητοποιημένη μορφή. Όμως, στη μύρα παραχθείσα με Philly Sour σε ελεύθερη μορφή παράχθηκαν ενώσεις σε υψηλότερη συγκέντρωση από ότι στην μύρα παραχθείσα με Philly Sour σε ακινητοποιημένη μορφή, χωρίς όμως στατιστικά σημαντική διαφορά.

Τα αποτελέσματα της οργανοληπτικής ανάλυσης έδειξαν ότι υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά στο χαρακτηριστικό της ξινής γεύσης, στο οποίο υπερτερούσαι η μύρα παραχθείσα με Philly Sour σε ακινητοποιημένη μορφή. Η μύρα που παράχθηκε με Philly Sour σε ελεύθερη μορφή συγκέντρωσε στα περισσότερα αρωματικά χαρακτηριστικά υψηλότερη βαθμολογία από την μύρα από ζύμωση με Philly Sour σε ακινητοποιημένη μορφή, με μικρή, όχι στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Για όλα τα χαρακτηριστικά, εκτός της ξινής γεύσης, δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά και βαθμολογήθηκαν ως χαμηλής έντασης. Για την εξαγωγή ασφαλέστερων συμπερασμάτων θα πρέπει να επαναληφθούν οργανοληπτικές δοκιμές σε μεγαλύτερους όγκους παραγωγής και σε περισσότερες φιάλες δειγμάτων καθώς παρατηρούνται διαφορές από φιάλη σε φιάλη κατά τη δεύτερη ζύμωση (bottle conditioning).

Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, συμπεραίνεται ότι η Philly Sour μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε ακινητοποιημένη μορφή, καθώς δεν υπάρχει μεγάλη διαφορά στην πορεία της ζύμωσης στις ζυμώσεις με ελεύθερα ή ακινητοποιημένα κύτταρα. Η μύρα που παράγεται με ακινητοποιημένα κύτταρα, είναι αρκετά όμοια με αυτή που παράγεται με ελεύθερα κύτταρα. Τα χαρακτηριστικά στα οποία διαφέρει είναι: το αρωματικό της προφίλ, με τη διαφορά να γίνεται ελάχιστα έως καθόλου αντιληπτή από τους δοκιμαστές και χωρίς να είναι στατιστικά σημαντική, η συγκέντρωση γαλακτικού οξέος, το pH και η ολική ογκομετρούμενη οξύτητα, για τα οποία τις περισσότερες φορές οι τιμές τους είναι κοντά σε αυτές της μύρας με Philly Sour σε ελεύθερη μορφή και τέλος, στο χαρακτηριστικό της ξινής γεύσης, το μοναδικό χαρακτηριστικό στο οποίο διαφέρει σε σημαντικό βαθμό και γίνεται εύκολα και έντονα αντιληπτό από τους δοκιμαστές.



Όσο αφορά τις διαδοχικές ζυμώσεις, παρατηρείται ότι η ζύμωση ολοκληρώνεται σε ίσο ή μικρότερο χρονικό διάστημα από την 1<sup>η</sup> διαδοχική, στην 2<sup>η</sup> και στην 3<sup>η</sup> διαδοχική ζύμωση αντίστοιχα. Πιθανή αιτία για αυτό, είναι διαφορές στη συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου ή/και το ενδεχόμενο ότι τα κύτταρα ζύμης ίσως είναι περισσότερα και έχουν ήδη προσαρμοστεί στην παρουσία του γλεύκους και στον μεταβολισμό των σακχάρων, με αποτέλεσμα τον χρόνο μείωσης της κατανάλωσης του εκχυλίσματος. Όμως, η τιμή του pH ήταν υψηλότερη στην 2<sup>η</sup> και 3<sup>η</sup> διαδοχική ζύμωση, συγκριτικά με την 1<sup>η</sup> διαδοχική ζύμωση έως και 0,58. Οι λόγοι στους οποίους μπορεί να οφείλεται η μη αποτελεσματική μείωση του pH είναι η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου, η πιθανή αλλαγή του μεταβολισμού των κυττάρων (από τη φάση παραγωγής οξέων στη βάση της έντονης παραγωγής αλκοόλης), η τυχόν διαφοροποίηση στη συγκέντρωση εμβολίου και η ηλικία των κυττάρων.

Οι μετρήσεις στις μπύρες των διαδοχικών ζυμώσεων έδειξαν ότι η Philly Sour μπορεί να ολοκληρώσει την ζύμωση τουλάχιστον για 3 συνεχόμενες φορές και να παράξει αλκοόλη έως και 5,76 % v/v. Ο φαινομενικός βαθμός ζύμωσης ήταν αρκετά υψηλός σε όλες τις μπύρες των διαδοχικών ζυμώσεων. Αντίθετα, η απόδοση σε αιθανόλη και η τιμή της ολικής ογκομετρούμενης οξύτητας μειώνεται από διαδοχική σε διαδοχική ζύμωση, με στατιστικά σημαντική διαφορά. Οι πιθανές αιτίες για την μείωση της απόδοσης σε αιθανόλη, ίσως είναι ίδιες με αυτές που συμβάλλουν στη μη μείωση της τιμής του pH.

Η Philly Sour σε ακινητοποιημένη μορφή μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε διαδοχικές ζυμώσεις και να ολοκληρώσει με επιτυχία τη ζύμωση, χωρίς όμως να μπορεί να μειώσει το pH στον ίδιο βαθμό και να προσδώσει στη μπύρα την χαρακτηριστική ξινή γεύση στις συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στο παρόν πείραμα. Ίσως, υπό άλλες συνθήκες, όπως με μέτρηση του πληθυσμού των κυττάρων των σφαιριδίων και εμβολιασμός του νέου γλεύκους με την κατάλληλη συγκέντρωση εμβολίου, να είναι δυνατή η μείωση του pH στις 2<sup>εξ</sup> και 3<sup>εξ</sup> διαδοχικές ζυμώσεις. Μπορεί ακόμη με την αύξηση του αριθμού των διαδοχικών επαναλήψεων, να παρατηρηθεί ξανά αποτελεσματική μείωση του pH, ίσως κάποιας ακόμη αλλαγής του μεταβολισμού των κυττάρων, που θα επανέφερε τον μεταβολισμό τους όπως στην αρχή της 1<sup>ης</sup> ζύμωσης. Η αύξηση του αριθμού των διαδοχικών επαναλήψεων είναι δύσκολα εφικτή, λόγω της δυσκολίας χειρισμού και του

μεγάλου κινδύνου επιμόλυνσης. Ένα σύστημα αντιδραστήρων συνεχής ζύμωσης ίσως να ήταν μια ενδιαφέρουσα προσέγγιση.

Προτείνεται ως μελλοντική έρευνα, η διερεύνηση της χρήσης Philly Sour σε ακινητοποιημένη μορφή για ζύμωση γλεύκους μέχρι την 3<sup>η</sup> - 4<sup>η</sup> ημέρα ζύμωσης, διότι μέχρι αυτή την ημέρα παρατηρείται η μεγάλη μείωση της τιμής του pH, κι έπειτα εμβολιασμός του γλεύκους με στέλεχος *S.cerevisiae*, για ολοκλήρωση της ζύμωσης. Τα σφαιρίδια της ακινητοποιημένης ζύμης μπορούν στη συνέχεια να χρησιμοποιηθούν σε διαδοχική ζύμωση, για να μελετηθεί εάν σε αυτή την περίπτωση, όπου η Philly Sour δεν ολοκληρώνει την ζύμωση του γλεύκους, δίνει σταθερότερα αποτελέσματα κατά την επαναχρησιμοποίησή της, λόγω μη αλλαγής του μεταβολισμού της από την παραγωγή οξέων στην έντονη παραγωγή αλκοόλης.

Άλλες μελέτες μπορούν να πραγματοποιηθούν σχετικά με την παραγωγή και άλλων μεταβολιτών, όπως γλυκερόλης, οξέων, πτητικών ουσιών, κλπ και πραγματοποίηση ποσοτικού προσδιορισμού τους και στατιστικής ανάλυσης, καθώς και της επίδρασης και άλλων παραμέτρων (π.χ. διαλυμένο O<sub>2</sub>, pH, % γλυκόζης, κλπ).

Επιπλέον, ένα ακόμη ενδιαφέρον αντικείμενο μελέτης είναι η εύρεση μιας κατάλληλης, εύκολης, γρήγορης και αξιόπιστης μεθόδου καταμέτρησης του πληθυσμού ή/και βιωσιμότητας των κυττάρων της ζύμης Philly Sour. Ο πολύ μεγάλος βαθμός συσσωμάτωσης που παρουσιάζει το συγκεκριμένο στέλεχος, καθιστά δύσκολη την σωστή καταμέτρηση των κυττάρων, καθώς τα κύτταρα σχηματίζουν συμπλέγματα μεταξύ τους, με αποτέλεσμα την δυσκολία καταμέτρησής τους.

Η χρήση διαλύματος EDTA που προτείνεται από την βιβλιογραφία ως παράγοντας που κάνει τα κύτταρα να χάσουν τον flocculent χαρακτήρα τους (Stewart, 2017a), έδειξε σε κάποια δοκιμαστικά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται), ότι επηρεάζει την βιωσιμότητα των κυττάρων. Οπότε, προτείνεται η περαιτέρω μελέτη για την εύρεση της κατάλληλης μεθόδου καταμέτρησης πληθυσμού και βιωσιμότητας των κυττάρων ζύμης Philly Sour.

## 6. Βιβλιογραφία

- Abdel-Aal, E. S. M., Hucl, P., Sosulski, F. W., Graf, R., Gillott, C., & Pietrzak, L. (2001). Screening spring wheat for midge resistance in relation to ferulic acid content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), 3559–3566. <https://doi.org/10.1021/jf010027h>
- Alcine Chan, M. Z., Chua, J. Y., Toh, M., & Liu, S. Q. (2019). Survival of probiotic strain *Lactobacillus paracasei* L26 during co-fermentation with *S. cerevisiae* for the development of a novel beer beverage. *Food Microbiology*, 82(January), 541–550. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.04.001>
- Araujo, T. M., Barga, M. C., Della-Bianca, B. E., & Basso, T. O. (2021). Yeast immobilisation for brewery fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, 127(4), 302–316. <https://doi.org/10.1002/jib.671>
- Basso, R. F., Alcarde, A. R., & Portugal, C. B. (2016). Could non-*Saccharomyces* yeasts contribute on innovative brewing fermentations? *Food Research International*, 86, 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.06.002>
- Bellal, M., Boudrant, J., Elfoul, L., & Bonaly, R. (1995). Flocculation dispersion in *Kluyveromyces lactis*. *Process Biochemistry*, 30(7), 641–648. [https://doi.org/10.1016/0032-9592\(94\)00046-8](https://doi.org/10.1016/0032-9592(94)00046-8)
- Benito, S. (2018). The impacts of *Lachancea thermotolerans* yeast strains on winemaking. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(16), 6775–6790. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9117-z>
- Bilang, M., Attioui, F., Loppinet, V., Michalski, J. C., & Bonaly, R. (1996). Structure of the phosphopeptidomannans from flocculent and non-flocculent yeast *Kluyveromyces lactis*. *Carbohydrate Research*, 280(2), 303–313. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(95\)00312-6](https://doi.org/10.1016/0008-6215(95)00312-6)
- Black, G. M., Webb, C., Matthews, T. M., & Atkinson, B. (1984). Practical Reactor Systems for Yeast Cell Immobilization Using Biomass Support Particles. *Biotechnology and Bioengineering*, XXVI, 134–141.
- Boulton, C. (2013). *Encyclopaedia of Brewing* (1st ed.). WILEY-BLACKWELL.
- Brányik, T., Silva, D. P., Baszczyński, M., Lehnert, R., & Almeida E Silva, J. B. (2012). A review of methods of low alcohol and alcohol-free beer production. *Journal of Food Engineering*, 108(4), 493–506.

- <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.09.020>
- Callejo, M. J., García Navas, J. J., Alba, R., Escott, C., Loira, I., González, M. C., & Morata, A. (2019). Wort fermentation and beer conditioning with selected non-*Saccharomyces* yeasts in craft beers. *European Food Research and Technology*, 245(6), 1229–1238. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03244-w>
- Canonico, L., Galli, E., Ciani, E., Comitini, F., & Ciani, M. (2019). Exploitation of three non-conventional yeast species in the brewing process. *Microorganisms*, 7(1). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7010011>
- Canonico, L., Zannini, E., Ciani, M., & Comitini, F. (2021). Assessment of non-conventional yeasts with potential probiotic for protein-fortified craft beer production. *Lwt*, 145(March), 111361. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111361>
- Carvalho, D. O., & Guido, L. F. (2022). A review on the fate of phenolic compounds during malting and brewing: Technological strategies and beer styles. *Food Chemistry*, 372(September 2021), 131093. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131093>
- Ciosek, A., Rusiecka, I., & Poreda, A. (2020). Sour beer production: impact of pitching sequence of yeast and lactic acid bacteria. *Journal of the Institute of Brewing*, 126(1), 53–58. <https://doi.org/10.1002/jib.590>
- Claro, F. B., Rijsbrack, K., & Soares, E. V. (2007). Flocculation onset in *Saccharomyces cerevisiae*: Effect of ethanol, heat and osmotic stress. *Journal of Applied Microbiology*, 102(3), 693–700. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03130.x>
- Coghe, S., Benoot, K., Delvaux, F., Vanderhaegen, B., & Delvaux, F. R. (2004). Ferulic Acid Release and 4-Vinylguaiacol Formation during Brewing and Fermentation: Indications for Feruloyl Esterase Activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(3), 602–608. <https://doi.org/10.1021/jf0346556>
- Coulon, J., Matoub, L., Dossot, M., Marchand, S., Bartosz, G., & Leroy, P. (2007). Potential relationship between glutathione metabolism and flocculation in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Research*, 7(1), 93–101. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00146.x>
- De Roos, J., & De Vuyst, L. (2019). Microbial acidification, alcoholization, and aroma production during spontaneous lambic beer production. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(1), 25–38. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9291>

- Di Gianvito, P., Tesnière, C., Suzzi, G., Blondin, B., & Tofalo, R. (2017). FLO5 gene controls flocculation phenotype and adhesive properties in a *Saccharomyces cerevisiae* sparkling wine strain. *Scientific Reports*, 7(1), 1–12.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-09990-9>
- Domingues, L., Vicente, A. A., Lima, N., & Teixeira, J. A. (2000). Applications of Yeast Flocculation in Biotechnological Processes. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 5(4), 288–305. <https://doi.org/10.1007/BF02942185>
- Domizio, P., House, J. F., Joseph, C. M. L., Bisson, L. F., & Bamforth, C. W. (2016). *Lachancea thermotolerans* as an alternative yeast for the production of beer. *Journal of the Institute of Brewing*, 122(4), 599–604.  
<https://doi.org/10.1002/jib.362>
- Dourtoglou, V., Antonopoulos, A., Dourtoglou, T., & Lalas, S. (2014). Discrimination of varietal wines according to their volatiles. *Food Chemistry*, 159, 181–187.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.032>
- Drosou, F. (2022). Μελέτη της αλκοολικής ζύμωσης με χρήση ζυμών non-*Sacharomyces*. Διδακτορική διατριβή. [Εθνικό Μετσόβειο Πολυτεχνείο].  
<https://freader.ekt.gr/eadd/index.php?doc=52337&lang=el#p=1>
- Dysvik, A., La Rosa, S., De Rouck, G., Rukke, E.-O., Westereng, B., & Wicklunda, T. (2020). Microbial Dynamics in Traditional and Modern Sour Beer Production. *Appl Environ Microbiol* 86:E00566-20. <https://doi.org/>  
<https://doi.org/10.1128/AEM.00566-20>
- Dysvik, A., La Rosa, S. L., Buffetto, F., Liland, K. H., Myhrer, K. S., Rukke, E. O., Wicklund, T., & Westereng, B. (2020). Secondary Lactic Acid Bacteria Fermentation with Wood-Derived Xylooligosaccharides as a Tool to Expedite Sour Beer Production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(1), 301–314.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b05459>
- Dysvik, A., Liland, K. H., Myhrer, K. S., Westereng, B., Rukke, E. O., de Rouck, G., & Wicklund, T. (2019). Pre-fermentation with lactic acid bacteria in sour beer production. *Journal of the Institute of Brewing*, 125(3), 342–356.  
<https://doi.org/10.1002/jib.569>
- Eddy, A. A. (1955). Flocculation Characteristics Of Yeasts: Sugars As Dispersing Agents. *Journal of the Institute of Brewing*, 61, 313–317.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1955.tb02801.x>
- El-Behhari, M., Géhin, G., Coulon, J., & Bonaly, R. (2000). Evidence for a lectin in

- Kluyveromyces* sp. that is involved in co-flocculation with *Schizosaccharomyces pombe*. FEMS Microbiology Letters, 184(1), 41–46.  
[https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(99\)00655-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(99)00655-2)
- Farber, M. J. (2019). Compositions and methods for brewing sour beer (Patent No. WO 2019/018803 A1).
- Fernandes, P. A., Moradas-Ferreira, P., & Sousa, M. (1993). Flocculation of *Kluyveromyces marxianus* is induced by a temperature upshift. Yeast, 9(8), 859–866. <https://doi.org/10.1002/yea.320090806>
- Fiddler, W., Parker, W. E., Wasserman, A. E., & Doerr, R. C. (1967). Thermal Decomposition of Ferulic Acid. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 15(5), 757–761. <https://doi.org/10.1021/jf60153a003>
- Finn, D. A., & Stewart, G. G. (2002). Fermentation characteristics of dried brewers yeast: Effect of drying on flocculation and fermentation. Journal of the American Society of Brewing Chemists, 60(3), 135–139. <https://doi.org/10.1094/asbcj-60-0135>
- Gamero, A., Quintilla, R., Groenewald, M., Alkema, W., Boekhout, T., & Hazelwood, L. (2016). High-throughput screening of a large collection of non-conventional yeasts reveals their potential for aroma formation in food fermentation. Food Microbiology, 60, 147–159. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.07.006>
- Ganatsios, V., Terpou, A., Bekatorou, A., Plessas, S., & Koutinas, A. A. (2021). Refining citrus wastes: From discarded oranges to efficient brewing biocatalyst, aromatic beer, and alternative yeast extract production. Beverages, 7(2), 1–13. <https://doi.org/10.3390/beverages7020016>
- Gatto, V., Binati, R. L., Lemos Junior, W. J. F., Basile, A., Treu, L., de Almeida, O. G. G., Innocente, G., Campanaro, S., & Torriani, S. (2020). New insights into the variability of lactic acid production in *Lachancea thermotolerans* at the phenotypic and genomic level. Microbiological Research, 238(April), 126525. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126525>
- Ge, X., Yang, L., & Xu, J. (2017). Cell immobilization: Fundamentals, technologies, and applications. In Industrial Biotechnology: Products and Processes (1st ed., pp. 205–236). by Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. <https://doi.org/10.1002/9783527807833>
- Géhin, G., Bonaly, R., & Coulon, J. (2001). The role of glucose in the *Kluyveromyces bulgaricus* flocculation phenomenon: Transduction by cAMP-dependent protein

- kinase pathway? FEMS Microbiology Letters, 203(2), 229–233.  
[https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(01\)00359-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(01)00359-7)
- González, M. G., Fernández, S., & Sierra, J. A. (1996). Effect of temperature in the evaluation of yeast flocculation ability by the Helm's method. Journal of the American Society of Brewing Chemists, 54(1), 29–31.  
<https://doi.org/10.1094/asbcj-54-0029>
- Goossens, K. V. Y., Ielasi, F. S., Nookaew, I., Stals, I., Alonso-sarduy, L., Daenen, L., Nielsen, J., Devreese, B., & Willaert, G. (2015). Molecular Mechanism of Flocculation Self-Recognition in Yeast and. Mbio, 6(2), 1–16.  
<https://doi.org/10.1128/mBio.00427-15.Editor>
- Guzzon, R., Cavazza, A., & Carturan, G. (2009). Innovative Materials For The Immobilization Of Malolactic Starters . Technologies , Biological Effects And Experimental Fermentations With Oenococcus Oeni Strains Immobilized In Hybrid Matrices ( Silica / Alginate ). Internet Journal Of Viticulture And Enology, 1–4.
- Hernanz, D., Nuñez, V., Sancho, A. I., Faulds, C. B., Williamson, G., Bartolomé, B., & Gómez-Cordovés, C. (2001). Hydroxycinnamic acids and ferulic acid dehydrodimers in barley and processed barley. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49(10), 4884–4888. <https://doi.org/10.1021/jf010530u>
- Holt, S., Mukherjee, V., Lievens, B., Verstrepen, K. J., & Thevelein, J. M. (2018). Bioflavoring by non-conventional yeasts in sequential beer fermentations. Food Microbiology, 72, 55–66. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.11.008>
- House, J. F. (2016). Novel Uses of non-*Saccharomyces* Yeasts in Brewing By Jennifer Frances House B . S . ( Colorado State University ) 2005 Thesis Submitted in partial satisfaction of the requirements for the degree of Masters of Science in Food Science in the office of University of California, Davis.
- Hussain, T., Salhi, O., Lematre, J., Charpentier, C., & Bonaly, R. (1986). Comparative studies of flocculation and deflocculation of *Saccharomyces uvarum* and *Kluyveromyces bulgaricus*. Applied Microbiology and Biotechnology, 23(3–4), 269–273. <https://doi.org/10.1007/BF00261927>
- Iturrutxa, E., Hill, A. E., & Torija, M. J. (2023). Profiling potential brewing yeast from forest and vineyard ecosystems. International Journal of Food Microbiology, 394. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110187>
- Jin, Y. L., & Alex Speers, R. (1998). Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. Food

- Research International, 31(6–7), 421–440. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(99\)00021-6](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(99)00021-6)
- Jin, Y. L., & Speers, R. A. (2000). Effect of environmental conditions on the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 58(3), 108–116. <https://doi.org/10.1094/asbcj-58-0108>
- Kapaklis, A., Voulgaris, I., Tataridis, P., Drichoutis, P., Nigam, P. S., & Nerantzis, E. T. (2005). Comparative Study Of Encapsulated And Entrapped Yeast For Bioethanol Production. In *International Conference Renewable Resources And Biorefineries Ghent – Belgium, September, 19-21, 2005*.
- Kapsopoulou, K., Kapaklis, A., & Spyropoulos, H. (2005). Growth and fermentation characteristics of a strain of the wine yeast *Kluyveromyces thermotolerans* isolated in Greece. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 21, 1599–1602. <https://doi.org/10.1007/s11274-005-8220-3>
- Kapsopoulou, K., Mourtzini, A., Anthoulas, M., & Nerantzis, E. (2007). Biological acidification during grape must fermentation using mixed cultures of *Kluyveromyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *World J Microbiol Biotechnol*, 23, 735–739. <https://doi.org/10.1007/s11274-006-9283-5>
- Karel, S. F., Libicki, S. B., & Robertson, C. R. (1985). The immobilization of whole cells: engineering principles. *Chemical Engineering Science*, 40, 1321–1354.
- Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banat, I. M., Marchant, R., & Koutinas, A. A. (2004). Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: A review. *Food Microbiology*, 21, 377–397. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2003.10.005>
- Kunze, W. (2004). *Technology brewing and malting* (3rd ed.). VLB Berlin.
- Kurtzman, C. P. (2003). Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other members of the Saccharomycetaceae, and the proposal of the new genera *Lachancea*, *Nakaseomyces*, *Naumovia*, *Vanderwaltozyma* and *Zygorhynchus*. *FEMS Yeast Research*, 4, 233–245. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(03\)00175-2](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(03)00175-2)
- Lachance, M. A., & Kurtzman, C. P. (2011). *Lachancea* Kurtzman (2003). In *The Yeasts, a Taxonomic study* (5th ed., pp. 511–519). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00041-0>
- McMurrugh, B. I., Madigan, D., Donnelly, D., Hurley, J., & Doyle, A. (1996). Control of ferulic acid and 4-vinyl guaiacol in brewing. *Journal of Institute of Brewing*,



102, 327–332.

- Michel, M., Meier-Dörnberg, T., Jacob, F., Methner, F. J., Wagner, R. S., & Hutzler, M. (2016). Review: Pure non-*Saccharomyces* starter cultures for beer fermentation with a focus on secondary metabolites and practical applications. *Journal of the Institute of Brewing*, 122(4), 569–587. <https://doi.org/10.1002/jib.381>
- Miki, B. L. A., Poon, N. H., James, A. P., & Seligy, V. L. (1982). Possible mechanism for flocculation interactions governed by gene FLO1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 150(2), 878–889. <https://doi.org/10.1128/jb.150.2.878-889.1982>
- Mill, P. J. (1964). The Nature of the Interactions Between Flocculent Cells in the. *Journal of General Microbiology*, 35, 61–68. <https://doi.org/10.1099/00221287-35-1-61>
- Monteiro, C. E. (2019). Assessing non-traditional yeasts species for the purpose of brewing beer [University College Cork, Ireland]. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.30491.90406>
- Morata, A., Loira, I., Tesfaye, W., Bañuelos, M. A., González, C., & Suárez Lepe, J. A. (2018). *Lachancea thermotolerans* applications in wine technology. *Fermentation*, 4(3). <https://doi.org/10.3390/fermentation4030053>
- Moreno-García, J., García-Martínez, T., Mauricio, J. C., & Moreno, J. (2018). Yeast immobilization systems for alcoholic wine fermentations: Actual trends and future perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 9(241). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00241>
- Müller-Auffermann, K., & Fritz, J. (2012). Process and plant for the continuous fermentation of fluids. EBC-Symposium.
- Nedović, V., Willaert, R., Leskošek-Čukalović, I. Obradović, B., & Bugarski, B. (2005). Beer production using immobilised cells. In *Applications of Cell Immobilization Biotechnology. Focus on Biotechnology* (pp. 259–273). Springer, Dordrecht.
- Norton, S., & D'Amore, T. (1994). Physiological effects of yeast cell immobilization: Applications for brewing. *Enzyme and Microbial Technology*, 16(5), 365–375. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)90150-3](https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)90150-3)
- Ogawa, M., Carmona-Jiménez, P., García-Martínez, T., Jorrín-Novo, J. V., Moreno, J., Rey, M. D., & Moreno-García, J. (2022). Use of yeast biocapsules as a fungal-based immobilized cell technology for Indian Pale Ale-type beer brewing. *Applied*

- Microbiology and Biotechnology. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12239-9>
- Osburn, K., Amaral, J., Metcalf, S. R., Nickens, D. M., Rogers, C. M., Sausen, C., Caputo, R., Miller, J., Li, H., Tennessen, J. M., & Bochman, M. L. (2018). Primary souring: A novel bacteria-free method for sour beer production. *Food Microbiology*, 70, 76–84. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.09.007>
- Peinado, R. A., Moreno, J. J., Villalba, J. M., González-Reyes, J. A., Ortega, J. M., & Mauricio, J. C. (2006). Yeast biocapsules: A new immobilization method and their applications. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(1), 79–84. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.10.040>
- Peng, X., Sun, J., Iserentant, D., Michiels, C., & Verachtert, H. (2001). Flocculation and coflocculation of bacteria by yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55(6), 777–781. <https://doi.org/10.1007/s002530000564>
- Peng, X., Sun, J., Michiels, C., Iserentant, D., & Verachtert, H. (2001a). Coflocculation of *Escherichia coli* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(1–2), 175–181. <https://doi.org/10.1007/s002530100717>
- Peng, X., Sun, J., Michiels, C., Iserentant, D., & Verachtert, H. (2001b). Decrease in Cell Surface Galactose Residues of *Schizosaccharomyces pombe* Enhances Its Coflocculation with *Pediococcus damnosus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(8), 3413–3417. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.8.3413-3417.2001>
- Pereira, A. P., Mendes-Ferreira, A., Estevinho, L. M., & Mendes-Faia, A. (2014). Mead production: Fermentative performance of yeasts entrapped in different concentrations of alginate. *Journal of the Institute of Brewing*, 120(4), 575–580. <https://doi.org/10.1002/jib.175>
- Peyer, L. C., Zarnkow, M., Jacob, F., De Schutter, D. P., & Arendt, E. K. (2017). Sour brewing: Impact of *Lactobacillus amylovorus* FST2.11 on technological and quality attributes of acid beers. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 75(3), 207–216. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2017-3861-01>
- Pires, E., & Brányik, T. (2015a). By-products of Beer Fermentation. In *Biochemistry of Beer Fermentation* (pp. 51–72). <http://www.springer.com/series/10196>
- Pires, E., & Brányik, T. (2015b). The Brewing Yeast. In *Biochemistry of Beer Fermentation* (pp. 11–49).
- Porter, T. J., Divol, B., & Setati, M. E. (2019). *Lachancea* yeast species: Origin, biochemical characteristics and oenological significance. *Food Research*

- International, 119(January), 378–389.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.02.003>
- Postigo, V., Esteban, S., & Arroyo, T. (2023). *Lachancea thermotolerans*, an Innovative Alternative for Sour Beer Production. *Beverages*, 9(20), 1–25.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.3390/beverages9010020>
- Postigo, V., Sánchez, A., Cabellos, J. M., & Arroyo, T. (2022). New Approaches for the Fermentation of Beer: Non-*Saccharomyces* Yeasts from Wine. *Fermentation*, 8(6), 1–22. <https://doi.org/10.3390/fermentation8060280>
- Powell, C. D., Quain, D. E., & Smart, K. A. (2003). The impact of brewing yeast cell age on fermentation performance, attenuation and flocculation. *FEMS Yeast Research*, 3(2), 149–157. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(03\)00002-3](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(03)00002-3)
- Puligundla, P., Smogrovicova, D., Mok, C., & Obulam, V. S. R. (2020). Recent developments in high gravity beer-brewing. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 64. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102399>
- Ramon-Portugal, F., Silva, S., Taillandier, P., & Strehaiano, P. (2003). Immobilized yeasts: Actual oenologic utilizations. *Wine Internet Technical Journal*, 1–8.
- Rhymes, M. R., & Smart, K. A. (2001). Effect of storage conditions on the flocculation and cell wall characteristics of an ale brewing yeast strain. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 59(1), 32–38. <https://doi.org/10.1094/asbcj-59-0032>
- Romano, P., Suzzi, G., Turbanti, L., & Polsinelli, M. (1994). Acetaldehyde production in *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, 118(3), 213–218. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1994.tb06830.x>
- Romero-Rodríguez, R., Durán-Guerrero, E., Castro, R., Díaz, A. B., & Lasanta, C. (2022). Evaluation of the influence of the microorganisms involved in the production of beers on their sensory characteristics. *Food and Bioproducts Processing*, 135, 33–47. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2022.06.004>
- Rossouw, D., Bagheri, B., Setati, M. E., & Bauer, F. F. (2015). Co-flocculation of yeast species, a new mechanism to govern population dynamics in microbial ecosystems. *PLoS ONE*, 10(8), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136249>
- Saito, K., Sato, S. I., Shimoi, H., Iefuji, H., & Tadenuma, M. (1990). Flocculation mechanism of *hansenula anomala* j224. *Agricultural and Biological Chemistry*, 54(6), 1425–1432. <https://doi.org/10.1080/00021369.1990.10870171>
- Scholtes, C., Nizet, S., & Collin, S. (2014). Guaiacol and 4-methylphenol as specific markers of torrefied malts. Fate of volatile phenols in special beers through aging.

- Journal of Agricultural and Food Chemistry, 62(39), 9522–9528.  
<https://doi.org/10.1021/jf5015654>
- Sheppard, J., Dunn, R., & Madden, A. (2016). Methods for the production of fermented beverages and other fermentation products (Patent No. WO 2016/187021 A1).
- Shinohara, T., Kubodera, S., & Yanagida, F. (2000). Distribution of phenolic yeasts and production of phenolic off-flavors in wine fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 90(1), 90–97. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(00\)80040-7](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(00)80040-7)
- Smukalla, S., Caldara, M., Pochet, N., Beauvais, A., Guadagnini, S., Yan, C., Vinces, M. D., Jansen, A., Prevost, M. C., Latgé, J. P., Fink, G. R., Foster, K. R., & Verstrepen, K. J. (2008). FLO1 Is a Variable Green Beard Gene that Drives Biofilm-like Cooperation in Budding Yeast. *Cell*, 135(4), 726–737.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.09.037>
- Soares, E. V. (2011). Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*: A review. *Journal of Applied Microbiology*, 110(1), 1–18. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04897.x>
- Soares, Eduardo V., & Duarte, A. A. (2002). Addition of nutrients induce a fast loss of flocculation in starved cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, 24(23), 1957–1960. <https://doi.org/10.1023/A:1021154212086>
- Sosa, O. A., Manca De Nadra, M. C., & Farías, M. E. (2008). Behaviour of *Kloeckera apiculata* flocculent strain in coculture with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Technology and Biotechnology*, 46(4), 413–418.
- Sousa, M. J., Teixeira, J. A., & Mota, M. (1992). Differences in the flocculation mechanism of *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, 14(3), 213–218. <https://doi.org/10.1007/BF01023361>
- Steensels, J., & Verstrepen, K. J. (2014). Taming wild yeast: Potential of conventional and nonconventional yeasts in industrial fermentations. *Annual Review of Microbiology*, 68, 61–80. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091213-113025>
- Stewart, G. G., & Russell, I. (2009). *An Introduction to Brewing Science and Technology: Series III: Brewer’s Yeast “The IBD Blue Book on Yeast”* (2nd ed.). The Institute of Brewing & Distilling.
- Stewart, G. G. (2017). Flavor Production by Yeast. In *Brewing and Distilling Yeasts* (pp. 325–356). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-69126-8>
- Stewart, G. G., & Goring, T. E. (1976). Effect Of Some Monovalent And Divalent Metal Ions On The Flocculation Of Brewers Yeast Strains. *Journal of Institute of*

- Brewing, 82, 341–342.
- Stewart, Graham G. (2017a). Harvesting and Cropping Yeast: Flocculation and Centrifugation. In *Brewing and Distilling Yeasts* (pp. 259–308). Springer. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-319-69126-8>
- Stewart, Graham G. (2017b). The production of secondary metabolites with flavor potential during brewing and distilling wort fermentations. *Fermentation*, 3(4). <https://doi.org/10.3390/fermentation3040063>
- Stratford, M., & Pearson, B. M. (1992). Lectin-mediated flocculation of the yeast *Saccharomyces ludwigii* NCYC 734. *Letters in Applied Microbiology*, 14(5), 214–216. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1992.tb00688.x>
- Stratford, Malcolm. (1989). Yeast flocculation: Calcium specificity. *Yeast*, 5(6), 487–496. <https://doi.org/10.1002/yea.320050608>
- Stratford, Malcolm. (1996). Induction of flocculation in brewing yeasts by change in pH value. *FEMS Microbiology Letters*, 136(1), 13–18. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(95\)00456-4](https://doi.org/10.1016/0378-1097(95)00456-4)
- Svendsen, C. I. (2016). Investigation of *Lachancea thermotolerans* as a Novel, Single Culture Brewing Yeast. North Carolina State University.
- Svensen, C. I. (2015). Investigation of *Lachancea thermotolerans* as a Novel, Single Culture Brewing Yeast. North Carolina State University.
- Tataridis, P., Ntagas, P., Voulgaris, I., & Nerantzis, E. T. (2005). Production Of Sparkling Wine With Immobilized Yeast Fermentation. *Science And Technology*, 1, 1–18. [http://ejst.uniwa.gr/proto\\_teuxos.htm](http://ejst.uniwa.gr/proto_teuxos.htm)
- Tataridis, Panagiotis. (2001). Study of Interactions between Wine Microorganisms – From the Qualitative to the Quantitative. Ph.D. Thesis. Ecole Nationale Supérieure des Ingénieurs en Arts Chimiques Et Technologiques, (ENSIACET). Institut National Polytechnique de Toulouse (INPT), France.
- Tataridis, Panagiotis, Barbari, A., Lelaj, M., Kanellis, A., Kechagia, D., & Logothetis, S. (2014). Effect of selected non- *Saccharomyces* yeast strains in brewing. 11th International Trends In Brewing. April 13th-17th 2014. Ghent, Belgium.
- Tataridis, Panagiotis, Diamantis, D., Gialitaki, K., Kanellis, A., Kechagia, D., & Nerantzis, E. (2013). Comparison of growth kinetics, major metabolites and sensory profiles in beers fermented with non-*Saccharomyces* yeasts. 34th European Brewery Convention Congress, May 26-29, 2013, Luxembourg.
- Tataridis, Panagiotis, Drosou, F., Kanellis, A., Kechagia, D., Logothetis, S., &

- Chatzilazarou, A. (2016). Differentiating beer aroma , flavor and alcohol content through the use of *Torulaspora delbrueckii*. 5th International Young Scientists Symposium on Malting, Brewing and Distilling. 21-23 April 2016, Chico, California.
- Tataridis, Panagiotis, Kanelis, A., Logotetis, S., & Nerancis, E. (2013). Use of non-*saccharomyces Torulaspora delbrueckii* yeast strains in winemaking and brewing. Jour. Nat. Sci., Matica Srpska Novi Sad, No 124, 415-426.  
<https://doi.org/10.2298/zmspn1324415t>
- Tofalo, R., Telera, G. C., Schirone, M., Corsetti, A., & Suzzi, G. (2010). Flocculation in *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* wine yeasts. Journal of Biotechnology, 150, 341. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.09.364>
- Toh, D. W. K., Chua, J. Y., Lu, Y., & Liu, S. Q. (2020). Evaluation of the potential of commercial non-*Saccharomyces* yeast strains of *Torulaspora delbrueckii* and *Lachancea thermotolerans* in beer fermentation. International Journal of Food Science and Technology, 55(5), 2049–2059. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14399>
- Vanbeneden, N., Van Roey, T., Willems, F., Delvaux, F., & Delvaux, F. R. (2008). Release of phenolic flavor precursors during wort production: Influence of process parameters and grist composition on ferulic acid release during brewing. Food Chemistry, 111(1), 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.03.029>
- Vanderhaegen, B., Delvaux, F., Daenen, L., Verachtert, H., & Delvaux, F. R. (2007). Aging characteristics of different beer types. Food Chemistry, 103(2), 404–412. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.062>
- Vanderkar, Venkatesh D. (2015). Manufacturing of Hollow Fiber Membrane. International Journal of Science and Research (IJSR), ISSN (Online): 2319-7064, <https://www.ijsr.net/archive/v4i9/26091502.pdf>
- Veelders, M., Brückner, S., Ott, D., Unverzagt, C., Mösch, H. U., & Essen, L. O. (2010). Structural basis of flocculin-mediated social behavior in yeast. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 107(52), 22511–22516. <https://doi.org/10.1073/pnas.1013210108>
- Vilela, A. (2018). *Lachancea thermotolerans*, the Non-*Saccharomyces* yeast that reduces the volatile acidity of wines. Fermentation, 4(3).  
<https://doi.org/10.3390/fermentation4030056>
- Virkajärvi, I. (2001). Feasibility of continuous main fermentation of beer using immobilized yeast. VTT Publications.

- Willaert, R., & Nedovic, V. A. (2006). Primary beer fermentation by immobilised yeast – a review on flavor formation and control strategies. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 83, 1353–1367. <https://doi.org/10.1002/jctb.1582>
- Willaert, R. (2011) . Cell Immobilization and Its Applications in Biotechnology: Current Trends and Future Prospects. In *Fermentation Microbiology and Biotechnology* (pp. 313-367)
- Zdaniewicz, M., Satora, P., Pater, A., & Bogacz, S. (2020). Low lactic acid-producing strain of *Lachancea thermotolerans* as a new starter for beer production. *Biomolecules*, 10(256), 1–16. <https://doi.org/10.3390/biom10020256>
- Zupfer, J. M., Churchill, K. E., Rasmusson, D. C., & Fulcher, R. G. (1998). Variation in Ferulic Acid Concentration among Diverse Barley Cultivars Measured by HPLC and Microspectrophotometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(4), 1350–1354. <https://doi.org/10.1021/jf9708103>