



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΟΙΝΟΥ, ΑΜΠΕΛΟΥ & ΠΟΤΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΖΥΜΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ  
*Zygosaccharomyces bailii* ΣΕ ΜΕΙΚΤΗ ΖΥΜΩΣΗ ΣΕ  
ΣΥΝΘΕΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ

Ανωγειανάκη Χρυσάνθη Μαρία - 19685005

Κουντουράκης Οδυσσέας - 19685054

**Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:** Δρόσου Φωτεινή, Δρ, Χημικός Μηχανικός, ΕΜΠ

**ΑΘΗΝΑ 2024**



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

## BACHELOR THESIS

EFFECT OF *Zygosaccharomyces bailii* IN MIXED CULTURE  
FERMENTATION IN SYNTHETIC SUBSTRATES

Anogeianaki Chrysanthi Maria - 19685005

Kountourakis Odysseas - 19685054

**Supervisor:** Drosou Foteini, PhD in Chemical Engineering, NTUA

**ATHENS 2024**



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΟΙΝΟΥ, ΑΜΠΕΛΟΥ & ΠΟΤΩΝ

ΔΗΛΩΣΗ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Οι υπογράφοντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη διπλωματική εργασία με τίτλο:

«Μελέτη της ζυμωτικής ικανότητας του *Zygosaccharomyces bailii* σε μεικτή ζύμωση σε συνθετικά υποστρώματα», και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

|   |                      |
|---|----------------------|
| <b>Ψηφιακή Υπογραφή Επιβλέποντα</b><br><br><b>Καθηγητή</b><br><br><b>(1ου Μέλους Επιτροπής)</b> | Φωτεινή Δρόσου       |
| <b>Ψηφιακή Υπογραφή Επιβλέποντα</b><br><br><b>Καθηγητή</b><br><br><b>(2ου Μέλους Επιτροπής)</b> | Παναγιώτης Ταταρίδης |
| <b>Ψηφιακή Υπογραφή Επιβλέποντα</b><br><br><b>Καθηγητή</b><br><br><b>(3ου Μέλους Επιτροπής)</b> | Ευθαλία Ντουρτόγλου  |

## ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η κάτωθι υπογράφουσα Ανωγειανάκη Χρυσάνθη Μαρία του Εμμανουήλ με αριθμό μητρώου 19685005 φοιτήτρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστημών οίνου, Αμπέλου και Ποτών δηλώνω υπεύθυνα ότι:

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

**Ανωγειανάκη Χρυσάνθη Μαρία**

Ο κάτωθι υπογράφων Κουντουράκης Οδυσσέας του Νικολάου με αριθμό μητρώου 19685054 φοιτητής του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστημών Οίνου, Αμπέλου και Ποτών δηλώνω υπεύθυνα ότι:

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

**Κουντουράκης Οδυσσέας**

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε ιδιαίτερα την κυρία Φωτεινή Δρόσου, επιβλέπουσα της παρούσας εργασίας, για την εμπιστοσύνη που έδειξε αναθέτοντάς μας το συγκεκριμένο θέμα. Θα θέλαμε επίσης να την ευχαριστήσουμε για την αμέριστη υποστήριξη της, για την υπομονή που έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας καθώς και για την καθοδήγηση που μας παρείχε για την πραγματοποίηση και ολοκλήρωση της εργασίας. Ευχαριστούμε επίσης τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Παναγιώτη Ταταρίδη για την παροχή εργαστηριακού εξοπλισμού και την καθοδήγηση του κατά τις τελικές εργαστηριακές αναλύσεις. Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα θέλαμε να εκφράσουμε στις δύο καθηγήτριες του ΠΑ.Δ.Α. Ευθαλία Ντουρτόγλου και Αρχοντούλα Χατζηλαζάρου για τη συνεχή ροή αναλωσίμων και αερίων προκειμένου να έρθει εις πέρας η διπλωματική εργασία. Ευχαριστούμε θερμά την Κατερίνα για την προετοιμασία των ζυμών προς εμβολιασμό και για την απεριόριστη βοήθεια κατά την χρήση των εργαστηριακών χώρων του πανεπιστημίου. Ολοκληρώνοντας θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε τα αγαπημένα μας πρόσωπα, τους συγγενείς και τους φίλους, οι οποίοι με τη συμπαράσταση τους συνέβαλλαν τα μέγιστα στην εκπόνηση της εργασίας.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο οίνος και ο ζύθος αποτελούν μοναδικά προϊόντα με ευρεία κατανάλωση ανά τους αιώνες. Η ιστορία τους ταυτίζεται με την αλκοολική ζύμωση, ήτοι με την εκμετάλλευση των ζυμών προς παραγωγή προϊόντων με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά. Αν και στην πλειονότητα των ζυμώσεων χρησιμοποιείται ο *Saccharomyces cerevisiae*, η επιλογή ζυμών non-*Saccharomyces* γίνεται ολοένα και συχνότερη. Στόχος της παρούσας εργασίας αποτέλεσε η μελέτη της ζυμωτικής ικανότητας του *Zygosaccharomyces bailii* σε μεικτή ζύμωση με τον *S. cerevisiae* σε συνθετικά υποστρώματα. Τα συνθετικά υποστρώματα αποτελούνταν είτε από καθαρά σάκχαρα (γλυκόζη, μαλτόζη) είτε από μείγματα σε αναλογίες σακχάρων αντίστοιχες με αυτές ενός ζυθογλεύκου. Επιπλέον, οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε δύο θερμοκρασίες (15 και 20 °C), σε δυο αναλογίες ζυμών (1:1, 1:20) και σε διαφορετικούς αρχικούς πληθυσμούς ( $1 \cdot 10^6$  και  $6 \cdot 10^6$  κύτταρα/ml). Η μελέτη επικεντρώθηκε στην ανάπτυξη των πληθυσμών, στην κατανάλωση σακχάρων και αφομοιώσιμου αζώτου, στη μέτρηση του αλκοολικού τίτλου και της τελικής οξύτητας, καθώς και στη μελέτη των πτητικών ενώσεων που δύναται να προκύψουν κατά τις ζυμώσεις. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας έδειξαν ότι οι ζύμες *Z. bailii* και *S. cerevisiae* συνυπάρχουν σε περιβάλλον ανταγωνισμού ζυμώνοντας τα κύρια σάκχαρα του ζυθογλεύκου και παράγοντας αιθυλική αλκοόλη σε ποσοστό μεγαλύτερο από 5% v/v. Η οξύτητα των τελικών προϊόντων έλαβε υψηλές τιμές, παρόμοιες με εκείνες ενός οίνου. Κατά τις ζυμώσεις προέκυψε επίσης πληθώρα ενώσεων που απαντώνται στα προϊόντα ζύμωσης, με τις συγκεντρώσεις των περισσότερων όμως να βρίσκονται σε χαμηλότερα επίπεδα από τα αντίστοιχα κατώφλια αντίληψης. Εν κατακλείδι, ο *Z. bailii* παρουσίασε ενδιαφέρουσες ιδιότητες αναφορικά με τη ζυμωτική του ικανότητα. Ωστόσο, η ευρύτερη χρήση του στην παραγωγή προϊόντων μαζικής κατανάλωσης απαιτεί περαιτέρω έρευνα.

*Λέξεις-Κλειδιά:* *Zygosaccharomyces bailii*, *Saccharomyces cerevisiae*, ζύμες, υπόστρωμα, γλυκόζη, μαλτόζη

## ABSTRACT

Wine and beer are unique products widely consumed throughout the centuries. Their history is identical with alcoholic fermentation, i.e. with the exploitation of yeasts to produce products with special characteristics. Although *Saccharomyces cerevisiae* is used in most fermentations, the choice of non-*Saccharomyces* yeasts is becoming more and more common. The aim of this work was to study the fermentation capacity of *Zygosaccharomyces bailii* in mixed fermentation with *S. cerevisiae* in different ratios. For this purpose, the study was conducted on synthetic substrates. The synthetic substrates consisted either of pure sugars (glucose, maltose) or of mixtures in ratios corresponding to those of a wort. Furthermore, the fermentations were carried out at two temperatures (15 and 20 °C), at two yeast ratios (1:1, 1:20) and different initial populations ( $1 \cdot 10^6$  and  $6 \cdot 10^6$  cells/ml). The study focused on population growth, consumption of sugars and assimilative nitrogen, measurement of alcoholic strength and final acidity, as well as the study of volatile compounds that may arise during fermentations. The results of the present work showed that the yeasts *Z. bailii* and *S. cerevisiae* coexist in a competitive environment fermenting the main sugars of the wort and producing ethanol at a rate greater than 5% v/v. The acidity of the final products obtained high values, similar to those of a wine. During the fermentations, a multitude of compounds found in the fermentation products were also produced, with the concentrations of most being at lower levels than the corresponding perception thresholds. In conclusion, *Z. bailii* presented interesting properties regarding its fermentative capacity. However, its use in mass production and in the industry requires further research.

*Keywords:* *Zygosaccharomyces bailii*, *Saccharomyces cerevisiae*, yeasts, fermentation, substrate, glucose, maltose

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

|   |    |
|---|----|
| ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ .....   | 4  |
| ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ .....   | 5  |
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....  | 6  |
| ABSTRACT .....  | 7  |
| ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....  | 11 |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ.....   | 12 |
| 1. Αλκοολική Ζύμωση και Ζύμες.....  | 12 |
| 1.1 Αλκοολική Ζύμωση.....   | 12 |
| 1.2 Παράγοντες που επιδρούν στην εξέλιξη των ζυμώσεων .....                         | 14 |
| 1.3 Αναπαραγωγή των Ζυμών.....  | 15 |
| 1.4 Μεταβολισμός των ζυμών.....   | 16 |
| 2. Ζύμες <i>Saccharomyces cerevisiae</i> και Non- <i>Saccharomyces</i> .....        | 17 |
| 2.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....   | 17 |
| 2.1.1 Γενικές Πληροφορίες.....  | 17 |
| 2.1.2 Μεταβολισμός του <i>S. cerevisiae</i> .....                                   | 18 |
| 2.1.3 Αρωματικές Ενώσεις που παράγονται στις ζυμώσεις με <i>S. cerevisiae</i> ..... | 19 |
| 2.2 Οι Ζύμες Non- <i>Saccharomyces</i> .....  | 21 |
| 3. <i>Zygosaccharomyces</i> .....   | 25 |
| 3.1 Το γένος <i>Zygosaccharomyces</i> .....   | 25 |
| 3.1.1 Γενικές Πληροφορίες.....  | 25 |
| 3.1.2 Μορφολογικά Χαρακτηριστικά και Ταξινόμηση.....                                | 26 |
| 3.1.3 Περιβάλλον Ανάπτυξης.....   | 26 |
| 3.1.4 Αλλοιώσεις τροφίμων από είδη του γένους <i>Zygosaccharomyces</i> .....        | 27 |
| 3.2 <i>Zygosaccharomyces bailii</i> .....   | 28 |
| 3.2.1 Γενικές Πληροφορίες.....  | 28 |
| 3.2.2 Μεταβολισμός σακχάρων από τον <i>Z. bailii</i> .....                          | 28 |
| 3.2.3 Αντοχή του <i>Z. bailii</i> στα οξέα .....                                    | 29 |
| 3.2.4 Παραγωγή Αρωματικών Ενώσεων από τον <i>Z. bailii</i> .....                    | 30 |
| 3.2.5 Ενδεχόμενες Χρήσεις του <i>Z. bailii</i> στη βιομηχανία.....                  | 30 |
| ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....  | 32 |
| 4. ΣΚΟΠΟΣ- ΥΛΙΚΑ- ΜΕΘΟΔΟΙ.....  | 32 |
| 4.1 Σκοπός-Σχεδιασμός Πειραμάτων.....   | 32 |
| 4.2 Στελέχη Ζυμομυκήτων.....  | 33 |
| 4.3 Υλικά.....  | 33 |
| 4.4 Πειραματική διαδικασία .....  | 34 |
| 4.4.1 Προετοιμασία των συνθετικών υποστρωμάτων .....                                | 34 |
| 4.4.2 Εμβολιασμός υποστρωμάτων .....  | 34 |



|   |    |
|---|----|
| 4.5 Αναλυτικές μέθοδοι.....   | 35 |
| 4.5.1 Μέτρηση πληθυσμού .....   | 35 |
| 4.5.2 Μέτρηση σακχάρων .....  | 36 |
| 4.5.3 Μέτρηση διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου (FAN) .....                                      | 36 |
| 4.5.4 Προσδιορισμός του Αλκοολικού Τίτλου και της Τελικής Πυκνότητας .....                  | 37 |
| 4.5.5 Προσδιορισμός Ολικής Οξύτητας και pH .....  | 38 |
| 4.5.6 Ανάλυση Πτητικών και Αρωματικών Ενώσεων.....  | 38 |
| 4.5.6.1 Διαδικασία εκχύλισης και συμπύκνωσης με στήλη Vigreux .....                         | 38 |
| 4.5.6.2 Ανάλυση αρωματικών συστατικών με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας GC-MS..... | 39 |
| 5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ.....   | 41 |
| 5.1 Μέτρηση Πληθυσμών .....   | 41 |
| 5.1.1 Ζυμώσεις εμβολιασμού $6 \cdot 10^6$ κύτταρα/ml .....                                  | 41 |
| 5.1.1.1 Ζυμώσεις στους 15 °C .....  | 41 |
| 5.1.1.2 Ζυμώσεις στους 20 °C .....  | 42 |
| 5.1.2 Ζυμώσεις σε εμβολιασμό $1 \cdot 10^6$ κύτταρα/ml .....                                | 45 |
| 5.1.2.1 Ζυμώσεις στους 15 °C .....  | 45 |
| 5.1.2.2 Ζυμώσεις στους 20 °C .....  | 46 |
| 5.1.3 Σύγκριση Ζυμώσεων ανά Σάκχαρο.....  | 48 |
| 5.2 Κατανάλωση Σακχάρων.....  | 50 |
| 5.3 Κατανάλωση Ελεύθερου Αζώτου Αμινοξέων (FAN) .....                                       | 51 |
| 5.3.1 Ζυμώσεις σε εμβολιασμό $6 \cdot 10^6$ κύτταρα/ml .....                                | 53 |
| 5.3.2 Ζυμώσεις σε εμβολιασμό $1 \cdot 10^6$ κύτταρα/ml .....                                | 55 |
| 5.3.3 Σύγκριση Ανά Υπόστρωμα.....   | 56 |
| 5.4 Αλκοολικός Τίτλος και Τελική Πυκνότητα .....  | 58 |
| 5.4.1 Τελική Πυκνότητα.....   | 58 |
| 5.4.2 Αλκοολικός Τίτλος (vol%) .....  | 59 |
| 5.5 Τελικές Οξύτητες .....  | 60 |
| 5.5.1 Ολική Οξύτητα.....  | 60 |
| 5.5.2 pH.....   | 61 |
| 5.6 Παραγωγή πτητικών ενώσεων στα συνθετικά υποστρώματα.....                                | 62 |
| 5.6.1 Ανώτερες Αλκοόλες.....  | 62 |
| 5.6.2 Λιπαρά Οξέα Μέσης Αλυσίδας - MCFA .....   | 65 |
| 5.6.3 MCFA Εστέρες.....   | 68 |
| 5.6.4 Άλλες Πτητικές Ενώσεις.....   | 71 |
| 6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ .....   | 75 |
| BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....  | 77 |

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

|   |    |
|---|----|
| Εικόνα 1. Σχηματική Απεικόνιση της μετατροπής πυροσταφυλικού οξέος σε αιθανόλη.....   | 12 |
| Εικόνα 2. Η ζύμη <i>Saccharomyces cerevisiae</i> όπως φαίνεται από το μικροσκόπιο (König et al.,2009) .....                                       | 18 |
| Εικόνα 3. Οι ζύμες <i>Brettanomyces</i> και <i>Pichia</i> από μικροσκόπιο (Καστανός , 2021).....  | 24 |
| Εικόνα 4. Απεικόνιση σε μικροσκόπιο του στελέχους <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> (Koji E. Aidoo, M.J. Rob Nout, and Prabir K. Sarkar, 2017)..... | 25 |

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

|   |    |
|---|----|
| Πίνακας 1. Αλκοολικός τίτλος και πυκνότητα στις ζυμώσεις με αρχικό πληθυσμό $6 \cdot 10^6$ κύτταρα/ml ..... | 58 |
| Πίνακας 2. Τελική Ολική Οξύτητα στις ζυμώσεις με αρχικό πληθυσμό $6 \cdot 10^6$ κύτταρα/ml.....             | 60 |
| Πίνακας 3. Τελικά pH στις ζυμώσεις με αρχικό πληθυσμό $6 \cdot 10^6$ κύτταρα/ml .....                       | 61 |
| Πίνακας 4. Συγκεντρώσεις πτητικών ενώσεων στις διάφορες συνθήκες. ....                                      | 72 |

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

|   |    |
|---|----|
| Διάγραμμα 1. Κυτταρική ανάπτυξη στις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν σε $T=15$ °C με αρχικό πληθυσμό $6 \cdot 10^6$ κύτταρα/ml.....  | 41 |
| Διάγραμμα 2. Κυτταρική ανάπτυξη στις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν σε $T=20$ °C με αρχικό πληθυσμό $6 \cdot 10^6$ κύτταρα/ml.....  | 42 |
| Διάγραμμα 3. Κυτταρική ανάπτυξη σε διαφορετικά υποστρώματα στις ζυμώσεις με αρχικό πληθυσμό $6 \cdot 10^6$ κύτταρα/ml .....         | 44 |
| Διάγραμμα 4. Κυτταρική ανάπτυξη στις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν σε $T=15$ °C με αρχικό πληθυσμό $1 \cdot 10^6$ κύτταρα/ml ..... | 45 |
| Διάγραμμα 5. Κυτταρική ανάπτυξη στις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν σε $T=20$ °C με αρχικό πληθυσμό $1 \cdot 10^6$ κύτταρα/ml.....  | 46 |
| Διάγραμμα 6. Κυτταρική ανάπτυξη στα διαφορετικά υποστρώματα στις ζυμώσεις με αρχικό πληθυσμό $1 \cdot 10^6$ κύτταρα/ml.....         | 48 |
| Διάγραμμα 7. Κατανάλωση Γλυκόζης υπό διάφορες συνθήκες .....  | 50 |
| Διάγραμμα 8. Κατανάλωση FAN στις ζυμώσεις με αρχικό πληθυσμό $6 \cdot 10^6$ κύτταρα/ml.....   | 53 |
| Διάγραμμα 9. Κατανάλωση FAN στις ζυμώσεις με αρχικό πληθυσμό $1 \cdot 10^6$ κύτταρα/ml .....  | 55 |
| Διάγραμμα 10. Κατανάλωση FAN στις ζυμώσεις με σε διαφορετικά υποστρώματα.....   | 57 |
| Διάγραμμα 11. Συγκεντρώσεις Ανώτερων Αλκοολών στις διαφορετικές θερμοκρασίες ζύμωσης. ..  | 62 |
| Διάγραμμα 12. Συγκεντρώσεις Ανώτερων Αλκοολών στα διαφορετικά υποστρώματα ζύμωσης. ....   | 64 |
| Διάγραμμα 13. Συγκεντρώσεις Λιπαρών Οξέων Μέσης Αλυσίδας σε ζυμώσεις θερμοκρασίας $15$ °C. ....                                     | 65 |
| Διάγραμμα 14. Συγκεντρώσεις Λιπαρών Οξέων Μέσης Αλυσίδας σε ζυμώσεις θερμοκρασίας $20$ °C. ....                                     | 66 |
| Διάγραμμα 15. Συγκεντρώσεις Λιπαρών Οξέων Μέσης Αλυσίδας στα διαφορετικά υποστρώματα ζύμωσης .....                                  | 67 |
| Διάγραμμα 16. Συγκεντρώσεις MCFA εστέρων σε ζυμώσεις θερμοκρασίας $15$ °C. ....   | 68 |
| Διάγραμμα 17. Συγκεντρώσεις MCFA εστέρων ζυμώσεις θερμοκρασίας $20$ °C. ....  | 69 |
| Διάγραμμα 18. Συγκεντρώσεις MCFA εστέρων στα διαφορετικά υποστρώματα ζύμωσης.....   | 70 |
| Διάγραμμα 19. Συγκεντρώσεις Οξικού Φαινυλαιθυλεστερά στις διαφορετικές θερμοκρασίες ζύμωσης. ....                                   | 72 |

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο οίνος και ο ζύθος αποτελούν σημαντικό κομμάτι του σύγχρονου κόσμου. Η ιστορία των προϊόντων αυτών είναι συνυφασμένη με την ιστορία της αλκοολικής ζύμωσης και την εκμετάλλευση των διαφόρων μικροοργανισμών προς παραγωγή προϊόντων με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά. Η μαζική παραγωγή και η ανάγκη της βιομηχανίας για σταθερό αποτέλεσμα και απόδοση, έχει οδηγήσει στην εδραίωση πληθώρας μεθόδων και τεχνικών. Σε ό,τι αφορά στις ζυμώσεις οίνου και ζύθου, στην πλειονότητα των περιπτώσεων χρησιμοποιούνται αποκλειστικά στελέχη *Saccharomyces cerevisiae*. Με τη ραγδαία ανάπτυξη των μικρών οινοποιείων και ζυθοποιείων σε παγκόσμια κλίμακα, οι παραγωγοί προσπάθησαν να διαφοροποιήσουν τα προϊόντα τους επιλέγοντας εναλλακτικές μεθόδους και νέες μορφές πρώτων υλών, με απώτερο σκοπό τον εμπλουτισμό των προϊόντων τους σε άρωμα και γεύση. Ένας βασικός τομέας διαφοροποίησης είναι και η επιλογή των ζυμών, των οποίων ο μεταβολισμός κύριο παράγοντα που καθορίζει το οργανοληπτικό προφίλ του τελικού προϊόντος. Γνωστές αρχικά από τον κλάδο της οινολογίας ως μικροοργανισμοί αλλοίωσης, οι non-*Saccharomyces* ή «άγριες» ζύμες, αποτελούν συχνή επιλογή των οινοποιών λόγω της αρωματικής και γευστικής πολυπλοκότητας που προσδίδουν στους οίνους. Σήμερα, μεγάλο ενδιαφέρον παρατηρείται στη χρήση των non-*Saccharomyces* και στον κλάδο της ζυθοποίησης, οι οποίες μέσα από διάφορα μονοπάτια που ακολουθούν για τον μεταβολισμό των σακχάρων του ζυθογλεύκου, μπορούν να παραγάγουν πληθώρα ουσιών που συνεισφέρουν στο αρωματικό προφίλ του ζύθου. Ο *Zygosaccharomyces bailii* είναι μια ζύμη της οποίας το όνομα ταυτίζεται με την επιμόλυνση και αλλοίωση όξινων και σακχαρούχων τροφίμων. Ωστόσο, σήμερα το ενδιαφέρον εστιάζεται περισσότερο στα ζυμωτικά του χαρακτηριστικά καθώς και στην δυνατότητα αξιοποίησης του στην βιομηχανία ποτών.

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση της ζυμωτικής ικανότητας του *Z. bailii* σε διάφορες συνθήκες. Η εργασία ξεκινά με μια βιβλιογραφική ανασκόπηση στην οποία καταγράφονται συνοπτικά πληροφορίες σχετικές με την αλκοολική ζύμωση, τον *S. cerevisiae*, τον *Z. bailii* καθώς και τις ιδιότητες τους. Την βιβλιογραφική ανασκόπηση ακολουθεί το πειραματικό μέρος, στο οποίο καταγράφονται αναλυτικά η πορεία και τα αποτελέσματα του πειράματος που πραγματοποιήθηκε. Το πείραμα περιλάμβανε μεικτές ζυμώσεις του *Z. bailii* με τον *S. cerevisiae* υπό διάφορες συνθήκες. Επιπλέον, με στόχο την απομόνωση των παραγόντων που επιδρούν στις ζυμώσεις, όλα τα υποστρώματα ζύμωσης ήταν συνθετικά και αποτελούνταν είτε από καθαρά σάκχαρα είτε από μείγματα σε αναλογίες σακχάρων όμοιες με εκείνες ενός ζυθογλεύκου. Η εργασία ολοκληρώνεται με τα συμπεράσματα που προέκυψαν από το πείραμα και με ορισμένες προτάσεις που αφορούν στην δυνατότητα χρήσης του *Z. bailii* στην βιομηχανία ποτών και σε μελλοντικές έρευνες.

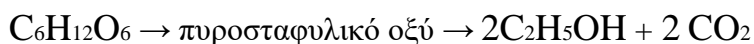
# ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

## 1. Αλκοολική Ζύμωση και Ζύμες

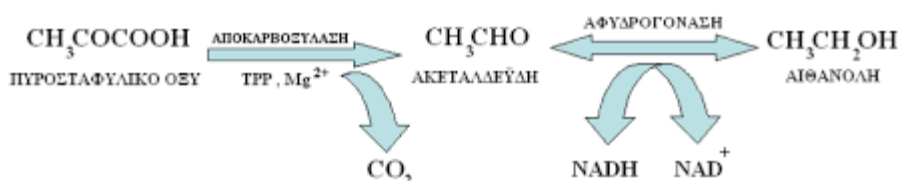
### 1.1 Αλκοολική Ζύμωση

Η αλκοολική ζύμωση, είναι μία αναερόβια διαδικασία η οποία μετατρέπει σάκχαρα (όπως γλυκόζη, φρουκτόζη και σακχαρόζη) σε ενέργεια (τριφωσφορική αδενοσίνη), αιθανόλη ( $C_2H_5OH$ ) και διοξείδιο του άνθρακα ( $CO_2$ ).

Η αντίδραση που πραγματοποιείται είναι η εξής:



Η μεταβολική διαδικασία της αλκοολικής ζύμωσης αποσκοπεί στην παραγωγή ενέργειας για το κύτταρο υπό μορφή ATP. Η γλυκόζη ανοικοδομείται μέχρι το στάδιο του πυροσταφυλικού οξέος σε μία μεταβολική πορεία που περιλαμβάνει εννέα στάδια και ονομάζεται γλυκόλυση. Κατά την πορεία της γλυκόλυσης λαμβάνει χώρα μία σημαντική αντίδραση οξειδωσης της 3-φωσφορικής γλυκεριναλδεύδης προς 3-φωσφορικό οξύ. Το υδρογόνο που απομακρύνεται από το υπόστρωμα μεταφέρεται κατά την ενζυμική αντίδραση σε ένα βοηθητικό μόριο, το συνένζυμο NAD το οποίο ανάγεται προς  $NADH_2$ . Το συνένζυμο αυτό παίζει το ρόλο του μεταφορέα υδρογόνου σε διάφορες ενζυμικές αντιδράσεις εντός του κυττάρου. Για να συνεχιστεί η πορεία της γλυκόλυσης τίθεται σε κίνηση ένας μηχανισμός που εξασφαλίζει την επανοξείδωση του ανηγμένου συνενζύμου στις αναερόβιες συνθήκες της αλκοολικής ζύμωσης. Η διαδικασία αυτή ξεκινά με την αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού οξέος προς ακεταλδεύδη η οποία με τη σειρά της ανάγεται από αλκοολική αφυδρογονάση σε αιθανόλη (Τσακίρης, 2007).



Εικόνα 1. Σχηματική Απεικόνιση της μετατροπής πυροσταφυλικού οξέος σε αιθανόλη

Η γνώση των επιμέρους μεταβολικών οδών που ακολουθούν οι ζύμες και γενικότερα οι διάφοροι μικροοργανισμοί αποτελούν την βάση της βιοτεχνολογίας, μια επιστήμης που αποσκοπεί στην εκμε-

τάλλευση των μικροοργανισμών προς παραγωγή νέων και εμπορεύσιμων προϊόντων. Ωστόσο οι μέθοδοι διεξαγωγής ζυμώσεων στη βιοτεχνολογία διαιρούνται σε τρεις επιμέρους γενικές κατηγορίες. Την ασυνεχή, την ημισυνεχή και τη συνεχή (Νεραντζής et al., 2016).

Οι ασυνεχείς ζυμώσεις είναι οι πιο διαδεδομένες, και βρίσκουν εφαρμογή στις περισσότερες βιομηχανίες που εκμεταλλεύονται ιδιότητες των ζυμών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί και η παραγωγή αλκοολούχων ποτών όπως ο οίνος ή ο ζύθος, των οποίων οι ζυμώσεις κατατάσσονται στις ασυνεχείς.

Για την μελέτη της εξέλιξης μιας ασυνεχούς ζύμωσης πραγματοποιείται μια καλλιέργεια κλασσικού τύπου, όπου έπειτα από τον εμβολιασμό παρακολουθείται η ανάπτυξη μέχρι την εξάντληση των θρεπτικών υλικών του υποστρώματος. Αρχικά, πραγματοποιείται εμβολιασμός ενός αποστειρωμένου θρεπτικού υλικού στο δοχείο καλλιέργειας. Ακολουθεί επώαση κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες περιβάλλοντος. Κατά τη διάρκεια της αύξησης δε γίνεται καμιά προσθήκη, εκτός από αέριο οξυγόνο και οξύ ή βάση για τη ρύθμιση του pH. Κατά την διάρκεια της επώασης της καλλιέργειας η σύνθεση του θρεπτικού υλικού, η συγκέντρωση της βιομάζας και η συγκέντρωση των μεταβολιτών αλλάζουν ως αποτέλεσμα του κυτταρικού μεταβολισμού (Νεραντζής et al., 2016). Η μελέτη της μικροβιακής κινητικής συνίσταται στη μέτρηση της συγκέντρωσης της βιομάζας, δηλαδή του αριθμού των κυττάρων ή cfu/mL, είτε στη μέτρηση του ξηρού βάρους σε g/L, σε συνάρτηση με το χρόνο. Η καμπύλη ανάπτυξης της συγκέντρωσης της βιομάζας των μεταβολικά ενεργών κυττάρων ακολουθεί ένα συγκεκριμένο μοντέλο και παρουσιάζει ομοιότητες για την πλειονότητα των ζυμομυκήτων. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό μια τυπική ασυνεχής ζύμωση μπορεί να διακριθεί σε έξι φάσεις:

### **1. Φάση προσαρμογής – Λανθάνουσα:**

Η φάση αυτή περιλαμβάνει την προσαρμογή των ζυμών στις συνθήκες του υποστρώματος εμβολιασμού. Η διάρκεια της φάσης αυτής ποικίλλει ανάλογα με τις συνθήκες καθώς και με τη συγκέντρωση του εμβολίου. Κατά τη φάση αυτή δεν πραγματοποιείται κυτταρικός πολλαπλασιασμός, αλλά σύνθεση των απαραίτητων ενζύμων, ώστε να γίνει δυνατή η αποικοδόμηση του υποστρώματος.

### **2. Φάση εκκίνησης**

Έπειτα από τη φάση προσαρμογής ακολουθεί η φάση εκκίνησης, κατά την οποία ξεκινά ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η αύξηση της βιομάζας. Η αύξηση αυτή πραγματοποιείται σταδιακά και επιταχύνεται με την πάροδο του χρόνου.

### **3. Εκθετική Φάση**

Κατά την εκθετική φάση η βιομάζα πολλαπλασιάζεται με εκθετικό ρυθμό. Σε πραγματικές ζυμώσεις αυτή η φάση έχει συνήθως μικρή διάρκεια .

### **4. Φάση Επιβράδυνσης**

Η στιγμιαία ταχύτητα παραγωγής και η ειδική ταχύτητα ανάπτυξης ελαττώνονται συγκριτικά με την εκθετική φάση. Η φάση επιβράδυνσης μπορεί να προκληθεί από τη μείωση της συγκέντρωσης ενός

απαραίτητου θρεπτικού συστατικού όπως το αφομοιώσιμο άζωτο και το οξυγόνο ή και από τη συσσώρευση ανασταλτικών προϊόντων και τοξικών για τα κύτταρα ουσιών. Παράλληλα η επιβράδυνση αποδίδεται στο γεγονός ότι η βιομάζα προσεγγίζει τη μέγιστη δυνατή τιμή που μπορεί να λάβει κατά την ζύμωση (Νεραντζής et al., 2016).

### **5. Φάση Στασιμότητας**

Κατά τη διάρκεια της φάσης αυτής, η συγκέντρωση βιομάζας των μεταβολικά ενεργών κυττάρων λαμβάνει τη μέγιστη τιμή της και παραμένει σταθερή. Κατά τη φάση αυτή ο πληθυσμός των ενεργών κυττάρων παραμένει σταθερός καθώς ο αριθμός των κυττάρων που δημιουργούνται είναι ίσος με τον αριθμό των κυττάρων που πεθαίνουν. Παράλληλα, ο μεταβολισμός των κυττάρων και σύνθεση νέων ουσιών συνεχίζουν να πραγματοποιούνται σε υψηλά επίπεδα.

### **6. Φάση Θανάτου**

Κατά τη φάση αυτή παρατηρείται παύση των μεταβολικών διεργασιών των κυττάρων και κατά συνέπεια ο θάνατος των ζυμών. Έτσι η συγκέντρωση της βιομάζας στην καμπύλη ανάπτυξης παρουσιάζει πτωτική πορεία (Νεραντζής et al., 2016).

## **1.2 Παράγοντες που επιδρούν στην εξέλιξη των ζυμώνσεων**

- **Θερμοκρασία**

Η θερμοκρασία αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες που επιδρούν στην ανάπτυξη των ζυμών. Ο ρόλος της είναι πολλαπλός καθώς όχι μόνο επηρεάζει τον ρυθμό ανάπτυξης, αλλά και τον τρόπο με τον οποίο μεταβολίζεται το υπόστρωμα από τις ζύμες. Οι ζύμες είναι οργανισμοί ψυχρόφιλοι και μεσόφιλοι με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης να κυμαίνεται συνήθως μεταξύ των 20-25 °C (Τσακίρης, 2007). Το εύρος αυτό δεν είναι δεσμευτικό, καθώς μεταβάλλεται ανάλογα με το είδος και το στέλεχος της ζύμης που εξετάζεται. Η αύξηση της θερμοκρασίας κατά κανόνα επιταχύνει τον πολλαπλασιασμό των ζυμών μέχρι ένα σημείο έπειτα από το οποίο παρατηρείται σταδιακή ελάττωση. Σε θερμοκρασίες υψηλότερες από 45 °C η δραστηριότητα των περισσότερων ειδών αναστέλλεται. Αντίθετα, οι χαμηλές θερμοκρασίες γενικά επιβραδύνουν την ανάπτυξη των ζυμών.

- **Οξύτητα**

Η οξύτητα του θρεπτικού υλικού μέσα στο οποίο αναπτύσσεται ο πληθυσμός των ζυμών είναι ιδιαίτερα σημαντική παράμετρος για την εκκίνηση και την ολοκλήρωση μιας αλκοολικής ζύμωσης. Οι ζύμες παρουσιάζουν ζυμωτική ικανότητα σε συγκεκριμένο εύρος pH. Γενικά παρατηρείται ότι το εύρος των τιμών pH στις οποίες οι ζύμες πολλαπλασιάζονται ικανοποιητικά κυμαίνεται μεταξύ 4 και 6. Η επίδραση της οξύτητας στην ανάπτυξη και την παραγωγική ικανότητα των ζυμών επηρεάζεται εμμέσως και από τη μεταβολή της θερμοκρασίας καθώς η αύξηση θερμοκρασίας ως ένα όριο μπορεί να ενισχύσει την παραγωγή αρωματικών ενώσεων όπως οι εστέρες (Drosou et al., 2022).

- **Επάρκεια σε Οξυγόνο**

Η αύξηση του αρχικού πληθυσμού επιτυγχάνεται σε αερόβιο περιβάλλον παρουσία οξυγόνου. Η παρουσία του οξυγόνου σε συνδυασμό με άλλους παράγοντες συντελεί τα μέγιστα στον πολλαπλασιασμό του κυτταρικού πληθυσμού. Στις αλκοολικές ζυμώσεις το οξυγόνο είναι επίσης ιδιαίτερα σημαντικό. Αν και η αλκοολική ζύμωση διεξάγεται σε αναερόβιο περιβάλλον για την εκκίνηση της ζύμωσης είναι απαραίτητη η διασφάλιση ενός μεγάλου αρχικού αριθμού κυττάρων. Εφόσον το ζητούμενο είναι η διεξαγωγή ζύμωσης σε αναερόβιες συνθήκες με επάρκεια όμως σε διαθέσιμο οξυγόνο, η συνήθης πρακτική είναι η εφαρμογή αερισμών κατά τα αρχικά στάδια της ζύμωσης. Οι αερισμοί αυτοί συμβάλλουν τόσο στην αύξηση του πληθυσμού όσο και στην εξάλειψη ορισμένων ανεπιθύμητων οσμών που ενδέχεται να εμφανιστούν κατά την διάρκεια της ζύμωσης (Τσακίρης, 2007).

- **Επάρκεια σε Θρεπτικά Συστατικά**

Ως ζωντανός οργανισμός, η ζύμη έχει ανάγκη την πρόσληψη ορισμένων συστατικών. Τα συστατικά αυτά αποτελούν την τροφή της, διασφαλίζοντας την επιβίωση, την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό της. Σε μοριακό επίπεδο είναι προφανές ότι η τροφή των ζυμών αποτελείται από στοιχεία όπως το οξυγόνο, το υδρογόνο, ο άνθρακας και το άζωτο. Παράλληλα, η ομαλή λειτουργία των δομικών και των λειτουργικών πρωτεϊνών προϋποθέτει και επάρκεια σε άλλα στοιχεία όπως ο φώσφορος, το κάλιο, το ασβέστιο, το μαγνήσιο και ο σίδηρος (Νεραντζής et al., 2015).

### **1.3 Αναπαραγωγή των Ζυμών**

Ανάλογα με τον τρόπο αναπαραγωγής τους, οι ζύμες διακρίνονται σε άσπορες και σπορογόνες. Οι άσπορες ζύμες πολλαπλασιάζονται αγενώς μέσω εκβλαστήσεων, ενώ οι σπορογόνες έχουν την δυνατότητα να πολλαπλασιαστούν και εγγενώς μέσω σπορίων (Νεραντζής et al., 2015). Η αγενής αναπαραγωγή πραγματοποιείται μέσω σχάσης, μέσω εκβλάστησης ή με συνδυασμό των δύο τρόπων. Κατά τη σχάση, το κύτταρο αναδιπλασιάζεται σχηματίζοντας στο εσωτερικό του ένα εγκάρσιο κυτταρικό τοίχωμα. Το τοίχωμα αυτό στη συνέχεια διχοτομεί το κύτταρο κάθετα στον εγκάρσιό του άξονα, παράγοντας έτσι δύο θυγατρικά κύτταρα. Το κάθε ένα από τα κύτταρα αυτά αναπτύσσεται κανονικά ώστε να πολλαπλασιαστεί αργότερα με τον ίδιο τρόπο επαναλαμβάνοντας τη διαδικασία. Ο τρόπος αυτός αναπαραγωγής είναι χαρακτηριστικός στα γένη *Endomycetaceae* και *Schizosaccharomycoidae* (Νεραντζής et al., 2015). Όταν το περιβάλλον και οι συνθήκες υπό τις οποίες πολλαπλασιάζονται οι ζύμες είναι δυσμενείς, ο πολλαπλασιασμός των σπορογόνων ζυμών δεν πραγματοποιείται αγενώς αλλά εγγενώς. Σε αυτή την περίπτωση, οι ζύμες μετατρέπονται σε ασκούς οι οποίοι παράγουν ασκοσπόρια. Ο πυρήνας των κυττάρων διαιρείται μειωτικά στο εσωτερικό της κυτταρικής μεμβράνης και κάθε νέος πυρήνας περιβάλλεται με κυτόπλασμα σχηματίζοντας έτσι ένα νέο κύτταρο

εντός της παλαιάς μεμβράνης. Η μεμβράνη γίνεται παχύτερη και πιο ανθεκτική σχηματίζοντας έτσι έναν προστατευτικό ασκό εντός του οποίου σχηματίζονται από ένα μέχρι και τέσσερα ασκοσπόρια. Όταν οι συνθήκες είναι ευνοϊκές, τα ασκοσπόρια βλαστάνουν, δίνοντας γένεση σε ένα νέο βλαστικό κύτταρο (Φασσέας, 2006).

Παράγοντες οι οποίοι καθορίζουν πόσο ευνοϊκό είναι το περιβάλλον για την ανάπτυξη των ζυμών αποτελούν εκτός των άλλων η περιεκτικότητα του υποστρώματος σε θρεπτικά, η ποσότητα του οξυγόνου η υγρασία και η θερμοκρασία.

## 1.4 Μεταβολισμός των ζυμών

Η αλκοολική ζύμωση είναι μια φυσική διεργασία η οποία πραγματοποιείται σε αναερόβιες συνθήκες με στόχο την εξασφάλιση ενέργειας για το κύτταρο. Η διεργασία περιλαμβάνει την διάσπαση των ανθρακικών αλυσίδων των σακχάρων. Λόγω του γεγονότος ότι η ενέργεια που απελευθερώνεται είναι μικρή όπως επίσης και του ότι η παραγόμενη αλκοόλη δρα παρεμποδιστικά, η αλκοολική ζύμωση δεν θεωρείται βιώσιμη μεταβολική οδός για τη ζύμη και συνεπώς δε συμβάλλει στον πολλαπλασιασμό των ζυμών (Νεραντζής et al., 2015). Η ικανότητα μιας ζύμης να μεταβολίζει σάκχαρα παράγοντας αλκοόλη και διοξείδιο του άνθρακα παρουσιάζει πλήθος διαφοροποιήσεων. Γένη όπως το *Saccharomyces* έχουν ικανότητα έντονης ζύμωσης για την πλειοψηφία των σακχάρων. Στον αντίποδα, γένη όπως το *Rhodotorula* ή το *Lipomyces* είναι ανίκανα για οποιαδήποτε ζύμωση (Fugelsang & Edwards, 1997). Γενικότερα, οι ζύμες πρέπει να έχουν την ικανότητα μεταφοράς σακχάρων στο κύτταρο προκειμένου να πραγματοποιηθεί μεταβολισμός. Η μεταφορά των σακχάρων έχει κρίσιμο ρόλο καθώς καθορίζει την ταχύτητα της ζύμωσης πολύ περισσότερο συγκριτικά με την ενζυμική διάσπαση τους (Alves-Araújo et al., 2007). Το κύτταρο των ζυμών προστατεύεται από το περιβάλλον μέσω ενός κυτταρικού τοιχώματος και μιας πλασματικής μεμβράνης που υπάρχει μεταξύ τους. Τα περισσότερα σάκχαρα μπορούν να περάσουν ελεύθερα από το κυτταρικό τοίχωμα, καθώς αποτελεί ένα πορώδες στρώμα γλυκάνης συνδεδεμένης με μαννάνη. Ωστόσο, τα σάκχαρα δεν μπορούν να περάσουν την πλασματική μεμβράνη. Αυτό απαιτεί την περαιτέρω δράση ειδικών πρωτεϊνών μεταφοράς (Bisson et al., 1993).



## 2. Ζύμες *Saccharomyces cerevisiae* και Non-*Saccharomyces*

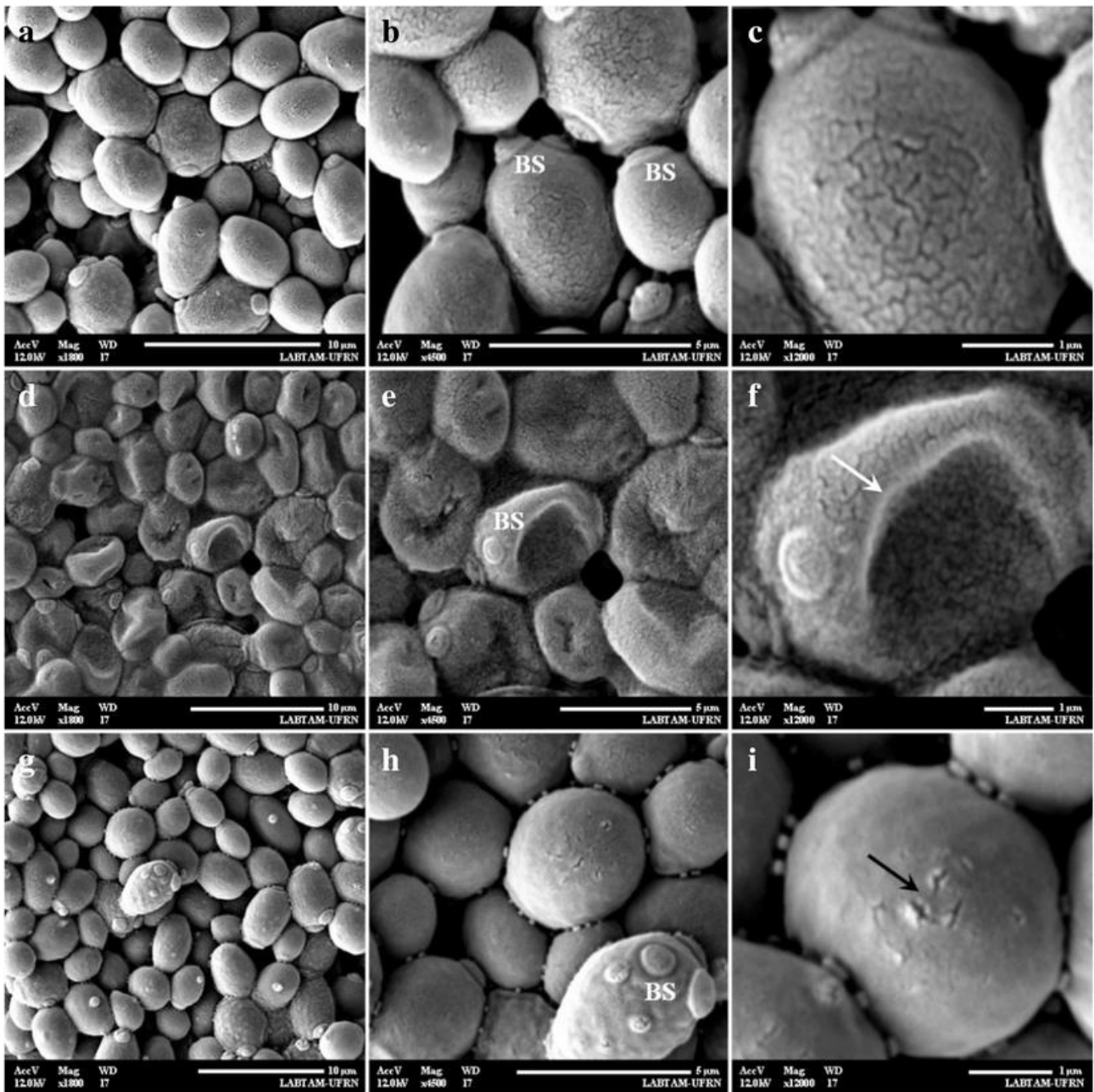
### 2.1 *Saccharomyces cerevisiae*

#### 2.1.1 Γενικές Πληροφορίες

Ο *Saccharomyces cerevisiae* είναι η πιο δημοφιλής ζύμη για την παραγωγή τροφίμων και ποτών. Η ονομασία "*Saccharomyces*" σημαίνει "μύκητας της ζάχαρης" και αποδίδεται στην ικανότητά της ζύμης να ζυμώνει σάκχαρα παράγοντας αιθυλική αλκοόλη και διοξείδιο του άνθρακα.

Ο *S. cerevisiae* υπήρξε κύριο στοιχείο εξέλιξης του ανθρώπινου πολιτισμού λόγω της εκτεταμένης του χρήσης στην παραγωγή τροφίμων και ποτών καθώς και της εμπορικής του σημασίας στον τομέα της βιοτεχνολογίας. Στην ευρωπαϊκή βιομηχανία ζύμης, παράγονται περίπου 1 εκατομμύριο τόνοι ετησίως, εκ των οποίων το 30% εξάγεται παγκοσμίως. Όσον αφορά στη βιομηχανία ποτών, το *S. cerevisiae* συμμετέχει στην παραγωγή πλήθους ποτών που έχουν υποστεί ζύμωση, όπως ο οίνος, ο ζύθος και ο μηλίτης, αλλά και σε βάσεις αποσταγμάτων όπως το μπράντι και το ουίσκι. (Encyclopedia of Food Microbiology, 2014)

Ο *S. cerevisiae* αποτελεί μονοκύτταρο μύκητα που ανήκει στο είδος των ασκομυκήτων (Phylum Ascomycota). Τα κύτταρα του έχουν σχήμα σφαιρικό και το μέγεθός τους θεωρείται σχετικά μεγάλο, με διάμετρο 5-10μm. Ο *S. cerevisiae* είναι μία από τις καλύτερα γενετικά χαρακτηρισμένες ζύμες καθώς το γονιδίωμα της έχει αναλυθεί διεξοδικά όντας πλήρως αλληλουχισμένο. Συγκεκριμένα, το γονιδίωμα του είναι περίπου 12 Mb, οργανωμένο σε 16 χρωμοσώματα (Goffeau et al., 1996). Τα 5570 εκ των περίπου 6000 γονιδίων φαίνεται να προορίζονται προς την κωδικοποίηση πρωτεϊνών (Doolittle, 1999) και είναι είτε προκαρυωτικής είτε ευκαρυωτικής προέλευσης (Hall et al., 2005).



Εικόνα 2. Η ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* όπως φαίνεται από το μικροσκόπιο (König et al., 2009)

### 2.1.2 Μεταβολισμός του *S. cerevisiae*

Με την βαθύτερη κατανόηση των μηχανισμών ζύμωσης από τον 17<sup>ο</sup> αιώνα και έπειτα, ο *S. cerevisiae* καθιερώθηκε ως ζύμη κυρίαρχη για την παραγωγή οίνου και ζύθου (Basso et al., 2016). Η ευρεία προτίμηση του *S. cerevisiae* στην παραγωγή οίνου και ζύθου έναντι άλλων ζυμών αποδίδεται σε ορισμένα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά όπως η υψηλή απόδοση σε παραγωγή αιθανόλης, καθώς και στην ικανότητά αντίστασης στο περιβαλλοντικό stress. Η χρήση του *S. cerevisiae* στην παραγωγή ποτών δε βασίζεται μόνο στις ζυμωτικές του ικανότητες αλλά και στην συμβολή της στη δημιουργία ενός ευχάριστου αρωματικού και γευστικού χαρακτήρα (Capece et al., 2018).

Αν και τα περισσότερα στελέχη *S. cerevisiae* αναπτύσσονται σε τιμές pH μεταξύ 2,50 και 8,50, ορισμένα οξεόφιλα στελέχη μεταβολίζουν καλύτερα τα συστατικά τους σε πιο όξινες συνθήκες. Ο *S. cerevisiae* έχει την ικανότητα να μεταβολίζει μονοσακχαρίτες όπως η γλυκόζη, η φρουκτόζη, η γαλακτόζη και η μαννόζη, και μερικούς δισακχαρίτες, όπως η μαλτόζη και η σακχαρόζη. Επίσης, είναι σε θέση να αξιοποιήσει μεταβολικά τον τρισακχαρίτη ραφινόζη. Οι μονο- και δισακχαρίτες μεταβολίζονται ευκολότερα από οποιαδήποτε άλλη πηγή άνθρακα. Δεδομένου ότι τα σάκχαρα δεν διαπερνούν ελεύθερα τις βιολογικές μεμβράνες, η πρόσληψή τους απαιτεί τη δράση πρωτεϊνών σε ρόλο «μεταφορέα». Τα κύτταρα του *S. cerevisiae* εμφανίζουν δύο μεταφορείς για μονοσακχαρίτες, τους λεγόμενους μεταφορείς γλυκόζης και γαλακτόζης οι οποίοι δρουν με μηχανισμό διευκολυνόμενης διάχυσης. Ορισμένα στελέχη μπορούν να μεταβολίζουν περισσότερο από 300 g/L σακχάρων με τα τελικά ποσοστά σε αιθανόλη να φτάνουν το 18% (v/v) σε ορισμένα αλκοολούχα ποτά όπως το κρασί.

### 2.1.3 Αρωματικές Ενώσεις που παράγονται στις ζυμώσεις με *S. cerevisiae*

#### Ανώτερες Αλκοόλες

Οι ανώτερες αλκοόλες από ποσοτική άποψη, είναι η σημαντικότερη ομάδα ενώσεων που παράγει ο *S. cerevisiae* κατά τη ζύμωση. Η βιοσύνθεσή τους διεξάγεται είτε μέσω γλυκόλυσης, είτε μέσω του καταβολισμού αμινοξέων, (οδός Ehrlich) (Ehrlich, 1907). Και στις δύο οδούς, προηγείται σχηματισμός α-κετοξέων, τα οποία αποκαρβοξυλιώνονται σε αλδεΐδες και στη συνέχεια ανάγονται για να προς παραγωγή της αντίστοιχης πρωτοταγούς αλκοόλης. Η ρύθμιση της βιοσύνθεσης των ανώτερων αλκοολών είναι αρκετά σύνθετη καθώς μπορούν να προκύψουν ως παραπροϊόντα του μεταβολισμού των αμινοξέων ή μέσω του πυροσταφυλικού οξέος που παράγεται από το μεταβολισμό των υδατανθράκων (Drosou et al., 2022). Κύριοι εκπρόσωποι των ανώτερων αλκοολών που βρίσκονται στο κρασί είναι η 1-προπανόλη ( $C_3H_8O$ ), η 1-βουτανόλη ( $C_4H_{10}O$ ), η ισοβουτανόλη ( $C_4H_{10}O$ ), η 2-φαινυλαιθανόλη ( $C_8H_8O$ ) και η ισοαμυλική αλκοόλη ( $C_5H_{12}O$ ) (Swiegers et al., 2005). Δεδομένης της αρνητικής οργανοληπτικής τους επίδρασης στην ζύμωση των ποτών σε συγκέντρωσή που υπερβαίνει τα 400 mg/L, η βιομηχανία στρέφεται ολοένα και περισσότερο σε στελέχη με σχετικά χαμηλή παραγωγή ανώτερων αλκοολών (Eldarov et al., 2016).

#### Αλδεΐδες

Η κύρια αλδεΐδη που συντίθεται από τον *S. cerevisiae* κατά τη ζύμωση του οίνου είναι η ακεταλδεΐδη που αποτελεί πάνω από το 90% της συνολικής περιεκτικότητας σε αλδεΐδες (Styger et al., 2011). Η ακεταλδεΐδη, είναι η τελευταία πρόδρομη ουσία που παράγεται στην αναερόβια μεταβολική οδό

πριν από την αιθανόλη και προκύπτει από τη μετατροπή του πυροσταφυλικού οξέος μέσω της πυροσταφυλικής αποκαρβοξυλάσης. Οι συγκεντρώσεις της ακεταλδεΐδης ποικίλλουν σημαντικά μεταξύ διαφορετικών τύπων οίνου, με μέσες τιμές περίπου 80 mg/L για το λευκό, 30 mg/L για το ερυθρό και 300 mg/L για τα sherry. Εκτός από την άμεση επίδραση της ακεταλδεΐδης στο αρωματικό προφίλ του κρασιού, είναι εξίσου σημαντική, η έμμεση επιρροή της λόγω της υψηλής αντιδραστικότητάς της με άλλες ενώσεις (Styger et al., 2011)

### **Λιπαρά Οξέα**

Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, σχηματίζονται λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας (LCFAs) μέσω της οδού σύνθεσης λιπαρών οξέων από το ακετύλο-CoA σε συγκεντρώσεις που ποικίλλουν από ng/L έως mg/L (Mato et al., 2007). Τα λιπαρά οξέα μεσαίας αλυσίδας έχουν επίσης μεγάλη σημασία για τις οργανοληπτικές ιδιότητες του τελικού προϊόντος είτε αυτό είναι ζύθος, είτε προϊόν ζύμωσης συνθετικού υποστρώματος. Τα λιπαρά οξέα μέσης αλυσίδας (MCFA) παράγονται κυρίως από τους ζυμομύκητες ως ενδιάμεσα προϊόντα στη βιοσύνθεση των LCFA . Οι ενώσεις αυτές μπορεί να συντελέσουν αρνητικά εάν η συγκέντρωση υπερβαίνει το όριο ανίχνευσής τους, προσδίδοντας αρώματα κεριού, σαπουνιού ή ακόμα και ταγγισμένου τυριού. Το εξανοϊκό, το οκτανοϊκό, το δεκανοϊκό και το δωδεκανοϊκό οξύ είναι τα πιο συνηθισμένα λιπαρά οξέα μέσης αλυσίδας με όρια αντίληψης τα 15, 10, 10 και 6,1 mg/L αντίστοιχα (Michel et al., 2016). Αυτά τα οξέα συμβάλλουν άμεσα στη γεύση ή χρησιμεύουν ως υποστρώματα στον σχηματισμό των αντίστοιχων εστέρων τους (Duan et al., 2015).

### **Εστέρες**

Οι εστέρες αποτελούν πτητικές ενώσεις οι οποίες είναι υπεύθυνες για τα φρουτώδη και τα ανθικά αρώματα του οίνου και των ποτών (Verstrepen et al., 2003). Οι ενώσεις αυτές παράγονται κατά τη ζύμωση στον ενδοκυτταρικό χώρο του κυττάρου και διαχέονται μεταξύ των κυττάρων και του μέσου ζύμωσης (Drosou et al. 2022). Οι πτητικοί εστέρες διαιρούνται σε δύο κύριες ομάδες: Τους οξικούς εστέρες των ανώτερων αλκοολών, και τους εστέρες των λιπαρών οξέων μέσης αλυσίδας [MCFA]. Οι οξικοί εστέρες παράγονται από την εστεροποίηση οξικού οξέος με μία αλκοόλη που προέρχεται από τον μεταβολισμό των αμινοξέων. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν ο οξικός αιθυλεστέρας (βερνίκι, φρούτα), ο οξικός ισοαμυλέστερας (μπανάνα, αχλάδι), ο οξικός ισοβουτυλεστέρας (μπανάνα), ο οξικός φαινυλαιθυλεστέρας (τριαντάφυλλο, μέλι). Οι εστέρες λιπαρών οξέων μέσης αλυσίδας προκύπτουν από την εστεροποίηση της αιθανόλης με ένα λιπαρό οξύ μέσης αλυσίδας (MCFA). Τυπικά παραδείγματα αποτελούν εκτός άλλων ο εξανοϊκός αιθυλεστέρας (μήλο, γλυκάνισος), ο οκτανοϊκός αιθυλεστέρας (μήλο) ο δεκανοϊκός αιθυλεστέρας (άνθη) (Saerens et al., 2008).

Γενικότερα, ο σχηματισμός και των δύο ομάδων εστέρων ευνοείται από την υψηλή σακχαροπεριεκτικότητα και την υψηλή διαθεσιμότητα του υποστρώματος σε άζωτο. Παράλληλα παρατηρείται αυξημένη παραγωγή σε υψηλά pH και χαμηλές θερμοκρασίες.

### **Φαινόλες**

Οι φαινόλες αποτελούν ενώσεις που απαντώνται σε διάφορες μορφές και μπορούν να παραχθούν κατά τη ζύμωση. Τα περισσότερα αρώματα που προέρχονται από φαινόλες και παράγονται από τις ζύμες αναφέρονται ως «phenolic off-flavours», θυμίζουν γαρύφαλλο ή καπνό, και περιγράφονται ως πικάντικα, φαρμακευτικά και καμένα (Scholtes et al., 2014). Γνωστές φαινόλες που παράγονται από τις ζύμες είναι μεταξύ άλλων η 4-βινυλ-γουαϊακόλη, η 4-βινυλφαινόλη, η 4-αιθυλ-γουαϊκόλη, η 4-αιθυλ-φαινόλη, η ευγενόλη και η βανιλίνη (Vanbeneden et al., 2008). Η σύνθεση αυτών των ενώσεων εξαρτάται από το είδος της ζύμης καθώς και από την παρουσία προδρόμων ουσιών, όπως τα φαινολικά οξέα, στο γλεύκος. Τα κατώφλια για αυτές τις πτητικές φαινόλες είναι χαμηλά. Πιο συγκεκριμένα, για την 4-αιθυλ-φαινόλη το κατώφλι και είναι 0,9 mg/L, για την 4-αιθυλ-γουαϊακόλη 0,13 mg/L, για την 4-βινυλ-γουαϊακόλη 0,3 mg/L (Michel et al., 2016).

## **2.2 Οι Ζύμες *Non-Saccharomyces***

Τα επιλεγμένα στελέχη ζυμών *Saccharomyces* χρησιμοποιούνται εδώ και τουλάχιστον 150 χρόνια για την παραγωγή οίνου και ζύθου. Παρόλο που η χρήση στελεχών *Saccharomyces* εξασφαλίζει ασφάλεια και σιγουριά τόσο για τη ζύμωση όσο και για το τελικό προϊόν, τα τελευταία χρόνια η συζήτηση για τη χρήση ζυμών *non-Saccharomyces* γίνεται όλο και πιο έντονη (Tataridis et al., 2013). Η μελέτη των ζυμών αυτών εστιάζει κυρίως στην σε ζυμώσεις μικρότερης διάρκειας και στην παραγωγή προϊόντων με ιδιαιτερότητες στο οργανοληπτικό προφίλ. Δεδομένης της ευρείας χρήσης του *S. cerevisiae* στην παραγωγή ποτών, γίνεται σαφές ότι η πλειοψηφία των διαφορετικών ειδών ζυμών είναι ανεπιθύμητη. Ωστόσο, κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης υπάρχει πάντοτε η πιθανότητα επιμόλυνσης από κάποιο είδος ζύμης διαφορετικό από το επιλεγμένο. Διάφοροι εξωγενείς παράγοντες όπως η υγιεινή του χώρου και του εξοπλισμού σε συνδυασμό με ένα περιβάλλον πλούσιο σε σάκχαρα αποτελούν ευνοϊκές συνθήκες για την εμφάνιση και την ανάπτυξη πλήθους διαφορετικών οργανισμών. Οι κύριοι ανεπιθύμητοι μικροοργανισμοί που εμφανίζονται στις ζυμώσεις είναι οι εξής:

- *Saccharomyces ludwigii*

Ο *Saccharomyces ludwigii* είναι μια ακόμα ζύμη η οποία μπορεί να μεταβολίσει γλυκόζη, φρουκτόζη και σακχαρόζη. Λόγω αυτού του χαρακτηριστικού χρησιμοποιείται ευρέως για παραγωγή ζύθου με χαμηλή περιεκτικότητα αλκοόλης ήτοι λιγότερο από 1 vol% (Michel et al., 2016). Επίσης, παράγει μεγάλες ποσότητες οξικού αιθυλεστέρα και ανώτερων αλκοολών και ως εκ τούτου συμβάλει στο αρωματικό προφίλ του τελικού προϊόντος (Bono et al., 2014). Τέλος, ο *Saccharomyces ludwigii* εμφανίζει υψηλή αντοχή στην αιθανόλη και το θειώδες.

- ***Zygosaccharomyces bailii***

Ο *Z. bailii* είναι ζύμη γνωστή λόγω της αλλοίωσης πλήθους τροφίμων με υψηλή οξύτητα και περιεκτικότητα σε συντηρητικά. Χαρακτηριστικό που διευκολύνει το *Z. bailii* στην προσβολή ποτών είναι εξαιρετική του αντοχή σε τοξικά περιβάλλοντα με υψηλό ποσοστό σε θειώδες. Η καταγραφή των επιμολύνσεων έχει δείξει ότι ο *Z. bailii* ευθύνεται για πλήθος επαναζυμώσεων ενώ απαντάται με αξιοσημείωτη συχνότητα στην παραγωγή γλυκών οίνων (Τσακίρης, 2007).

- ***Hansenula anomala***

Η *Hansenula anomala* είναι ζύμη non-*Saccharomyces* που εμφανίζεται κυρίως στην αρχή των ζυμώσεων, ενώ συχνά παρατηρείται σε γλεύκη οίνου προσβεβλημένα από βοτρυτή. Η συγκεκριμένη ζύμη προκαλεί έντονα προβλήματα, αφενός διότι παράγει οξικό οξύ και οξικό αιθυλεστέρα, αφετέρου διότι καταναλώνει οξέα του υποστρώματος αυξάνοντας το pH του τελικού προϊόντος (Plata et al., 2003). Επιπλέον, έχει την ικανότητα παραγωγής αιθανόλης σε τιμές ως και 4,5 vol%. Το βιολογικό ενδιαφέρον της συγκεκριμένης ζύμης εστιάζεται στην ικανότητά της να παράγει τοξίνη killer, η οποία φαίνεται να είναι αρκετά αποτελεσματική απέναντι σε ανταγωνιστικά είδη του γένους *Brettanomyces* (Comitini et al., 2011)

- ***Torulaspora delbrueckii***

Μια από τις πιο μελετημένες non-*Saccharomyces* ζύμες, η *Torulaspora delbrueckii*, είναι από τις πρώτες ζύμες κυκλοφόρησε εμπορικά ενώ ακόμη και σήμερα χρησιμοποιείται ευρέως (Basso et al., 2016; Jolly et al., 2006). Παλαιότερα αναφερόταν ως *Saccharomyces roseii* ή *Saccharomyces delbrueckii* (Basso et al., 2016). Έρευνες έχουν δείξει θετικά στοιχεία σχετικά με την αντοχή της σε υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης και σε χαμηλές θερμοκρασίες, τη μειωμένη παραγωγή ανεπιθύμητων ουσιών όπως η ακεταλδεΐδη, το μεθυλοπροπανικό οξύ και το οξικό οξύ και ταυτόχρονα την παραγωγή άλλων επιθυμητών ουσιών (Canonico et al., 2017). Χαρακτηριστικό της ζύμης αυτής είναι η υψηλή παραγωγή ανώτερων αλκοολών. Σύμφωνα με την έρευνα Loira et al, ορισμένα στελέχη της

*T. delbrueckii* μπορούν να παραγάγουν ως και 80 mg/L ανώτερων αλκοολών, τιμή που είναι υψηλότερη από τις συγκεντρώσεις που παράγονται από τον *S. cerevisiae* (Loira et al., 2014).

- ***Kloeckera apiculata/Hanseniaspora uvarum***

Η *Kloeckera apiculata* ή *Hanseniaspora uvarum* είναι μια ζύμη ωφέλιμη για την παραγωγή αλκοολούχων ποτών λόγω της παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών όπως η γλυκερόλη, ο οξικός αιθυλεστέρας και η ακεταλδεΐδη. Ως είδος, δεν έχει την δυνατότητα παραγωγής μεγάλων ποσοτήτων αλκοόλης, με αποτέλεσμα να απαιτείται συνήθως η ύπαρξη του *S. cerevisiae* ώστε να ολοκληρωθεί η ζύμωση. Ωστόσο, η συμβολή του παραμένει σημαντική καθώς μπορεί να διαφοροποιήσει σημαντικά το αρωματικό προφίλ του τελικού προϊόντος (Jolly et al., 2006). Επιπλέον, λόγω της χαμηλής παραγωγής αιθανόλης μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην παραγωγή οίνων ή ζύθων χαμηλότερης αλκοολικής περιεκτικότητας (Varela, 2016).

- ***Pichia***

Με κύριο εκπρόσωπο την *Pichia membranaefaciens* οι ζύμες αυτές εμφανίζονται στα αρχικά στάδια της ζύμωσης, όντας όμως γνωστότερες για την δημιουργία υμένα στην επιφάνεια του οίνου κατά την ωρίμαση του. Χαρακτηριστικό γνώρισμα αυτής της ζύμης αποτελεί η ανθεκτικότητα του στην αιθανόλη στις χαμηλές θερμοκρασίες ωρίμασης εντός των κελαριών. Ωστόσο, κατά γενικό κανόνα το όριο ανάπτυξης αυτής της ζύμης περιορίζεται σε αλκοολικούς τίτλους κοντά στο 10 vol% (Τσακίρης, 2007).

- ***Candida***

Το γένος *Candida* περιλαμβάνει ένα ευρύτατο φάσμα πανομοιότυπων ζυμών οι οποίες εμφανίζονται σε όλα τα στάδια των αλκοολικών ζυμών από την έναρξη έως και το τέλος. Οι ζύμες αυτές είναι αρκετά συνηθισμένες σε μεικτές ζυμώσεις με την ανάπτυξή τους να παραμένει ικανοποιητική σε εύρος θερμοκρασιών από 10 έως και 30 °C (Τσακίρης, 2007).

- ***Brettanomyces***

Οι ζύμες αυτού του γένους έχουν τη δυνατότητα να διασπούν και να μεταβολίζουν μαλτόζη, δεξτρίνες και υπολειμματικά σάκχαρα ζυμών με *S. cerevisiae*, μέσω της β-γλυκοσιδάσης. Επιπλέον, μέσω του μεταβολισμού τους παράγουν υψηλές ποσότητες εστέρων, αυξάνοντας τον ανθικό αρωματικό χαρακτήρα του τελικού προϊόντος. Ωστόσο, η παρουσία αυτών των ζυμών σε οίνους και ζύθους

θεωρείται προβληματική, καθώς μπορεί να προσδώσει δυσάρεστα αρώματα ζωικής προέλευσης. Παρόλα αυτά μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην παραγωγή ζύθου τύπου lambic και gueuze δίνοντας ενδιαφέροντα αποτελέσματα. Τα δύο κύρια είδη που χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία ποτών είναι τα *Brettanomyces bruxellensis* και *Brettanomyces anomalus*. Ο *Brettanomyces bruxellensis* μπορεί να παραγάγει μεγάλη ποικιλία εστέρων, όπως ο οξικός αιθυλεστέρας και ο καπρυλικός αιθυλεστέρας, ενώσεις επιθυμητές σε μέτρια επίπεδα. Επίσης, συμβάλλει στην παραγωγή ζύθου υψηλής περιεκτικότητας σε αιθανόλη (15 vol%), έντονη οξύτητα και με χαρακτηριστικά αρώματα που θυμίζουν άλολο (αιθυλ-φαινόλες). Ο *Brettanomyces anomalus* είναι ικανός να ζυμώνει τα κύρια σάκχαρα του ζυθογλεύκους, όπως η μαλτόζη και η γλυκόζη. Τα στελέχη *B. anomalus* μπορούν να μεταβολίσουν επίσης ορισμένα από τα οξέα που υπάρχουν στο γλεύκος, όπως το κουμαρικό και το φερουλικό οξύ παράγοντας 4-βινυλγουαϊακόλη ή 4-βινυλφαινόλη, γνωστές για τη φαινολική τους ιδιότητα στο τελικό προϊόν (Edlin et al., 1995)



Εικόνα 3. Οι ζύμες *Brettanomyces* και *Pichia* από μικροσκόπιο (Καστανός, 2021)



## 3. *Zygosaccharomyces*

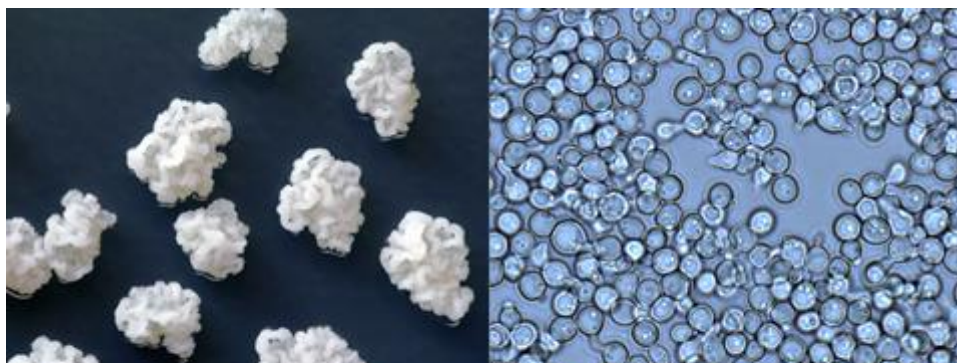
### 3.1 Το γένος *Zygosaccharomyces*

#### 3.1.1 Γενικές Πληροφορίες

Η πρώτη περιγραφή ζύμης που ανήκει στο γένος *Zygosaccharomyces* έγινε το 1895 από τον Linder. Η αναφερόμενη ζύμη πρόκειται για τον *Zygosaccharomyces bailii* η οποία την εποχή εκείνη εμφανιζόταν γραμμένη ως *Saccharomyces bailii*. Σε ύστερες αναφορές συναντώνται επίσης τα ονόματα *Saccharomyces acidifaciens* και *Saccharomyces elegans*. Η συμπερίληψη του *Z. bailii* στο γένος *Saccharomyces* διήρκεσε μέχρι την νεότερη θεώρηση, σύμφωνα με την οποία οκτώ ως τότε γνωστά είδη, κατατάσσονται στο νέο γένος με την ονομασία *Zygosaccharomyces*. Οι *Zygosaccharomyces bailii*, *Z. rouxii*, *Z. bisporus* και *Z. florentinus* είναι τα είδη που αναφέρονται συχνότερα, κυρίως λόγω της ύπαρξή τους στο σταφύλι και στα γλεύκη οίνου (Fugelsang & Edwards, 1997).

Κύριο γνώρισμα των ζυμών αυτών αποτελεί το γεγονός ότι είναι έντονα “οσμόφιλες”. Ο όρος αυτός αποδίδεται σε μικροοργανισμούς οι οποίοι παρουσιάζουν υψηλή αντοχή σε διαλύματα με υψηλή σακχαροπεριεκτικότητα. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι οι ζύμες *Zygosaccharomyces* παρουσιάζουν αντοχή ακόμα και σε περιβάλλοντα με 50 ή και 60% περιεκτικότητα σε σάκχαρα. Η επικινδυνότητα των ζυμών αυτών για τη βιομηχανία των οίνων και των ποτών ερμηνεύεται και από την υψηλή αντοχή σε περιβάλλοντα με υψηλή περιεκτικότητα σε οξικό οξύ και αιθανόλη. Συγκεκριμένα, η αντοχή σε οξικό οξύ φτάνει και σε περιεκτικότητες έως 2,5 vol% ενώ η αντοχή σε αιθανόλη προσεγγίζει και τιμές κοντά στο 18 vol%.

Εκτός από τη δυνατότητα προσαρμογής σε περιβάλλοντα υψηλής οσμωτικής πίεσης, οι ζύμες *Zygosaccharomyces* παρουσιάζουν υψηλή αντοχή σε κοινά συντηρητικά που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων και ποτών. Για παράδειγμα, η αντοχή απέναντι στη μοριακή μορφή του διοξειδίου του θείου μπορεί να εκφράζεται και μέσω τιμών μεγαλύτερων από 3 mg/L. Κατά γενικό κανόνα οι ζύμες παρουσιάζουν αντοχή και σε συντηρητικά όπως το σορβικό και το βενζοϊκό οξύ, με ανώτατη περιεκτικότητα να κυμαίνεται μεταξύ 600 και 1000 mg/L.



Εικόνα 4. Απεικόνιση σε μικροσκόπιο του στελέχους *Zygosaccharomyces rouxii* (Koji E. Aidoo, M.J. Rob Nout, and Prabir K. Sarkar, 2017)

### 3.1.2 Μορφολογικά Χαρακτηριστικά και Ταξινόμηση

Η μορφολογία των κυττάρων και των αποικιών του γένους *Zygosaccharomyces* ποικίλλει ανάλογα με το υπόστρωμα στο οποίο αναπτύσσονται. Σύμφωνα με την πλειοψηφία των παρατηρήσεων οι ζύμες αυτές παρουσιάζουν ωοειδές και κυλινδρικό σχήμα, με το μέγεθός τους να κυμαίνεται μεταξύ 4,5 - 11,5  $\mu\text{m}$  x 3,5 – 6,5  $\mu\text{m}$  (Erickson & McKenna, 1999). Η ανάπτυξη και ο πολλαπλασιασμός των ζυμών γίνεται αντιληπτός από τον σχηματισμό ψευδομηκυλίου. Τα σπόρια του κάθε είδους που ανήκει στο γένος *Zygosaccharomyces* τείνουν να παρουσιάζουν μορφολογικές διαφορές μεταξύ τους, με εκείνο του *Z. bailii* να αποκτά συνήθως σχήμα μπαστουνιού και του *Z. rouxii* σχήμα αλτήρα.

Οι γενικές ταξινομικές ιδιότητες του *Zygosaccharomyces* είναι πανομοιότυπες με άλλα γένη ζυμομυκήτων όπως είναι τα γένη *Saccharomyces*, *Candida* και *Pichia*. Το γένος *Zygosaccharomyces* διαιρείται σε οκτώ αναγνωρισμένα είδη, εκ των οποίων τα τρία αποτελούν σημαντικό παράγοντα αλλοίωσης τροφίμων. Τα τρία αυτά είδη ζυμών είναι ο *Z. bailii*, ο *Z. rouxii* και ο *Z. bisporus*. Σύμφωνα με εμπειρικά δεδομένα, το είδος *Z. bailii* είναι ιδιαίτερα επιθετικό, προσβάλλοντας συνήθως διάφορα προϊόντα όπως είναι η μαγιονέζα, το τουρσί λαχανικών, και ποικιλία ποτών. Αντίθετα, η αλλοίωση του *Z. rouxii* συνήθως συνδέεται με συστατικά με υψηλή περιεκτικότητα σε ζάχαρη ή αλάτι και τελικά προϊόντα όπως συμπυκνωμένοι χυμοί φρούτων, σιρόπια, ζαχαρωμένα φρούτα και είδη ζαχαροπλαστικής όπως η αμυγδαλόπαστα. Το προφίλ αλλοίωσης του *Z. bisporus* είναι παρόμοιο με το *Z. rouxii*, όμως εμφανίζεται λιγότερο συχνά. Ο τύπος των τροφίμων που προσβάλλονται από το *Zygosaccharomyces* είναι συνήθως προϊόντα ανθεκτικά σε αλλοιώσεις τα οποία απενεργοποιούν σχετικώς εύκολα ένα ευρύ φάσμα μικροοργανισμών (Martorell et al., 2007).

### 3.1.3 Περιβάλλον Ανάπτυξης

Η ανάπτυξη και οι μεταβολικές δραστηριότητες των μικροοργανισμών συμπεριλαμβανομένων των βακτηρίων και των μυκήτων, είναι από τους κύριους παράγοντες που ευθύνονται για την αλλοίωση των τροφίμων. Η ομάδα ζυμών με το όνομα *Zygosaccharomyces* περιλαμβάνει αρκετές από τις πιο γνωστές και απαιτητικές ζύμες αλλοίωσης.

Αν και συνήθως οι ζύμες *Zygosaccharomyces* απομονώνονται απευθείας από φρούτα, έχει αποδειχθεί ότι οι πληθυσμοί και συνεπώς η πιθανότητα εύρεσης είναι πολύ μεγαλύτεροι στα προϊόντα που προκύπτουν έπειτα από επεξεργασία. Αυτό οφείλεται κυρίως στην καλύτερη προσαρμογή των ζυμών σε περιβάλλοντα τα οποία έπειτα από σειρά διεργασιών έχουν γίνει αφιλόξενα για πλήθος άλλων ανταγωνιστικών οργανισμών. Μεταξύ των τριών ζυμών αλλοίωσης τροφίμων και ποτών *Zygosaccharomyces*, ο *Z. bailii* διαθέτει τα πιο έντονα και διαφοροποιημένα χαρακτηριστικά αντιμικροβιακής αντοχής. Μάλιστα έρευνες έχουν δείξει ότι η συγκεκριμένη ζύμη έχει αντοχή σε υψηλές συγκεντρώσεις μονοκαρβοξυλικών οξέων, χημικών αντιμυκητιασικών συντηρητικών και αιθανόλης. Συγκεκριμένα, ο *Z. bailii* έχει αποδειχθεί ότι είναι εγγενώς ανθεκτικός στα κοινά χρησιμοποιούμενα

συντηρητικά τροφίμων και ποτών, όπως το οξικό οξύ, γαλακτικό οξύ, προπιονικό οξύ, βενζοϊκό οξύ, σορβικό οξύ, διοξειδίο του θείου και αιθανόλη. Η βέλτιστη αντίσταση απέναντι στα συντηρητικά εξαρτάται από τα επίπεδα γλυκόζης, με συγκεντρώσεις 10-20% να θεωρούνται ιδανικές. Ανάλογα με τους παρακείμενους παράγοντες σύνθεσης όπως το pH, δεν είναι ασυνήθιστη η παρατήρηση στελεχών *Z. bailii* να αλλοιώνουν προϊόντα διατηρημένα με ποσότητες μεγαλύτερες από 1000 ppm σορβικού καλίου. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η αντοχή του *Z. bailii* στα συντηρητικά διεγείρεται από την παρουσία πολλαπλών αντιμικροβιακών συστατικών. Το γεγονός αυτό εκφράζεται με αναστολή της πρόσληψης οξικού οξέος έπειτα από την προσθήκη την σορβικό οξύ, βενζοϊκό οξύ ή αιθανόλη στο επιλεγμένο μέσο καλλιέργειας.

Οι επιμολύνσεις από τις ζύμες του γένους *Zygosaccharomyces* εμφανίζονται συνήθως στις γραμμές παραγωγής και συσκευασίας σε σημεία τα οποία αποστειρώνονται δύσκολα. Η χρήση ανεπαρκούς ποσότητας αποστειρωτικών μέσων και νερού σε χαμηλότερη από το επιθυμητό θερμοκρασία, αποτελούν συχνά σφάλματα που ευνοούν την ανάπτυξη των ζυμών. Αξίζει άλλωστε να σημειωθεί ότι η καταπολέμηση των ζυμών *Zygosaccharomyces* απαιτεί άριστες συνθήκες υγιεινής, καθώς στην περίπτωση του *Z. bailii* μπορεί να αναπτυχθεί πληθυσμός προερχόμενος μόνο από ένα κύτταρο ανά 5-10 L υποστρώματος. Σε ό,τι αφορά στα οινοποιεία και τις μονάδες παραγωγής αλκοολούχων, η πιθανότητα εύρεσης των οργανισμών σε συγκεκριμένα σημεία παρουσιάζεται αυξημένη. Από μελέτη των Rankine και Pilone το 1973 προέκυψε ότι το συνηθέστερο σημείο επιμόλυνσης είναι η μηχανή φιλτραρίσματος. Δεδομένου ότι αυτή η συσκευή χρησιμοποιείται κατά την τελική φάση πριν από την εμφιάλωση, ο κίνδυνος επιμόλυνσης του τελικού προϊόντος πολλαπλασιάζεται.

### **3.1.4 Αλλοιώσεις τροφίμων από είδη του γένους *Zygosaccharomyces***

Η αλλοίωση τροφίμων από ζύμες *Zygosaccharomyces* παρατηρείται κυρίως σε συσκευασμένα τρόφιμα των οποίων κοινό χαρακτηριστικό είναι η χρήση οξικού οξέος ως μέσο αντιμετώπισης των μικροβιακών αλλοιώσεων. Παρόμοια περιστατικά αλλοίωσης εμφανίζονται και σε σιρόπια φρούτων με υψηλή περιεκτικότητα σε οξύ και ζάχαρη με την πλειονότητα να αφορά στην παρουσία του *Z. bailii*. Παρά την σαφή πρόοδο στον έλεγχο της σύνθεσης, το σχεδιασμό και την κατασκευή εξοπλισμού επεξεργασίας τροφίμων και τις τεχνολογίες υγιεινής, ο *Z. bailii* και τα υπόλοιπα είδη *Zygosaccharomyces* παραμένουν σοβαρός κίνδυνος για τις συσκευασμένες σάλτσες, τα τουρσί λαχανικών και τους μη αεριούχους φρουτοχυμούς. Το γεγονός αυτό επικυρώνει την υψηλή προσαρμοστικότητα και την ανθεκτικότητα των ζυμών (Erickson & McKenna, 1999).

Με την εμφάνιση νέων προϊόντων και με την εκτενέστερη καταγραφή περιστατικών επιμολύνσεων, φαίνεται ότι η αλλοίωση που προκαλείται από τις ζύμες *Zygosaccharomyces* επεκτείνεται και σε άλλες κατηγορίες τροφίμων. Αν συνυπολογιστεί ο χρόνος εμφάνισης των αλλοιώσεων από ζύμες *Zygosaccharomyces* οι συνέπειες μεγιστοποιούνται. Δεδομένου ότι για την εμφάνιση της αλλοίωσης

απαιτούνται δύο έως τέσσερις μήνες μετά την συσκευασία, η ανάκληση και ο προσδιορισμός των προσβεβλημένων παρτίδων γίνεται πολύ δυσκολότερος. Παράλληλα η δυσκολία ταυτοποίησης του είδους το οποίο ευθύνεται για την αλλοίωση, δυσχεραίνει σε μεγάλο βαθμό την στοχευμένη αντιμετώπιση του προβλήματος.

## **3.2 *Zygosaccharomyces bailii***

### **3.2.1 Γενικές Πληροφορίες**

Ο *Zygosaccharomyces bailii* είναι μία ζύμη του γένους *Zygosaccharomyces*, γνωστή ως μία από τις πιο επιθετικές ζύμες αλλοίωσης των τροφίμων. Συχνά απομονώνεται ως μολυσματικός παράγοντας κατά τη ζύμωση του οίνου, καθώς και από πολλά όξινα αλλά και πλούσια σε ζάχαρη κονσερβοποιημένα τρόφιμα. Όπως και με τα άλλα είδη του γένους *Zygosaccharomyces*, η ικανότητα του είδους να αλλοιώνει τρόφιμα βασίζεται στην μοναδική του ανθεκτικότητα και αντοχή σε κοινά συντηρητικά όπως τα θειώδη, το οξικό οξύ, το σορβικό οξύ και τον διττανθρακικό διμεθυλεστέρα. Παρόλο που απαντάται συχνά ως μέρος της μικροχλωρίδας των τροφίμων και των ποτών, λίγα είναι γνωστά για τον μεταβολισμό του σε διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας.

Πράγματι, ο *Z. bailii* είναι ζύμη εξαιρετικά ανθεκτική σε καταστάσεις που είναι συνήθως εχθρικές για την ανάπτυξη των περισσότερων κυττάρων. Καταστάσεις τέτοιες αποτελούν εκτός άλλων η υψηλή οσμωτική πίεση, η υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης, οι χαμηλές τιμές pH και η παρουσία ασθενών οργανικών οξέων ή και διαφόρων συντηρητικών στο υπόστρωμα. Η έντονη οσμωτική αντοχή και η υψηλή ικανότητα ζύμωσης επιδεινώνουν τις επιπτώσεις της αλλοίωσης, καθώς το CO<sub>2</sub> που παράγεται κατά την αλκοολική ζύμωση όπως προαναφέρθηκε ευθύνεται για την έκρηξη κονσερβοποιημένων και εμφιαλωμένων τροφίμων (Kuanyshev et al., 2017).

Επιπλέον, παρά το γεγονός ότι ο *Z. bailii* είναι πιο ευαίσθητος στην αιθανόλη από τον *S. cerevisiae* (Kalathenos et al., 2008), υπάρχουν παραδείγματα ανάπτυξης σε μέσα που περιέχουν 20% αιθανόλη (Thomas & Davenport, 1985). Τα πειράματα αυτά υποδεικνύουν ότι η ανοχή στην αιθανόλη ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των διαφορετικών στελεχών. Αναφορικά με τη μόλυνση του οίνου, έχει επίσης αναφερθεί ότι ο *Z. bailii* είναι σε θέση να εξουδετερώσει σημαντικές συγκεντρώσεις θειώδους ακόμα και μεγαλύτερες από 3 mg/L. Η εξουδετέρωση αυτή επιτυγχάνεται μέσω κυτταρικών αποκρίσεων όπως η αποβολή θείου, η παραγωγή ακεταλδεΐδης και ο περιορισμός της διαπερατότητας του κυτταρικού τοιχώματος ή μεμβράνης σε επιβλαβείς ουσίες (Thomas & Davenport, 1985).

### **3.2.2 Μεταβολισμός σακχάρων από τον *Z. bailii***

Ο *Z. bailii* είναι μια ζύμη που υπό αερόβιες συνθήκες και επαρκή συγκέντρωση σακχάρων μπορεί να παράγει βιομάζα. Ο μεταβολισμός του του *Z. bailii* σε κύριους μονοσακχαρίτες πραγματοποιείται

μέσω μεταφορέων. Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί ότι η αξιοποίηση φρουκτόζης, σε αντίθεση με τη γλυκόζη πραγματοποιείται από ειδικό μεταφορέα. Το γονίδιο που κωδικοποιεί την μεταφορά φρουκτόζης, είναι το FFZ1 (Fructose Facilitator *Zygosaccharomyces*). Η αλληλουχία του FFZ1 διαφέρει σε μεγάλο βαθμό από εκείνη στους μεταφορείς γλυκόζης του *S. cerevisiae*. Παράλληλα είναι φυλογενετικά απομακρυσμένο από άλλους μεταφορείς σακχάρων, όπως το FSY1 και το Frt1, οι οποίοι απαντώνται σε είδη όπως το *Saccharomyces pastorianus* και το *Kluyveromyces lactis* (Pina et al., 2004)

Πέρα από την ύπαρξη και την εκμετάλλευση μονομερών σακχάρων ο *Z. bailii* είναι ικανός να μεταβολίζει και μεγαλύτερα σάκχαρα με διαφορετικούς μηχανισμούς (Arez et al., 2014). Ο *Z. bailii* μπορεί να χρησιμοποιήσει και τη σακχαρόζη ως πηγή άνθρακα χάρη στην παραγωγή ιμπερτάσης, του ενζύμου δηλαδή που καταλύει την υδρόλυση της σακχαρόζης σε γλυκόζη και φρουκτόζη (Thomas & Davenport, 1985).

Όπως ο *S. cerevisiae*, ο *Z. bailii* είναι μια Crabtree θετική ζύμη (Leyva et al., 1999). Αυτό σημαίνει ότι σε περιβάλλον με αερόβιες συνθήκες και υψηλή συγκέντρωση σακχάρων, μέρος του μεταβολισμού του άνθρακα ανακατευθύνεται προς την παραγωγή αιθανόλης. Στον *Z. bailii* το φαινόμενο Crabtree σχετίζεται στενά με την αντίστοιχη πηγή άνθρακα. Σε υποστρώματα φρουκτόζης, η αερόβια παραγωγή αιθανόλης είναι αρκετά εντονότερη συγκριτικά με τη γλυκόζη, γεγονός που αποδεικνύει την προτίμηση του συγκεκριμένου μύκητα στο σάκχαρο της φρουκτόζης.

### 3.2.3 Αντοχή του *Z. bailii* στα οξέα

Το *Z. bailii* εμφανίζει μια αξιοσημείωτη ικανότητα ανοχής σε υψηλές συγκεντρώσεις οργανικών οξέων, μεταξύ των οποίων και το συχνά παρόν στα τρόφιμα οξικό οξύ (Stratford et al., 2014). Η ικανότητα αντοχής στα οργανικά οξέα πηγάζει από τη δομή και τις χημικές τους ιδιότητες. Σε υδατικό διάλυμα, υπάρχει ένα οξύ σε μια εξαρτώμενη από το pH ισορροπία μεταξύ της μη φορτισμένης όξινης και της φορτισμένης ανιοντικής μορφής. Όταν το εξωτερικό pH είναι κάτω από το pKa του οξέος, κυριαρχεί η αδιάσπαστη μορφή του οξέος (RCOOH) και διαπερνά την κυτταρική πλασματική μεμβράνη μέσω απλής διάχυσης. Μόλις εισέλθει στο κύτταρο, το σχεδόν ουδέτερο εσωτερικό pH προκαλεί τη διάσταση του οξέος σε πρωτόνια (H<sup>+</sup>) και σε ανιόν (RCOO<sup>-</sup>) (Valli et al., 2005). Τα δύο αυτά φορτισμένα ιόντα, λόγω της αδυναμίας τους να διαχυθούν κατά μήκος της διπλής στοιβάδας της μεμβράνης, συσσωρεύονται μέσα στο κύτταρο (Brul & Coote, 1999). Η απελευθέρωση πρωτονίων οδηγεί σε οξίνιση, η οποία μπορεί να επηρεάσει διαφορετικές μεταβολικές λειτουργίες διαταράσσοντας έτσι την κατάσταση ιονισμού των πλευρικών αλυσίδων αμινοξέων. Εκτός από τη δημιουργία υψηλής πίεσης, η συσσώρευση καρβοξυλικών ανιόντων μπορεί να οδηγήσει επίσης σε παραγωγή ελεύθερων ριζών, προκαλώντας οξειδωτικό στρες, συσσώρευση πρωτεϊνών, υπεροξειδωση λιπιδίων και αναστολή της κινητικότητας των μεμβρανών (Piper et al., 2001).

Τέλος, η ανάπτυξη του *Z. bailii* στο οξικό οξύ φαίνεται να εξαρτάται από την ικανότητα αποικοδόμησης των συντηρητικών και τη μειωμένη διαπερατότητα της μεμβράνης. Η ανοχή του *Z. bailii* σε ασθενή οργανικά οξέα μπορεί επίσης να οφείλεται σε ένα μειωμένο ενδοκυτταρικό pH. Έχει παρατηρηθεί ότι πληθυσμοί με χαμηλότερο ενδοκυτταρικό pH είναι πιο ανθεκτικοί σε έναν αριθμό οργανικών οξέων. Σύμφωνα με τους Stratford et al., τα κύτταρα με χαμηλότερο pH συσσωρεύουν λιγότερο οξύ, γεγονός που επιδρά ευεργετικά στον μεταβολισμό και την ανάπτυξη της ζύμης.

### **3.2.4 Παραγωγή Αρωματικών Ενώσεων από τον *Z. bailii***

Ο ανταγωνισμός των διαφόρων ειδών ζυμών έχει αντίκτυπο και στο αρωματικό προφίλ του τελικού προϊόντος. Οι περισσότερες από τις ενώσεις οι οποίες θεωρούνται επιζήμιες για την ποιότητα τόσο του οίνου όσο και του ζύθου παράγονται σε υψηλές συγκεντρώσεις από καθαρές καλλιέργειες ζυμών non-*Saccharomyces*, δεν προσεγγίζουν παρόμοια επίπεδα σε μικτές ζυμώσεις. Από την άλλη, κάποιες μικτές ζυμώσεις έδειξαν ότι ανάλογα με το είδος ζύμης και με τις αναλογίες των εκάστοτε εμβολίων, οι ζύμες non-*Saccharomyces* μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αύξηση της παραγωγής πολυσακχαριτών και για τη ρύθμιση των τελικών συγκεντρώσεων οξικού οξέος και πτητικών ενώσεων. Πτητικές ενώσεις στις οποίες φαίνεται να υπάρχει άμεση επίδραση είναι εκτός άλλων ο οξικός αιθυλεστέρας, ο φαινυλ-οξικός αιθυλεστέρας, η 2-φαινυλαιθανόλη και η 2-μεθυλ 1-βουτανόλη (Domizio et al., 2011). Η δομή ενός σακχάρου μπορεί να επηρεάσει εξίσου την πορεία της ζύμωσης ως προς το μεταβολισμό του εκάστοτε ζυμομύκητα και την παραγωγή αρωματικών ενώσεων (Berthels et al., 2004). Ο *Z. bailii* μεταβολίζει τη φρουκτόζη πιο εύκολα από τη γλυκόζη παρουσιάζοντας εντονότερους ρυθμούς ζύμωσης στα αντίστοιχα υποστρώματα (Dang et al., 2010; Leandro et al., 2011). Η διαφοροποίηση από σάκχαρο σε σάκχαρο οφείλεται στην κινητική των μεταφορέων που ευνοούν την πρόσληψη φρουκτόζης και τη μερική αναστολή του φορέα γλυκόζης από τη φρουκτόζη (Leyva et al., 1999). Το pH του υποστρώματος επηρεάζει επίσης την παραγωγή αρωματικών ενώσεων, επιδρώντας στην δραστηριότητα ενζύμων που δραστηριοποιούνται για την παραγωγή αρωματικών ενώσεων.

### **3.2.5 Ενδεχόμενες Χρήσεις του *Z. bailii* στη βιομηχανία**

Ο *Z. bailii* αντιπροσωπεύει μια ζύμη ιδιαίτερα σημαντική, της οποίας ο ισχυρός φαινότυπος θα μπορούσε να αξιοποιηθεί σε πληθώρα βιοτεχνολογικών εφαρμογών.

Η δυνατότητα αξιοποίησης της ζύμης αυτής έγκειται κυρίως στην ικανότητα της να αντέχει σε περιβάλλοντα με χαμηλό pH υψηλή συγκέντρωση οξέων. Ένα επιπλέον πεδίο ενδιαφέροντος στο οποίο εστιάζεται η μελέτη του *Z. bailii* είναι η παραγωγή πρωτεϊνών, διαφορετικής προέλευσης και

βιοχημικών λειτουργιών. Αν και ο *Z. bailii* θεωρείται ζύμη ανεπιθύμητη, ορισμένες του ιδιότητες μελετώνται με στόχο την αξιοποίηση τους στην βιομηχανία αλκοολούχων ποτών. Μια από τις ιδιότητες της ζύμης αυτής η οποία έχει τεθεί υπό μελέτη, είναι η ελάττωση των υπολειμματικών σακχάρων των οίνων κατά το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης. Η αργή ή σταματημένη αλκοολική ζύμωση έχει ως αποτέλεσμα οίνους που περιέχουν  $\geq 2$  g/L υπολειμματικά σάκχαρα και αλκοολικό τίτλο χαμηλότερο από το αναμενόμενο. Οι μέθοδοι αντιμετώπισης είναι περιορισμένες και ο επανεμβολιασμός με *S. cerevisiae* είναι η συνηθέστερη. Ωστόσο η προτίμηση της ζύμης αυτής στον μεταβολισμό γλυκόζης δεν ευνοεί την κατανάλωση της υπολειπόμενης φρουκτόζης που παραμένει στο τέλος της ζύμωσης. Διάφορες μελέτες πρότειναν ως μέσο αντιμετώπισης την χρήση ζυμών non-*Saccharomyces* όπως ο *Z. bailii*. Η πρόταση της συγκεκριμένης ζύμης αποδίδεται στο ότι είναι φρουκτόφιλη και στο ότι μπορεί να αναπτύσσεται ικανοποιητικά υπό συνθήκες αλκοολικού τίτλου  $\geq 18\%$  v/v (Santos et al., 2008). Η επιβίωση του *Z. bailii* εξαρτάται κυρίως από την περιεκτικότητα του οίνου σε αιθανόλη με τους χαμηλούς αλκοολικού τίτλους να αποτελούν πιο βιώσιμο περιβάλλον. Παράλληλα, ο αλκοολικός τίτλος καθορίζει την ικανότητα του *Z. bailii* να ολοκληρώνει την ζύμωση οίνου με σακχαροπεριεκτικότητα  $< 2$  mg/L. Η χρήση του φαίνεται να έχει ουσιαστικό νόημα μόνο για οίνους μικρότερους από 15 vol % (Zuehlke et al., 2015). Η χρήση του *Z. bailii* περιορίζεται από το γεγονός ότι είναι ζύμη υπεύθυνη για αυξημένα ποσοστά σε πτητική οξύτητα. Στο πείραμα των Zuehlke et al., οι οίνοι με εμβολιασμό *Z. bailii* είχαν υψηλότερη πτητική οξύτητα (0,8 -1 g/L) συγκριτικά με εκείνους που εμβολιάστηκαν με *S. cerevisiae* (0,71- 0,77 g/L). Με βάση αυτά τα αποτελέσματα, η εμπορική εφαρμογή του *Z. bailii* για αντιμετώπιση σταματημένων ζυμώσεων φαίνεται να είναι ισοδύναμη με τη χρήση του *S. cerevisiae*. Δεδομένης της αυξημένης πτητικής οξύτητας καθώς και του γεγονότος ότι τα συγκρινόμενα στελέχη *Z. bailii* δεν μεταβόλισαν φρουκτόζη καλύτερα από εκείνα του *S. cerevisiae*, η χρήση *Z. bailii* φαίνεται περιττή. Σύμφωνα με άλλες έρευνες (Sütterlin, 2010), η χρήση του *S. cerevisiae* δεν είναι επαρκής, και για τη βέλτιστη ολοκλήρωση της ζύμωσης απαιτείται συνεμβολιασμός με κάποιο φρουκτόφιλο είδος όπως ο *Z. bailii*. Αν και η χρήση του *Z. bailii* συνιστάται ως λύση χωρίς ιδιαίτερους κινδύνους, ο αργός μεταβολισμός *Z. bailii* την καθιστά χρονοβόρα. Ως εναλλακτική, και σε αυτή την περίπτωση προτείνεται η χρήση φρουκτόφιλων στελεχών *S. cerevisiae*.

# ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## 4. ΣΚΟΠΟΣ- ΥΛΙΚΑ- ΜΕΘΟΔΟΙ

### 4.1 Σκοπός-Σχεδιασμός Πειραμάτων

Στόχος της παρούσας πτυχιακής ήταν η διερεύνηση της ζυμωτικής ικανότητας του *Z. bailii* σε μεικτές ζυμώσεις συνθετικών υποστρωμάτων. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε ανάλυση των προϊόντων που προέκυψαν μετά το πέρας των ζυμώσεων. Η επιλογή του *Z. bailii* έγινε κυρίως λόγω της φήμης του ως ανεπιθύμητου μικροοργανισμού, καθώς και λόγω της έλλειψης μελετών για τα πιθανά θετικά χαρακτηριστικά που μπορεί να παρουσιάζει.

Η πειραματική πορεία της εργασίας επικεντρώθηκε στη διερεύνηση της ικανότητας των δύο εξεταζόμενων ζυμών να μεταβολίσουν κάποια σάκχαρα συχνά απαντώμενα σε φυσικά υποστρώματα, όπως η γλυκόζη και μαλτόζη. Για τον σκοπό αυτό οι μικροοργανισμοί αναπτύχθηκαν σε συνθετικό υπόστρωμα πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά, που περιείχε τα παραπάνω σάκχαρα, ενώ διερευνήθηκε ξεχωριστά η ανάπτυξη του κάθε μικροοργανισμού σε υπόστρωμα ενός σακχάρου αλλά και σε υπόστρωμα που περιείχε και τα δύο βασικά σάκχαρα σε αναλογία αντίστοιχη με εκείνη ενός ζυθογλεύκου. Η επιλογή του συνθετικού υποστρώματος αντί γλεύκου, έγινε με γνώμονα τον ακριβή έλεγχο της σύστασης του υποστρώματος και την καλύτερη απομόνωση των παραγόντων που επιδρούν στη ζύμωση.

Από τη συγκεκριμένη πειραματική μελέτη εκτιμήθηκε η ανάπτυξη του κάθε μικροοργανισμού, η κατανάλωση γλυκόζης, καθώς και η δυνατότητα παραγωγής αιθανόλης. Οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε διαφορετικές συνθήκες με σκοπό την αναγνώριση του τρόπου με τον οποίο επιδρά η κάθε μία στο τελικό αποτέλεσμα. Πρώτος παράγοντας διαφοροποίησης ήταν η επιλογή δύο διαφορετικών θερμοκρασιών ζύμωσης (15 και 20 °C), με απώτερο σκοπό την πιθανή ανάδειξη της βέλτιστης ως προς τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος. Παράλληλα, οι ζυμώσεις διαφοροποιήθηκαν και ως προς την αναλογία των δυο ειδών ζύμης στο εμβόλιο. Έτσι, πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις σε αναλογία 1:1 και αναλογία 1:20 υπέρ του *Z. bailii*. Τέλος, οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε δύο διαφορετικούς αρχικούς πληθυσμούς ( $6 \cdot 10^6$  κύτταρα/ml -  $1 \cdot 10^6$  κύτταρα/ml).

Ειδικότερα, εκτός του μεταβολισμού των σακχάρων, μελετήθηκε και ο μεταβολισμός του ελεύθερου αζώτου καθ' όλη τη διάρκεια των ζυμώσεων. Με την ολοκλήρωση των ζυμώσεων, μετρήθηκαν το ποσοστό της παραγόμενης αλκοόλης, η τελική πυκνότητα, η ολική οξύτητα καθώς και το τελικό pH.



Συγχρόνως, δείγματα των τελικών προϊόντων αναλύθηκαν για τον προσδιορισμό των διαφορετικών αρωματικών ενώσεων που παράγονται στην εκάστοτε συνθήκη.

## 4.2 Στελέχη Ζυμομυκήτων

Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα πτυχιακή εργασία είναι τα παρακάτω:

- *Saccharomyces cerevisiae* (Safale US-05, Lallemant)
- *Zygosaccharomyces bailii* (στέλεχος απομονωμένο από οίνο ποικιλίας ξινόμαυρο)

## 4.3 Υλικά

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω όργανα και σκεύη:

Φυγόκεντρος, μαγνητικός αναδευτήρας, σπεκτροφωτόμετρο, μετρητής Alex 500 (Anton Paar), αέριος χρωματογράφος - φασματόμετρο μάζας, στήλες Vigreux, ύψους 30 cm και διαμέτρου 19/26, μικροσκόπιο, ηλεκτρονικό πεχάμετρο, προχοϊδα, πιπέτες μεταβλητού όγκου, πιπέτες Pasteur, πλακίδια Neubauer, διαχωριστικές χοάνες 250 ml, απιοειδείς φιάλες, φιάλες Duran, και διάφοροι ακόμη τύποι γυάλινων φιαλών.

Χρησιμοποιήθηκαν επίσης τα παρακάτω αντιδραστήρια:

Όξινο φωσφορικό κάλιο (Potassium phosphate) >99%, δισόξινο φωσφορικό κάλιο (Potassium dihydrogen phosphate) >98%, Θεικό αμμώνιο (Ammonium sulfate) >99.5%, θεικό μαγνήσιο (Magnesium sulfate, eptahydrate) >99.5%, θειικός ψευδάργυρος (Zink sulfate heptahydrate) >99.5%, εκχύλισμα ζύμης (yeast extract), γλυκόζη (D-(+)-Glucose), 99%, φρουκτόζη (D-Fructose) >98.5%, μαλτόζη (D-(+)-Maltose monohydrate) >99%, κυανό του μεθυλενίου, διάλυμα NaOH 0,1M, NaOH Sodium hydroxide pellets pure <99%, φαινολοφθαλείνη (phenolphthalein), δινιτροσαλικυλικό οξύ (3,5-dinitrosalicylic acid) 98%, potassium sodium tartrate tetrahydrate 99%, ένυδρο όξινο φωσφορικό νάτριο (di-sodium hydrogen phosphate dehydrate) >99.5, ιωδικό κάλιο (potassium iodate) >99.7-100%, αιθανόλη (ethanol) 99.8%, γλυκίνη (glycine) 98.5 - 101.0 %, n-πεντάνιο (n-Pentane), διαιθυλαιθέρας (diethylether) >99.5%, θεικό νάτριο (sodium sulfate), 3-οκτανόλη, φωσφορικό οξύ 10% v/v και ισοοκτάνιο Uvasol Isooctane for spectroscopy >99.8%.

## 4.4 Πειραματική διαδικασία

### 4.4.1 Προετοιμασία των συνθετικών υποστρωμάτων

Τα συνθετικά υποστρώματα περιέχουν όλα τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά που απαιτούνται για την βέλτιστη ανάπτυξη ενός μικροοργανισμού, καθώς και τα βασικά σάκχαρα ανάλογα με το πείραμα. Το συνθετικό υπόστρωμα που παρασκευάστηκε αποτελείται από τα εξής συστατικά και στις εξής αναλογίες:

Όξινο φωσφορικό κάλιο 1 g/L, δισόξινο φωσφορικό κάλιο 1 g/L, θειικό αμμώνιο 2 g/L, θειικό μαγνήσιο 0,2 g/L, θειικός ψευδάργυρος 0,2 g/L, εκχύλισμα ζύμης 2 g/L.

Το εκχύλισμα ζύμης είναι εμπορικό σκεύασμα το οποίο περιέχει: Αμινοξέα, Πεπτίδια, Βιταμίνες και Υδατάνθρακες.

Αφού ζυγίστηκαν οι παραπάνω ποσότητες, προστέθηκαν σε νερό και ακολούθησε ήπια ανάδευση. Στη συνέχεια ρυθμίστηκε το pH του μίγματος ( $\approx 4.5$ ) με την βοήθεια φωσφορικού οξέος 10% v/v. Η αρχική συγκέντρωση του εκάστοτε σακχάρου ήταν 120 g/L. Η αναλογία σακχάρων που επιλέχθηκε για το μείγμα, προέκυψε από την βιβλιογραφία και προσομοιάζει την περιεκτικότητα ενός ζυθογλεύκου σε σάκχαρα.

Δηλαδή:

- Γλυκόζη 9% των ολικών σακχάρων.
- Φρουκτόζη 5% των ολικών σακχάρων.
- Μαλτόζη 86% των ολικών σακχάρων.

Η προσθήκη των σακχάρων πραγματοποιήθηκε σε συνθήκες συνεχούς και ήπιας ανάδευσης. Κάθε ένα από τα συστήματα υποστρώματος-σακχάρου που παρασκευάστηκαν αποστειρώθηκαν σε κλίβανο αποστείρωσης.

### 4.4.2 Εμβολιασμός υποστρωμάτων

Μετά το πέρας της αποστείρωσης των υποστρωμάτων ακολούθησε ο εμβολιασμός τους με ζύμες. Για τον σκοπό αυτό αρχικά ζυγίστηκε 1g ξηρής ζύμης, η οποία στην συνέχεια ενυδατώθηκε σε 100 mL αποστειρωμένου νερού. Η επιλογή της ποσότητας της ξηρής ζύμης μπορεί να γίνει είτε με βάση την μάζα ξηρής ζύμης είτε με βάση τον όγκο εμβολιασμού. Σε κάθε περίπτωση επιλέγονται ποσότητες τέτοιες ώστε το εμβολιαζόμενο υπόστρωμα να έχει αρχική συγκέντρωση κυττάρων περίπου ίση με  $6 \cdot 10^6$  κύτταρα/mL ή με  $1 \cdot 10^6$  κύτταρα ανά περίπτωση (Lewis & Bamforth, 2007).

Συγκεκριμένα, έγινε με βάση την συγκέντρωση πληθυσμού στο υπόστρωμα και όχι με βάση την μάζα. Για κάθε αιώρημα από τις ζύμες πραγματοποιήθηκε μέτρηση συγκέντρωσης κυττάρων σύμφωνα με τη διαδικασία που αναφέρεται στις αναλυτικές μεθόδους. Στη συνέχεια, υπολογίστηκε η ποσότητα ενυδατωμένης ζύμης που πρέπει να προστεθεί σε κάθε ένα από τα συνθετικά υποστρώματα σακχάρων. Ο εμβολιασμός των υποστρωμάτων πραγματοποιήθηκε υπό ασηπτικές συνθήκες. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε φιάλες Duran χωρίς πλήρως αεροστεγή κάλυψη, όπου και πραγματοποιήθηκαν οι ζυμώσεις.

## 4.5 Αναλυτικές μέθοδοι

### 4.5.1 Μέτρηση πληθυσμού

Η συγκέντρωση κυττάρων σε ένα δείγμα ανέρχεται σε εκατομμύρια κύτταρα/ml και μετρήθηκε με την χρήση μικροσκοπίου με την χρήση πλακιδίου Neubauer (Νεραντζής et al., 2015).

α. Προετοιμασία δείγματος:

Πριν από τη δειγματοληψία πραγματοποιείται έντονη ανάδευση με σκοπό την καταστροφή των κροκιδωμάτων και την ομογενοποίηση των δειγμάτων. Με την χρήση αποστειρωμένης πιπέτας και υπό ασηπτικές συνθήκες, τοποθετείται 1ml δείγματος σε δοκιμαστικό σωλήνα. Ακολουθεί αραιώση.

b. Μέτρηση στο μικροσκόπιο:

Η μεγέθυνση που επιλέγεται στο μικροσκόπιο είναι 40×10 και η μέτρηση πραγματοποιείται με ένα πλακίδιο Neubauer. Το εν λόγω πλακίδιο αποτελείται από 25 μεγάλα τετράγωνα και η μέτρηση πραγματοποιείται σε πέντε από αυτά (εδώ επιλέχθηκε η μέτρηση πέντε τετραγώνων της διαγώνιου). Πρέπει συνολικά να μετριοούνται 100-150 κύτταρα ανά πλακίδιο ώστε το ποσοστό λάθους να είναι μικρότερο από 10%. Προσεγγιστικά 30-60 κύτταρα σε κάθε μεγάλο τετράγωνο, αν ο αριθμός των κυττάρων είναι μεγαλύτερος τότε το δείγμα πρέπει να αραιωθεί. Με την βοήθεια του μικροσκοπίου μετρείται ο αριθμός των κυττάρων σε συγκεκριμένο αριθμό τετραγώνων.

c. Υπολογισμοί:

Στην συνέχεια σύμφωνα με τις εξισώσεις που ακολουθούν υπολογίζεται η συγκέντρωση των κυττάρων:

$$C = (n/N) * D * 0,25 * 10^6 \text{ κύτταρα/ml}$$

όπου n ο συνολικός αριθμός κυττάρων, N ο αριθμός των τετραγώνων που μετρήθηκαν και D ο συντελεστής αραιώσης.

## 4.5.2 Μέτρηση σακχάρων

Η μέτρηση των αναγωγικών σακχάρων πραγματοποιήθηκε με την φωτομετρική μέθοδο DNS. Τα αναγωγικά σάκχαρα, καθώς διαθέτουν ένα ελεύθερο ημιακεταλικό υδροξύλιο μπορούν να σχηματίσουν σύμπλοκο μεταξύ αυτού και του δινιτροσαλικυλικού οξέος. Η αντίδραση αυτή είναι δυνατό να πραγματοποιηθεί σε θερμοκρασία μεγαλύτερη των 70 °C (Drosou, et al. 2022). Το σύμπλοκο που σχηματίζεται παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στα 540nm. Τα σάκχαρα που χρησιμοποιήθηκαν στην εν λόγω εργασία είναι αναγωγικά, και κατά συνέπεια μπορούν να μετρηθούν με την μέθοδο DNS.

α. Παρασκευή αντιδραστηρίου:

Παρασκευάζεται διάλυμα δινιτροσαλικυλικού οξέος (3,5 dinitrosalicylic acid) συνολικής ποσότητας 1 L, ως εξής: Αρχικά ζυγίζονται 16 g NaOH και διαλύονται σε 200 mL απιονισμένου νερού σε ένα ποτήρι ζέσεως. Έτσι, προκύπτει διάλυμα NaOH 8% w/v. Στο ίδιο ποτήρι ζέσεως και υπό συνεχή ανάδευση προστίθενται 500 mL απιονισμένου νερού. Στην συνέχεια, πάλι υπό ανάδευση προστίθενται 10 g άνυδρου DNS. Με παροχή ελαφριάς θέρμανσης και ήπιας ανάδευσης, προστίθενται 402.7 g τρυγικού καλιονατρίου με αργό ρυθμό. Τελικά το ομοιογενές διάλυμα τοποθετείται σε ειδικό δοχείο καφέ χρώματος ώστε να προστατεύεται από το φως.

β. Μεθοδολογία:

Σε δοκιμαστικούς σωλήνες (δύο για κάθε συγκέντρωση σακχάρου) προστίθενται 0.5 mL δινιτροσαλικυλικού οξέος και 0.5 mL δείγματος. Επίσης παρασκευάζεται και το τυφλό διάλυμα, που περιέχει 0.5 mL DNS και 0.5 mL απιονισμένο νερό. Τα δείγματα αναδεύονται καλά και στην συνέχεια τοποθετούνται σε νερό που βράζει για 5 min, ώστε να ξεκινήσει η αντίδραση. Στη συνέχεια σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται 4 mL απιονισμένου νερού. Το φωτόμετρο ρυθμίζεται στα 540 nm, και μετά τον μηδενισμό του με το τυφλό διάλυμα πραγματοποιείται η μέτρηση των δειγμάτων. Ο υπολογισμός της περιεκτικότητας σε αναγωγικά σάκχαρα γίνεται με βάση τις καμπύλες αναφοράς. Οι καμπύλες αναφοράς παρασκευάστηκαν από πρότυπα διαλύματα γλυκόζης, συγκέντρωσης 2 mg/mL με διαδοχικές αραιώσεις.

## 4.5.3 Μέτρηση διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου (FAN)

Η μέτρηση του αμμωνιακού αζώτου πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την επίσημη μέθοδο νινυδρίνης όπως περιγράφεται από το ASBC Methods of Analysis. Για την μέτρηση διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου πρέπει πρώτα να παρασκευαστούν τα παρακάτω αντιδραστήρια:

Αντιδραστήριο νινυδρίνης: Σε κωνική φιάλη των 100 mL προστίθενται 10 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 6.0 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5 g νινυδρίνης και 0.3 g φρουκτόζης. Στην συνέχεια η κωνική φιάλη απογεμίζεται με απιονισμένο νερό μέχρι την χαραγή.

Διάλυμα αραιώσης: Ζυγίζονται 2 g  $\text{KIO}_3$  και διαλύονται σε 600 mL απιονισμένου νερού και στη συνέχεια προστίθενται 400 mL αιθανόλης (96%). Ακολουθεί αποθήκευση στους 5 °C.

Πρότυπο πυκνό διάλυμα γλυκίνης (stock solution): Ζυγίζονται 107.2 g γλυκίνης και διαλύονται σε 100 mL απιονισμένου νερού. Ακολουθεί αποθήκευση στους 0 °C.

Πρότυπο αραιό διάλυμα γλυκίνης: 1 mL από το διάλυμα stock solution διαλύεται σε 100 mL απιονισμένου νερού. Το πρότυπο αυτό διάλυμα περιέχει 2 mg αμμωνιακού αζώτου/L.

α. Μεθοδολογία:

Αρχικά, για κάθε ένα από τα δείγματα πραγματοποιείται κατάλληλη αραιώση με απιονισμένο νερό. Σε δοκιμαστικούς σωλήνες μεταφέρονται 2 mL αραιωμένου δείγματος, 2 mL πρότυπου διαλύματος γλυκίνης και 2 mL απιονισμένου νερού. Για κάθε ένα από τα παραπάνω η μέθοδος πραγματοποιείται εις τριπλούν. Στη συνέχεια, σε κάθε έναν από τους δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθεται 1 mL από το αντιδραστήριο νινυδρίνης που έχει ήδη παρασκευασθεί. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες σφραγίζονται καλά, ώστε να αποφευχθεί η εξάτμιση και θερμαίνονται σε νερό που βράζει για 16 min. Μετά από ακριβώς 16 min τα δείγματα απομακρύνονται από το θερμό μέσο και αφήνονται να κρυώσουν για 20 min σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 20 °C. Στη συνέχεια σε κάθε έναν από τους δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθενται 5 mL από το διάλυμα αραιώσης. Ρυθμίζεται το φωτόμετρο στα 570 nm και μετά τον μηδενισμό του με απιονισμένο νερό πραγματοποιείται η μέτρηση των δειγμάτων.

β. Υπολογισμοί:

Υπολογίζεται ο μέσος όρος απορρόφησης των τριών επαναλήψεων κάθε δείγματος. Στην συνέχεια, ο μέσος όρος των ενδείξεων του φωτόμετρου για το τυφλό διάλυμα αφαιρείται τόσο από τους μέσους όρους των δειγμάτων γλεύκους όσο και από το πρότυπο διάλυμα γλυκίνης. Τελικά υπολογίζεται το ελεύθερο αμμωνιακό άζωτο σύμφωνα σε mg/L με την εξής σχέση:

$$FAN = (\text{απορρόφηση δείγματος} / \text{απορρόφηση προτύπου γλυκίνης}) * 2 * \text{βαθμός αραιώσης}$$

#### 4.5.4 Προσδιορισμός του Αλκοολικού Τίτλου και της Τελικής Πυκνότητας

Στην παρούσα εργασία, ο προσδιορισμός του τελικού αλκοολικού τίτλου και της πυκνότητας πραγματοποιήθηκε μέσω της χρήσης αναλυτή Alex 500 από τον κατασκευαστή Anton Paar:

## **Προσδιορισμός του Αλκοολικού Τίτλου και της Τελικής Πυκνότητας**

Για τον προσδιορισμό της αιθυλικής αλκοόλης που παρήχθη στα πρότυπα υποστρώματα, προηγήθηκε φυγοκέντριση και διήθηση όλων των δειγμάτων με φίλτρα διαμέτρου 0,22 μm, με στόχο την μέγιστη δυνατή διαύγεια. Στην συνέχεια κάθε δείγμα εισήχθη στη συσκευή Alex 500, η οποία και προσδιόριζε την παραγόμενη αλκοόλη εντός λίγων λεπτών. Παράλληλα με την μέτρηση της αλκοόλης η συσκευή πραγματοποίησε και μέτρηση της τελικής πυκνότητας για κάθε δείγμα.

## **4.5.5 Προσδιορισμός Ολικής Οξύτητας και pH**

### **Προσδιορισμός του pH.**

Με το πέρας των ζυμώσεων πραγματοποιήθηκε μέτρηση του τελικού pH για κάθε δείγμα. Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε με ηλεκτρονικό πεχάμετρο. Πριν από την μέτρηση, προηγήθηκε ρύθμιση της συσκευής με τα κατάλληλα ρυθμιστικά διαλύματα. (pH= 7 και pH=4).

### **Προσδιορισμός της Ολικής Οξύτητας.**

α. Η ολική οξύτητα των τελικών προϊόντων προσδιορίστηκε με την μέθοδο της τιτλοδότησης, σε προχοΐδα. Η προχοΐδα πληρώθηκε με πρότυπο διάλυμα NaOH 0,1M. Παράλληλα, σε κωνική φιάλη, προστέθηκαν 10ml δείγματος, 20 ml νερού και 3-4 σταγόνες δείκτη φαινολοφθαλεΐνης. Η κωνική φιάλη τοποθετήθηκε κάτω από την προχοΐδα και ακολούθησε τιτλοδότηση του δείγματος με το πρότυπο. Η κατανάλωση των δειγμάτων κατεγράφη.

β. Υπολογισμοί.

Για την έκφραση της ολικής οξύτητας σε g/L ως προς το γαλακτικό οξύ, χρησιμοποιείται ο εξής τύπος **ογκομετρούμενη οξύτητα (g/lit) = (a/v) \*N \*90 (σε γαλακτικό),**

όπου N η κανονικότητα του διαλύματος NaOH, α ο όγκος του καταναλωθέντος διαλύματος NaOH (ml), και v ο όγκος του οίνου που χρησιμοποιήθηκε στο προσδιορισμό (ml).

## **4.5.6 Ανάλυση Πτητικών και Αρωματικών Ενώσεων**

### **4.5.6.1 Διαδικασία εκχύλισης και συμπύκνωσης με στήλη Vigreux**

Για την ανάλυση των αρωματικών με αέρια χρωματογραφία προηγείται μια διαδικασία εκχύλισης. Στην εν λόγω μελέτη, επιλέχθηκε η εκχύλιση και συμπύκνωση με στήλη Vigreux. Κατά τη μέθοδο αυτή οι επιθυμητές προς προσδιορισμό ουσίες, εκχυλίζονται σε ένα μίγμα οργανικών διαλυτών. Η

φάση του διαλύτη συλλέγεται ενώ η φάση που περιέχει τις πρωτεΐνες απορρίπτεται. Στην συνέχεια πραγματοποιείται συμπύκνωση του μίγματος σε στήλη Vigreux, κατά την οποία οι πιο πτητικοί διαλύτες απομακρύνονται και τελικά συλλέγεται ένα μίγμα το οποίο είναι πλούσιο σε ουσίες που σχετίζονται με το αρωματικό προφίλ προϊόντων ζύμωσης. Το τελικό αυτό μίγμα αναλύεται σε αέριο χρωματογράφο GC-MS.

Μεθοδολογία:

Σε ποτήρι ζέσεως τοποθετούνται 50 mL δείγματος 25 mL πεντάνιο και 25 mL αιθέρα. Το διάλυμα αφήνεται για 10 min υπό ήπια ανάδευση και στη συνέχεια τοποθετείται στη φυγόκεντρο για 10 min στις 3500 rpm. Μετά το πέρας των 10 min με την χρήση σιφωνίου διαχωρίζεται η οργανική από την υδατική φάση. Το διάλυμα των οργανικών διαλυτών που περιέχουν τις αρωματικές ενώσεις συλλέγεται. Στην υδατική φάση προστίθεται εκ νέου μίγμα διαλυτών και πραγματοποιείται ξανά η παραπάνω διαδικασία. Στη διαχωριστική χοάνη τοποθετούνται οι οργανικές φάσεις που έχουν συλλεχθεί παραπάνω και προστίθενται περίπου 10 mL απιονισμένο νερό. Η υδατική φάση απορρίπτεται και η οργανική τοποθετείται σε ποτήρι ζέσεως. Για την απορρόφηση της εναπομένουσας υγρασίας προστίθεται μικρή ποσότητα θεικού νατρίου στο δείγμα. Έπειτα από ήπια ανάδευση το δείγμα φιλτράρεται, τοποθετείται σε προζυγισμένη απιοειδή φιάλη και προστίθενται σε αυτό 10  $\mu$ L 3-οκτανόλη, ως εσωτερικό πρότυπο. Η απιοειδής φιάλη συνδέεται με μία στήλη Vigreux και αφήνεται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 35-40 °C για περίπου 45 min. Μετά το τέλος της απόσταξης πραγματοποιείται ένεση του δείγματος στη συσκευή GC-MS.

#### **4.5.6.2 Ανάλυση αρωματικών συστατικών με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας GC-MS**

Το αρωματικό προφίλ έχει πολύ σημαντικό ρόλο στην αποδοχή του τελικού προϊόντος από τους καταναλωτές. Ως εκ τούτου, η ανάλυση του αρωματικού προφίλ του τελικού προϊόντος είναι μείζονος σημασίας, και η πιο διαδεδομένη μέθοδος που εφαρμόζεται για την ανίχνευση των αρωματικών ενώσεων είναι η αέρια χρωματογραφία. Για τον προσδιορισμό των πτητικών ενώσεων χρησιμοποιήθηκε αέριος χρωματογράφος - φασματόμετρο μάζας. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με μια τριχοειδή στήλη διοξειδίου του πυριτίου με διαστάσεις 30 m  $\times$  0.32 mm  $\times$  0.25  $\mu$ m ενώ ως φέρον αέριο χρησιμοποιείται ήλιο (He) με παροχή 1mL/min. Ποσότητα 1 $\mu$ l από κάθε εκχύλισμα εγχέεται στο χρωματογράφο με split ratio 100:1. Η θερμοκρασία της γραμμής μεταφοράς είναι 38 ο C. Στο φασματόμετρο μάζας τα ηλεκτρόνια παράγονται στον θάλαμο ιονισμού από θερμαινόμενο μεταλλικό νήμα και έχουν δυναμικό της τάξεως των 70 eV στα 40-550 amu. Τέλος η ανάλυση των αποτελεσμάτων γίνεται μέσω λογισμικού HP Chemstation rev.A.06.03. Το εμβადόν της κορυφής που

εμφάνιζε η κάθε ουσία μετατρέπεται σε συγκέντρωση με τη βοήθεια του εσωτερικού προτύπου (3-οκτανόλη) σύμφωνα με προκατασκευασμένη καμπύλη αναφοράς.



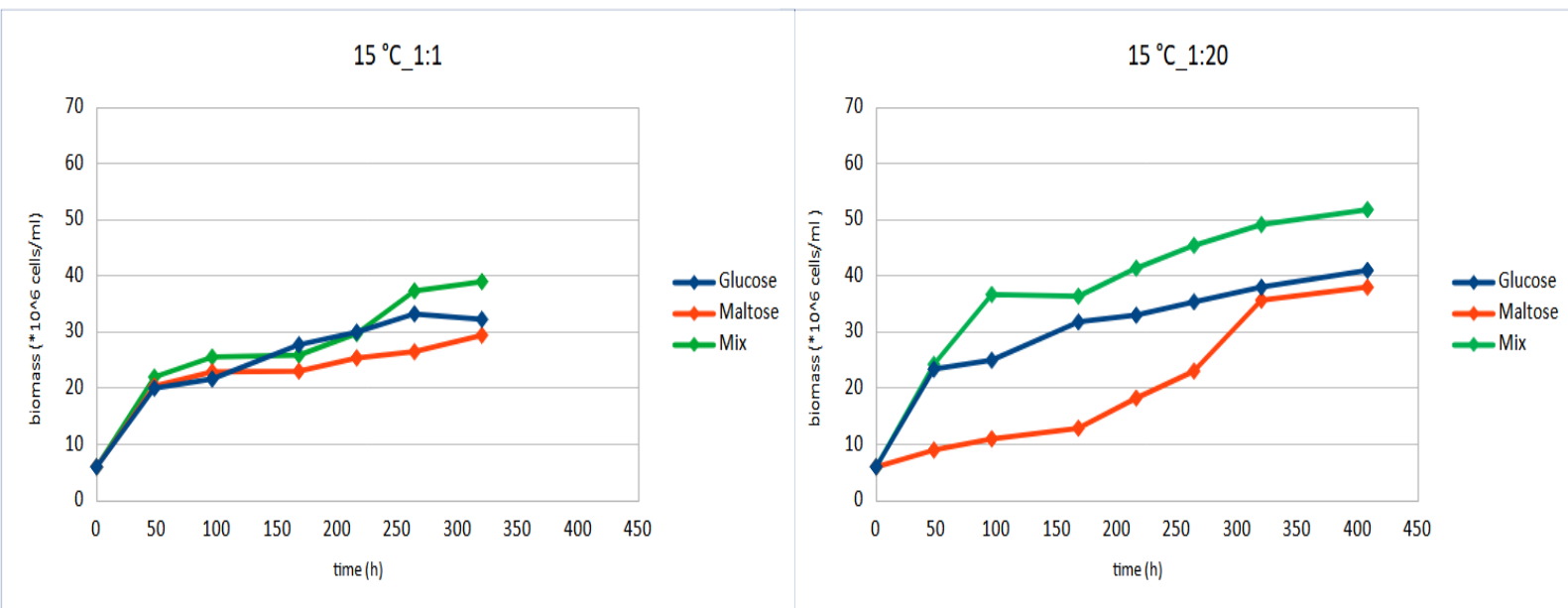
## 5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ

Με βάση το σχεδιασμό των πειραμάτων στο προηγούμενο κεφάλαιο, σε αυτό το κεφάλαιο παρατίθενται και σχολιάζονται τα αποτελέσματα των επί μέρους σειρών πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν.

### 5.1 Μέτρηση Πληθυσμών

#### 5.1.1 Ζυμώσεις εμβολιασμού $6 \cdot 10^6$ κύτταρα/ml

##### 5.1.1.1 Ζυμώσεις στους $15^\circ\text{C}$



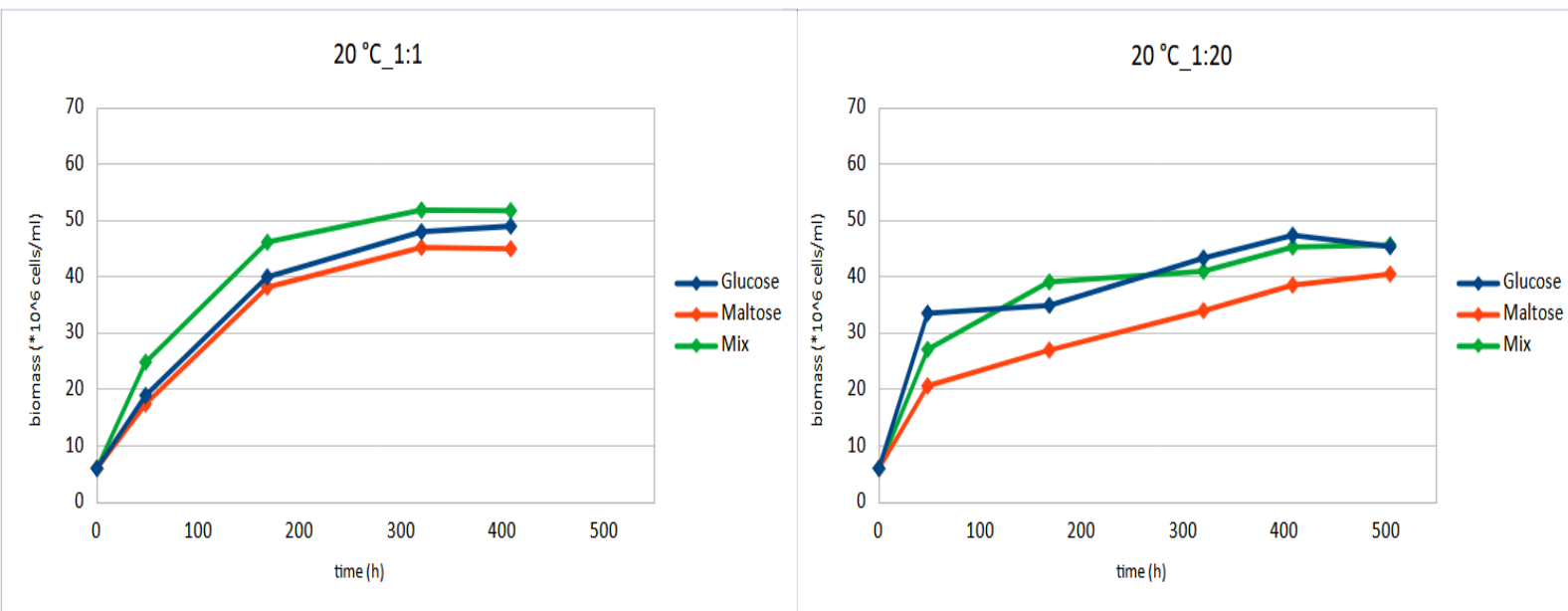
Διάγραμμα 1. Κυτταρική ανάπτυξη στις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν σε  $T=15^\circ\text{C}$  με αρχικό πληθυσμό  $6 \cdot 10^6$  κύτταρα/ml

Αρχικά εξετάζονται οι ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν σε αρχικό πληθυσμό  $6 \cdot 10^6$  κύτταρα/ml και σε θερμοκρασία  $15^\circ\text{C}$  (διάγραμμα 1). Σε αναλογία ζυμών 1:1, οι τιμές πληθυσμού ήταν κοινές για τις 48 ώρες, στις οποίες παρατηρήθηκε ταχεία αύξηση. Έπειτα από ( $t=48$  ώρες), ξεκίνησε η διαφοροποίηση των υποστρωμάτων. Οι ζυμώσεις στη μαλτόζη και το μείγμα ακολούθησαν παρόμοια ανάπτυξη ως τις 200 ώρες, με τις καμπύλες στη συνέχεια να διαφοροποιούνται. Για τις ζυμώσεις σε αυτή τη συνθήκη η φάση στασιμότητας επήλθε κοντά στις 270 ώρες.

Στην αναλογία 1:20 παρατηρήθηκε διαφοροποίηση, η οποία έγινε εμφανής κατά τις πρώτες 48 ώρες (διάγραμμα 1). Οι αντίστοιχοι πληθυσμοί στη γλυκόζη και το μείγμα παρουσίασαν ταχεία ανάπτυξη συγκριτικά με εκείνους στη μαλτόζη, στην ζύμωση της οποίας ο πληθυσμός αυξήθηκε πιο σταδιακά.

Έπειτα από ( $t=48$  ώρες), το μείγμα σακχάρων παρουσίασε έντονη αύξηση καταλήγοντας έτσι στην υψηλότερη τιμή πληθυσμού ( $52 \cdot 10^6$  κύτταρα/ml). Οι ζυμώσεις στα άλλα δύο υποστρώματα κατέληξαν σε πληθυσμούς περίπου ίσους με  $40 \cdot 10^6$  κύτταρα/ml. Οι ζυμώσεις σε αναλογία 1:20 ολοκληρώθηκαν κατά τις 350 ώρες. Στη σύγκριση των δύο αναλογιών ζυμών, η ζύμωση σε αναλογία 1:20 είχε μεγαλύτερη διάρκεια και ολοκληρώθηκε πιο αργά (350 ώρες). Οι τελικές τιμές σε αναλογία 1:20 ήταν επίσης σε υψηλότερο επίπεδο σε ένα εύρος μεταξύ  $40-50 \cdot 10^6$  κύτταρα/ml, συγκριτικά με  $30-40 \cdot 10^6$  κύτταρα/ml σε αναλογία 1:1. Τα αποτελέσματα υπέδειξαν το μείγμα ως βέλτιστο υπόστρωμα λόγω της ταχείας αύξησης του πληθυσμού μέχρι υψηλού επιπέδου. Αυτό διακρίνεται κυρίως σε αναλογία εμβολιασμού 1:20. Οι καμπύλες των ζυμώσεων στη γλυκόζη εξελίχθηκαν παράλληλα με εκείνες του μείγματος, χωρίς ωστόσο να παρατηρηθεί ταχεία ανάπτυξη στα αρχικά στάδια ή αντίστοιχα υψηλές τιμές πληθυσμού. Η ζύμωση σε μαλτόζη κατέληξε σε ικανοποιητικές τιμές, παρά την καθυστέρηση κατά την έναρξη. Αναφορικά με την αναλογία ζυμών, οι ζυμώσεις σε αναλογία 1:20 έδειξαν καλύτερα χαρακτηριστικά συγκριτικά με εκείνες σε αναλογία 1:1, καθώς κατέληξαν σε υψηλότερες τελικές τιμές.

### 5.1.1.2 Ζυμώσεις στους 20 °C



Διάγραμμα 2. Κυτταρική ανάπτυξη στις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν σε  $T=20$  °C με αρχικό πληθυσμό  $6 \cdot 10^6$  κύτταρα/ml

Στις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν στους 20 °C και σε αναλογία 1:1, τα υποστρώματα της γλυκόζης και της μαλτόζης παρουσίασαν κοινή πορεία κατά την εκθετική φάση, με τη γλυκόζη όμως να καταγράφει υψηλότερη τελική τιμή ( $50 \cdot 10^6$  κύτταρα/ml) (διάγραμμα 2). Το μείγμα παρουσίασε πιο έντονη αύξηση κατά την εκθετική φάση με τελική τιμή ίση με  $52 \cdot 10^6$  κύτταρα/ml. Δεδομένων

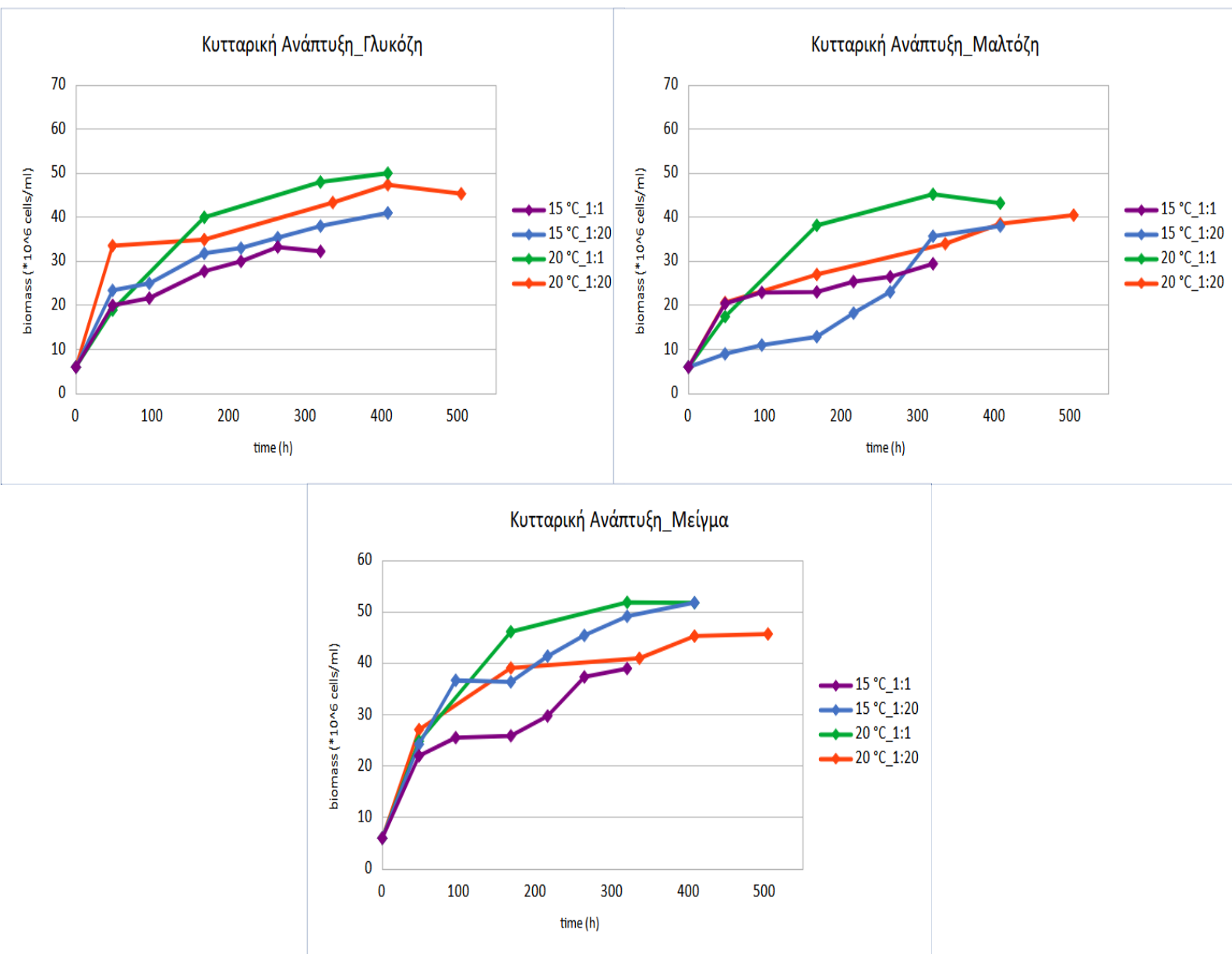
των τελικών αυτών τιμών, η γλυκόζη και το μείγμα φάνηκε να αποτελούν τα πιο κατάλληλα περιβάλλοντα υπό αυτή τη συνθήκη.

Σε αναλογία 1:20, οι ζυμώσεις σε γλυκόζη και μείγμα ήταν παρόμοιες, με τις τιμές στις καμπύλες να τέμνονται σε μεγάλο μέρος του διαγράμματος. Οι τιμές τελικής βιομάζας επίσης ταυτίστηκαν και ήταν υψηλότερες συγκριτικά με εκείνες της μαλτόζης ( $45 \cdot 10^6$  συγκριτικά με  $40 \cdot 10^6$  κύτταρα /ml). Και σε αυτή την περίπτωση, το υπόστρωμα της μαλτόζης είχε πιο χαμηλή παραγωγή βιομάζας η οποία αποδόθηκε περισσότερο στην ασθενή ανάπτυξη έπειτα από τις 48 ώρες.

Από τη σύγκριση αναλογιών για τη γλυκόζη, η ζύμωση σε αναλογία 1:20 εξελίχθηκε ταχύτερα ως τις 48 ώρες. Στη συνέχεια, η πορεία ήταν αργά ανοδική. Η καμπύλη στην αναλογία 1:1 είχε πιο έντονη άνοδο, με τις 300 h να είναι το σημείο στο οποίο σταθεροποιείται. Ο τελικός πληθυσμός ήταν υψηλότερος σε αναλογία 1:1 ( $52 \cdot 10^6$  κύτταρα/ml). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ο *Z. bailii* αναπτύσσεται ταχέως κατά τις πρώτες 48 – 96 ώρες της ζύμωσης, χωρίς αυτό να παρεμποδίζει την ενδεχόμενη ύστερη εξέλιξη του *S. cerevisiae* (Carece et al., 2022). Υπό προϋποθέσεις όπως η χαμηλή θερμοκρασία, ο *Z. bailii* μπορεί να επικρατήσει του *S. cerevisiae* (Heard & Fleet, 1988). Στο υπόστρωμα αναλογίας 1:1, δεν υπήρξαν ιδιαίτερα σημεία διαφοροποίησης, και ο ανταγωνισμός των στελεχών δεν ήταν εμφανής. Για τη μαλτόζη, οι πορείες των ζυμώσεων είναι παρόμοιες με εκείνες της γλυκόζης με τη διαφορά ότι οι τιμές πληθυσμών είναι σταθερά χαμηλότερες. Οι τελικοί πληθυσμοί ( $45 \cdot 10^6$  κύτταρα/ml) και το σημείο στασιμότητας ήταν κοντά, με τη διαφοροποίηση να γίνεται εμφανής στις πρώτες 48 -72 ώρες όπου ο *Z. bailii* εξελίσσεται ταχύτερα μέχρι να επικρατήσει ο *S. cerevisiae*. Στο μείγμα και σε κάθε αναλογία, οι τελικοί πληθυσμοί ήταν υψηλότεροι, αλλά συγκρίσιμοι με των υπόλοιπων υποστρωμάτων.

Συμπερασματικά, προκύπτει ότι η διαφορετική αναλογία επηρέασε τόσο τον τελικό πληθυσμό, όσο και τη διάρκεια της ζύμωσης. Αν και οι τελικοί πληθυσμοί διαφοροποιήθηκαν ανά συνθήκη, η διάρκεια ζύμωσης ήταν σταθερά υψηλότερη στις ζυμώσεις αναλογίας 1:20. Τέλος, το μείγμα σακχάρων παρουσίασε ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά με υψηλές τελικές τιμές πληθυσμού.

### 5.1.1.3 Σύγκριση Ζυμώσεων ανά Σάκχαρο



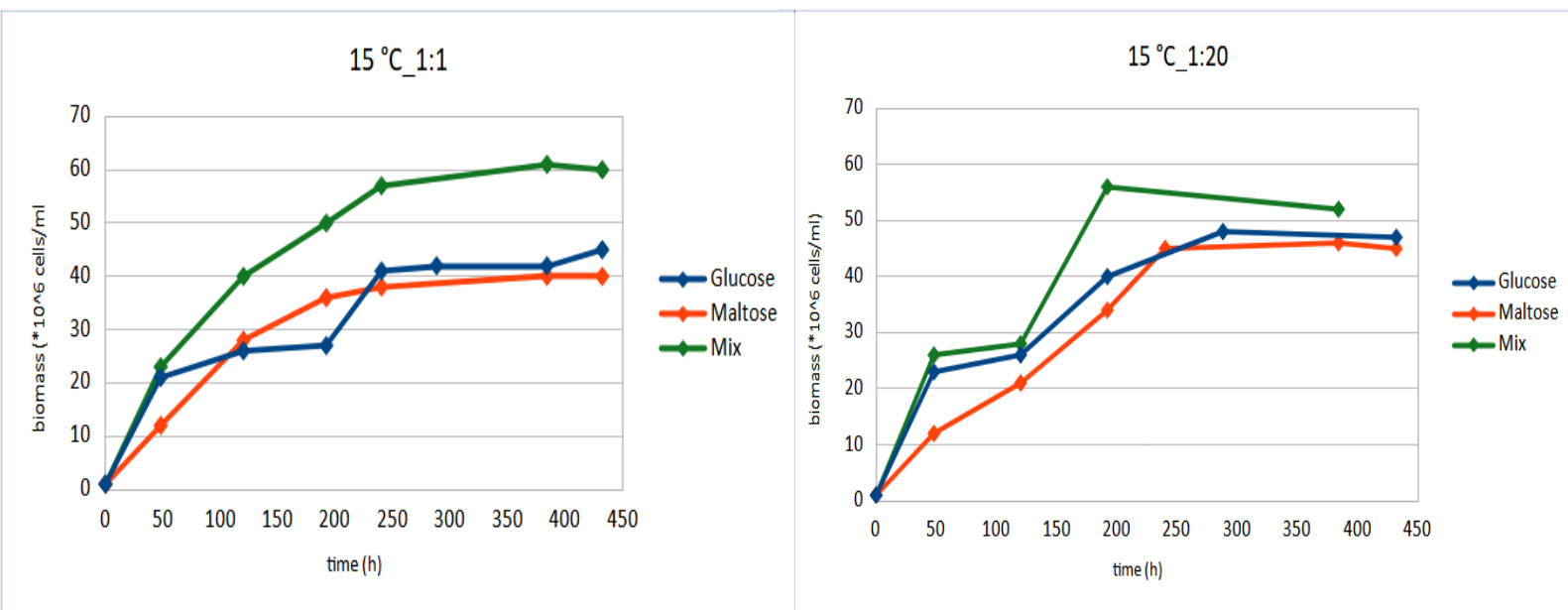
Διάγραμμα 3. Κυτταρική ανάπτυξη σε διαφορετικά υποστρώματα στις ζυμώσεις με αρχικό πληθυσμό  $6 \cdot 10^6$  κύτταρα/ml

Σε συνέχεια της μελέτης της κινητικής των ζυμώσεων με αρχικό πληθυσμό  $6 \cdot 10^6$  κύτταρα/ml, παρουσιάζονται διαγράμματα υπό το πρίσμα του κάθε σακχάρου μεμονωμένα. Τα διαγράμματα αυτά αποσκοπούν περισσότερο στην σύγκριση των δύο θερμοκρασιών ζύμωσης (15 και 20 °C) και δευτερευόντως στην περαιτέρω ανάλυση των υπόλοιπων παραγόντων που επίδρασαν στις ζυμώσεις. Σε ό,τι αφορά στη γλυκόζη, οι ζυμώσεις παρουσίασαν ομοιότητες με μικρές όμως διαφοροποιήσεις σε συγκεκριμένες φάσεις των ζυμώσεων. Σύμφωνα με το διάγραμμα 3, παρατηρήθηκε πιο παρατεταμένη εκθετική φάση και υψηλότερες τελικές τιμές πληθυσμού για τις ζυμώσεις στους 20 °C. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, η οποία υπαγορεύει καλύτερη ανάπτυξη των ζυμών σε θερμοκρασία 20 °C, χωρίς όμως να αποκλείεται ικανοποιητική ανάπτυξη

και σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (Garavaglia et al., 2015). Από την περαιτέρω σύγκριση αναλογιών δεν παρατηρήθηκε κάποιο σημείο διαφοροποίησης. Στη μαλτόζη (διάγραμμα 3), οι παρατηρήσεις ήταν παρόμοιες. Η αναλογία εμβολιασμού 1:1 στους 20 °C έλαβε υψηλότερες τιμές για το μεγαλύτερο μέρος της ζύμωσης ενώ στους 15 °C τις χαμηλότερες. Οι παρατηρήσεις των προηγούμενων υποστρωμάτων επιβεβαιώθηκαν και για το υπόστρωμα του μείγματος, παρά τις μικρές διαφοροποιήσεις. Η αναλογία 1:20 στους 15 °C προσέγγισε τις πορείες και τις τελικές τιμές ζύμωσης 1:1 στους 20 °C, καθώς είχε ταχεία ανάπτυξη και μεγάλο τελικό πληθυσμό ( $52 \cdot 10^6$  κύτταρα/ml). Για τα διαγράμματα των ζυμώσεων στους 20 °C, οι παρατηρήσεις επανελήφθησαν, με τους τελικούς πληθυσμούς να μην διαφοροποιούνται έντονα. Συμπερασματικά, προέκυψε ότι βέλτιστη συνθήκη για ανάπτυξη πληθυσμού σε εμβολιασμό  $6 \cdot 10^6$  κυττάρων/ml είναι οι 20 °C σε αναλογία ζυμών 1:1.

## 5.1.2 Ζυμώσεις σε εμβολιασμό $1 \cdot 10^6$ κύτταρα/ml

### 5.1.2.1 Ζυμώσεις στους 15 °C



Διάγραμμα 4. Κυτταρική ανάπτυξη στις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν σε  $T=15$  °C με αρχικό πληθυσμό  $1 \cdot 10^6$  κύτταρα/ml

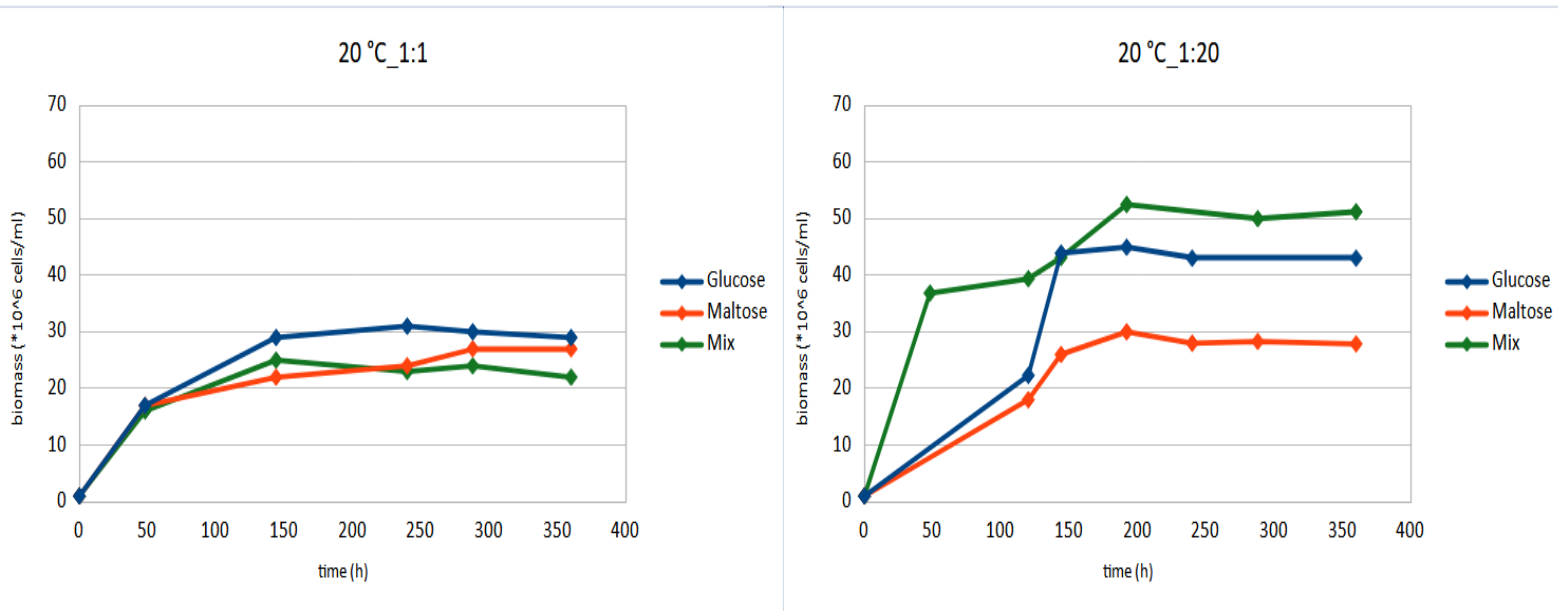
Οι παρατηρήσεις για τα διαγράμματα ζυμώσεων με εμβολιασμό  $1 \cdot 10^6$  κύτταρα/ml ήταν παρόμοιες με εκείνες στα αντίστοιχα διαγράμματα εμβολιασμού  $6 \cdot 10^6$  κύτταρα/ml. Η εξέταση των πληθυσμών ξεκίνησε από τα διαγράμματα που αφορούν σε ζυμώσεις στους 15 °C. Για τις ζυμώσεις αναλογίας 1:1 οι πληθυσμοί στα υποστρώματα αναπτύχθηκαν ως τις 250-300 ώρες, με την καμπύλη τους ύστερα να σταθεροποιείται. Οι ζυμώσεις στα υποστρώματα καθαρών σακχάρων κινήθηκαν σε πιο χαμηλά επίπεδα συγκριτικά με το μείγμα, με τους τελικούς πληθυσμούς να φτάνουν ως τα 40 -  $45 \cdot 10^6$

κύτταρα/ml. Η ζύμωση του μείγματος διαφοροποιήθηκε, παρουσιάζοντας έντονη εκθετική φάση και τον υψηλότερο τελικό πληθυσμό ( $60 \cdot 10^6$  κύτταρα/ml). Η εμφανής διαφοροποίηση της καμπύλης συγκριτικά με τις άλλες δύο, υποδεικνύει ότι το μείγμα παρουσίασε πιο ευνοϊκές συνθήκες για την παραγωγή βιομάζας.

Σε αναλογία 1:20, οι παρατηρήσεις ήταν κοινές με εκείνες της ζύμωσης σε αναλογία 1:1. Έτσι, οι ζυμώσεις σε γλυκόζη και μαλτόζη κατέληξαν σε ίδιες τιμές τελικού πληθυσμού ( $\sim 48 \cdot 10^6$  κύτταρα/ml). Η διαφορά σε αυτή τη συνθήκη είναι ότι στις 48 ώρες, η καμπύλη της μαλτόζης σημείωσε άνοδο προσεγγίζοντας εκείνη του μείγματος. Το μείγμα παρουσίασε ταχεία ανάπτυξη για όλη τη διάρκεια της εκθετικής φάσης, γεγονός που συνετέλεσε στην υψηλότερη τιμή τελικού πληθυσμού ( $53 \cdot 10^6$  κύτταρα /ml).

Αναφορικά με την σύγκριση μεταξύ των αναλογιών των δύο ζυμών στο εμβόλιο, δεν υπήρξε έντονη διαφοροποίηση. Η φάση στασιμότητας σε αναλογίες 1:1 ήταν κοντά στις 250 ώρες ζύμωσης, ενώ σε αναλογίες 1:20 σε ένα εύρος χρόνου μεταξύ 200 και 300 ωρών. Οι τιμές των τελικών πληθυσμών ήταν κοντά και για τις δύο συνθήκες εμβολιασμού, με την υψηλότερη τιμή να καταγράφεται σε ζύμωση μείγματος. Συμπερασματικά, όπως και στις ζυμώσεις αρχικού πληθυσμού  $6 \cdot 10^6$  κυττάρων, στις ζυμώσεις αυτές το μείγμα φάνηκε να είναι το ευνοϊκότερο υπόστρωμα για παραγωγή βιομάζας.

### 5.1.2.2 Ζυμώσεις στους 20 °C



Διάγραμμα 5. Κυτταρική ανάπτυξη στις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν σε  $T=20$  °C με αρχικό πληθυσμό  $1 \cdot 10^6$  κύτταρα/ml

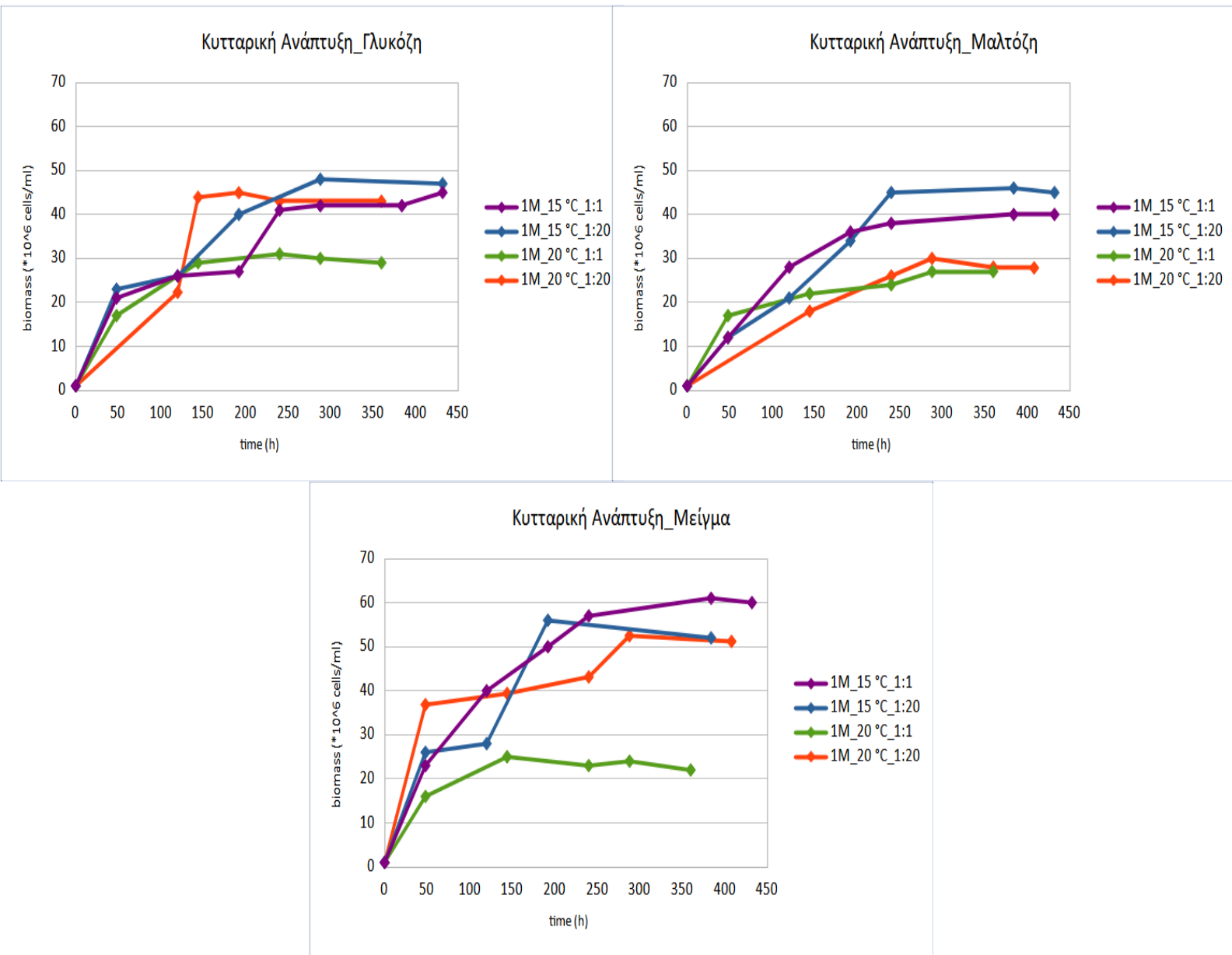
Στις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν στους 20 °C και σε αναλογία 1:1, παρατηρήθηκαν χαμηλές τιμές τελικών πληθυσμών με εύρος  $20-30 \cdot 10^6$  κύτταρα/ml. Επίσης, η στασιμότητα των ζυμώσεων διαφοροποιήθηκε ανά υπόστρωμα με δύο ζυμώσεις να σταθεροποιούνται σε  $t=150$  h, και μία στις

t=300 h. Κατά τη φάση ανάπτυξης, το υπόστρωμα με τις σταθερά υψηλότερες τιμές ήταν η γλυκόζη. Στη ζύμωση της μαλτόζης, η αργή αλλά διαρκής εξέλιξη είχε ως αποτέλεσμα τελική τιμή κοντά σε εκείνη του υποστρώματος γλυκόζης ( $27 \cdot 10^6$  κύτταρα/ml). Στο μείγμα, η τιμή του τελικού πληθυσμού ήταν η χαμηλότερη φτάνοντας ως τα  $25 \cdot 10^6$  κύτταρα/ml.

Σε αναλογία 1:20, παρατηρήθηκε μεγάλο εύρος τιμών πληθυσμών. Στην αρχή της εκθετικής φάσης, οι πληθυσμοί γλυκόζης έλαβαν τιμές κοινές με εκείνες της μαλτόζης. Ωστόσο, στις 120 ώρες η καμπύλη γλυκόζης παρουσίασε αξιοσημείωτη άνοδο με σταθεροποίηση 24 ώρες αργότερα. Αντίθετα, η καμπύλη της μαλτόζης είχε πιο αργή άνοδο, ως τη στασιμότητα στις 200 ώρες. Η καμπύλη του μείγματος διαφοροποιήθηκε, παρουσιάζοντας ταχεία αύξηση στις πρώτες 48 ώρες. Στη συνέχεια η αύξηση ήταν πιο ομαλή, με τη στασιμότητα να επέρχεται στις 200 ώρες.

Η κυριότερη παρατήρηση αναφορικά με την σύγκριση των δύο αναλογιών ζυμών, ήταν ότι η αναλογία 1:20 επέφερε αρκετά υψηλότερες τιμές πληθυσμού βιομάζας συγκριτικά με τις ανεξήγητα χαμηλές τιμές σε αναλογία 1:1. Οι ζυμώσεις αυτής της αναλογίας παρουσίασαν έντονες μεταβολές κατά τις 120 ώρες της φάσης ανάπτυξης, προσεγγίζοντας τιμές συγκρίσιμες με εκείνες στις ζυμώσεις άλλων συνθηκών. Αναμενόμενα, το μείγμα παρουσίασε την υψηλότερη τελική τιμή ( $50 \cdot 10^6$  κύτταρα/ml).

### 5.1.3 Σύγκριση Ζυμώσεων ανά Σάκχαρο



Διάγραμμα 6. Κυτταρική ανάπτυξη στα διαφορετικά υποστρώματα στις ζυμώσεις με αρχικό πληθυσμό  $1 \cdot 10^6$  κύτταρα/ml

Η μελέτη των διαφοροποιήσεων στους πληθυσμούς συνεχίστηκε υπό το πρίσμα του κάθε σακχάρου μεμονωμένα και με στόχο την διερεύνηση της επίδρασης της θερμοκρασίας.

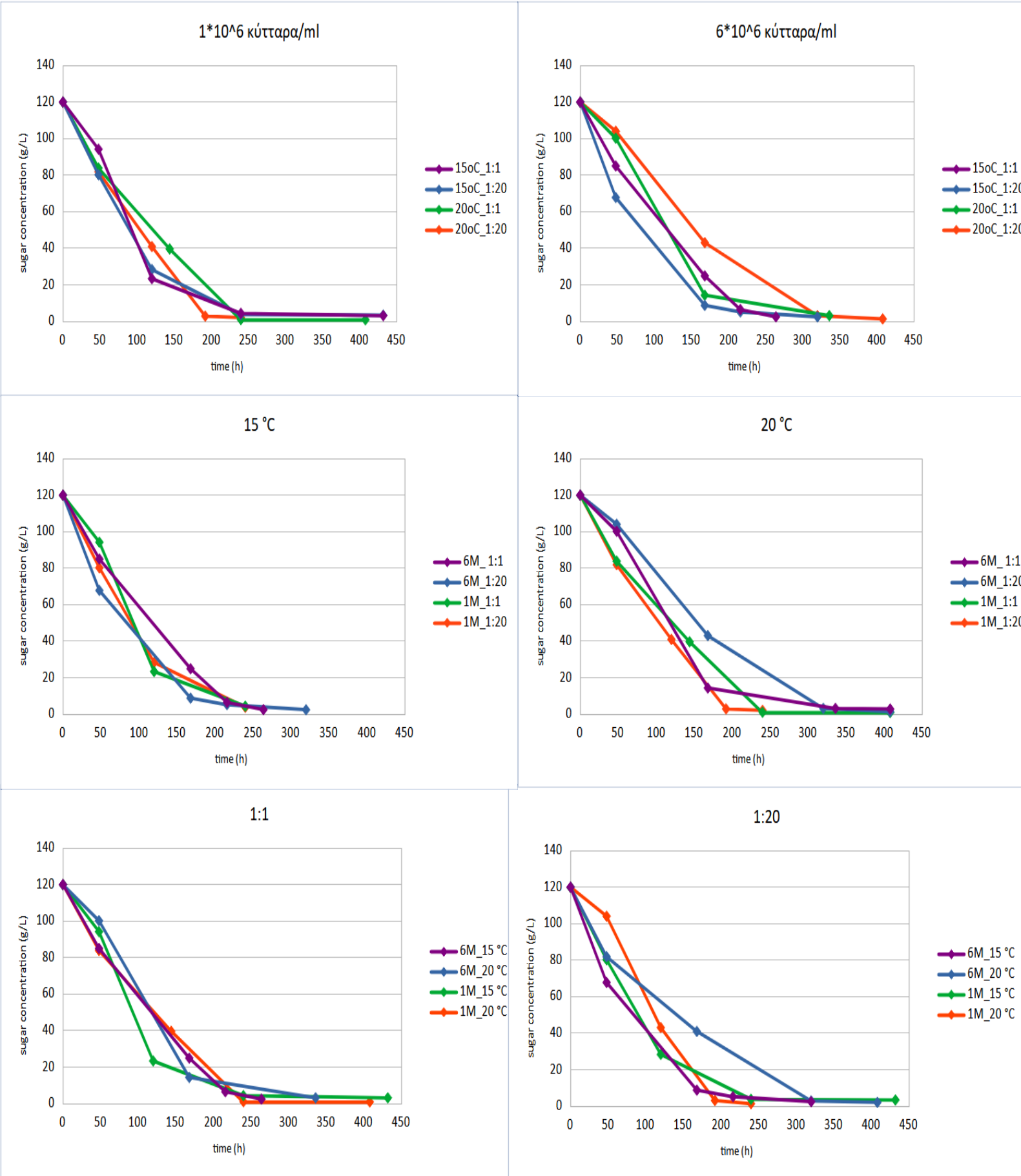
Κύρια παρατήρηση στο διάγραμμα 6, είναι οι χαμηλές τιμές στις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 20 °C. Με τη θερμοκρασία αυτή να είναι βέλτιστη για την ανάπτυξη των περισσότερων ζυμών το αναμενόμενο αποτέλεσμα θα ήταν οι υψηλότερες τιμές να καταγραφούν σε αυτές τις ζυμώσεις. Δεδομένου ότι το φαινόμενο αυτό παρατηρήθηκε αποκλειστικά σε ορισμένες



ζυμώσεις εμβολίου  $1 \cdot 10^6$  κύτταρα/ml, το αποτέλεσμα θα μπορούσε να αποδοθεί σε σφάλματα κατά τη δειγματοληψία λόγω έντονης κροκίδωσης.

Ανακεφαλαιώνοντας, σε ό,τι αφορά στην κατανάλωση σακχάρων οι μεικτές ζυμώσεις με *Z. bailii* παρουσίασαν ικανοποιητική ανάπτυξη πληθυσμών. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων το μείγμα αποτέλεσε το καλύτερο υπόστρωμα ζύμωσης, με τις υψηλότερες τιμές ανεξάρτητα αναλογίας ζυμών ή θερμοκρασίας. Στις ζυμώσεις αρχικού πληθυσμού  $6 \cdot 10^6$  κύτταρα/ml, αναμενόμενα οι υψηλότερες τιμές καταγράφηκαν στη θερμοκρασία των 20 °C. Αντίθετα, σε αρχικό πληθυσμό  $1 \cdot 10^6$  κύτταρα/ml, οι ζυμώσεις στους 20 °C παρουσίασαν ασυνήθιστα χαμηλές τιμές. Τέλος, αναφορικά με την αναλογία ζυμών τα αποτελέσματα διαφοροποιήθηκαν ανά συνθήκη, χωρίς να υποδεικνύεται κάποια αναλογία ως βέλτιστη.

## 5.2 Κατανάλωση Σακχάρων



Διάγραμμα 7. Κατανάλωση Γλυκόζης υπό διάφορες συνθήκες

Στην δεύτερη σειρά πειραμάτων μελετήθηκε η κινητική των ζυμώσεων σε συνθετικά υποστρώματα υπό το πρίσμα της κατανάλωσης σακχάρων. Στην παρούσα εργασία, η μέτρηση αναγόντων σακχάρων με τη μέθοδο DNS αφορά αποκλειστικά στο υπόστρωμα της γλυκόζης.

Σύμφωνα με το διάγραμμα 7, οι μεικτές ζυμώσεις ολοκληρώθηκαν, με τα ζυμώσιμα σάκχαρα να καταναλώνονται εξ, ολοκλήρου σε ένα εύρος χρόνου μεταξύ 200 και 350 ωρών. Αναφορικά με τη σύγκριση των εμβολιασμών ( $6 \cdot 10^6$ ,  $1 \cdot 10^6$ ), δεν προέκυψε κάποιο σημείο ιδιαίτερης σύγκρισης μεταξύ των δύο συνθηκών. Σε ό,τι αφορά στις ζυμώσεις με εμβολισμό  $6 \cdot 10^6$  κυττάρων/ml, φαίνεται ότι οι ζυμώσεις σε θερμοκρασία 15 °C, ολοκληρώθηκαν λίγο ταχύτερα συγκριτικά με εκείνες στους 20 °C. Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε αντίθεση με τη βιβλιογραφία, καθώς ο ρυθμός κατανάλωσης των σακχάρων συνήθως αυξάνεται με αύξηση της θερμοκρασίας της ζύμωσης (Drosou, et al., 2022). Ωστόσο, στον κανόνα παρατηρούνται και εξαιρέσεις, οι οποίες εμφανίζονται κυρίως σε ζυμώσεις με είδη non-*Saccharomyces*. Σε αυτές τις περιπτώσεις, οι υψηλότεροι ρυθμοί κατανάλωσης μπορεί να παρατηρηθούν σε χαμηλότερη θερμοκρασία (Drosou et al., 2022). Από την σύγκριση των διαγραμμάτων θερμοκρασιών, παρατηρείται ότι στους 20 °C, οι ζυμώσεις αρχικού πληθυσμού  $6 \cdot 10^6$  κύτταρα/ml ολοκληρώθηκαν πιο αργά, κοντά στις 320 ώρες.

Στη σύγκριση των διαγραμμάτων αναλογίας ζυμών, δεν προέκυψε κάποιο αξιοσημείωτο σημείο σύγκρισης μεταξύ των συνθηκών, με τις ζυμώσεις να ολοκληρώνονται κατά περίπτωση εύρος μεταξύ 200 και 350 ωρών.

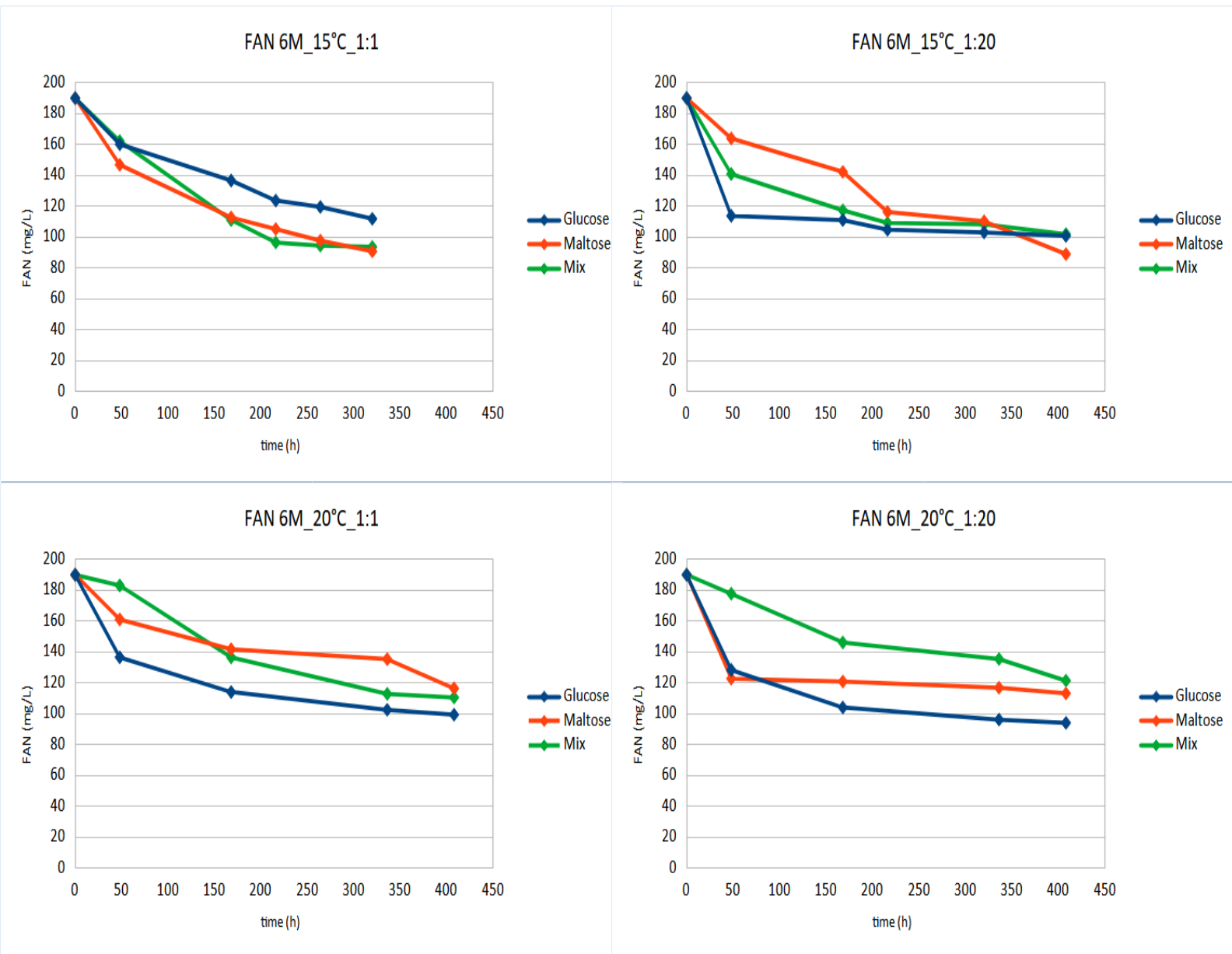
### 5.3 Κατανάλωση Ελεύθερου Αζώτου Αμινοξέων (FAN)

Η περιεκτικότητα ενός κυττάρου σε άζωτο κυμαίνεται μεταξύ 6 και 9% (w/w) (Drosou et al., 2022) και η ανάπτυξη ζυμομύκητα απαιτεί άζωτο, κυρίως υπό τη μορφή αμινοξέων για τη σύνθεση πρωτεϊνών και άλλων αζωτούχων συστατικών. Η πρόσληψη αζώτου επιβραδύνεται προς το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης καθώς ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων της ζύμης σταματά. Τα επίπεδα αζώτου που υπάρχουν στα βυνογλεύκη επηρεάζουν την ανάπτυξη των ζυμών και σε επίπεδα κάτω από 100 mg/l ελεύθερου αζώτου. Το ελεύθερο άζωτο αμινοξέων ή FAN αναφέρεται στο ελεύθερο α-αμινο άζωτο και εκφράζεται ως χιλιοστόγραμμα N ανά λίτρο αφομοιώσιμου αζώτου. Το FAN περιλαμβάνει όλα τα αμινοξέα εκτός της προλίνης, καθώς η τελευταία δεν είναι α-αμινοξύ και δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τον *Saccharomyces cerevisiae* υπό αναερόβιες συνθήκες (Drosou et al., 2022). Το FAN επηρεάζει ένα μεγάλο εύρος άλλων παραγόντων ζύμωσης, όπως την κυτταρική ανάπτυξη, τη βιομάζα, τη βιωσιμότητα και το pH. Σύμφωνα με την μελέτη του Russel, διαφορετικά στελέχη ζύμης παρουσιάζουν διαφορετικούς ρυθμούς απορρόφησης αμινοξέων καθώς και διαφορετικές προτιμήσεις. Η πρόσληψη αμινοξέων από τη ζύμη εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένου του ποσοστού του συνολικού αφομοιώσιμου αζώτου, των επιμέρους συγκεντρώσεων αμινοξέων, της ποιότητας και του ποσοστού απορρόφησης, της

ανταγωνιστικής αναστολής αμινοξέων, του στελέχους και της φάσης ανάπτυξης του ζυμομύκητα (Russell, 2006).

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η συμμετοχή ζυμών non-*Saccharomyces* σε ζυμώσεις συνεπάγεται αυξημένη χρήση αμινοξέων για την παραγωγή βιομάζας (Capece et al., 2022). Έτσι, αν και στις μεικτές ζυμώσεις, ο *S. cerevisiae* κυριαρχεί συχνά παρατηρείται έντονη κατανάλωση αζώτου. Επιπλέον, το γεγονός ότι ο *S. cerevisiae* χρησιμοποιεί άζωτο πιο γρήγορα και πιο αποτελεσματικά μπορεί επίσης να εξηγήσει την καλύτερη απόδοση ζύμωσης αυτού του είδους και την ικανότητά του να επικρατεί επί των άλλων ειδών ζύμης. Βάσει των παρατηρήσεων αυτών θα μπορούσε να υποτεθεί ότι οι ζυμώσεις με υψηλότερη αρχική αναλογία σε *Z. bailii*, θα έχουν και υψηλότερη κατανάλωση. Ωστόσο, σύμφωνα με την έρευνα του Bellut σε δείγματα ζύθου, η ζύμωση με *Z. bailii* δεν συνεπάγεται απαραίτητα υψηλότερες καταναλώσεις FAN (Bellut et al., 2018).

### 5.3.1 Ζυμώσεις σε εμβολιασμό $6 \cdot 10^6$ κύτταρα/ml



Διάγραμμα 8. Κατανάλωση FAN στις ζυμώσεις με αρχικό πληθυσμό  $6 \cdot 10^6$  κύτταρα/ml

Η πρώτη σειρά ζυμώσεων που τέθηκε προς εξέταση στο παρόν πείραμα ήταν εκείνη με αρχικό πληθυσμό  $6 \cdot 10^6$  κύτταρα/ml (διάγραμμα 8). Το αρχικό FAN όλων των ζυμώσεων ήταν ίσο με 190 mg/L.

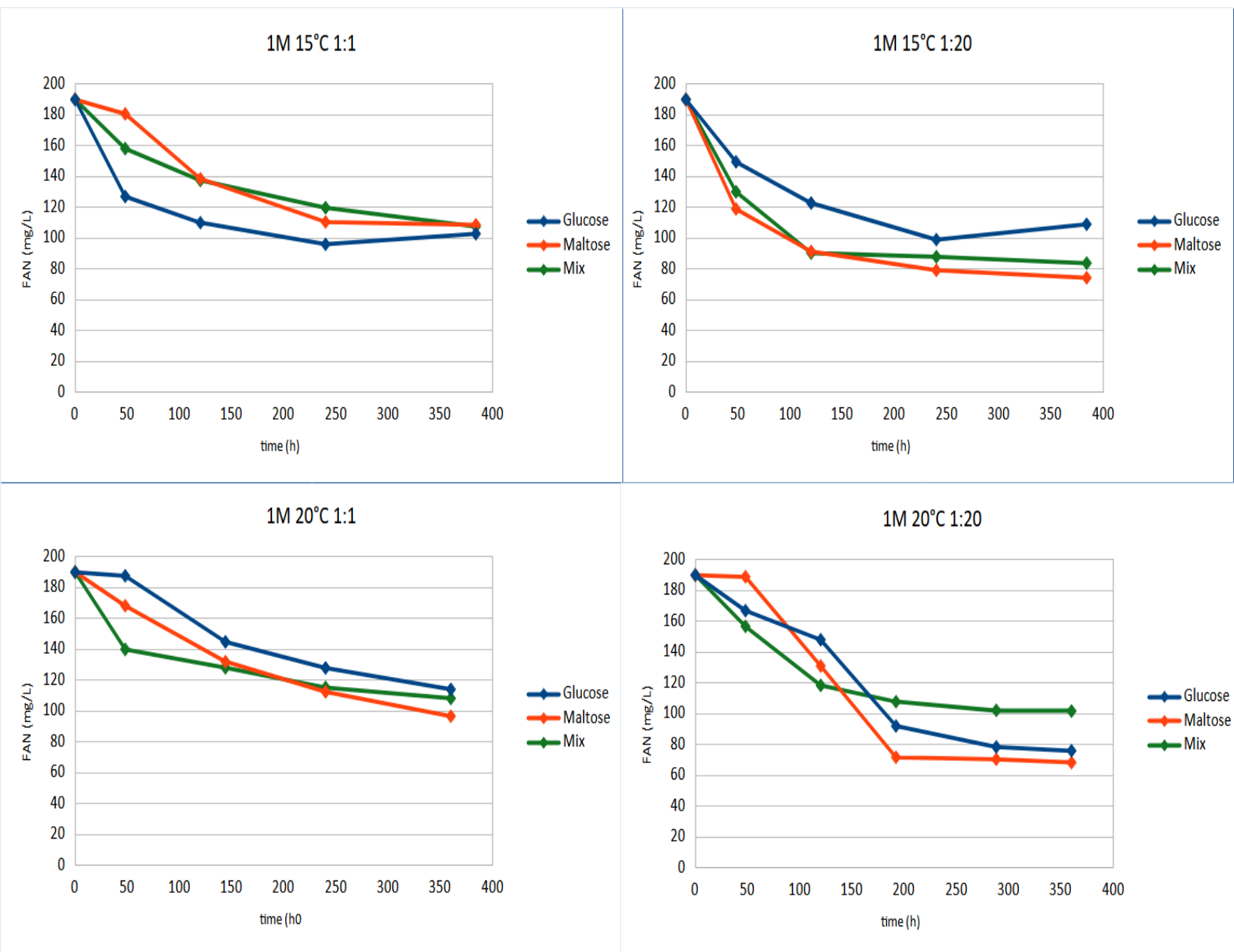
Στις ζυμώσεις οι οποίες πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 15 °C (διάγραμμα 8), οι καμπύλες των υποστρωμάτων τόσο σε αναλογία 1:1 όσο και σε αναλογία 1:20 δεν παρουσίασαν πολλά σημεία σύγκρισης μεταξύ τους. Από την εξέταση των διαγραμμάτων προκύπτει ότι με το πέρας των ζυμώσεων, το υπόστρωμα με τις υψηλότερες καταναλώσεις σε άζωτο ήταν η μαλτόζη, με την τελική τιμή διαθέσιμου αζώτου σε κάθε συνθήκη να είναι περίπου ίση με 90 mg/L.

Στις ζυμώσεις οι οποίες πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 20 °C (διάγραμμα 8), παρατηρήθηκε ταχεία κατανάλωση του αζώτου στο υπόστρωμα της γλυκόζης στις 48 ώρες. Η ταχεία αυτή ελάττωση συνετέλεσε σε χαμηλές τελικές τιμές (100 mg/L) στις δύο αναλογίες εμβολίου. Οι ζυμώσεις στο υπόστρωμα του μείγματος παρουσίασαν τη μικρότερη ανάγκη σε άζωτο με μικρή ελάττωση στις 48 ώρες και υψηλές τελικές τιμές (110-120 mg/L). Στην μαλτόζη, οι καταναλώσεις διαφοροποιήθηκαν ανά συνθήκη. Σε αναλογία 1:20 οι καμπύλη ταυτίστηκε με εκείνη της γλυκόζης ως τις 48 ώρες, παρουσιάζοντας στασιμότητα αμέσως μετά. Το συμπέρασμα που προέκυψε από τη σύγκριση των συγκεκριμένων διαγραμμάτων είναι ότι η ανάγκη για άζωτο ήταν μεγαλύτερη στο υπόστρωμα γλυκόζης και μικρότερη στο μείγμα. Παράλληλα, η αναλογία εμβολίου δεν φάνηκε να επηρεάζει με οποιονδήποτε τρόπο το αποτέλεσμα.

Συγκρίνοντας την επίδραση της θερμοκρασίας στην κατανάλωση αζώτου, προέκυψε ότι οι ζυμώσεις σε θερμοκρασία 15 °C είχαν υψηλότερες καταναλώσεις για τα υποστρώματα μαλτόζης και μείγματος. Η γλυκόζη παρουσίασε υψηλότερες καταναλώσεις σε ζυμώσεις θερμοκρασίας 20 °C.

Αναφορικά με τις αναλογίες ζυμών, οι συγκρίσιμες τελικές καταναλώσεις μεταξύ των δύο αναλογιών υπέδειξαν ότι η παρουσία *Z. bailii* σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στη ζύμωση δεν συνεπάγεται απαραίτητα υψηλότερες καταναλώσεις FAN (Bellut et al., 2018).

### 5.3.2 Ζυμώσεις σε εμβολιασμό $1 \cdot 10^6$ κύτταρα/ml



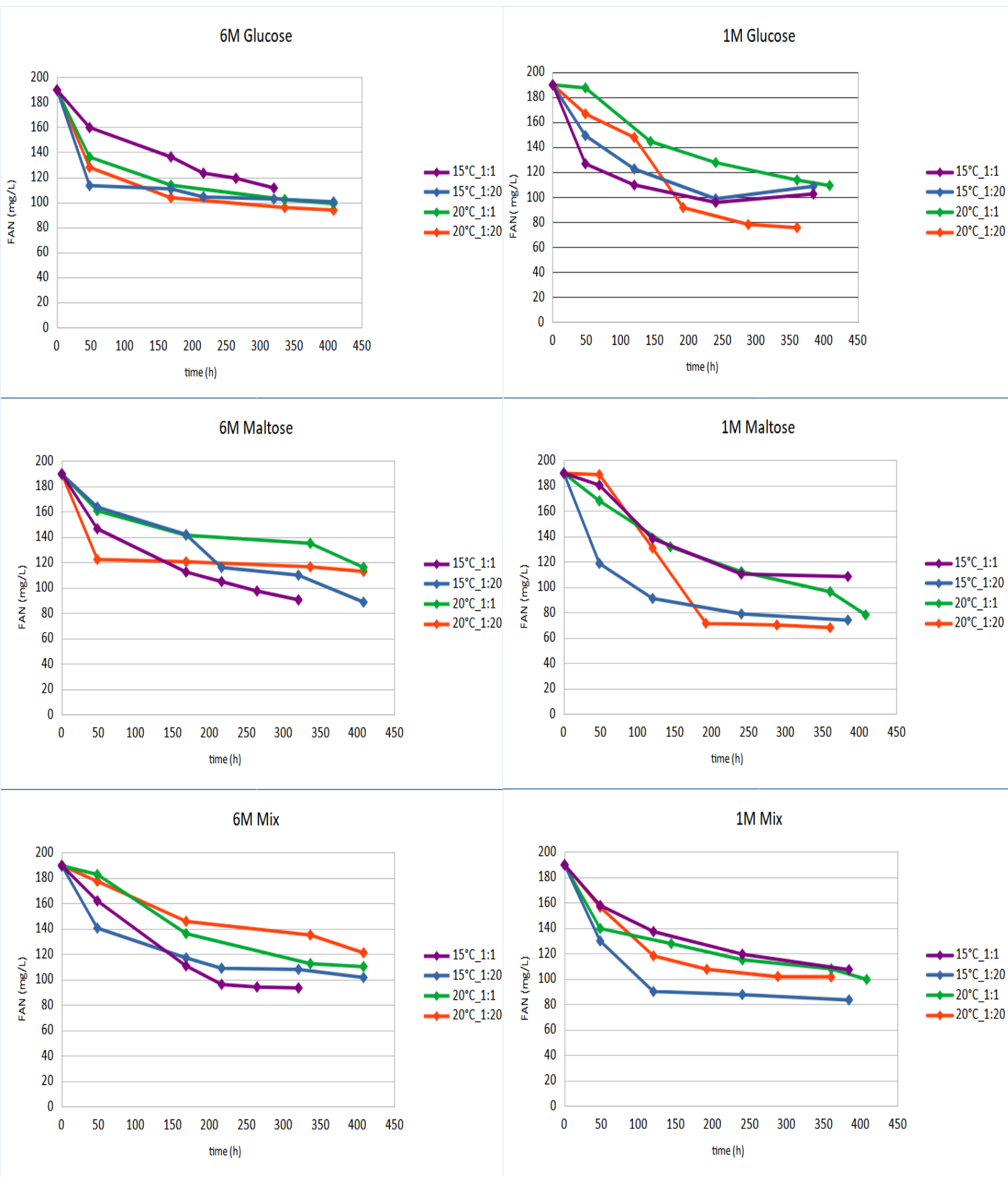
Διάγραμμα 9. Κατανάλωση FAN στις ζυμώσεις με αρχικό πληθυσμό  $1 \cdot 10^6$  κύτταρα/ml

Εκτός από τις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν σε αρχικό πληθυσμό  $6 \cdot 10^6$  κύτταρα/ml, εξετάστηκαν με αντίστοιχο τρόπο και εκείνες με αρχικό πληθυσμό  $1 \cdot 10^6$  κύτταρα/ml. Αρχικά, από τις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν στους  $15^\circ\text{C}$  (διάγραμμα 10), δεν προέκυψε κάποιο υπόστρωμα με σαφώς υψηλότερη ανάγκη σε άζωτο, καθώς οι καταναλώσεις διαφοροποιήθηκαν ανά συνθήκη. Ωστόσο, στην αναλογία 1:20 παρατηρήθηκαν οι υψηλότερες καταναλώσεις, με τις τιμές ελεύθερου αζώτου στο πέρας των ζυμώσεων για τη μαλτόζη και το μείγμα να ισοδυναμούν με  $80 \text{ mg/L}$ . Από τις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν στους  $20^\circ\text{C}$  (διάγραμμα 10), η μαλτόζη προέκυψε ως το υπόστρωμα με την μεγαλύτερη τελική κατανάλωση αζώτου. Αν και οι πορείες των ζυμώσεων διαφοροποιήθηκαν ανά συνθήκη, και σε αυτή την θερμοκρασία, οι ζυμώσεις σε αναλογία 1:20

παρουσίασαν υψηλότερες καταναλώσεις με την χαμηλότερη τελική τιμή να αναλογεί στη μαλτόζη και να είναι ίση με 75 mg/L. Τέλος, συγκρίνοντας τις θερμοκρασίες ζύμωσης δεν προέκυψε κάποια σημαντική διαφοροποίηση.

### **5.3.3 Σύγκριση Ανά Υπόστρωμα**





Διάγραμμα 10. Κατανάλωση FAN στις ζυμώσεις με σε διαφορετικά υποστρώματα

Παρατηρώντας τα διαγράμματα γλυκόζης, δεν προκύπτουν ασφαλή συμπεράσματα για σύγκριση. Αυτό που παρατηρείται είναι ότι και στις δύο συνθήκες αρχικού πληθυσμού, η ζύμωση 1:20 στους 20 βαθμούς παρουσίασε τις υψηλότερες καταναλώσεις, με εκείνη στα  $1 \cdot 10^6$  κύτταρα/ml να προσεγγίζει τα 110 mg/L (διάγραμμα 10).

Στα διαγράμματα μαλτόζης οι παρατηρήσεις διαφοροποιούνται. Στα  $6 \cdot 10^6$  κύτταρα/ml οι χαμηλότερες τελικές τιμές παρατηρούνται στις ζυμώσεις στους 15 °C. Στα  $1 \cdot 10^6$  κύτταρα/ml οι χαμηλότερες τελικές τιμές παρατηρούνται σε ζυμώσεις αναλογίας 1:20. Και σε αυτό το υπόστρωμα η ζύμωση 1:20 στους 20 °C παρουσίασε τις υψηλότερες καταναλώσεις, με εκείνη στα  $1 \cdot 10^6$  κύτταρα/ml να προσεγγίζει τα 125 mg/L. Στο διάγραμμα του μείγματος, οι ζυμώσεις με την υψηλότερη κατανάλωση αζώτου είναι εκείνες οι οποίες πραγματοποιήθηκαν στους 15 °C. Αυτή η παρατήρηση συνάδει με συμπεράσματα άλλων μελετών που υποδεικνύουν ότι η κατανάλωση αζώτου σε μεικτές ζυμώσεις μπορεί να είναι αυξημένη σε χαμηλότερες θερμοκρασίες. Στο υπόστρωμα του μείγματος, οι ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν σε αρχικό πληθυσμό  $1 \cdot 10^6$  κύτταρα/ml παρουσίασαν γενικά υψηλότερες καταναλώσεις. Σε ό,τι αφορά στην αναλογία εμβολίου, δεν παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη διαφοροποίηση μεταξύ των δύο αναλογιών.

## 5.4 Αλκοολικός Τίτλος και Τελική Πυκνότητα

|                   | Αλκοολικός Τίτλος (vol %) |           |           |                   | Πυκνότητα (g/cm <sup>3</sup> ) |             |             |
|-------------------|---------------------------|-----------|-----------|-------------------|--------------------------------|-------------|-------------|
|                   | Glucose                   | Maltose   | Mix       |                   |                                |             |             |
| <b>15 °C 1:1</b>  | 6,02±0,34                 | 6,36±0,00 | 5,84±0,26 | <b>15 °C 1:1</b>  | 0,996±0,000                    | 0,997±0,001 | 0,999±0,000 |
| <b>15 °C 1:20</b> | 5,73±0,27                 | 5,70±0,17 | 5,04±0,00 | <b>15 °C 1:20</b> | 0,997±0,001                    | 0,997±0,000 | 0,998±0,000 |
| <b>20 °C 1:1</b>  | 6,29±0,07                 | 5,31±0,27 | 5,29±0,83 | <b>20 °C 1:1</b>  | 0,995±0,000                    | 1,000±0,002 | 1,003±0,007 |
| <b>20 °C 1:20</b> | 6,17±0,13                 | 5,84±0,00 | 5,57±0,24 | <b>20 °C 1:20</b> | 0,995±0,000                    | 0,998±0,000 | 1,001±0,000 |

Πίνακας 1. Αλκοολικός τίτλος και πυκνότητα στις ζυμώσεις με αρχικό πληθυσμό  $6 \cdot 10^6$  κύτταρα/ml

### 5.4.1 Τελική Πυκνότητα

Οι τελικές πυκνότητες των προϊόντων ζύμωσης παρουσίασαν παραπλήσιες τιμές, αποδεικνύοντας ότι οι ζυμώσεις ολοκληρώθηκαν και τα σάκχαρα καταναλώθηκαν. Ωστόσο, στις τελικές πυκνότητες

δεν υπήρξε κάποιο στοιχείο έντονης διαφοροποίησης το οποίο να οδηγεί σε περαιτέρω συμπεράσματα σχετικά με την πορεία των ζυμώνσεων.

#### 5.4.2 Αλκοολικός Τίτλος (vol%)

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, η μελέτη του *Z. bailii* φαίνεται να εστιάζει στην παραγωγή αλκοολούχων ποτών με χαμηλή περιεκτικότητα σε αιθανόλη. Η παραγωγή αιθανόλης από τον *S. cerevisiae* είναι υψηλότερη σε απλές ζυμώσεις συγκριτικά με μεικτές, γεγονός που υποδεικνύει ανταγωνισμό μεταξύ των ζυμών (Heard & Fleet, 1988). Σύμφωνα με τον Bellut, ο *Z. bailii* είναι η καλύτερη επιλογή non-*Saccharomyces* ζύμης για την παραγωγή ζύθου alcohol-free, δυνάμενο να παραγάγει ζύθο με αλκοολικό τίτλο (0.42 vol%) (Bellut et al., 2018). Σε άλλη μελέτη (Capece et al., 2021), ο *Z. bailii* ήταν η non-*Saccharomyces* ζύμη με την μικρότερη συνεισφορά στην μείωση του αλκοολικού τίτλου, καθώς η μείωση συγκριτικά με αντίστοιχη καθαρή καλλιέργεια να είναι μικρότερη από 0,1 vol%. Σε ορισμένες περιπτώσεις, μπορεί να παρατηρηθεί και αύξηση του αλκοολικού τίτλου (+0,05 vol%) συγκριτικά με ζυμώσεις *S. cerevisiae* (Capece et al., 2021; Domizio et al., 2011).

Παρατηρήθηκε ότι για αναλογία εμβολίου 1:20, ο αλκοολικός τίτλος στους 20 °C ήταν υψηλότερος (πίνακας 1). Παρ' όλα αυτά, δεν ισχύει το ίδιο για την αναλογία 1:1, καθώς φαίνεται ότι η θερμοκρασία ζύμωσης δεν επηρέασε με άμεσο τρόπο την παραγωγή αιθανόλης, επιβεβαιώνοντας έτσι την θεώρηση ότι η χρήση του *Z. bailii* σε μεικτές ζυμώσεις δεν διασφαλίζει την μείωση της αιθανόλης (Postigo et al., 2022).

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, σε υψηλότερες θερμοκρασίες ζύμωσης (>20%), παρατηρείται ελάττωση της συγκέντρωσης αιθανόλης, λόγω περιορισμένου μεταβολισμού του (Casey & Ingledew, 1986) ή της αύξησης προϊόντων όπως η γλυκερίνη ή το οξικό οξύ (Torija et al., 2002). Η ελάττωση αυτή φαίνεται να ισχύει σε μεγαλύτερο βαθμό σε θερμοκρασίες > 20 °C. Στην έρευνα Torija et al. σε δείγματα οίνου, η μεταβολή από 15 σε 20 °C είχε ως αποτέλεσμα ελάττωση αλκοολικού τίτλου < 0.1 vol %.

Συγκρίνοντας τις αναλογίες ζυμών, η αναλογία 1:1 απέδωσε καλύτερα, κυρίως σε θερμοκρασία ίση με 15 °C. Έτσι, προέκυψε ότι η αναλογία ζυμών δεν επηρέασε άμεσα την παραγωγή αιθανόλης.

Η συγκέντρωση της αιθανόλης στα τελικά προϊόντα, δεν επηρεάστηκε άμεσα από τη θερμοκρασία ή την αναλογία των ζυμών, αλλά από τα προς εξέταση σάκχαρα. Με το υπόστρωμα της γλυκόζης, να φτάνει έως τους 6,29 vol%. Ακολούθησαν η μαλτόζη και το μείγμα, με το μείγμα να παρουσιάζει σταθερά τις χαμηλότερες τιμές.

## 5.5 Τελικές Οξύτητες

### 5.5.1 Ολική Οξύτητα

#### Ο.Οξύτητα ( g/L γαλακτικό οξύ)

|                   | Glucose   | Maltose   | Mix       |
|-------------------|-----------|-----------|-----------|
| <b>15 °C 1:1</b>  | 2,03±0,95 | 2,66±1,34 | 3,2±0,19  |
| <b>15 °C 1:20</b> | 3,15±0,13 | 2,48±1,46 | 2,7±0,00  |
| <b>20 °C 1:1</b>  | 3,56±0,06 | 3,38±0,06 | 3,38±0,06 |
| <b>20 °C 1:20</b> | 3,33±0,13 | 3,65±0,19 | 2,97±0,13 |

Πίνακας 2. Τελική Ολική Οξύτητα στις ζυμώσεις με αρχικό πληθυσμό  $6 \cdot 10^6$  κύτταρα/ml

Η ολική οξύτητα και τελικό pH αποτελούν πολύ σημαντικές παραμέτρους για τη σύσταση του προϊόντος. Σε οργανοληπτικό επίπεδο είναι υπεύθυνες για την αίσθηση στο στόμα, καθώς και για τον τρόπο έκφρασης πλήθους αρωματικών ενώσεων. Σε βιοτεχνολογικό επίπεδο, οι παράμετροι αυτές μπορούν να δώσουν αρκετές πληροφορίες τόσο για την πορεία της εκάστοτε ζύμωσης, όσο και για τις ιδιότητες της ζύμης που χρησιμοποιήθηκε. Η σχέση του *Z. bailii* με το pH έχει αναφερθεί σε άρθρα που εστιάζουν στην ικανότητά του να επιμολύνει όξινα τρόφιμα. Πράγματι, η ζύμη αυτή παρουσιάζει εξαιρετική ικανότητα επιβίωσης σε όξινα περιβάλλοντα με χαμηλό pH (<2,2) (Thomas & Davenport, 1985). Υπό αυτή την πληροφορία θα μπορούσε να υποτεθεί ότι η παρουσία *Z. bailii* προκαλεί πτώση του pH στο υπόστρωμα που μεταβολίζει. Ωστόσο, σύμφωνα με έρευνες (Bellut et al., 2018; Postigo et al., 2022), η παρουσία *Z. bailii* δεν ταυτίζεται με πτώση του pH. Αντίθετα, σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε άλλα προϊόντα, ο *Z. bailii* έδειξε ικανός να ανεβάσει το pH του υποστρώματος καθιστώντας το περιβάλλον φιλικότερο προς άλλα είδη μικροοργανισμών (Dakin & Day, 1958) (Cohen et al., 2023).

Στην παρούσα μελέτη οι ολικές οξύτητες και το pH μετρήθηκαν με το πέρας των ζυμώσεων, με τα αποτελέσματα να καταγράφονται σε συγκεντρωτικούς πίνακες. Στο υπόστρωμα της γλυκόζης, οι ζυμώσεις οι οποίες πραγματοποιήθηκαν στους 20 °C παρουσίασαν υψηλότερη τελική οξύτητα. Επιπλέον, στις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν στους 15 °C με αναλογία εμβολιασμού 1:1, το αποτέλεσμα ήταν σημαντικά μικρότερο συγκριτικά με εκείνα των υπόλοιπων συνθηκών. Για κάθε υπόστρωμα και αναλογία εμβολιασμού η ζύμωση στους 20 °C απέδωσε υψηλότερη οξύτητα από την

αντίστοιχη στους 15 °C, γεγονός που υποδεικνύει ότι η θερμοκρασία επηρέασε ποσοτικά την παραγωγή οξέων.

Ανακεφαλαιώνοντας, η οξύτητα δεν έδειξε να επηρεάζεται ούτε από το υπόστρωμα ζύμωσης, ούτε από την αναλογία εμβολιασμού των δύο ανταγωνιστικών ζυμών. Η ολική οξύτητα επηρεάστηκε περισσότερο από τη θερμοκρασία ζύμωσης, με τις υψηλές θερμοκρασίες (20°C) να αποδίδουν ελαφρώς υψηλότερη οξύτητα. Η αύξηση της οξύτητας σε ζυμώσεις με υψηλότερη θερμοκρασία μπορεί να αποδοθεί σε εντονότερη παραγωγή οργανικών οξέων από τις ζύμες (Chidi et al., 2018; Cohen et al., 2023). Από την έρευνα των Cohen et al. σε δείγματα kombucha, η αύξηση της θερμοκρασίας από 20 σε 30 °C είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της οξύτητας από 3.26-3.96 g/L, σε 12.83-18.24 g/L.

### 5.5.2 pH

| Τελικό pH         |            |           |           |
|-------------------|------------|-----------|-----------|
|                   | Glucose    | Maltose   | Mix       |
| <b>15 °C 1:1</b>  | 3,58±0,04  | 3,32±0,16 | 3,34±0,03 |
| <b>15 °C 1:20</b> | 3,85± 0,00 | 3,47±0,01 | 3,51±0,01 |
| <b>20 °C 1:1</b>  | 3,40±0,12  | 3,31±0,01 | 3,33±0,04 |
| <b>20 °C 1:20</b> | 3,40±0,00  | 3,30±0,00 | 3,31±0,01 |

Πίνακας 3. Τελικά pH στις ζυμώσεις με αρχικό πληθυσμό  $6 \cdot 10^6$  κύτταρα/ml

Από την ανάλυση του πίνακα 3, προέκυψε ότι για κάθε υπόστρωμα οι τιμές ζύμωσης σε θερμοκρασία 15 °C ήταν υψηλότερες συγκριτικά με εκείνες στους 20 °C. Η παρατήρηση αυτή βρίσκεται σε συμφωνία με τις αντίστοιχες παρατηρήσεις που αναφέρονται στην ολική οξύτητα, ενώ οι μικρές τυπικές αποκλίσεις επιτρέπουν την εξαγωγή ασφαλούς συμπεράσματος. Έτσι, αν εξεταστούν οι αναλογίες εμβολιασμού, προκύπτει ότι σε θερμοκρασία 15 °C οι ζυμώσεις με αναλογία 1: 20 έχουν υψηλότερο pH. Ωστόσο, η παρατήρηση αυτή δεν υφίστατο στις ζυμώσεις στους 20 °C. Από την παρατήρηση κάθε συνθήκης μεμονωμένα, θα μπορούσε να προκύψει διαφοροποίηση μεταξύ των pH στα διάφορα υποστρώματα, χωρίς όμως μεγάλες διαφορές. Σε κάθε συνθήκη, το υπόστρωμα γλυκόζης παρουσίασε εμφανώς υψηλότερο pH από τα υπόλοιπα υποστρώματα. Μεταξύ της μαλτόζης και του μείγματος, η διαφορά ήταν μικρή με τις ζυμώσεις στο μείγμα να παρουσιάζουν ελαφρώς υψηλότερο pH.

Αντίστοιχα με την ολική οξύτητα, το τελικό pH των ζυμώσεων επηρεάστηκε άμεσα από τη θερμοκρασία. Σε υψηλές θερμοκρασίες το pH που προέκυψε ήταν μικρότερο, παρατήρηση που συμφωνεί με την βιβλιογραφία (Chidi et al., 2018; Cohen et al., 2023). Από την έρευνα των Cohen et al. σε δείγματα kombucha, η αύξηση της θερμοκρασίας από 20 σε 30 °C είχε ως αποτέλεσμα την ελάττωση του pH από 2.25-2.38, σε 1.95-2.21.

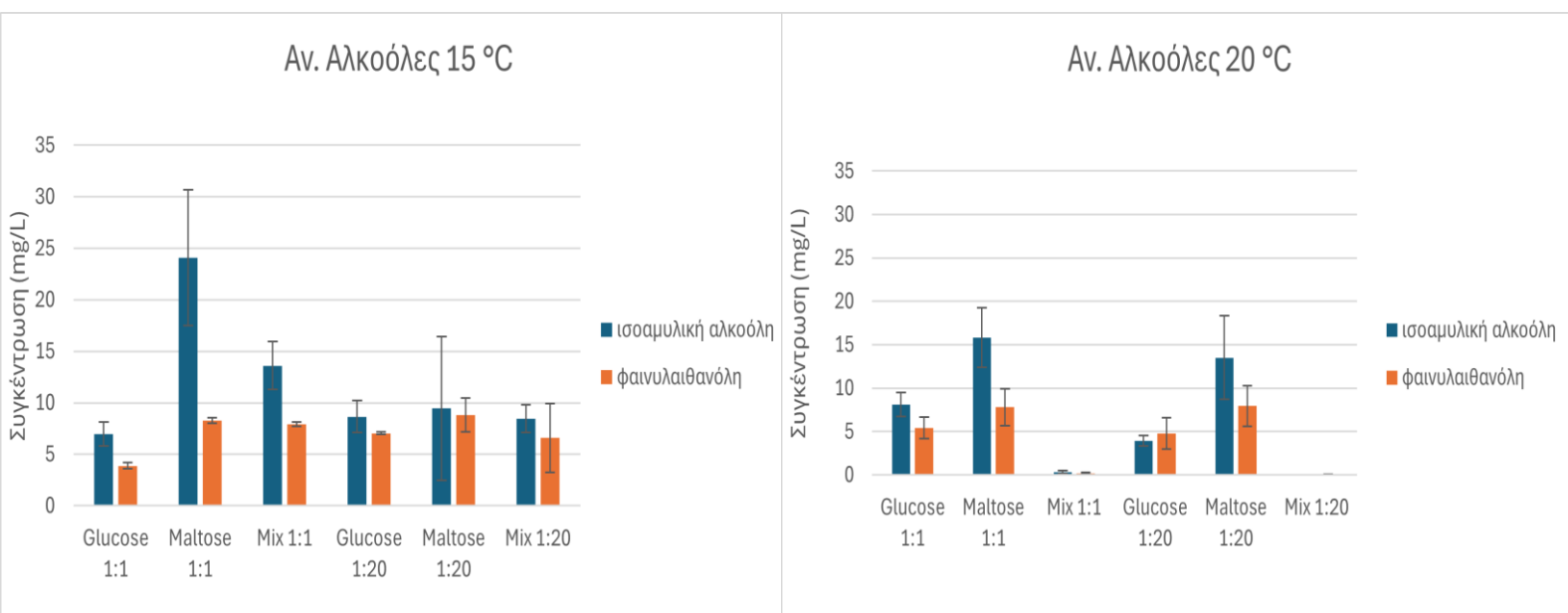
Η επίδραση της αναλογίας εμβολιασμού μεταξύ των δύο ζυμών ήταν εμφανής μόνο σε χαμηλή θερμοκρασία. Το υπόστρωμα ζύμωσης διαδραμάτισε επίσης ρόλο, καθώς φάνηκε να υπάρχει διαφοροποίηση. Κατατάσσοντας τα υποστρώματα κατά αύξουσα σειρά τελικού pH, η ζύμωση μαλτόζης δημιούργησε το πιο όξινο περιβάλλον, ακολουθούμενη από το μείγμα με μικρή διαφορά. Στον αντίποδα, το υπόστρωμα της γλυκόζης παρουσίασε τις υψηλότερες τιμές pH (3,4-3,85).

## 5.6 Παραγωγή πτητικών ενώσεων στα συνθετικά υποστρώματα

Η παραγωγή πτητικών και αρωματικών ενώσεων κατά τη ζύμωση, έχει κρίσιμη σημασία στη βιομηχανία οίνου και ζύθου. Ανάλογα με τις εκάστοτε απαιτήσεις των καταναλωτών οι παραγωγοί αποσκοπούν στην βέλτιστη αξιοποίηση των διαθέσιμων μέσων ώστε να δημιουργήσουν ένα ευχάριστο αποτέλεσμα. Την ίδια ώρα οι ερευνητές μελετούν τις παραμέτρους που επηρεάζουν την παραγωγή αρωματικών κατά τη ζύμωση, εστιάζοντας όλο και περισσότερο στην εκμετάλλευση ζυμών non-*Saccharomyces* (Soufleros & Bertrand, 1979).

Στην παρούσα μελέτη επιχειρήθηκε η διερεύνηση του αρωματικού προφίλ προϊόντων που προέκυψαν από την μεικτή ζύμωση *Z. bailii* και *S. cerevisiae* σε συνθετικά υποστρώματα.

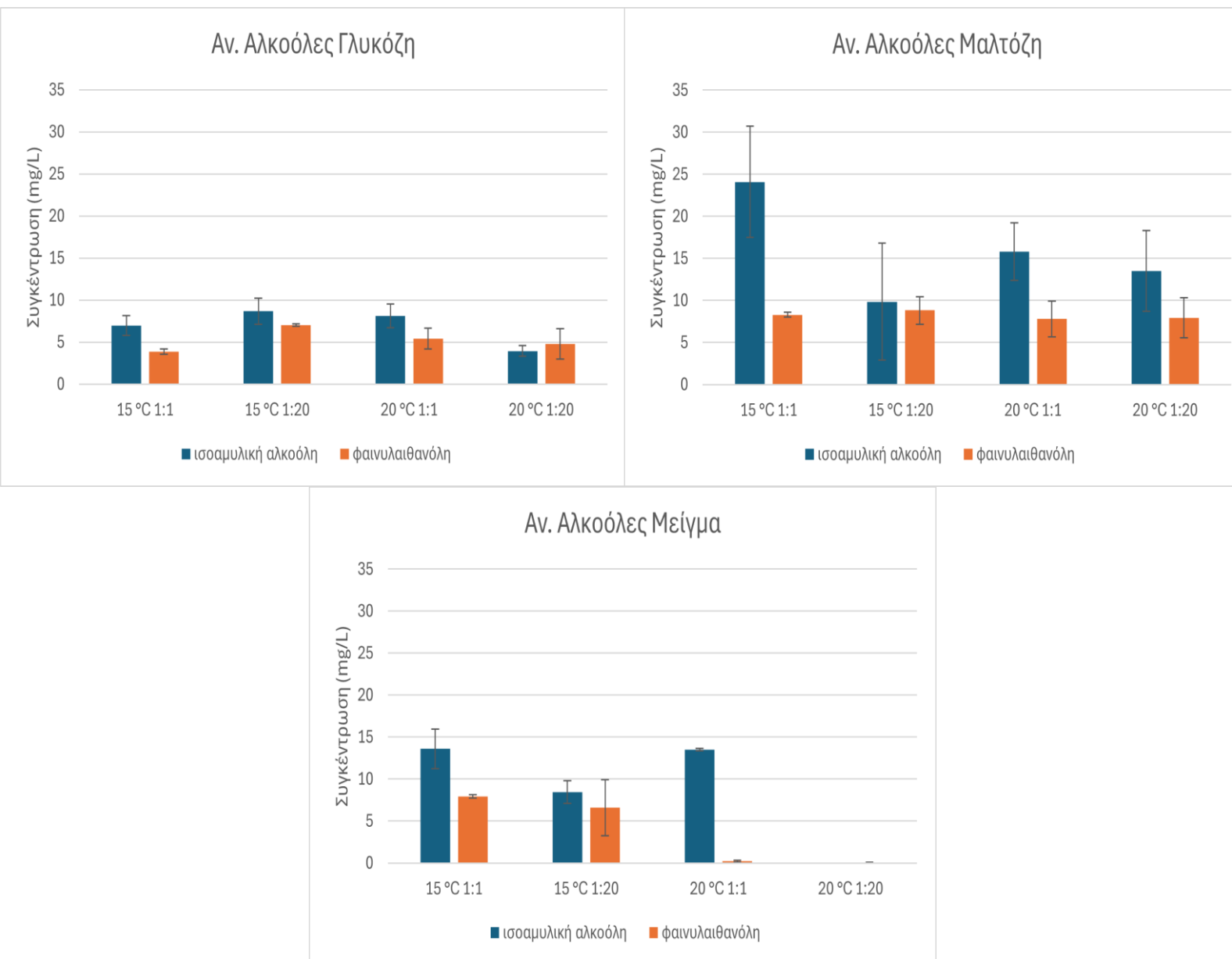
### 5.6.1 Ανώτερες Αλκοόλες



Διάγραμμα 11. Συγκεντρώσεις Ανώτερων Αλκοολών στις διαφορετικές θερμοκρασίες ζύμωσης.

Στο διάγραμμα 11, απεικονίζονται οι ανώτερες αλκοόλες και οι συγκεντρώσεις αυτών, οι οποίες ανιχνεύθηκαν μέσω του GC-MS στις μικτές ζυμώσεις των *Z. bailii* και *S. cerevisiae*. Οι κύριες ανώτερες αλκοόλες που εμφανίστηκαν σε όλες τις ζυμώσεις στους 15 °C, είναι η ισοαμυλική και η φαινυλαιθανόλη (με όριο ανίχνευσης 65 και 40 mg/L αντίστοιχα) (Michel et al., 2016). Στην παρούσα μελέτη, όλες οι ζυμώσεις παρήγαγαν τι προαναφερθείσες ανώτερες αλκοόλες σε συγκεντρώσεις κατώτερες των ορίων αντίληψής τους. Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε αντίθεση με μελέτες οι οποίες υποστηρίζουν ότι ο *Z. bailii* σε μεικτή ζύμωση με *S. cerevisiae* ενισχύει την παραγωγή ανώτερων αλκοολών στο ζύθο (Postigo et al., 2022). Η παρατήρηση αυτή αποδίδεται στον ανταγωνισμό μεταξύ των ειδών για αφομοιώσιμο άζωτο (He et al., 2014). Εξετάζοντας το διάγραμμα υπό το πρίσμα των υποστρωμάτων ζύμωσης, προέκυψε ότι η παραγωγή των ανώτερων αλκοολών ευνοήθηκε ελαφρώς σε υποστρώματα μαλτόζης. Εξετάζοντας επιπλέον και τις αναλογίες μεταξύ των δύο ζυμών δεν προέκυψε αναλογία που να ευνοεί την παραγωγή των ανώτερων αυτών αλκοολών.

Στους 20 °C, οι παρατηρήσεις ήταν παρόμοιες. Και στην θερμοκρασία αυτή παρατηρείται ότι η παραγωγή των ανώτερων αλκοολών αυξήθηκε σε υποστρώματα μαλτόζης. Επιπλέον, οι συγκεντρώσεις φαινυλαιθανόλης στα υποστρώματα μείγματος ήταν πολύ μικρές και θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν αμελητέες. Συμπερασματικά, προκύπτει ότι η διαφοροποίηση ανά σάκχαρο ήταν πιο εμφανής σε θερμοκρασία 20 °C. Τέλος, όπως και στους 15 °C, η αναλογία το εμβολίου δεν είχε άμεση επίδραση στην παραγωγή ανώτερων αλκοολών.



Διάγραμμα 12. Συγκεντρώσεις Ανώτερων Αλκοολών στα διαφορετικά υποστρώματα ζύμωσης.

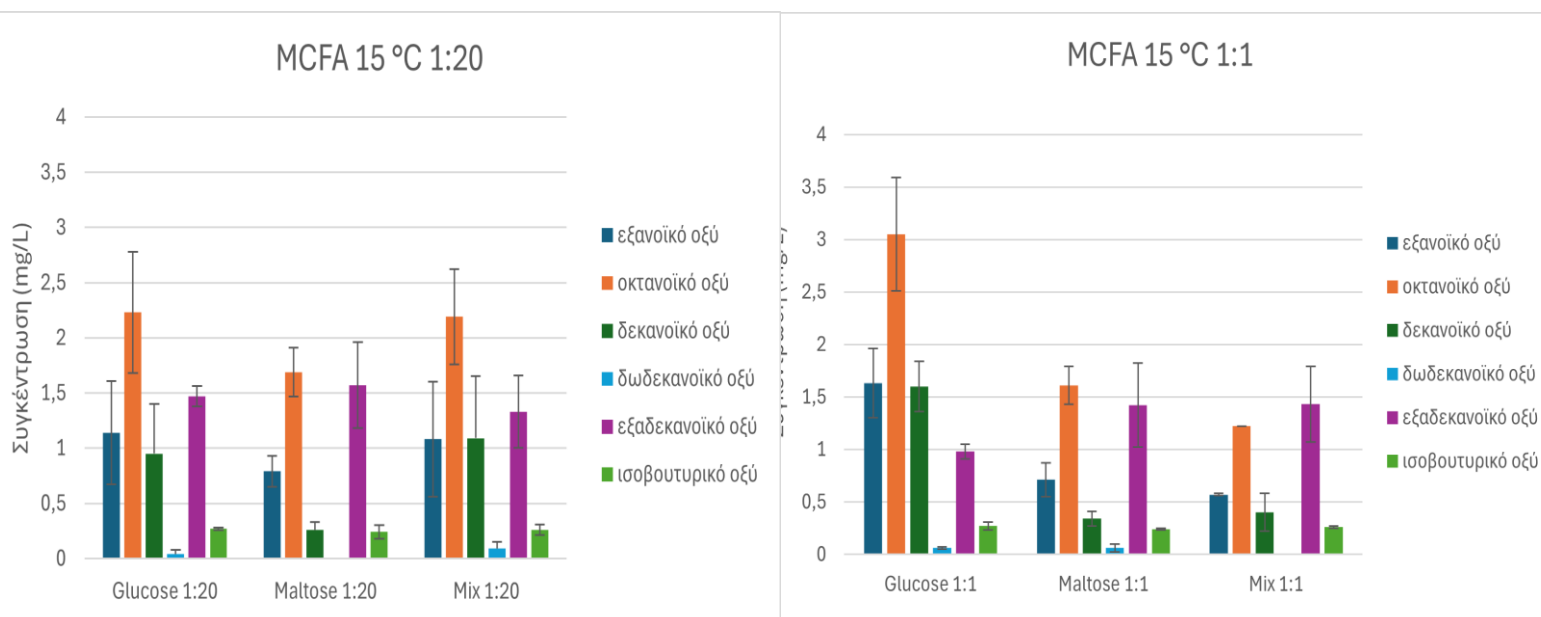
Από την παρατήρηση του διαγράμματος 12 για τη γλυκόζη, προέκυψε ότι η παραγωγή ισοαμυλικής αλκοόλης ευνοήθηκε περισσότερο σε ζυμώσεις θερμοκρασίας 15 °C. Δεν προέκυψε όμως το ίδιο συμπέρασμα για την φαινυλαιθανόλη. Στο διάγραμμα μαλτόζης δεν σημειώθηκε αισθητή διαφοροποίηση μεταξύ των τιμών συγκέντρωσης. Εξετάζοντας τέλος τη ζύμωση του μείγματος (διάγραμμα 12), προέκυψε ότι η συγκέντρωση ισοαμυλικής αλκοόλης έλαβε υψηλότερες τιμές στη θερμοκρασία των 15 °C. Το ίδιο φάνηκε να ισχύει και στην περίπτωση της φαινυλαιθανόλης με τη διαφορά όμως να είναι πιο εμφανής. Δεδομένου ότι στους 20 °C η παραγωγή φαινυλαιθανόλης ήταν ελάχιστη, η θερμοκρασία δεν φάνηκε να επηρεάζει σημαντικά την παραγωγή ανώτερων αλκοολών.



Η παραγωγή των ανώτερων αλκοολών από το *Z. bailii* σε τιμές υψηλότερες από το κατώφλι αντίληψης θα μπορούσε να αυξηθεί σημαντικά με εφαρμογή αερισμού στα δείγματα κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, όπως υποδεικνύει η βιβλιογραφία (Postigo et al., 2022).

### 5.6.2 Λιπαρά Οξέα Μέσης Αλυσίδας - MCFA

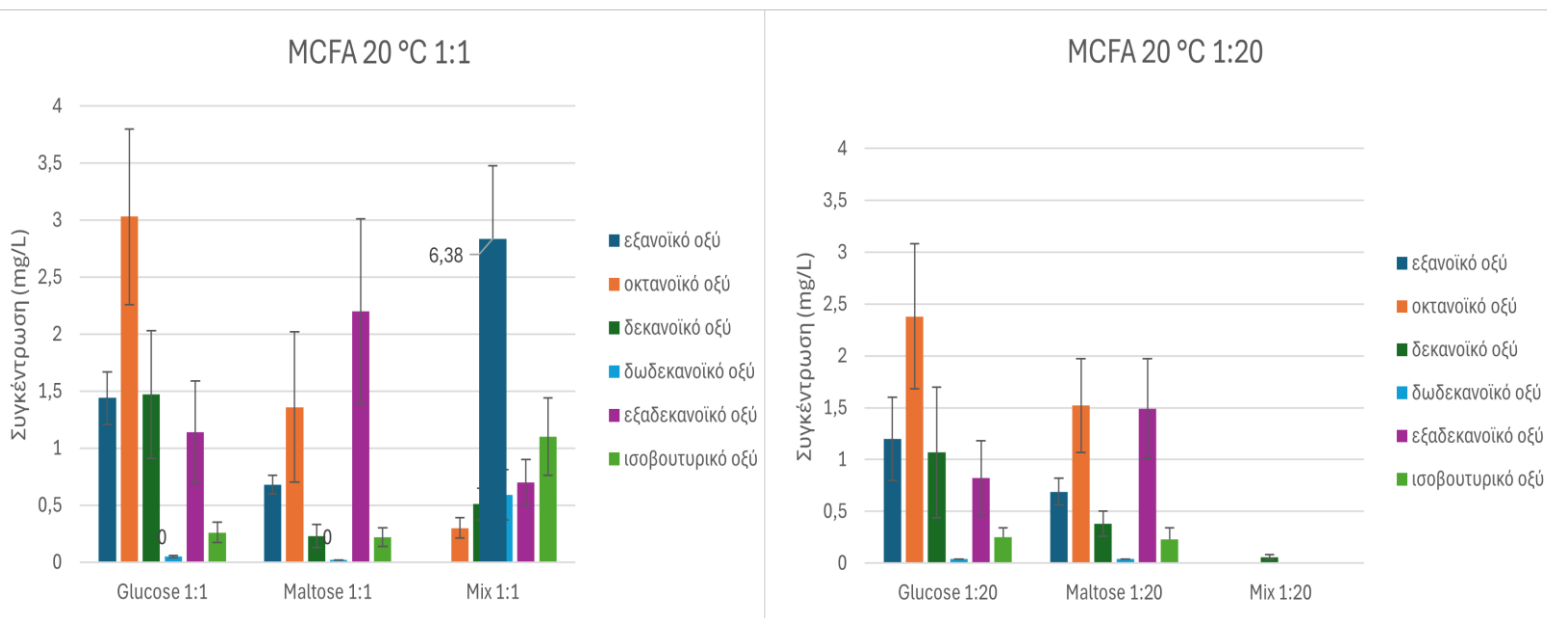
Τα λιπαρά οξέα μεσαίας αλυσίδας έχουν επίσης μεγάλη σημασία για τις οργανοληπτικές ιδιότητες του τελικού προϊόντος είτε αυτό είναι ζύθος, είτε προϊόν ζύμωσης συνθετικού υποστρώματος. Οι ενώσεις αυτές μπορεί να συντελέσουν αρνητικά εάν η συγκέντρωση υπερβαίνει το όριο αντίληψής τους, προσδίδοντας αρώματα κεριού, σαπουνιού ή ακόμα και ταγγισμένου τυριού. Το εξανοϊκό, το οκτανοϊκό, το δεκανοϊκό και το δωδεκανοϊκό οξύ είναι τα πιο συνηθισμένα λιπαρά οξέα μέσης αλυσίδας με όρια αντίληψης τα 15, 10, 10 και 6,1 mg/L, αντίστοιχα (Michel et al., 2016). Στην παρούσα μελέτη, και στις δύο θερμοκρασίες οι ζυμώσεις παράγαγαν τα προαναφερθέντα οξέα αλλά σε συγκεντρώσεις κατώτερες των ορίων αντίληψής τους.



Διάγραμμα 13. Συγκεντρώσεις Λιπαρών Οξέων Μέσης Αλυσίδας σε ζυμώσεις θερμοκρασίας 15 °C.

Από την παρατήρηση του διαγράμματος 13 για τις ζυμώσεις στους 15 °C, προκύπτει ότι το οξύ που παρήχθη στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ήταν το οκτανοϊκό, με συγκεντρώσεις να ξεπερνούν το 1,5 mg/L, και τη διαφοροποίηση του από τα υπόλοιπα οξέα σε κάθε συνθήκη να είναι εμφανής. Άλλο ένα οξύ το οποίο παρήχθη σε ψηλές συγκεντρώσεις κοντά στα 1,5 mg/L είναι το εξαδεκανοϊκό. Το εξανοϊκό και το δεκανοϊκό έλαβαν αντίστοιχα τιμές μεταξύ 0,5 και 1 mg/L. Το ισοβουτυρικό οξύ παρήχθη σε όλες τις ζυμώσεις σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις, κοντά στα 0,2 mg/L. Η παραγωγή δωδεκανοϊκού ήταν αμελητέα, καθώς σε όσες συνθήκες παρήχθη η τελική του συγκέντρωση ήταν

μικρότερη από 0,1 mg/L. Η γλυκόζη ως υπόστρωμα, ευνόησε την παραγωγή εξανοϊκού, οκτανοϊκού και δεκανοϊκού οξέος. Αξίζει να σημειωθεί ότι η διαφοροποίηση αυτή ήταν πιο εμφανής σε αναλογία εμβολίου 1:1. Για τα υπόλοιπα τρία οξέα, δεν υπήρξε βέλτιστο υπόστρωμα ανάπτυξης. Επιπλέον, η αναλογία εμβολίου δεν επηρέασε με γενικό τρόπο τις τελικές συγκεντρώσεις των λιπαρών οξέων. Οι επιδράσεις παρατηρήθηκαν μεμονωμένα και συναρτήσκει άλλων παραγόντων χωρίς αυτό να υποδεικνύει συγκεκριμένη αναλογία ως την ευνοϊκότερη.

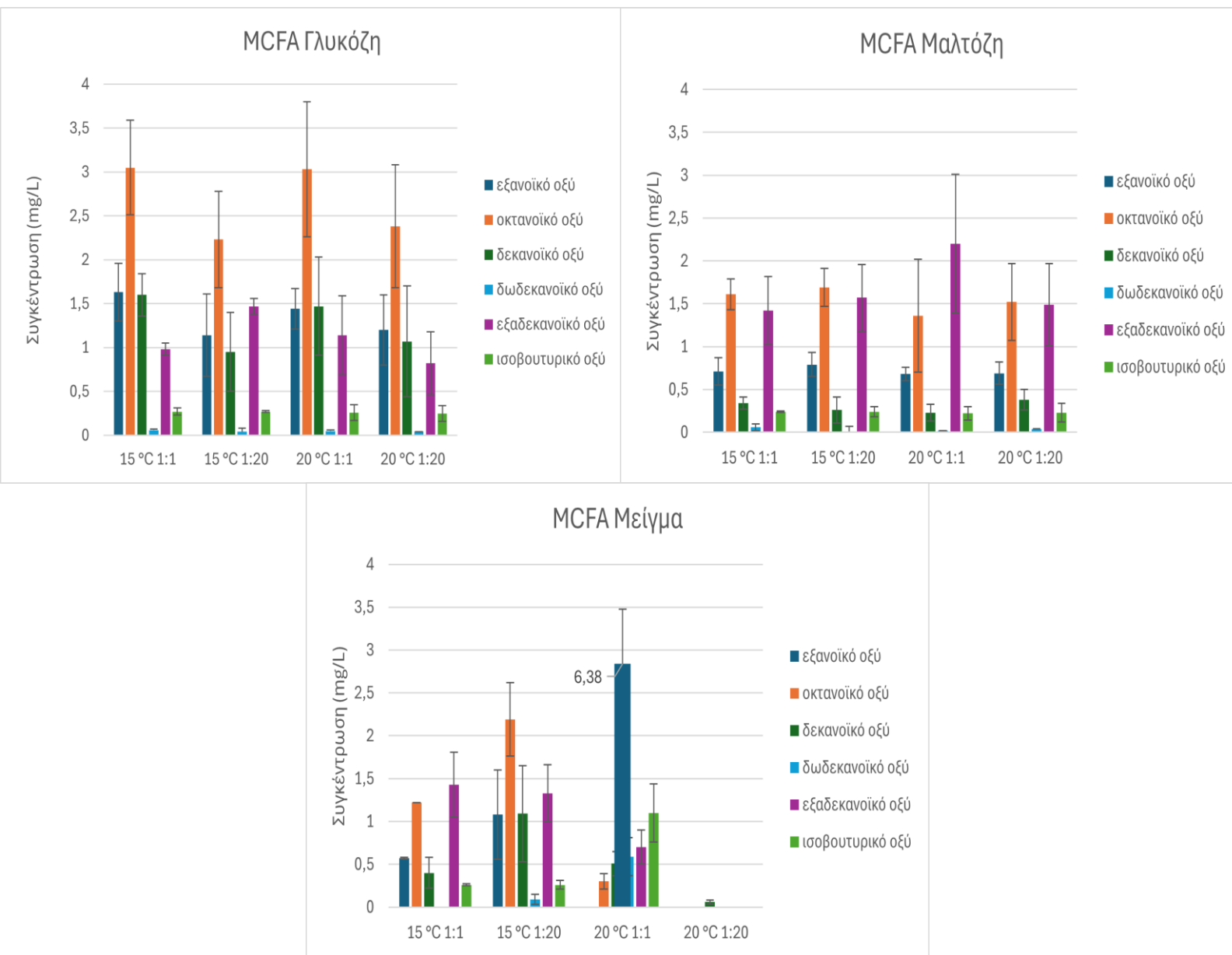


Διάγραμμα 14. Συγκεντρώσεις Λιπαρών Οξέων Μέσης Αλυσίδας σε ζυμώσεις θερμοκρασίας 20 °C.

Σε θερμοκρασία ζύμωσης 20 °C οι παρατηρήσεις ήταν διαφορετικές. Το οκτανοϊκό οξύ παρήχθη στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στο υπόστρωμα της γλυκόζης, ενώ οι συγκεντρώσεις του σε υποστρώματα μείγματος ήταν ελάχιστες (διάγραμμα 14). Το εξανοϊκό οξύ παρήχθη σε πλήθος διαφορετικών συγκεντρώσεων ανά συνθήκη, με την παραγωγή του στο μείγμα με αναλογία εμβολίου 1:1 να φτάνει τα 6,4 mg/L. Η παραγωγή δεκανοϊκού οξέος ήταν παρόμοια με εκείνη του εξανοϊκού, με σταθερά χαμηλότερη όμως τιμή. Το οξύ αυτό, ήταν το μόνο που παρήχθη σε ζύμωση μείγματος με αναλογία 1:20. Το εξαδεκανοϊκό οξύ παρήχθη σταθερά, με τη μέγιστη τιμή του στα 2 mg/L. Το ισοβουτυρικό παρήχθη σε χαμηλή συγκέντρωση, με εξαίρεση μία συνθήκη κατά την οποία η συγκέντρωση ήταν ίση με 1 mg/L (μείγμα, 1:1). Η τιμή του δωδεκανοϊκού οξέος ήταν σταθερά μικρότερη από 0,1 mg/L με μια εξαίρεση στην οποία η τιμή του ήταν 0,5 mg/L (μείγμα, 1:1).

Από τη σύγκριση των υποστρωμάτων προέκυψε ότι η γλυκόζη ευνόησε την παραγωγή εξανοϊκού, οκτανοϊκού και δεκανοϊκού οξέος. Από την άλλη, η μαλτόζη ευνόησε την παραγωγή εξαδεκανοϊκού οξέος. Αν και το μείγμα σε αναλογία 1:20 δεν οδήγησε στην παραγωγή λιπαρών οξέων μέσης αλυσίδας, η υψηλή συγκέντρωση εξανοϊκού και ισοβουτυρικού οξέος σε αναλογία 1:1 δεν μπορεί να

αποδοθεί με βεβαιότητα στο υπόστρωμα της ζύμωσης. Η αναλογία εμβολίου δεν φάνηκε να επηρεάζει με κάποιο τρόπο την παραγωγή λιπαρών οξέων μέσης αλυσίδας.



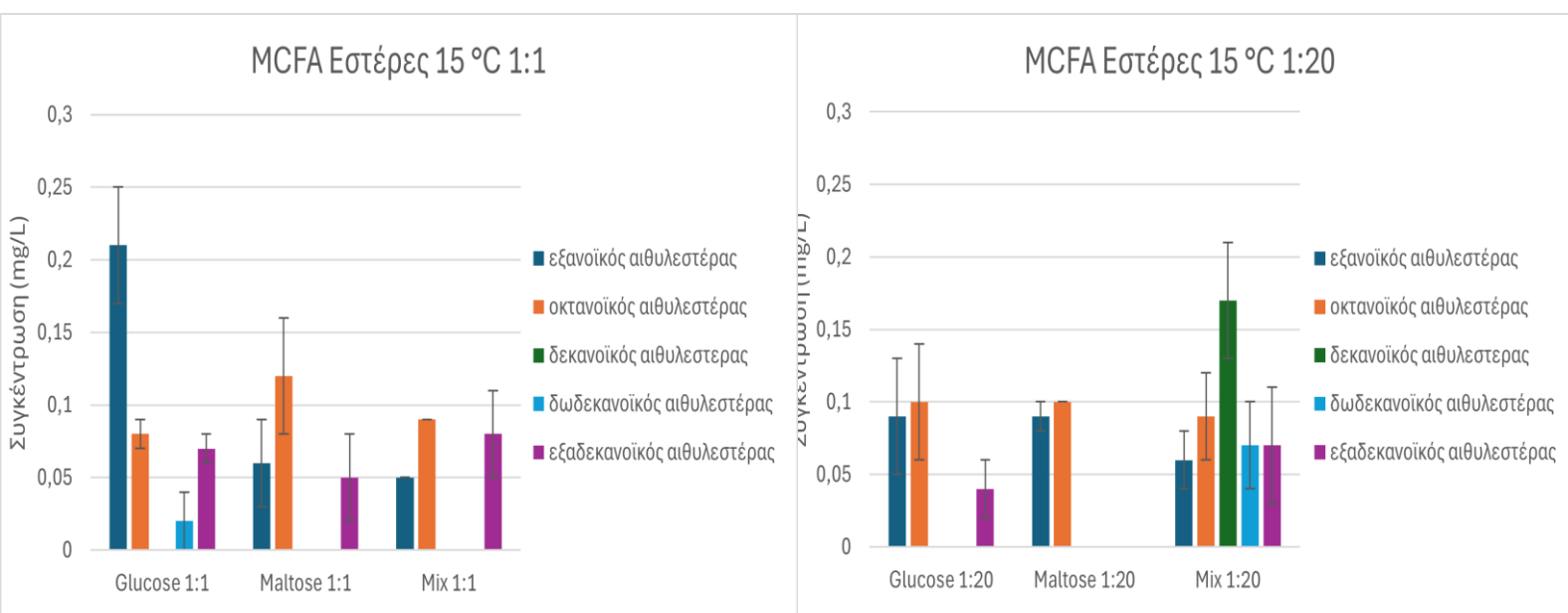
Διάγραμμα 15. Συγκεντρώσεις Λιπαρών Οξέων Μέσης Αλυσίδας στα διαφορετικά υποστρώματα ζύμωσης

Παρατηρώντας το διάγραμμα 15, δεν προέκυψε κάποια σαφής διαφοροποίηση μεταξύ των δύο θερμοκρασιών για τη γλυκόζη. Ωστόσο, η παραγωγή εξανοϊκού, οκτανοϊκού και δεκανοϊκού οξέος σε αυτό το υπόστρωμα ήταν υψηλότερη σε αναλογία 1:1. Στο υπόστρωμα μαλτόζης, η παραγωγή εξανοϊκού και οκτανοϊκού οξέος ευνοήθηκε ελαφρώς σε θερμοκρασία 15 °C. Η παρατήρηση αυτή δεν επιβεβαιώθηκε από τα υπόλοιπα δείγματα. Στο υπόστρωμα μαλτόζης, η εικόνα γύρω από την επίδραση της αναλογίας εμβολίου διαφοροποιήθηκε συγκριτικά με την αντίστοιχη στη γλυκόζη. Το εξανοϊκό και το οκτανοϊκό οξύ έλαβαν υψηλότερες τιμές συγκέντρωσης σε αναλογίες εμβολίου 1:20.

Για τα υπόλοιπα οξέα δεν υπήρξε άμεση διαφοροποίηση. Στο μείγμα, η απουσία ενώσεων για την αναλογία 1:20 σε θερμοκρασία 20 °C δεν επέτρεψε την διενέργεια περαιτέρω συγκρίσεων.

### 5.6.3 MCFA Εστέρες

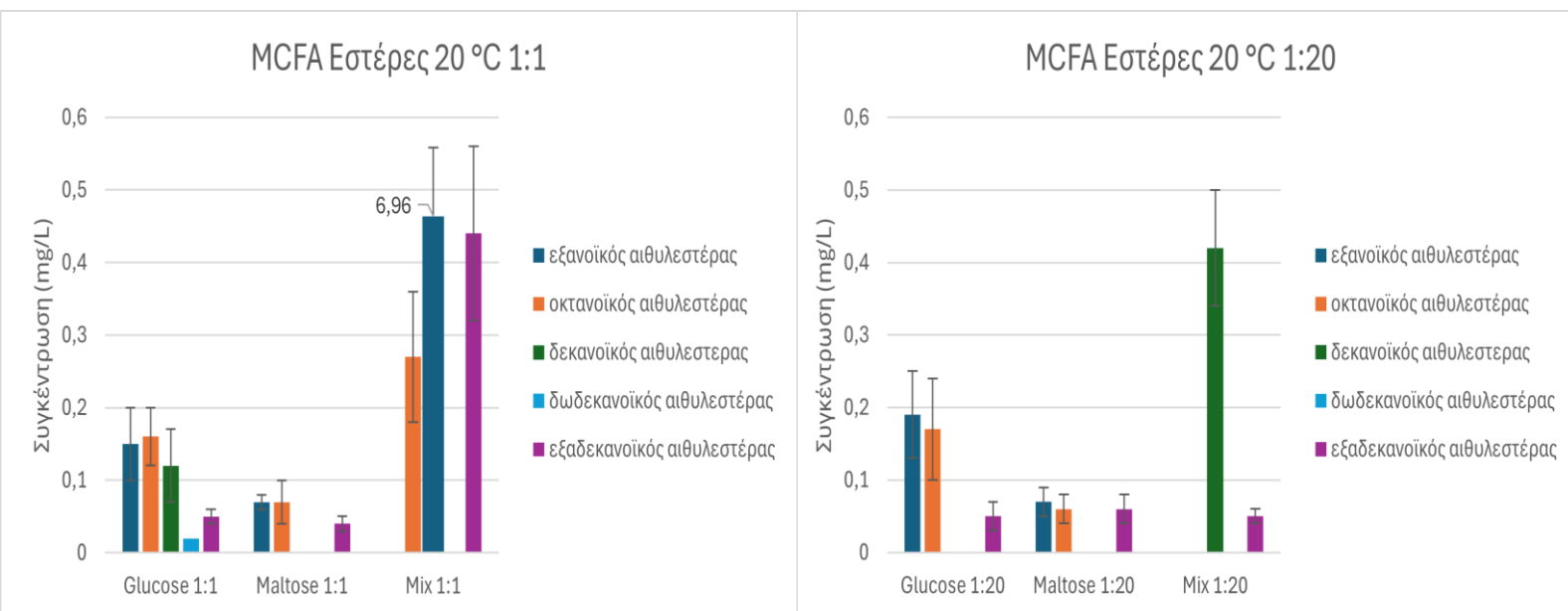
Οι εστέρες των λιπαρών οξέων μεσαίας αλυσίδας (MCFA Εστέρες), είναι ενώσεις πολύ σημαντικές για την βιομηχανία οίνου και ζύθου, καθώς αποδίδουν στο τελικό προϊόν αρώματα φρούτων και ανθέων. Η σύνθεση των εστέρων κατά τη ζύμωση εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το είδος της ζύμης καθώς και από τη θερμοκρασία. Για παράδειγμα οι χαμηλές θερμοκρασίες ζύμωσης (10-15 °C) ευνοούν την σύνθεση εστέρων γεγονός που συχνά εκμεταλλεύονται οι οινοποιοί προς δημιουργία ευχάριστου αρωματικού προφίλ (Heard & Fleet, 1988).



Διάγραμμα 16. Συγκεντρώσεις MCFA εστέρων σε ζυμώσεις θερμοκρασίας 15 °C.

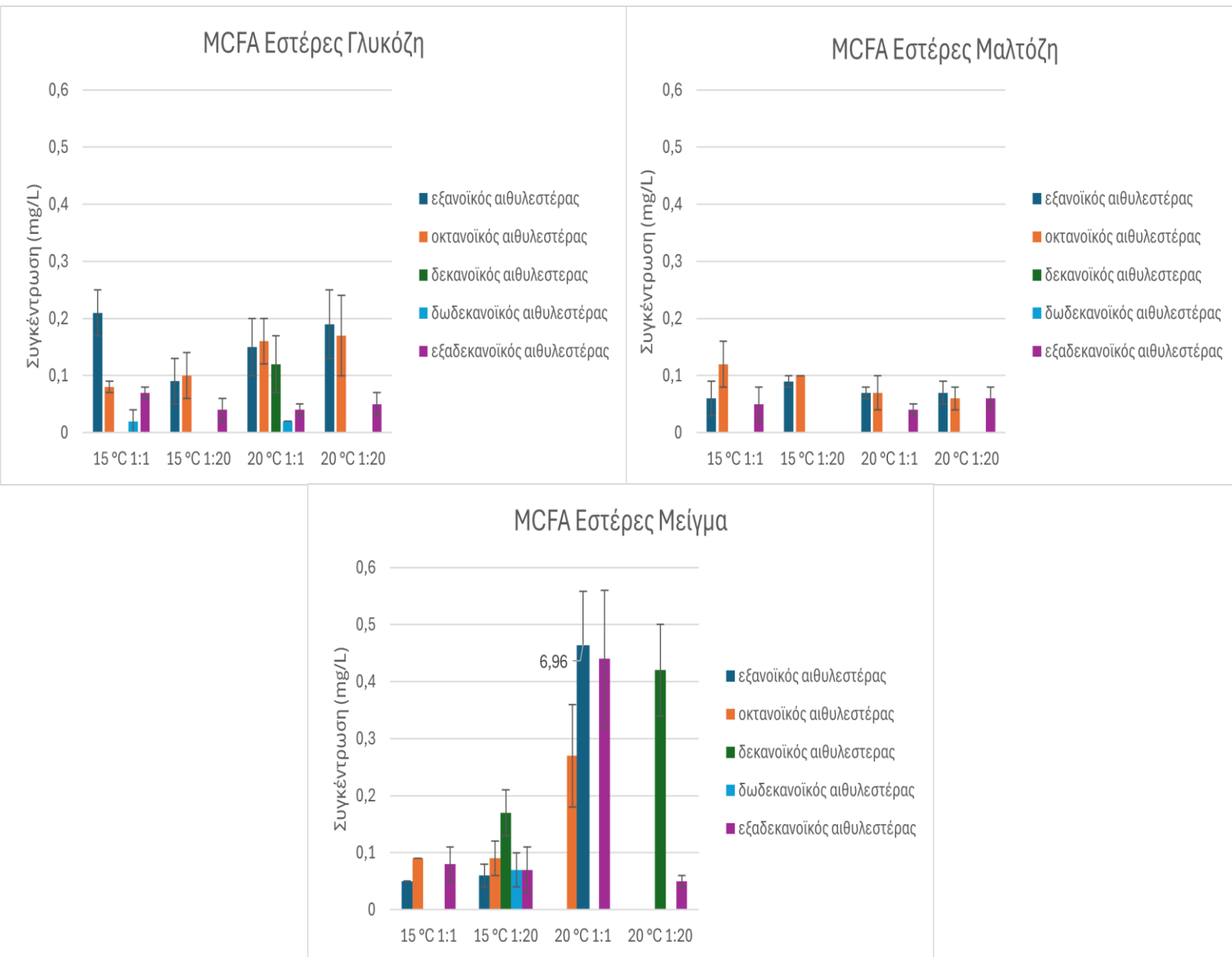
Οι εστέρες οι οποίοι παρήχθησαν σε κάθε ζύμωση που πραγματοποιήθηκε στους 15 °C ήταν ο εξανοϊκός και ο οκτανοϊκός αιθυλεστέρας. Με εξαίρεση μία συνθήκη (γλυκόζη, 15 °C, 1:1) ο οκτανοϊκός αιθυλεστέρας παρουσίασε συγκριτικά υψηλότερες τιμές. Ο δεκανοϊκός αιθυλεστέρας παρήχθη μόνο σε ζύμωση μείγματος και σε αναλογία 1:20. Ο δωδεκανοϊκός παρήχθη μόνο σε δύο συνθήκες οι οποίες δε συσχετίζονται μεταξύ τους. Ο εξαδεκανοϊκός αιθυλεστέρας παρήχθη σε όλες τις συνθήκες πλην μιας (μαλτόζη 15 °C, 1:20). Τα υποστρώματα ζύμωσης δεν έδειξαν να επηρεάζουν την παραγωγή εστέρων σε ποσοτικό επίπεδο. Σε ποιοτικό επίπεδο, το υπόστρωμα γλυκόζης ήταν ευνοϊκό για την παραγωγή εξανοϊκού αιθυλεστέρα. Η μαλτόζη ευνόησε αποκλειστικά την παραγωγή του εξανοϊκού και του οκτανοϊκού αιθυλεστέρα. Αν και η ζύμωση σε μείγμα με αναλογία 1:20 παρουσίασε τιμές για όλους τους εξεταζόμενους εστέρες, δεν παρατηρήθηκε το ίδιο και στις ζυμώσεις αναλογίας 1:1. Η αναλογία εμβολιασμού δεν φάνηκε να επηρεάζει με γενικευμένο τρόπο

την παραγωγή κάποιου συγκεκριμένου εστέρα. Ωστόσο, στη ζύμωση του μείγματος σε αναλογία 1:20, παρήχθησαν όλοι οι δυνατοί εστέρες, γεγονός που ίσως να υποδεικνύει την συγκεκριμένη συνθήκη ως βέλτιστη προς παραγωγή προϊόντος με πλούσιο αρωματικό προφίλ.



Διάγραμμα 17. Συγκεντρώσεις MCFA εστέρων ζυμώσεις θερμοκρασίας 20 °C.

Στις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν στους 20 °C, δεν υπήρξε σταθερή διαφοροποίηση μεταξύ των διαφόρων εστέρων με την παραγωγή του κάθε εστέρα φάνηκε να ευνοείται περισσότερο υπό συγκεκριμένες συνθήκες. Ο εξανοϊκός, ο οκτανοϊκός και ο εξαδεκανοϊκός αιθυλεστέρας εμφανίστηκαν στην πλειονότητα των ζυμώσεων. Η γλυκόζη συνεισέφερε στην παραγωγή εξανοϊκού και οκτανοϊκού αιθυλεστέρα. Η μαλτόζη ως υπόστρωμα δεν απέδωσε ποιοτικά ή ποσοτικά στην παραγωγή εστέρων, ενώ στο μείγμα και σε αναλογία 1:1 παρατηρούνται οι υψηλότερες τιμές σε εξανοϊκό, οκτανοϊκό και εξαδεκανοϊκό αιθυλεστέρα. Η συγκέντρωση του εξανοϊκού αιθυλεστέρα διαφοροποιήθηκε σημαντικά συγκριτικά με τις άλλες, με την τιμή της να προσεγγίζει τα 7 mg/L. Αναφορικά με την αναλογία ζυμών, στις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν σε αναλογία 1:20 ευνοήθηκε η παραγωγή δεκανοϊκού αιθυλεστέρα. Ωστόσο, η αναλογία εμβολίου δεν επίδρασε ευρύτερα στην παραγωγή των υπόλοιπων εστέρων.



Διάγραμμα 18. Συγκεντρώσεις MCFΑ εστέρων στα διαφορετικά υποστρώματα ζύμωσης.

Η παραγωγή ενός εστέρα εξαρτάται από τη θερμοκρασία ζύμωσης καθώς και από το επιλεγμένο στέλεχος ζύμης. Παρόλο που η χαμηλή θερμοκρασία οδηγεί σε μεγαλύτερη συγκέντρωση εστέρων (Heard & Fleet, 1988; Willaert, 2012), η θερμοκρασία γενικότερα επηρεάζει κάθε έναν από αυτούς με διαφορετικό τρόπο. Επιπλέον, ο σχηματισμός ενός εστέρα μπορεί να διαφέρει όταν χρησιμοποιούνται διαφορετικά στελέχη ζύμης, καθώς τα τελευταία επηρεάζονται επίσης διαφορετικά από τη θερμοκρασία ζύμωσης (Verstrepen et al., 2003). Στη γλυκόζη (διάγραμμα 18), η μόνη ένωση η οποία παρουσίασε συνεπείς παρατηρήσεις ήταν ο οκτανοϊκός αιθυλεστέρας, του οποίου οι συγκεντρώσεις ήταν σταθερά υψηλότερες θερμοκρασία 20 °C. Επίσης, αξίζει να σημειωθεί ότι ο δωδεκανοϊκός αιθυλεστέρας παρήχθη μόνο σε ζύμωση με αναλογία 1:1. Στη μαλτόζη, η παραγωγή

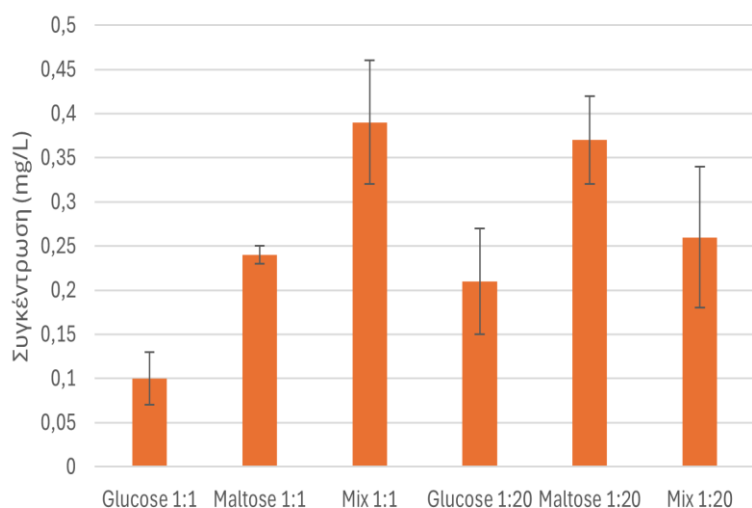
MCFA εστέρων ήταν ελλιπής. Από τους πέντε εξεταζόμενους εστέρες, παρήχθησαν μόνο τρεις. Οι δε συγκεντρώσεις τους ήταν μικρότερες από 0,15 mg/L. Συγκρίνοντας τις θερμοκρασίες, ο οκτανοϊκός σε αιθυλεστέρας ήταν η μόνη ένωση της οποίας η συγκέντρωση ευνοήθηκε από συγκεκριμένη θερμοκρασία. Εν αντιθέσει με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις στη γλυκόζη, οι υψηλότερες τιμές σε υπόστρωμα μαλτόζης σημειώθηκαν στους 15 °C. Στο μείγμα, εξαιρώντας τον εξανοϊκό αιθυλεστέρα σε αναλογία 1:1, δεν υπήρξε κάποια ένδειξη που να υποδεικνύει συγκεκριμένη θερμοκρασία ως βέλτιστη. Συγκρίνοντας αναλογίες ζυμών, ο δεκανοϊκός αιθυλεστέρας παρήχθη αποκλειστικά σε αναλογία 1:1. Αξίζει μία παραπάνω παρατήρηση στο υπόστρωμα του μείγματος σε θερμοκρασία 20 °C και αναλογία εμβολίου 1:1, καθώς συνθήκη αυτή η ευνόησε σε πολύ μεγάλο βαθμό την παραγωγή εξανοϊκού οξέος και εξανοϊκού αιθυλεστέρα.

#### **5.6.4 Άλλες Πτητικές Ενώσεις**

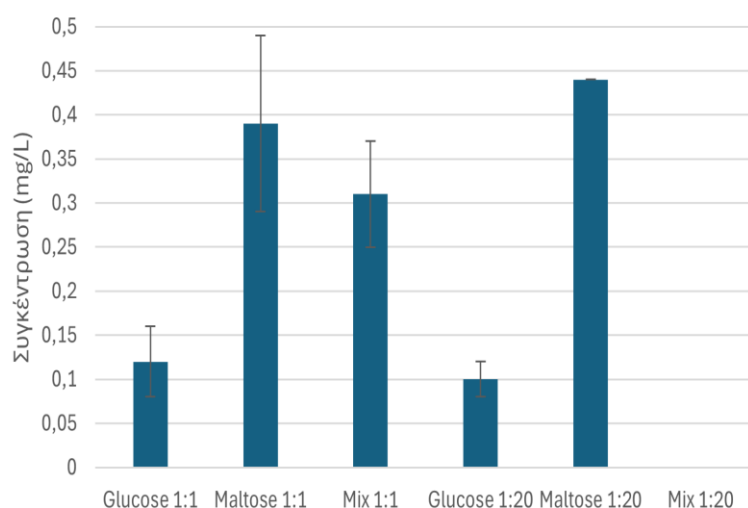
Κατά την διάρκεια των ζυμώσεων παρήχθησαν ορισμένες ακόμη ενώσεις με αρωματικές ιδιότητες οι οποίες καταγράφονται παρακάτω. Η καταγραφή αυτή ξεκινά από την διερεύνηση των οξικών εστέρων.

Οι κύριοι οξικοί εστέρες που επιδρούν στο αρωματικό προφίλ του προϊόντος είναι ο οξικός ισοαμυλεστέρας και ο οξικός φαινυλαιθυλεστέρας. Οι ενώσεις αυτές προκύπτουν από την εστεροποίηση ανώτερων αλκοολών με το οξικό οξύ, ενώ η συμβολή τους στο αρωματικό προφίλ ενός προϊόντος είναι γλυκίες νότες μελιού και μπανάνας (Canonico et al., 2017). Το όριο αντίληψης του οξικού φαινυλαιθυλεστέρα είναι 3,8 mg/L, ενώ το όριο του οξικού ισοαμυλεστέρα είναι 1,6 mg/L (Michel et al., 2016). Η απουσία οξικού αιθυλεστέρα προκάλεσε εντύπωση, καθώς αποτελεί έναν οξικό εστέρα ο οποίος παράγεται συχνά από ζύμες non-*Saccharomyces* (Soufleros & Bertrand, 1979). Ωστόσο, σύμφωνα με άλλες βιβλιογραφικές πηγές οι ζύμες του γένους *Zygosaccharomyces* χαρακτηρίζονται από μικρή παραγωγή οξικού αιθυλεστέρα (Thomas & Davenport, 1985).

Οξικός Φαινυλεθυλεστέρας 15 °C



Οξικός Φαινυλεθυλεστέρας 20 °C



Διάγραμμα 19. Συγκεντρώσεις Οξικού Φαινυλαιθυλεστέρας στις διαφορετικές θερμοκρασίες ζύμωσης.

Στις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν δεν παρήχθη ούτε οξικός ισοαμυλεστέρας. Ωστόσο, ο οξικός φαινυλαιθυλεστέρας παρήχθη σε όλες τις ζυμώσεις θερμοκρασίας 15 °C. Αν και η παραγωγή του δεν έδειξε να ευνοείται περισσότερο από συγκεκριμένο υπόστρωμα, η συγκέντρωση του ήταν σταθερά η μικρότερη στις ζυμώσεις γλυκόζης. Στις ζυμώσεις σε θερμοκρασία 20 °C, ο οξικός φαινυλαιθυλεστέρας αναπτύχθηκε καλύτερα σε υπόστρωμα μαλτόζης με συγκεντρώσεις υψηλότερες από 0,35 mg/L. Αντίθετα, και σε αυτή τη θερμοκρασία οι τιμές στο υπόστρωμα γλυκόζης ήταν μικρές (< 0,2 mg/L).

Συγκεντρώσεις (mg/L)

| Peak Area                            | 6M_15oC_1:1 |           |           | 6M_15oC_1:20 |           |           | 6M_20oC_1:1 |           |           | 6M_20oC_1:20 |           |           |           |
|--------------------------------------|-------------|-----------|-----------|--------------|-----------|-----------|-------------|-----------|-----------|--------------|-----------|-----------|-----------|
|                                      | GLUCOSE     | MALTOSE   | MIX       | GLUCOSE      | MALTOSE   | MIX       | GLUCOSE     | MALTOSE   | MIX       | GLUCOSE      | MALTOSE   | MIX       |           |
| 2-Furanmethanol                      | 25,767      | 0,0±0,00  | 0,0±0,00  | 0,0±0,00     | 0,0±0,00  | 0,08±0,06 | 0,0±0,00    | 0,0±0,00  | 0,0±0,00  | 0,0±0,00     | 0,0±0,00  | 0,01±0,00 | 0,06±0,01 |
| 1H-Indole-3-ethanol, acetate (ester) | 83,751      | 0,0±0,00  | 0,0±0,00  | 0,0±0,00     | 0,0±0,00  | 0,03±0,02 | 0,0±0,00    | 0,0±0,00  | 0,0±0,00  | 0,45±0,08    | 0,0±0,00  | 0,0±0,00  | 0,0±0,00  |
| Tryptophol                           | 85,234      | 0,0±0,00  | 0,14±0,1  | 0,24±0,16    | 0,14±0,01 | 0,3±0,33  | 0,21±0,15   | 0,0±0,00  | 0,16±0,03 | 0,47±0,09    | 0,0±0,00  | 0,05±0,01 | 0,0±0,00  |
| Acetic acid, 2-phenylethyl ester     | 31,824      | 0,1±0,03  | 0,24±0,01 | 0,39±0,07    | 0,21±0,16 | 0,37±0,05 | 0,26±0,24   | 0,12±0,04 | 0,39±0,1  | 0,31±0,06    | 0,1±0,02  | 0,44±0,00 | 0,0±0,00  |
| Acetic acid                          | 15,996      | 0,22±0,03 | 0,0±0,00  | 0,0±0,00     | 0,53±0,36 | 0,35±0,25 | 0,0±0,00    | 0,45±0,14 | 0,28±0,05 | 0,45±0,18    | 0,59±0,26 | 0,18±0,03 | 0,06±0,01 |

Πίνακας 4. Συγκεντρώσεις πτητικών ενώσεων στις διάφορες συνθήκες.

Μια ακόμη σημαντική ένωση η οποία εξετάστηκε στην παρούσα μελέτη είναι η τρυπτοφόλη. Η αλκοόλη αυτή είναι γνωστή για τη συνεισφορά της στο αρωματικό προφίλ του οίνου με αρώματα ανθέων και τη γεύση αμύγδαλου (Drosou et al., 2022). Η ένωση αυτή παράγεται από τον μεταβολισμό του αμινοξέος τρυπτοφάνη από τις ζύμες (Quirós et al., 2013), και το κατώφλι αντίληψής της είναι



200 mg/L (Li & Liu, 2015). Με βάση τον πίνακα 4, η τρυπτοφόλη έλαβε υψηλότερες τιμές συγκέντρωσης σε υποστρώματα μαλτόζης και χαμηλότερες υποστρώματα γλυκόζης. Στους 20 °C, η παραγωγή τρυπτοφόλης δεν παρουσίασε συγκεκριμένο κανόνα εκτός του ότι δεν παρήχθη σε κανένα υπόστρωμα γλυκόζης.

Μια ακόμη αρωματική ένωση η οποία παρουσιάζει ενδιαφέρον, είναι ο εστέρας της ινδόλης-3-οξικού οξέος (IAA). Ο εστέρας αυτός εντοπίζεται κυρίως στις ζυμώσεις ζυμών non-Saccharomyces, και σχηματίστηκε πιθανώς μέσω εστεροποίησης της ινδόλης με οξικό οξύ (Drosou et al., 2022). Σύμφωνα με πρόσφατη μελέτη (Álvarez-Fernández et al., 2019), η εστεροποίηση αυτή πραγματοποιείται υπό την προϋπόθεση ότι οι ζύμες είναι ανεκτικές στην αιθανόλη και ότι διαθέτουν γονίδια που σχετικά με αυτόν τον μεταβολισμό. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις, (<20 µg/L) οι ινδόλες συμβάλλουν στο αρωματικό προφίλ λευκών οίνων με νότες λουλουδιών (Arevalo-Villena et al., 2010; Capone et al., 2010). Ωστόσο, σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, η επίδραση τους είναι αρνητική και χαρακτηρίζονται ως off-flavors (Arevalo-Villena et al., 2010). Ο εστέρας της ινδόλης-3-οξικού οξέος παρήχθη μόνο σε μια συνθήκη ζύμωσης ανά θερμοκρασία. Τα διαφορετικά υποστρώματα και αναλογίες ζυμών δεν επέτρεψαν την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τις συνθήκες που ευνοούν την παραγωγή αυτού του εστέρα. Οι συγκεντρώσεις που παρήχθησαν ήταν αρκετά μικρές και δεν ξεπέρασαν τα 0,45 mg/L.

Η 2-φουρανμεθανόλη αποτελεί μια ένωση η οποία παράγεται συνήθως κατά την παλαίωση ζύθων, προσδίδοντας νότες καμένου ξύλου. Στην παρούσα μελέτη οι συγκεντρώσεις της ήταν μικρές με αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό ότι παρήχθη αποκλειστικά στις ζυμώσεις με αναλογία εμβολίου 1:20. Το οξικό οξύ είναι μια από τις ενώσεις που έχουν απασχολήσει πολύ την βιομηχανία αλκοολούχων ποτών. Η ταύτισή του με αρνητικές καταστάσεις κατά τη ζύμωση καθώς και το άρωμα ξυδιού που προσδίδει την κατατάσσουν συνήθως ως ένωση off-flavor. Η παρουσία οξικού οξέος σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από το κατώφλι αντίληψης (70-200mg/L) υποβαθμίζει την οργανοληπτική ποιότητα του τελικού προϊόντος (Engan, 1974; Zhang et al., 2012). Το οξικό οξύ μπορεί να παραχθεί με διάφορους τρόπους, στις ζυμώσεις είτε μέσω του μεταβολισμού των ζυμών είτε παρουσία οξικών βακτηρίων. Στην παρούσα μελέτη, το οξικό οξύ παρήχθη σε όλες τις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 20 °C. Στους 15 °C παρήχθη σε κάθε υπόστρωμα πλην του μείγματος. Οι τιμές συγκέντρωσης σε αυτές τις ζυμώσεις έφτασαν μέχρι τα 0,5 mg/L, με τις υψηλότερες να παρατηρούνται στο υπόστρωμα γλυκόζης. Το γεγονός ότι η συγκέντρωση του οξικού οξέος είναι μικρότερη από το κατώφλι αντίληψης οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η ένωση αυτή δεν επίδρασε σημαντικά στο αρωματικό προφίλ του τελικού προϊόντος.

Από την εξέταση των στηλών της γλυκόζης δεν προέκυψε κάποιο συμπέρασμα, ενώ από την εξέταση των στηλών μαλτόζης φαίνεται ότι οξικός φαινυλαιθυλεστέρας παρήχθη περισσότερο σε θερμοκρασίες 20 °C. Αντίθετα, η παραγωγή τρυπτοφόλης ευνοήθηκε σε ζυμώσεις θερμοκρασίας

15 °C. Με βάση τις στήλες του πίνακα που αφορούν στο μείγμα, η μόνη παρατήρηση που προέκυψε ήταν ότι οξικός φαινυλαιθυλεστέρας έλαβε υψηλότερες τιμές συγκέντρωσης σε αναλογία ζυμών 1:1.

## 6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

Καταληκτικά, μελετώντας τα αποτελέσματα των ζυμώσεων στα συνθετικά υποστρώματα, προκύπτει ότι ο συνδυασμός των ειδών *Z. bailii* και *S. cerevisiae* μπορεί να ζυμώσει τα κύρια σάκχαρα ενός ζυθογλεύκου σε διαφορετικές θερμοκρασίες και υπό διαφορετικές αναλογίες εμβολίου.

Η πειραματική πορεία αφορούσε στην παρακολούθηση των διαφορετικών παραγόντων που επιδρούν στη ζύμωση και πιο συγκεκριμένα στο αρχικό εμβόλιο, στην αναλογία, στη θερμοκρασία ζύμωσης και στα διαφορετικά υποστρώματα σακχάρων. Η μελέτη των πληθυσμών στις διάφορες συνθήκες υπέδειξε το μείγμα ως το βέλτιστο υπόστρωμα ζύμωσης στην πλειονότητα των περιπτώσεων. Η διαφορά μεταξύ των αρχικών πληθυσμών ήταν εμφανής κυρίως στις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 20 °C, με τους υψηλότερους πληθυσμούς να καταγράφονται στις ζυμώσεις με αρχικό πληθυσμό  $6 \cdot 10^6$  κύτταρα/ml. Αναφορικά με τον αλκοολικό τίτλο στα τελικά προϊόντα ο παράγοντας που επίδρασε περισσότερο ήταν το υπόστρωμα ζύμωσης. Στο υπόστρωμα της μαλτόζης παρήχθη η υψηλότερη συγκέντρωση αιθανόλης φτάνοντας τα 6,36 vol%, ενώ στο μείγμα η χαμηλότερη (5,02 vol%). Η τελική ολική οξύτητα και το pH επηρεάστηκαν κυρίως από τη θερμοκρασία ζύμωσης, με τους 20 °C να παρουσιάζουν τις υψηλότερες τιμές. Η τελευταία σειρά πειραμάτων αφορούσε στη μελέτη των παραγόμενων πτητικών ενώσεων στα τελικά προϊόντα. Η παραγωγή ανώτερων αλκοολών ήταν υψηλότερη σε ζυμώσεις μαλτόζης. Αναφορικά με τα λιπαρά οξέα μεσαίας αλυσίδας (MCFA), η γλυκόζη ευνόησε την παραγωγή εξανοϊκού, οκτανοϊκού και δεκανοϊκού οξέος. Από την άλλη, η μαλτόζη ευνόησε την παραγωγή εξαδεκανοϊκού οξέος. Η παραγωγή εστέρων ευνοήθηκε περισσότερο στο υπόστρωμα γλυκόζης και λιγότερο στο υπόστρωμα μαλτόζης. Από τους οξικούς εστέρες, η μόνη ένωση που παρήχθη ήταν ο οξικός φαινυλαιθυλεστέρας, με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις του να παρατηρούνται σε αναλογία 1:1. Η παραγωγή τρυπτοφύλης ήταν υψηλότερη σε ζυμώσεις της μαλτόζης στους 15 °C, ενώ η παραγωγή της σε υποστρώματα γλυκόζης ήταν ιδιαίτερα περιορισμένη. Η 2-φουρανμεθανόλη παρήχθη σε μικρές συγκεντρώσεις και αποκλειστικά στις μεικτές ζυμώσεις με αναλογία 1:20. Τέλος, το οξικό οξύ παρήχθη σε όλες τις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 20 °C, ενώ στους 15 °C παρήχθη σε κάθε υπόστρωμα πλην του μείγματος.

Ανακεφαλαιώνοντας, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας φανερώνουν ότι η ζύμη *Z. bailii* σε μεικτές ζυμώσεις μπορεί να ζυμώσει τα κύρια σάκχαρα που απαντώνται σε ζυθογλέκη, παράγοντας ικανοποιητική συγκέντρωση αιθυλικής αλκοόλης. Ωστόσο, η υψηλή οξύτητα καθώς και οι μικρές συγκεντρώσεις πτητικών αρωματικών ενώσεων δεν μπορούν να θεωρηθούν χαρακτηριστικά ευνοϊκά για την παραγωγή προϊόντος προς μαζική κατανάλωση. Ωστόσο, τα ζυμωτικά χαρακτηριστικά που παρουσίασε ο *Z. bailii* θα μπορούσαν ίσως να αξιοποιηθούν στην παραγωγή εναλλακτικών και πιο εξεζητημένων προϊόντων όπως ο ζύθος τύπου Sour και ορισμένοι τύποι φυσικού οίνου. Η μελέτη των ιδιοτήτων του *Z. bailii* σε μεικτές ζυμώσεις αποτελεί πεδίο με πολλά περιθώρια εξέλιξης και

έρευνας. Αναφορικά με το με πλήθος εφαρμογών στη βιομηχανία οίνου ο *Z. bailii* δεν έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στην βιομηχανία ποτών, με την χρήση του να περιορίζεται κυρίως σε έρευνες που αφορούν στη μείωση του αλκοολικού τίτλου και στην αποζύμωση των υπολειπόμενων σακχάρων στον οίνο. Η δυνατότητα αξιοποίησης άλλων ιδιοτήτων του *Z. bailii* σχετικά με τη ζυμωτική του ικανότητα ή την παραγωγή ευχάριστων αρωματικών ενώσεων, συνεχίζει να αποτελεί πεδίο ανοιχτό για μελλοντικές έρευνες.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Álvarez-Fernández, M. A., Fernández-Cruz, E., Garcia-Parrilla, M. C., Troncoso, A. M., Mattivi, F., Vrhovsek, U., & Arapitsas, P. (2019). Saccharomyces cerevisiae and Torulaspora delbrueckii Intra- and Extra-Cellular Aromatic Amino Acids Metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(28), 7942–7953. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b01844>
- Alves-Araújo, C., Pacheco, A., Almeida, M. J., Spencer-Martins, I., Leão, C., & Sousa, M. J. (2007). Sugar utilization patterns and respiro-fermentative metabolism in the baker's yeast Torulaspora delbrueckii. *Microbiology*, 153(3), 898–904. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/003475-0>
- Arevalo-Villena, M., Bartowsky, E. J., Capone, D., & Sefton, M. A. (2010). Production of indole by wine-associated microorganisms under oenological conditions. *Food Microbiology*, 27(5), 685–690. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.03.011>
- Arez, B. F., Alves, L., & Paixão, S. M. (2014). Production and Characterization of a Novel Yeast Extracellular Invertase Activity Towards Improved Dibenzothiophene Biodesulfurization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2048–2057.
- Basso, R. F., Alcarde, A. R., & Portugal, C. B. (2016). Could non-Saccharomyces yeasts contribute on innovative brewing fermentations? In *Food Research International* (Vol. 86, pp. 112–120). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.06.002>
- Bellut, K., Michel, M., Zarnkow, M., Hutzler, M., Jacob, F., De Schutter, D. P., Daenen, L., Lynch, K. M., Zannini, E., & Arendt, E. K. (2018). Application of non-Saccharomyces yeasts isolated from kombucha in the production of alcohol-free beer. *Fermentation*, 4(3). <https://doi.org/10.3390/fermentation4030066>
- Berthels, N. J., Cordero Otero, R. R., Bauer, F. F., Thevelein, J. M., & Pretorius, I. S. (2004). Discrepancy in glucose and fructose utilisation during fermentation by Saccharomyces cerevisiae wine yeast strains. *FEMS Yeast Research*, 4(7), 683–689. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.02.005>
- Bisson, L. F., Coons, D. M., Kruckeberg, A. L., & Lewis, D. A. (1993). Yeast sugar transporters. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 28(4), 259–308. <https://doi.org/10.3109/10409239309078437>
- Bovo, B., Carlot, M., Lombardi, A., Lomolino, G., Lante, A., Giacomini, A., & Corich, V. (2014). Exploring the use of Saccharomyces cerevisiae commercial strain and Saccharomyces ludwigii natural isolate for grape marc fermentation to improve sensory properties of spirits. *Food Microbiology*, 41, 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.01.006>
- Brul, S., & Coote, P. (1999). Preservative agents in foods Mode of action and microbial resistance mechanisms. In *International Journal of Food Microbiology* (Vol. 50).
- Canonico, L., Comitini, F., & Ciani, M. (2017). Torulaspora delbrueckii contribution in mixed brewing fermentations with different Saccharomyces cerevisiae strains. *International Journal of Food Microbiology*, 259, 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.07.017>
- Capece, A., De Fusco, D., Pietrafesa, R., Siesto, G., & Romano, P. (2021). Performance of wild non-conventional yeasts in fermentation of wort based on different malt extracts to select novel starters for low-alcohol beers. *Applied Sciences (Switzerland)*, 11(2), 1–17. <https://doi.org/10.3390/app11020801>
- Capece, A., Pietrafesa, A., Pietrafesa, R., Garrigós, V., Tedesco, F., Romano, P., Matallana, E., Siesto, G., & Aranda, A. (2022). Impact of Starmerella bacillaris and Zygosaccharomyces bailii on ethanol reduction and Saccharomyces cerevisiae metabolism during mixed wine fermentations. *Food Research International*, 159. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111649>
- Capece, A., Romaniello, R., Pietrafesa, A., Siesto, G., Pietrafesa, R., Zambuto, M., & Romano, P. (2018). Use of Saccharomyces cerevisiae var. bouldarii in co-fermentations with S. cerevisiae for the production of craft beers with potential healthy value-added. *International Journal of Food Microbiology*, 284, 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.06.028>
- Capone, D. L., van Leeuwen, K. A., Pardon, K. H., Daniel, M. A., Elsey, G. M., Coulter, A. D., & Sefton, M. A. (2010). Identification and analysis of 2-chloro-6-methylphenol, 2,6-

- dichlorophenol and indole: Causes of taints and off-flavours in wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 16(1), 210–217. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2009.00065.x>
- Casey, G. P., & Ingledew, W. M. M. (1986). Ethanol tolerance in yeasts. *Critical Reviews in Microbiology*, 13(3), 219–280. <https://doi.org/10.3109/10408418609108739>
- Chidi, B. S., Bauer, F. F., & Rossouw, D. (2018). Organic Acid Metabolism and the Impact of Fermentation Practices on Wine Acidity: A Review. *J. Enol. Vitic*, 39(2). <https://doi.org/10.21548/39-2-3164>
- Cohen, G., Sela, D. A., & Nolden, A. A. (2023). Sucrose Concentration and Fermentation Temperature Impact the Sensory Characteristics and Liking of Kombucha. *Foods*, 12(16). <https://doi.org/10.3390/foods12163116>
- Comitini, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., & Ciani, M. (2011). Selected non-Saccharomyces wine yeasts in controlled multistarter fermentations with Saccharomyces cerevisiae. *Food Microbiology*, 28(5), 873–882. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.12.001>
- Dakin, J. C., & Day, P. M. (1958). Yeasts causing spoilage in acetic acid preserves. *Journal of Applied Bacteriology*, 21(1), 94–96. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1958.tb00120.x>
- Dang, T. D. T., Mertens, L., Vermeulen, A., Geeraerd, A. H., Van Impe, J. F., Debevere, J., & Devlieghere, F. (2010). Modelling the growth/no growth boundary of Zygosaccharomyces bailii in acidic conditions: A contribution to the alternative method to preserve foods without using chemical preservatives. *International Journal of Food Microbiology*, 137(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.10.020>
- Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Comitini, F., Gobbi, M., Mannazzu, I., & Ciani, M. (2011). Outlining a future for non-Saccharomyces yeasts: Selection of putative spoilage wine strains to be used in association with Saccharomyces cerevisiae for grape juice fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 147(3), 170–180. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.03.020>
- Doolittle W. F., (1999). Lateral Genomics. Elsevier. PII: S0168-9525(99)01877-6 [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(99\)01877-6](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(99)01877-6)
- Drosou, F. (2022). Μελέτη της αλκοολικής ζύμωσης με χρήση ζυμών non-Saccharomyces.
- Duan, L. L., Shi, Y., Jiang, R., Yang, Q., Wang, Y. Q., Liu, P. T., Duan, C. Q., & Yan, G. L. (2015). Effects of Adding Unsaturated Fatty Acids on Fatty Acid Composition of Saccharomyces cerevisiae and Major Volatile Compounds in Wine. In *Afr. J. Enol. Vitic* (Vol. 36, Issue 2).
- Ehrlich, F. (1907). Über die Bedingungen der Fuselölbildung und über ihren Zusammenhang mit dem Eiweißaufbau der Hefe. *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 40(1), 1027–1047. <https://doi.org/10.1002/cber.190704001156>
- Eldarov, M. A., Kishkovskaia, S. A., Tanaschuk, T. N., & Mardanov, A. V. (2016). Genomics and biochemistry of Saccharomyces cerevisiae wine yeast strains. In *Biochemistry (Moscow)* (Vol. 81, Issue 13, pp. 1650–1668). Maik Nauka Publishing / Springer SBM. <https://doi.org/10.1134/S0006297916130046>
- Engan, S. (1974). Organoleptic threshold values of some organic acids in beer. *Journal of the Institute of Brewing*, 80(2), 162–163. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1974.tb03598.x>
- Erickson, J. P., & McKenna Denise N. (1999). Zygosaccharomyces. In *Encyclopedia of Food Microbiology* (pp. 2359–2365).
- Fugelsang, K. C., & Edwards, C. C. (1997). *Wine Microbiology*.
- Garavaglia, J., Schneider, R. de C. de S., Camargo Mendes, S. D., Welke, J. E., Zini, C. A., Caramão, E. B., & Valente, P. (2015). Evaluation of Zygosaccharomyces bailii BCV 08 as a co-starter in wine fermentation for the improvement of ethyl esters production. *Microbiological Research*, 173, 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.02.002>
- Goffeau, A., Barrell, G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E. J., Mewes, H. W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., & Oliver, S. G. (1996). Life with 6000 genes. *Science*, 274(5287), 546–567. <https://doi.org/10.1126/science.274.5287.546>

- Hall, C., Brachat, S., & Dietrich, F. S. (2005). Contribution of horizontal gene transfer to the evolution of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, 4(6), 1102–1115. <https://doi.org/10.1128/EC.4.6.1102-1115.2005>
- He, Y., Dong, J., Yin, H., Zhao, Y., Chen, R., Wan, X., Chen, P., Hou, X., Liu, J., & Chen, L. (2014). Wort composition and its impact on the flavour-active higher alcohol and ester formation of beer - A review. In *Journal of the Institute of Brewing* (Vol. 120, Issue 3, pp. 157–163). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/jib.145>
- Heard, G. M., & Fleet, G. H. (1988). The effects of temperature and pH on the growth of yeast species during the fermentation of grape juice. *Journal of Applied Bacteriology*, 65(1), 23–28. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1988.tb04312.x>
- Jesús Torija, M., Rozè, N., Poblet, M., Guillamón, J. M., & Mas, A. (2002). Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. [www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro](http://www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro)
- Jolly, N. P., Augustyn, O. P. H., & Pretorius, I. S. (2006). The Role and Use of Non-Saccharomyces Yeasts in Wine Production. In *J. Enol. Vitic* (Vol. 27, Issue 1).
- Kalathenos, P., Sutherland, J. P., & Roberts, T. A. (2008). Resistance of some wine spoilage yeasts to combinations of ethanol and acids present in wine. *Journal of Applied Microbiology*, 245–250.
- Kuanyshev, N., Adamo, G. M., Porro, D., & Branduardi, P. (2017). The spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii*: Foe or friend? *Yeast*, 34(9), 359–370. <https://doi.org/10.1002/yea.3238>
- Leandro, M. J., Sychrová, H., Prista, C., & Loureiro-Dias, M. C. (2011). The osmotolerant fructophilic yeast *Zygosaccharomyces rouxii* employs two plasma-membrane fructose uptake systems belonging to a new family of yeast sugar transporters. *Microbiology*, 157(2), 601–608. <https://doi.org/10.1099/mic.0.044446-0>
- Lewis, M. J., & Bamforth, C. W. (2007). *Essays in Brewing Science*. Springer.
- Leyva, J. S., Manrique, M., Prats, L., Loureiro-Dias, M. C., & Peinado, J. M. (1999). *Regulation of fermentative CO<sub>2</sub> production by the food spoilage yeast Zygosaccharomyces bailii*.
- Li, H., & Liu, F. (2015). The chemistry of sour taste and the strategy to reduce the sour taste of beer. *Food Chemistry*, 185, 200–204. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.135>
- Loira, I., Vejarano, R., Bañuelos, M. A., Morata, A., Tesfaye, W., Uthurry, C., Villa, A., Cintora, I., & Suárez-Lepe, J. A. (2014). Influence of sequential fermentation with *Torulaspota delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* on wine quality. *LWT*, 59(2P1), 915–922. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.06.019>
- Martorell, P., Stratford, M., Steels, H., Fernández-Espinar, M. T., & Querol, A. (2007). Physiological characterization of spoilage strains of *Zygosaccharomyces bailii* and *Zygosaccharomyces rouxii* isolated from high sugar environments. *International Journal of Food Microbiology*, 114(2), 234–242. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.09.014>
- Mato, I., Suárez-Luque, S., & Huidobro, J. F. (2007). Simple determination of main organic acids in grape juice and wine by using capillary zone electrophoresis with direct UV detection. *Food Chemistry*, 102(1), 104–112. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.002>
- 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. In *Journal of the Institute of Brewing* (Vol. 122, Issue 4, pp. 569–587). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/jib.381>
- Pina, C., Gonçalves, P., Prista, C., & Loureiro-Dias, M. C. (2004). Ffz1, a new transporter specific for fructose from *Zygosaccharomyces bailii*. *Microbiology*, 150(7), 2429–2433. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26979-0>
- Piper, P., Calderon, C. O., Hatzixanthis, K., & Mollapour, M. (2001). Weak acid adaptation : the stress response that confers yeasts with resistance to organic acid food preservatives. In *Microbiology* (Vol. 147).

- Plata, C., Mill, C., Mauricio, J. C., & Ortega, J. M. (2003). FOOD MICROBIOLOGY [www.elsevier.nl/locate/jnlabr/yfmic](http://www.elsevier.nl/locate/jnlabr/yfmic) Formation of ethyl acetate and isoamyl acetate by various species of wine yeasts. In *Food Microbiology* (Vol. 20). [www.elsevier.nl/locate/jnlabr/yfmic](http://www.elsevier.nl/locate/jnlabr/yfmic)
- Postigo, V., O'Sullivan, T., Elink Schuurman, T., & Arroyo, T. (2022). Non-Conventional Yeast: Behavior under Pure Culture, Sequential and Aeration Conditions in Beer Fermentation. *Foods*, *11*(22). <https://doi.org/10.3390/foods11223717>
- Quirós, M., Martínez-Moreno, R., Albiol, J., Morales, P., Vázquez-Lima, F., Barreiro-Vázquez, A., Ferrer, P., & Gonzalez, R. (2013). Metabolic Flux Analysis during the Exponential Growth Phase of *Saccharomyces cerevisiae* in Wine Fermentations. *PLoS ONE*, *8*(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071909>
- Russell, I. (2006). *Handbook of Brewing* (G. G. Stewart & F. G. Priest, Eds.; 2nd ed.). Taylor & Francis Group.
- Saerens, S. M. G., Delvaux, F., Verstrepen, K. J., Van Dijck, P., Thevelein, J. M., & Delvaux, F. R. (2008). Parameters affecting ethyl ester production by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, *74*(2), 454–461. <https://doi.org/10.1128/AEM.01616-07>
- Santos, J., Sousa, M. J., Cardoso, H., Inácio, J., Silva, S., Spencer-Martins, I., & Leão, C. (2008). Ethanol tolerance of sugar transport, and the rectification of stuck wine fermentations. *Microbiology*, *154*(2), 422–430. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/011445-0>
- 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>
- Soufleros, E., & Bertrand, A. (1979). Role de la “Souche Levure” dans la production des substances volatiles au cours de la fermentation du jus de raisin. (Vol. 13, Issue 3).
- Stratford, M., Steels, H., Nebe-von-Caron, G., Avery, S. V., Novodvorska, M., & Archer, D. B. (2014). Population heterogeneity and dynamics in starter culture and lag phase adaptation of the spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii* to weak acid preservatives. *International Journal of Food Microbiology*, *181*, 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.017>
- Styger, G., Prior, B., & Bauer, F. F. (2011). Wine flavor and aroma. In *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* (Vol. 38, Issue 9, pp. 1145–1159). <https://doi.org/10.1007/s10295-011-1018-4>
- Sütterlin, K. A. (2010). *Fructophilic yeasts to cure stuck fermentations in alcoholic beverages*.
- Swiegers, J. H., Bartowsky, E. J., Henschke, P. A., & Pretorius, I. S. (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *11*(2), 139–173. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00285.x>
- Tataridis, P., Kanelis, A., Logotetis, S., & Nerancis, E. (2013). Use of non-saccharomyces *Torulaspora delbrueckii* yeast strains in winemaking and brewing. *Zbornik Matice Srpske Za Prirodne Nauke*, *124*, 415–426. <https://doi.org/10.2298/zmspn1324415t>
- Thomas, D. S., & Davenport, R. R. (1985). *Zygosaccharomyces bailii*-a profile of characteristics and spoilage activities. In *Food Microbiology* (Vol. 2).
- Valli, M., Sauer, M., Branduardi, P., Borth, N., Porro, D., & Mattanovich, D. (2005). Intracellular pH distribution in *Saccharomyces cerevisiae* cell populations, analyzed by flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(3), 1515–1521. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.3.1515-1521.2005>
- Vanbeneden, N., Van Roey, T., Willems, F., Delvaux, F., & Delvaux, F. R. (2008). Release of phenolic flavour 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>
- Varela C. (2016). The impact of non-Saccharomyces yeasts in the production of alcoholic beverages. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *100*, 9861–9874.
- Verstrepen, K. J., Derdelinckx, G., Dufour, J.-P., Winderickx, J., Thevelein, J. M., Pretorius, I. S., & Delvaux, F. R. (2003). *Flavor-Active Esters: Adding Fruitiness to Beer* (Vol. 96, Issue 2).



- Willaert, R. (2012). Biochemistry of Beer Fermentation. In *Food Biochemistry and Food Processing: Second Edition* (pp. 627–653). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9781118308035.ch33>
- Zhang, Y., Jia, S., & Zhang, W. (2012). Predicting acetic acid content in the final beer using neural networks and support vector machine. *Journal of the Institute of Brewing*, 118(4), 361–367. <https://doi.org/10.1002/jib.50>
- Zuehlke, J. M., Childs, B. C., & Edwards, C. G. (2015). Evaluation of *Zygosaccharomyces bailii* to metabolize residual sugar present in partially-fermented red wines. *Fermentation*, 1(1). <https://doi.org/10.3390/fermentation1010003>
- Νεραντζής, Η., Τ. Π. , Λ. Σ. (2016). *Βιοτεχνολογία και Βιομηχανικές Ζυμώσεις*. ΕΜΒΡΥΟ.
- Νεραντζής, Η., Ταταρίδης, Π., Λιούνη, Μ., & Βαρέλας, Β. (2015). *Μικροβιολογία Οίνου*. ΕΜΒΡΥΟ.
- Τσακίρης, Α. (2007). *Οινολογία*. Ψύχαλος.
- Φασσέας, Κ. (2006). *Πανεπιστημιακές Παραδόσεις για το μάθημα “Βιολογία Κυττάρου.”*