



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
Τμήμα Επιστημών Οίνου,
Αμπέλου & Ποτών

Επίδραση του *Zygosaccharomyces Bailii* σε συνθετικά υποστρώματα

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΔΕΜΙΡΤΖΗΣ ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ- ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ
ΚΑΡΑΪ ΙΩΑΝΝΑ

Επιβλέπουσα: ΔΡΟΣΟΥ ΦΩΤΕΙΝΗ

ΑΘΗΝΑ 2024



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
Τμήμα Επιστημών Οίνου,
Αμπέλου & Ποτών

Effect of *Zygosaccharomyces bailii* in synthetic substrates

BACHELOR THESIS

DEMIRTZIS EMMANOUIL-PANAGIOTIS
KARAJ JOANA

Supervisor: DROSOU FOTEINI

ATHENS 2024

Τριμελής επιτροπή:

ΔΡΟΣΟΥ ΦΩΤΕΙΝΗ, ακαδημαϊκός υπότροφος σχολής Οίνου, Αμπέλου και Ποτών,
ΠΑ.Δ.Α

Ψηφιακή υπογραφή

ΧΑΤΖΗΛΑΖΑΡΟΥ ΑΡΧΟΝΤΟΥΛΑ ,καθηγήτρια σχολής Οίνου, Αμπέλου και Ποτών,
ΠΑ.Δ.Α

Ψηφιακή υπογραφή

ΝΤΟΥΡΤΟΓΛΟΥ ΕΥΘΑΛΙΑ, αναπληρώτρια καθηγήτρια σχολής Οίνου, Αμπέλου και
Ποτών, ΠΑ.Δ.Α

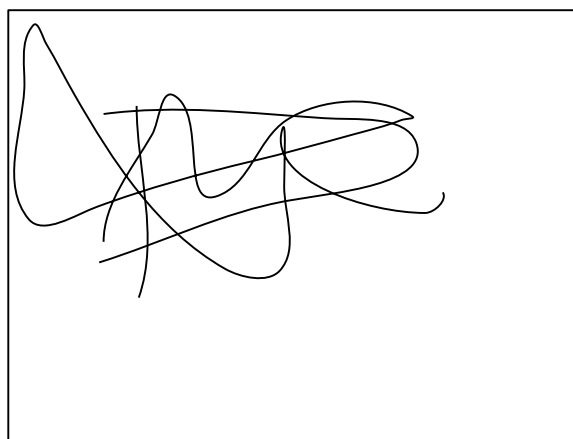
Ψηφιακή υπογραφή

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

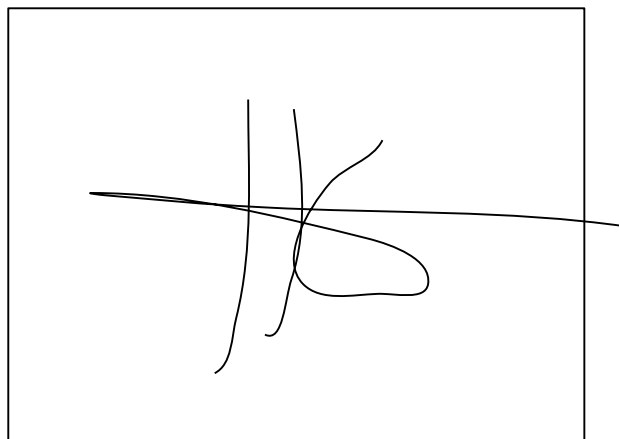
Οι κάτωθι υπογράφωντες ΔΕΜΙΡΤΖΗΣ ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ με αριθμό μητρώου 19685027 και ΚΑΡΑΙ ΙΩΑΝΝΑ με αριθμό μητρώου 19685045 φοιτητές του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, της σχολής Επιστημών Τροφίμων του τμήματος Επιστημών Οίνου, Αμπέλου και Ποτών δηλώνουμε υπεύθυνα ότι:

“Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βήμα που 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 εμένα 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”.

Δεμιρτζής Εμμανουήλ-Παναγιώτης

A square box containing a handwritten signature in black ink. The signature is highly stylized and cursive, with several loops and overlapping lines.

Καράι Ιωάννα

A square box containing a handwritten signature in black ink. The signature is more linear and less cursive than the one above, featuring a prominent horizontal line and a few vertical strokes.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ξεκινώντας, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε από καρδιάς την κυρία Δρόσου Φωτεινή για την ευκαιρία που μας έδωσε να εξελιχθούμε, την εμπιστοσύνη που μας έδειξε, καθώς και την άψογη συνεργασία που μας παρείχε. Θα θέλαμε να τονίσουμε την υποστήριξη που μας έδωσε και την καθοδήγηση που μας παρείχε κατά την διάρκεια της διπλωματικής μας εργασίας. Ευχαριστούμε επίσης, τον κύριο Ταταρίδη Παναγιώτη, επίκουρο καθηγητή του τμήματος, για την συνεργασία και την παροχή εργαστηριακού εξοπλισμού αλλά και την άμεση διάθεση του στις τελικές εργαστηριακές μελέτες μας. Επιπλέον, ευχαριστούμε την κ. Ντουρτόγλου και κ. Χατζηλαζάρου για την συνεχή παροχή αναλωσίμων καθώς και την διάθεση του εργαστηριακού χώρου ώστε να πραγματοποιηθούν οι αναλύσεις που είχαμε προγραμματίσει. Ευχαριστούμε την υποψήφια διδάκτορα Τζαμουράνη Αικατερίνη, για την συνεργασία και την προετοιμασία των ζυμών που σκοπεύαμε να εμβολιάσουμε. Ιδιαίτερη μνεία ε όλα τα κοντινά πρόσωπα μας, συγγενείς και φίλους για την συνεχή στήριξη και συμπαράσταση που χρειαζόμασταν ώστε να έρθει εις πέρας αυτή η δύσκολη εργασία. Τέλος, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε ο ένας τον άλλο, για την ομαδικότητα και την στήριξη καθ'όλη τη διάρκεια των πειραμάτων.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εδώ και πολλές δεκαετίες, ο συμβατικός σακχαρομύκητας, *Saccharomyces cerevisiae*, αποτελεί τον κατεξοχήν οργανισμό που επιτελεί την αλκοολική ζύμωση. Ωστόσο, λόγω της αύξησης της χρήσης των non-*Saccharomyces* ζυμών, γνωστές για τα αρωματικά χαρακτηριστικά που προσδίδουν στα τελικά προϊόντα, στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η εξέταση της ζυμωτικής ικανότητας ενός άλλου ζυμομύκητα, του *Zygosaccharomyces bailii*, ο οποίος απαντάται φυσικά στον οίνο και συνδέεται συχνά με αλλοιώσεις.

Γι' αυτό το σκοπό, οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε συνθετικά υποστρώματα με διαφορετική πηγή σακχάρων σαν υπόστρωμα. Πιο συγκεκριμένα, παρήχθησαν υποστρώματα με κύριο σάκχαρο τη μαλτόζη και τη γλυκόζη καθώς κι ένα τρίτο μείγμα σακχάρων, το οποίο περιείχε 86% μαλτόζη, 9% γλυκόζη και 5% φρουκτόζη. Οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες, στους 20 °C και στους 15 °C, με σκοπό να διαπιστωθεί σε ποια από τις δύο θερμοκρασίες η ζύμη δίνει τα βέλτιστα αποτελέσματα. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε η κινητική της ζύμωσης, καθώς και τα παραγόμενα μεταβολικά προϊόντα στις δύο θερμοκρασίες.

Μέσω των αποτελεσμάτων παρατηρήθηκε, πως το εξεταζόμενο στέλεχος είναι ικανό να ζυμώσει τα βασικά σάκχαρα. Τα μεγέθη της αιθανόλης, του pH, της οξύτητας και της κατανάλωσης σακχάρων, δεν παρουσίασαν μεγάλες αποκλίσεις σε σχέση με αυτά της βιβλιογραφίας, ενώ παράλληλα εμφάνισαν παρόμοιες τιμές μεταξύ των στελεχών.

Η μέτρηση του ελεύθερου αζώτου αμινοξέων (FAN) οδήγησε στο συμπέρασμα πως ο *Zygosaccharomyces bailii* έχει παρόμοιες ανάγκες σε άζωτο με τον συμβατικό σακχαρομύκητα, ενώ η ανάλυση των πτητικών έδειξε μεγάλη ποικιλία σε αρωματικές ενώσεις, με την χαμηλή θερμοκρασία να παρουσιάζει τις υψηλότερες συγκεντρώσεις.

Ο συνδυασμός των αποτελεσμάτων αποδεικνύει πως ο *Zygosaccharomyces bailii* έδωσε αρκετά ικανοποιητικά αποτελέσματα και κρίνεται ικανός να ζυμώσει και τα τρία διαφορετικά υποστρώματα. Έτσι, παρότι είναι μια non-*Saccharomyces* ζύμη, γνωστή για τις αλλοιώσεις που προκαλεί, το εν λόγω στέλεχος θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε μελλοντικές ζυμώσεις, προσδίδοντας διαφορετικά χαρακτηριστικά από αυτά του *Saccharomyces cerevisiae*.

Λέξεις κλειδιά: *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, ζυμώσεις, γλυκόζη, μαλτόζη, αειφορία

Abstract

For many decades, the conventional *Saccharomyces cerevisiae* has been the predominant yeast organism that carries out alcoholic fermentation. However, due to the increasing use of non-*Saccharomyces* yeasts, which are known for the aromatic complexity they impart to the final products, this thesis aims to examine the fermentative capacity of another yeast, *Zygosaccharomyces bailii*. This yeast is naturally occurring in wine and is often associated with spoilage.

For this purpose, analyses were carried out on synthetic substrates with different sources of sugars. Specifically, substrates with maltose and glucose as the main sugars, as well as a third sugar mixture containing 86% maltose, 9% glucose, and 5% fructose, were produced. The fermentations were conducted at two different temperatures, 20°C and 15°C, to determine which temperature yields the best results for the yeast. The study focused on fermentation kinetics and the metabolic products produced at these temperatures.

The results showed that the examined strain is capable of fermenting the basic sugars. The values of ethanol, pH, acidity, and sugar consumption were similar to those found in the literature for *Saccharomyces cerevisiae*, indicating only minor deviations between the strains regardless of the sugar source. The measurement of free amino acid nitrogen (FAN) led to the conclusion that *Zygosaccharomyces bailii* has similar nitrogen requirements to conventional *Saccharomyces cerevisiae*. Additionally, the GC-MS volatile analysis revealed a wide range of aromatic compounds, with higher concentrations observed at the lower temperature.

Overall, the results demonstrate that *Zygosaccharomyces bailii* produced satisfactory results and appears to be capable of fermenting all three different substrates. Although it is known as a spoilage yeast, this strain could be used in future fermentations, offering different characteristics compared to *Saccharomyces cerevisiae*.

Περιεχόμενα

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	3
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ABSTRACT	6
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	7
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	10
Κεφάλαιο 1: Βιοτεχνολογία και ζυμώσεις	10
1.1 Εισαγωγή	10
1.2 Εφαρμογές	12
1.3 Παράγοντες που επηρεάζουν τη ζύμωση	14
Κεφάλαιο 2: Ζύμες	16
2.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16
2.1.1 Εφαρμογές του <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
2.2 Non- <i>Saccharomyces</i>	19
2.3 <i>Zygosaccharomyces bailii</i>	20
2.3.1 Προέλευση και χαρακτηριστικά	21
2.3.2 Ζυμωτικά χαρακτηριστικά	22
Κεφάλαιο 3: Αειφόρος ανάπτυξη στην παραγωγική διαδικασία	24
3.1 Εισαγωγή	25
3.2 Μέτρα για την μείωση του περιβαλλοντικού αποτυπώματος	26
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	28
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 : ΣΚΟΠΟΣ-ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	29
4.1. Σκοπός σχεδιασμός πειραμάτων	29
4.2. Στελέχη Ζυμομυκήτων	29
4.3. Υλικά	29
4.4. Πειραματική διαδικασία	30
4.4.1. Προετοιμασία των συνθετικών υποστρωμάτων	30
4.4.2. Εμβολιασμός υποστρωμάτων	31
4.5. Αναλυτικές μέθοδοι	32
4.5.1. Μέτρηση πληθυσμού και βιωσιμότητας	32
4.5.2. Μέτρηση σακχάρων.....	32
4.5.2.1. Μέτρηση σακχάρων με την μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS)	32
4.5.3. Μέτρηση διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου (FAN)	33
4.5.4 Μέτρηση pH.....	35
4.5.5. Διαδικασία εκχύλισης με στήλη Vigreux.....	35

4.5.6 Μέτρηση οξύτητας με πιπλοδότηση.....	36
4.5.7 Μέτρηση αιθανόλης με Alex 500.....	36
4.5.8 Στατιστική ανάλυση.....	37
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 : ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	37
5.1 Κυτταρική ανάπτυξη.....	38
5.2 Κατανάλωση σακχάρων.....	40
5.3 pH	41
5.4 Ογκομετρούμενη Οξύτητα.....	42
5.5 Παραγωγή αιθανόλης.....	43
5.6 Μέτρηση διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου (FAN).....	44
5.7 Παραγωγή πτητικών ενώσεων.....	46
5.7.1 Ανώτερες αλκοόλες	47
5.7.2 Οξικοί εστέρες.....	49
5.7.3 Λιπαρά οξέα μεσαίας αλυσίδας (MCFA) και οι εστέρες τους	51
5.7.3.1 Λιπαρά οξέα μεσαίας αλυσίδας (MCFA).....	51
5.7.3.2 Οι εστέρες των λιπαρών οξέων	53
5.7.4 Λοιπές αρωματικές ενώσεις.....	55
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΕΠΙΛΟΓΟΣ	56
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	58

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1: Η κυτταρική ανάπτυξη του <i>Zygosaccharomyces Bailii</i> σε σχέση με τον <i>Saccharomyces cerevisiae</i> στους 20°C και στους 15°C σε αρχικό πληθυσμό εμβολιασμού 1x10 ⁶ κύτταρα/mL.....	38
Διάγραμμα 2: Η κυτταρική ανάπτυξη του <i>Zygosaccharomyces Bailii</i> σε σχέση με τον <i>Saccharomyces cerevisiae</i> στους 20°C και στους 15°C σε αρχικό πληθυσμό εμβολιασμού 6x10 ⁶ κύτταρα/mL.....	39
Διάγραμμα 3: Η κατανάλωση της γλυκόζης στην πορεία της ζύμωσης του <i>Zygosaccharomyces Bailii</i> σε σχέση με τον <i>Saccharomyces cerevisiae</i> σε θερμοκρασία 15°C και 20°C.....	41
Διάγραμμα 4: Η κατανάλωση του διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου (FAN) σε ζυμώσεις με τα στελέχη <i>Saccharomyces cerevisiae</i> και <i>Zygosaccharomyces Bailii</i> και σε συνθήκες θερμοκρασίας 20°C.....	45
Διάγραμμα 5: Η κατανάλωση του διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου (FAN) σε ζυμώσεις με τα στελέχη <i>Saccharomyces cerevisiae</i> και <i>Zygosaccharomyces Bailii</i> και σε συνθήκες θερμοκρασίας 15°C.....	46
Διάγραμμα 6: Η συγκέντρωση των ανώτερων αλκοολών(mg/L) στην ζύμωση με το εκάστοτε σάκχαρο και στις δυο θερμοκρασίες στις ζυμώσεις με τα στελέχη <i>Saccharomyces cerevisiae</i> και <i>Zygosaccharomyces Bailii</i>	48

Διάγραμμα 7: Η συγκέντρωση του οξικού φαινυλαιθυλεστέρα στην ζύμωση με το εκάστοτε σάκχαρο και στις δυο θερμοκρασίες στις ζυμώσεις με τα στελέχη <i>Saccharomyces cerevisiae</i> και <i>Zygosaccharomyces Bailii</i>	50
Διάγραμμα 8: Οι συγκεντρώσεις των MCFA στην ζύμωση με το εκάστοτε σάκχαρο και στις δυο θερμοκρασίες στις ζυμώσεις με τα στελέχη <i>Saccharomyces cerevisiae</i> και <i>Zygosaccharomyces Bailii</i>	52
Διάγραμμα 9: Οι συγκεντρώσεις των εστέρων των MCFA στην ζύμωση με το εκάστοτε σάκχαρο και στις δυο θερμοκρασίες στις ζυμώσεις με τα στελέχη <i>Saccharomyces cerevisiae</i> και <i>Zygosaccharomyces Bailii</i>	54

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Οι τελικές τιμές pH στις ζυμώσεις των δύο στελεχών σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και θερμοκρασίες.	42
Πίνακας 2: Τελικά αποτελέσματα ογκομετρούμενης οξύτητας του <i>Z.bailii</i> σε διαφορετικές θερμοκρασίες	42
Πίνακας 3: Τελικές τιμές παραγόμενης αιθανόλης των δυο στελεχων σε διαφορετικές θερμοκρασίες και ταξινομημένες ανά σάκχαρο ζύμωσης.....	43
Πίνακας 4: Οι συγκεντρώσεις άλλων σημαντικών πτητικών ενώσεων σε ζυμώσεις με τα στελέχη <i>Saccharomyces cerevisiae</i> και <i>Zygosaccharomyces Bailii</i> και σε θερμοκρασίες 20°C και 15°C.....	55

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1: Βιοτεχνολογία και ζυμώσεις

1.1 Εισαγωγή

Η σύγχρονη βιολογία είναι η πιο διεπιστημονική από όλες τις επιστήμες, περικλείοντας μια συντριπτική ποικιλία επιμέρους κλάδων, όπως η μικροβιολογία, η ανατομία φυτών και ζώων, η βιοχημεία, η ανοσολογία, η κυτταρική βιολογία, η μοριακή βιολογία, η φυσιολογία φυτών και ζώων, η μορφογένεση, η οικολογία, η γενετική και πολλούς άλλους. Μετά τον Δεύτερο Παγκόσμιο Πόλεμο η σύγχρονη βιολογία αποκτά περισσότερη ποικιλομορφία, λόγω της εισαγωγής άλλων επιστημονικών κλάδων, όπως η φυσική, η χημεία και τα μαθηματικά. Αυτοί οι κλάδοι κατέστησαν δυνατή την περιγραφή των διαδικασιών της ζωής σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο. Τα τελευταία 20 χρόνια έχουν απονεμηθεί περισσότερα από 20 βραβεία Νόμπελ για ανακαλύψεις που έγιναν σε αυτούς τους τομείς (Smith, 2009).

Η υγεία και η ευημερία της ανθρωπότητας έχουν ήδη επωφεληθεί σε μεγάλο βαθμό από τις πρόσφατα αποκτηθείσες γνώσεις πάνω στην επιστήμη της Βιολογίας. Ωστόσο, λίγοι άνθρωποι γνωρίζουν τον πλήρη αντίκτυπο που έχουν οι βιοεπιστήμες στην υγειονομική περίθαλψη, τα τρόφιμα και την ενέργεια, τη γεωργία και τη δασοκομία, η οποία αντιπροσωπεύει πάνω από το 30% του παγκόσμιου οικονομικού κύκλου εργασιών. Αυτός ο οικονομικός αντίκτυπος θα αυξηθεί μόνο, καθώς η βιοτεχνολογία αναπτύσσει νέες μεθόδους επηρεασμού της επεξεργασίας πρώτων υλών. Είναι πλέον ευρέως αποδεκτό, ότι μέχρι τις αρχές του 21ου αιώνα, η βιοτεχνολογία θα προσθέσει πολλά τρισεκατομμύρια στις παγκόσμιες αγορές και ότι θα έχει ολοένα και μεγαλύτερο αντίκτυπο στην αποτελεσματικότητα όλων των επιστημονικών τομέων, συμπεριλαμβανομένων των βιοεπιστημών (Smith, 2009).

Ο Karl Ereky, ένας Ούγγρος μηχανικός, χρησιμοποίησε για πρώτη φορά τον όρο «βιοτεχνολογία» το 1919, για να περιγράψει την επιστήμη και τις τεχνικές που επιτρέπουν την παραγωγή προϊόντων από πρώτες ύλες με τη βοήθεια έμβιων οργανισμών. Η αξιοποίηση ζωντανών κυττάρων ή/και η αξιοποίηση ενώσεων που λαμβάνονται από αυτά, για εφαρμογές που αποσκοπούν στην ανθρώπινη ευημερία με τη χρήση ποικίλων επιστημονικών οργάνων και τεχνολογιών, αποτελεί το ευρύ πεδίο της βιοτεχνολογίας. Σε αυτή τη κοινοπραξία της βιολογικής επιστήμης και της μηχανικής, χρησιμοποιούνται ζωντανοί ιστοί, κύτταρα ή συστατικά μέρη για την παραγωγή προϊόντων. Η ιατρική βιοτεχνολογία, η γεωργική βιοτεχνολογία, η βιομηχανική βιοτεχνολογία, η θαλάσσια βιοτεχνολογία, η βιοτεχνολογία τροφίμων και

η περιβαλλοντική βιοτεχνολογία είναι τα βασικά υποπεδία αυτού του κλάδου (Gupta et al., 2017).

Μικροοργανισμοί χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή μπύρας, οίνου, γαλακτοκομικών και ειδών αρτοποιίας, πριν από αιώνες. Ωστόσο, ο τομέας αναπτύχθηκε σταδιακά και τώρα περιλαμβάνει τη χρήση ή την τροποποίηση μικροοργανισμών για την παραγωγή ωφέλιμων ενώσεων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη βιομηχανία, τη γεωργία ή για ιατρικούς σκοπούς. Ενώ η σύγχρονη βιοτεχνολογία ασχολείται με την τεχνική που αξιοποιεί βιολογικά μόρια όπως το γενετικό υλικό, τα μονοκλωνικά αντισώματα, τα βιολογικά φάρμακα και άλλα, η συμβατική βιοτεχνολογία ορίζεται ως η προσέγγιση που χρησιμοποιεί μικροοργανισμούς για συγκεκριμένους στόχους, όπως η δημιουργία ειδών αρτοποιίας ή γαλακτοκομικών (Gupta et al., 2017).

Μια μεταβολική διαδικασία που ονομάζεται ζύμωση μετατρέπει τα σάκχαρα σε ένα οξύ ή μία αλκοόλη. Λαμβάνει χώρα με την παρουσία βακτηρίων και μυκήτων (ζυμομύκητες), καθώς και σε μυϊκά κύτταρα απουσία οξυγόνου, όπως στην περίπτωση της ζύμωσης με γαλακτικό οξύ. Ένας ευρύτερος ορισμός της ζύμωσης είναι η μαζική αύξηση μικροοργανισμών σε ένα θρεπτικό μέσο ανάπτυξης, συχνά με σκοπό τη δημιουργία ενός συγκεκριμένου χημικού προϊόντος, όπως ένζυμα, εμβόλια, αντιβιοτικά, τρόφιμα ή πρόσθετα τροφίμων (Stanbury et al., 1995).

Από τη Νεολιθική εποχή, οι άνθρωποι χρησιμοποιούσαν τη ζύμωση για τη δημιουργία τροφίμων και ποτών. Για παράδειγμα, η ζύμωση χρησιμοποιείται για τη συντήρηση τροφίμων με τη δημιουργία γαλακτικού οξέος, το οποίο υπάρχει σε όξινα τρόφιμα όπως τα αγγούρια τουρσί και το γιαούρτι, καθώς και για την παρασκευή αλκοολούχων ποτών όπως ο οίνος και η μπύρα (Stanbury et al., 1995).

Η χρήση ζυμομυκήτων για την παρασκευή τροφίμων και αλκοολούχων ποτών θεωρείται συνήθως ως η πρώτη εφευρετική κίνηση στη βιοτεχνολογία. Οι σύγχρονες βιοτεχνολογικές διεργασίες, διαμορφώθηκαν με βάση τις βιοδιεργασίες των ζυμομυκήτων που αναπτύχθηκαν τον 19ο αιώνα, μετά την ανακάλυψη των μικροβιακών μεταβολικών δραστηριοτήτων. Στις περισσότερες βιομηχανικές βιοπαραγωγές σήμερα, η προσέγγιση αυτή χρησιμοποιείται με την ονομασία τροφοδοτούμενη ζύμωση (fed-batch) για την αποφυγή υπερπλήρωσης του μεταβολισμού (Mattanovich et al., 2014).

Η κύρια μέθοδος του κυττάρου για την παραγωγή ενέργειας υπό την μορφή μορίων ATP είναι η ζύμωση, η οποία λαμβάνει χώρα όταν δεν υπάρχει αρκετό οξυγόνο (και η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων δεν λειτουργεί). Ανάλογα με τον τύπο της ζύμωσης, μετατρέπει το NADH και το πυροσταφυλικό οξύ από το στάδιο της γλυκόλυσης, σε NAD⁺. Το NADH και το πυροσταφυλικό οξύ χρησιμοποιούνται στην αναπνοή για την παραγωγή ATP παρουσία οξυγόνου (O₂). Αυτή η διαδικασία, γνωστή ως οξειδωτική φωσφορυλίωση, παράγει πολύ περισσότερο ATP από ότι η απλή γλυκόλυση. Εξαιτίας αυτού, τα κύτταρα συνήθως επωφελούνται από την αποφυγή της ζύμωσης, διότι η ζύμωση λαμβάνει χώρα κάτω από αναερόβιες συνθήκες. (Stanbury et al., 1995).

Η γλυκόζη ή η σακχαρόζη, που προέρχεται από το ζαχαροκάλαμο και το άμυλο καλαμποκιού, είναι τα παραδοσιακά υποστρώματα άνθρακα για τους ζυμομύκητες. Με

την επιτυχή ανάπτυξη της βιομηχανικής βιοτεχνολογίας και λαμβάνοντας υπόψη τις ανθρώπινες διατροφικές ανάγκες, μια έλλειψη αυτών των παραδοσιακών υποστρωμάτων, θα ωθήσει την έρευνα για τη χρήση υποκατάστατων πηγών άνθρακα. Αυτές μπορεί να προκύψουν από την υδρόλυση της λιγνοκυτταρίνης, για την οποία απαιτούνται ζυμομύκητες που μπορούν να χρησιμοποιήσουν την ξυλόζη και την αραβινόζη. Αυτοί είναι είτε ζυμομύκητες που αφομοιώνουν πεντόζες, όπως π.χ. ο *Pichia stipitis* ή ο *Hansenula polymorpha* ή στελέχη του *S. cerevisiae* με τροποποιημένες οδούς αξιοποίησης πεντόζης (Mattanovich et al., 2014).

1.2 Εφαρμογές

Γύρω στα μέσα του 20ού αιώνα, τα βακτήρια και οι νηματοειδείς μύκητες άρχισαν να κυριαρχούν στην ανάπτυξη των βιολογικών διεργασιών. Έκτοτε, πολυάριθμες νέες χρήσεις των ζυμομυκήτων στη βιοτεχνολογία κατέστησαν δυνατές, λόγω των νέων εξελίξεων στην παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, τη μεταβολική μηχανική, τη συστημική βιολογία και τη συνθετική βιολογία, σε συνδυασμό με τη ζήτηση για πολυάριθμα προϊόντα που μπορούν να παραχθούν αξιοποιώντας τους ζυμομύκητες. Η παραγωγή μεταβολιτών, η δημιουργία ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών και οι *in vivo* βιομετασχηματισμοί, είναι οι τρεις κύριες εφαρμογές των ζυμομυκήτων στη σύγχρονη βιοτεχνολογία (Mattanovich et al., 2014).

Η κύρια χρήση των αναερόβιων ζυμομυκήτων σχετίζεται προφανώς με την ικανότητά τους να μετατρέπουν υδατάνθρακες σε αιθυλική αλκοόλη και διοξείδιο του άνθρακα υπό αναερόβιες συνθήκες. Επιπλέον, παράγονται διάφορες δευτερογενείς ενώσεις, οι οποίες έχουν αντίκτυπο στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά ορισμένων τροφίμων. Παρόλα αυτά, οι μεταβολικές τους ικανότητες, δεν πρέπει να περιορίζονται αποκλειστικά στη ζυμωτική δραστηριότητα. Ο βαθμός διαθεσιμότητας οξυγόνου και το είδος της πηγής άνθρακα είναι οι κύριες μεταβλητές που επηρεάζουν το μεταβολισμό των ζυμομυκήτων. Πολλά στελέχη είναι ικανά να μεταβαίνουν μεταξύ αναερόβιων και αερόβιων συνθηκών και να εκτελούν μεταβολικές διεργασίες και στις δύο αυτές συνθήκες (Otterstedt et al., 2004). Η πορεία των κύριων μεταβολικών μονοπατιών είναι αναμφίβολα σταθερή, αλλά ορισμένα ρυθμιστικά συστήματα ξεχωρίζουν ως ένδειξη εξαιρετικής ευελιξίας του μεταβολισμού (Barnett et al., 2005). Τα γένη *Candida*, *Endomycopsis* και *Kluyveromyces* είναι απαραίτητα για την παρασκευή μονοκυτταρικής πρωτεΐνης (Single-Cell protein, SCP), ενώ ο *Saccharomyces cerevisiae* χρησιμοποιείται ευρύτερα στην βιομηχανία τροφίμων. Σημαντικά στελέχη ζυμομυκήτων επιλέγονται με ακρίβεια, από την τεράστια φυσική βιοποικιλότητα, και στη συνέχεια, οι ιδιότητές τους αξιοποιούνται για τις εκάστοτε βιοτεχνολογικές διεργασίες. Για την δημιουργία βιοτεχνολογικά τροποποιημένων μορίων που σχετίζονται με συγκεκριμένες βιοτεχνολογικές διεργασίες, χρησιμοποιούνται τόσο

παραδοσιακές τεχνικές όσο και σύγχρονες στρατηγικές γονιδιακής επεξεργασίας (Steensels et al., 2014; Hahn-Hägerdal et al., 2005).

Αναφορικά με την παραγωγή μπύρας, υπάρχουν δύο κατηγορίες ζυμών που χρησιμοποιούνται στη ζυθοποιία: οι ζύμες ale και οι ζύμες lager. Αν και το κυτταρικό σχήμα των δύο ειδών είναι πανομοιότυπο, διαφέρουν σε ορισμένα χαρακτηριστικά, που καθορίζουν και τον τύπο του τελικού προϊόντος. Οι μπύρες με διακριτικό φρουτώδες άρωμα παράγονται όταν η ζύμη ale ζυμώνει σε θερμοκρασία δωματίου.

Δεδομένου ότι η θερμοκρασία ζύμωσης είναι χαμηλότερη όταν χρησιμοποιείται ζύμη lager, η διαδικασία αυτή διαρκεί περισσότερο απ' όταν χρησιμοποιούνται στελέχη ale (Berlowska et al., 2014). Σε σύγκριση με τη ζύμη lager, τα στελέχη ale έχουν μεγαλύτερο ποσοστό αερόβιας αναπνοής. Το γένος ζυμομυκήτων *Saccharomyces* περιλαμβάνει τόσο ζύμες ale όσο και ζύμες lager. Η ζύμη lager αναφερόταν κάποτε ως *Saccharomyces carlsbergensis*, αλλά χάρη στη χρήση σύγχρονων ταξινομικών μεθόδων, το είδος *S. carlsbergensis* συμπεριλήφθηκε ως μέρος της ταξινομικής ομάδας του *Saccharomyces pastorianus*. Η γενετική έρευνα οδήγησε στην τρέχουσα ταξινόμηση των στελεχών *S. pastorianus* ως υβρίδια μεταξύ των *S. cerevisiae* και *S. bayanus* (Bond, 2009). Η ικανότητα κροκίδωσης (ή συσσωμάτωσης), η οποία προκαλεί την καθίζηση των ζυμομυκήτων στον πυθμένα του ζυμωτήρα/της δεξαμενής κατά την ολοκλήρωση του σταδίου της ζύμωσης, φάνηκε να είναι ιδιαίτερα σημαντική από τεχνολογική άποψη, εκτός από την υψηλή ζυμωτική δραστηριότητα των ζυμομυκήτων και την ανοχή σε συνθήκες περιβαλλοντικού στρες (Soares, 2010; Verstrepen et al., 2003).

Όσον αφορά στην παραγωγή οίνου, αυτή προκαλείται από τη ζύμωση του γλεύκους, η οποία προκαλείται από μια ποικιλία ειδών ζυμομυκήτων, που αποτελούν την πλειονότητα της φυσικής μικροβιακής χλωρίδας των οικοσυστημάτων των καρπών. Οι ζυμομύκητες που αποικίζουν στο σταφύλι ανήκουν στα γένη *Saccharomyces*, *Brettanomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaromyces*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Torulaspora*, *Schizosaccharomyces* και *Zygosaccharomyces*. Στα πρώιμα και μεσαία στάδια της ζύμωσης κυριαρχούν οι μη συμβατικές ζύμες (non-*Saccharomyces*), ενώ ο *Saccharomyces cerevisiae* ολοκληρώνει τη διαδικασία της ζύμωσης (Pretorius et al., 1999).

1.3 Παράγοντες που επηρεάζουν τη ζύμωση

Οι συνεχείς έλεγχοι κατά τη ζύμωση, είναι απαραίτητοι για την εξασφάλιση της ομαλής διεξαγωγής της. Επιπλέον, απαιτείται συνεχής μέτρηση ή συχνή δειγματοληψία για τον προσδιορισμό των σχετικών παραμέτρων της διεργασίας (YB Study, 2021). Μπορούν να διακριθούν δύο κατηγορίες παραμέτρων που αντικατοπτρίζουν τις αλλαγές στη ζύμωση: Η μία είναι το σύνολο των παραμέτρων που μπορούν να ανιχνευθούν άμεσα από έναν συγκεκριμένο αισθητήρα οργάνου της εκάστοτε μέτρησης. Περιλαμβάνουν τις λεγόμενες άμεσες παραμέτρους, όπως η θερμοκρασία, η πίεση, η ισχύς ανάδευσης, η ταχύτητα της ζύμωσης, το ιζώδες, η θολερότητα, το pH, η συγκέντρωση ιόντων, το διαλυμένο οξυγόνο και άλλα, που αντιπροσωπεύουν αλλαγές στο φυσικό περιβάλλον και στο χημικό περιβάλλον. Η δεύτερη κατηγορία αποτελείται από παράγοντες που είναι ακόμη δύσκολο να καταγραφούν από τους αισθητήρες, όπως η αναπνοή, η κυτταρική ανάπτυξη και η σύνθεση προϊόντων. Αυτές οι παράμετροι πρέπει να προσδιορίζονται με υπολογισμούς από συγκεκριμένα μαθηματικά μοντέλα ή φυσικοχημικές αναλύσεις που βασίζονται σε ορισμένες άμεσα ανιχνευόμενες παραμέτρους. Κατά συνέπεια, οι παράγοντες αυτοί είναι γνωστοί ως έμμεσες παράμετροι. Η θερμοκρασία, το pH και η περιεκτικότητα σε διαλυμένο οξυγόνο έχουν μεγαλύτερο αντίκτυπο στη ζύμωση από τις άλλες προαναφερθείσες μεταβλητές (YB Study, 2021).

Υπάρχουν πολλοί τρόποι με τους οποίους η θερμοκρασία μπορεί να επηρεάσει τους μικροοργανισμούς. Η ενζυμική δραστηριότητα μπορεί να επηρεαστεί από τη θερμοκρασία. Η ανάπτυξη και ο μεταβολισμός των βακτηρίων επιταχύνονται καθώς η θερμοκρασία πλησιάζει στο ιδανικό εύρος θερμοκρασιών, και ο ρυθμός της ταχύτητας της ζύμωσης, επίσης, αυξάνεται. Όταν η θερμοκρασία υπερβαίνει το ιδανικό εύρος, τα ένζυμα αδρανοποιούνται γρήγορα, τα βακτήρια θανατώνονται, η ζύμωση συντομεύεται και η ποσότητα των μικροοργανισμών μειώνεται. του γλεύκους, καθώς και την ικανότητα των βακτηρίων να αφομοιώνουν και να απορροφούν θρεπτικά συστατικά. Ως εκ τούτου, η διατήρηση της ιδανικής θερμοκρασίας είναι απαραίτητη για τη διασφάλιση της ζύμωσης. Ωστόσο, η ιδανική θερμοκρασία που απαιτείται τόσο για την ανάπτυξη των βακτηρίων όσο και για τη σύνθεση των προϊόντων δεν είναι πάντα η ίδια (YB Study, 2021).

Η κατάσταση των κυτταρικών μεμβρανών και η ενζυμική δραστηριότητα επηρεάζονται αμφότερα από το pH. Οι αλλαγές στην κατάσταση της κυτταρικής μεμβράνης θα μεταβάλουν, επίσης, τη διαπερατότητά της, η οποία θα μπορούσε να έχει αντίκτυπο στο πόσο αποτελεσματικά απορροφώνται τα θρεπτικά συστατικά και πόσο εύκολα τα βακτήρια εκκρίνουν μεταβολίτες. Ο τρόπος διάσπασης των θρεπτικών συστατικών στο μέσο επηρεάζεται, επίσης, από το pH. Κατά συνέπεια, το pH του μέσου ζύμωσης πρέπει να ελέγχεται. Το pH μεταβάλλεται αναπόφευκτα κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, καθώς τα βακτήρια χρησιμοποιούν θρεπτικά συστατικά και συσσωρεύουν μεταβολίτες. Στην βιομηχανική παραγωγή, προστίθεται ένα ρυθμιστικό διάλυμα για τη διατήρηση του pH, ή μπορεί να ελεγχθεί με την προσθήκη αμμωνίας, ουρίας,

ανθρακικού αμμωνίου ή ανθρακικού ασβεστίου. Επί του παρόντος, έχουν δημιουργηθεί ηλεκτρόδια pH. Αυτά τα ηλεκτρόδια χρησιμοποιούνται για τη συνεχή μέτρηση και καταγραφή των μεταβολών του pH, ενώ μία πρόσθετη συσκευή μέτρησης του pH ελέγχει την ποσότητα του οξέος και του αλκάλειου που προστίθεται (YB Study, 2021).

Η διαθεσιμότητα του οξυγόνου είναι ένα κρίσιμο στοιχείο στην αερόβια ζύμωση. Όσον αφορά στην ποσότητα οξυγόνου που απαιτείται για την πλήρη οξείδωση και οι αερόβιοι μικροοργανισμοί χρειάζονται πολύ οξυγόνο, αλλά καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας. Και η διαλυτότητα μειώνεται όσο αυξάνεται η θερμοκρασία. Ως αποτέλεσμα, η ζύμωση πρέπει να τροφοδοτείται συνεχώς με σημαντική ποσότητα οξυγόνου σε συνδυασμό με ανάδευση η οποία βοηθάει στην διαλυτοποίηση του οξυγόνου στο μείγμα (YB Study, 2021).

Ένας ακόμη παράγοντας είναι ο αφρισμός που μπορεί να παραχθεί κατά τη διάρκεια της ζύμωσης ως αποτέλεσμα του αερισμού, της ανάδευσης, του μεταβολισμού των μικροοργανισμών, της διάσπασης συγκεκριμένων στοιχείων στο κατά τη διαδικασία αλλά και άλλων χειρισμών. Είναι ζωτικής σημασίας να απομακρύνεται ο αφρός, καθώς καταλαμβάνει χώρο στη δεξαμενή ζύμωσης, παρεμποδίζει τον αερισμό και την ανάδευση, μπορεί να οδηγήσει ακόμη και σε ανομοιόμορφο μεταβολισμό, παρεμποδίζει την ομαλή δειγματοληψία καθώς και την διεξαγωγή τυχόν αναλύσεων στο δείγμα. Τέλος, η συγκέντρωση των διαφόρων θρεπτικών συστατικών στο μέσο ζύμωσης, ιδίως η αναλογία άνθρακα προς άζωτο, τα ανόργανα άλατα και οι βιταμίνες, έχουν άμεσο αντίκτυπο στην ανάπτυξη των βακτηρίων και τη δημιουργία μεταβολιτών.(YB Study, 2021).

Κεφάλαιο 2: Ζύμες

2.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Ο *Saccharomyces cerevisiae* είναι ο πιο διαδεδομένος ζυμομύκητας που χρησιμοποιείται στην ζύμωση. Σε διάφορους τομείς της μοριακής βιολογίας, οι όροι «ζύμη» και «*Saccharomyces*» χρησιμοποιούνται συχνά εναλλακτικά. Η κατανόηση της φύσης των ζυμομυκήτων έχει διευρυνθεί με τη διαπίστωση ότι ορισμένα είδη ανήκουν στην τάξη των βασιδιομυκήτων. Ως αποτέλεσμα, οι ζυμομύκητες θεωρούνται ότι αναπαράγονται αγενώς μέσω της εκβλάστησης ή της σχάσης. Οι ζυμομύκητες ορίζονται ως οι μύκητες των οποίων η αγενής ανάπτυξη προκύπτει κυρίως από εκβλάστηση ή σχάση, και οι οποίοι δεν σχηματίζουν τη σεξουαλική τους κατάσταση μέσα ή πάνω σε καρποφόρο σώμα (Kurtzman et al., 2011).

Οι μοριακές μελέτες για τους ζυμομύκητες που ανήκουν στους ασκομύκητες, έχουν υποστηρίξει αυτή τη διαφοροποίηση, παρουσιάζοντας ότι οι ζυμομύκητες που αναπαράγονται με εκβλάστηση και οι ζυμομύκητες που αναπαράγονται με διχοτόμηση, είναι φυλογενετικά διακριτοί μεταξύ τους, όπως και από τους ασκομύκητες. Εξαιρεση αποτελεί το γένος *Eremascus*, το οποίο έχει ανοικτούς ασκούς αλλά δεν αναπτύσσονται σε εκβλαστημένα κύτταρα. Παρόμοιες διακρίσεις μπορούν να γίνουν για τους ζυμομύκητες που ανήκουν στους βασιδιομύκητες, οι οποίες συχνά διαφέρουν φυλογενετικά από τα *taxa* που αποτελούν σύνθετα καρποφόρα σώματα, όπως τα μανιτάρια. Συμπερασματικά, οι ζυμομύκητες -είτε πρόκειται για ασκομύκητες είτε για βασιδιομύκητες- διακρίνονται συνήθως από την εκβλάστηση ή τη σχάση (διχοτόμηση), ως τις κύριες μεθόδους αγενής αναπαραγωγής (Kurtzman et al., 2011).

Παραδοσιακά, ο όρος «ζύμη» αναφέρεται στον *Saccharomyces cerevisiae* και τα συγγενικά του είδη, τα οποία χρησιμοποιούνται στην αρτοποιία και στην αλκοολική ζύμωση. Ωστόσο, μέχρι σήμερα έχουν αναγνωρισθεί 1.500 είδη ζυμομυκήτων, αν και ο αριθμός αυτός είναι μεταβαλλόμενος λόγω πρόσφατων ανακατατάξεων. Όλοι οι ζυμομύκητες εκτός του *S.cerevisiae*, αναφέρονται συλλογικά από τους βιοτεχνολόγους ως «μη συμβατικοί» ζυμομύκητες. Αυτό που τους συνδέει, είναι ένα χαμηλότερο επίπεδο ζυμωτικού μεταβολισμού και μια σχετικά πρόσφατη ιστορία γενετικού και βιολογικού χαρακτηρισμού. Ο *S. cerevisiae* ευδοκίμει σε περιβάλλοντα με εξαιρετικά υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων και χρησιμοποιεί την πλειονότητά τους για την παραγωγή αιθυλικής αλκοόλης. Τέτοια υποστρώματα δεν υπάρχουν στη φύση, ώστε η πλειονότητα των μη συμβατικών ζυμομυκήτων να είναι σε θέση να προσφέρει εναλλακτικές μεταβολικές οδούς και τη σύνθεση προϊόντων (Mattanovich et al., 2014).

Ο *Saccharomyces cerevisiae* έχει πυρηνικό γονιδιωματικό DNA μεγέθους 12.068 kb το οποίο είναι δομημένο σε 16 χρωμοσώματα. Το γονιδίωμά του έχει αλληλουχηθεί πλήρως και ανακαλύφθηκε ότι περιέχει περίπου 6.000 γονίδια, εκ των οποίων τα

5.570 προβλέπεται ότι κωδικοποιούν πρωτεΐνες (Goffeau et al., 1996; Wood et al., 2001). Τα γονίδια αυτά είναι είτε προκαρυωτικής είτε ευκαρυωτικής προέλευσης (Hall et al., 2005). Το 2005 ανακαλύφθηκαν 10 γονίδια που ενδέχεται να έχουν βακτηριακή προέλευση (Hall et al., 2005). Το γονίδιο *FSY1* είναι ένα κλασικό παράδειγμα ευκαρυωτικού γονιδίου. Ένας μεταφορέας φρουκτόζης, ο οποίος κωδικοποιείται από το γονίδιο *FSY1*, έχει πιθανώς προέλθει από στενό συγγενή του *S. cerevisiae*. Το γονίδιο αυτό είναι σημαντικό, διότι το αποτέλεσμά του πιθανόν να προσδίδει στο στέλεχος ξενιστή (EC1118) αυξημένη ικανότητα μεταβολισμού της φρουκτόζης, παρουσία χαμηλών συγκεντρώσεων εξόζης (δηλαδή προς την τελική φάση της ζύμωσης) (Galeote et al., 2010).

Ο *S. cerevisiae* είναι ένας ζυμομύκητας-μοντέλο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για πολλές μελέτες. Σε αντίθεση, όμως, με άλλους, όπως το *Escherichia coli* ή το *Caenorhabditis elegans*, είναι, επίσης, ένας οργανισμός που χρησιμοποιείται για διάφορους εμπορικούς σκοπούς. Αυτή η ιδιότητα οφείλεται κυρίως σε ένα στοιχείο του τρόπου ζωής του, γνωστό ως «παράγω-συσσωρεύω-καταναλώνω» (Thomson et al., 2005). Αυτό το χαρακτηριστικό βασίζεται στο φαινόμενο Crabtree, το οποίο περιγράφει τον τρόπο με τον οποίο ο *S. cerevisiae* παράγει αιθυλική αλκοόλη και άλλα μόρια δύο άνθρακα μέσω του πυροσταφυλικού οξέος. Ο μεταβολισμός των σακχάρων -και κατ'επέκταση η αύξηση της βιομάζας του- μπορεί να επιτευχθεί ακόμη και υπό αερόβιες συνθήκες. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα ο *S. cerevisiae* να δημιουργεί και να συσσωρεύει αιθυλική αλκοόλη, η οποία είναι τοξική ή μη ευνοϊκή για την ανάπτυξη της πλειονότητας των μικροβιακών ειδών που μπορούν να ανταγωνιστούν τον *S. cerevisiae* για τα μόρια σακχάρου, εξαλείφοντας τον ανταγωνισμό. Αφού ο *S. cerevisiae* εξαλείψει την πλειονότητα των αντιπάλων του, συνεχίζει να καταναλώνει την αιθυλική αλκοόλη που έχει παραχθεί, επιταχύνοντας έτσι τη δική του ανάπτυξη (Pronk et al., 1996).

Τα στελέχη *S. cerevisiae* που βρίσκονται στο φύση, συνήθως δεν αναπτύσσονται σε ιδανικές συνθήκες, σε αντίθεση με εκείνα που αναπτύσσονται σε εργαστηριακές συνθήκες. Ο *S. cerevisiae* βρίσκεται σε αφθονία σε ενδισπρήματα όπως τα φύλλα και οι κορμοί διαφόρων ειδών φυτών. Ακόμη, είναι άφθονος σε μέρη όπως τα οινοποιεία, αν και πρέπει να σημειωθεί ότι δεν εντοπίζεται σε αφθονία ούτε στο αμπέλι ούτε στους φλοιούς των σταφυλιών σε αντίθεση με άλλους μικροοργανισμούς (Mortimer & Polsinelli, 1999). Επιπλέον, ανακαλύφθηκε ότι όταν πρόκειται για σταφύλια που έχουν υποστεί ζημιές στο αμπέλι, η συχνότητα εμφάνισης του *S. cerevisiae* αυξάνεται σε ένα στα τέσσερα. Ο *S. cerevisiae* εντοπίζεται σε διάφορα έντομα, όπως σφήκες και είδη *Drosophila*, τα οποία τρέφονται μεταξύ άλλων με τραυματισμένα σταφύλια (Stefanini et al., 2012; Buser et al., 2014).

2.1.1 Εφαρμογές του *Saccharomyces cerevisiae*

Λόγω της ευρείας χρήσης του στη βιομηχανία τροφίμων και ποτών, Ο *S. cerevisiae* έχει μεγάλη οικονομική σημασία. Ο *S. cerevisiae* χρησιμοποιείται για την παρασκευή πολυάριθμων αλκοολούχων ποτών που έχουν υποστεί ζύμωση καθώς και σε αποστάγματα. Επίσης, χρησιμοποιείται για την παρασκευή αλκοολούχων ποτών από φρούτα, μέλι και τσάι, σε όλο τον κόσμο. Η ύπαρξη DNA από *S. cerevisiae* σε ένα πιθάρι οίνου από την Αίγυπτο, η οποία χρονολογείται από το 3150 π.Χ., χρησιμεύει ως απόδειξη ότι ο οίνος και ο *S. cerevisiae* έχουν μακρά κοινή ιστορία (Cavalieri et al., 2003). Αυτή η σύνδεση, ωστόσο, δεν ανακαλύφθηκε μέχρι το 1860, όταν ο Louis Pasteur παρατήρησε για πρώτη φορά τον άγνωστο έως τότε κόσμο της δραστηριότητας των ζυμομυκήτων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του οίνου. Αργότερα, το 1890, ο Müller-Thurgau πρωτοστάτησε στη μέθοδο των ελεγχόμενων ζυμώσεων του οίνου χρησιμοποιώντας καλλιέργειες εκκίνησης. Τη δεκαετία του 1970 άρχισε η ευρεία χρήση αυτής της πρωτοποριακής τεχνικής, η οποία άλλαξε τα δεδομένα στην οινολογία και βελτίωσε την ποιότητα του οίνου παρέχοντας καλύτερο έλεγχο και, με τη σειρά της, αυξημένη επαναληψιμότητα και αξιοπιστία τόσο των ζυμώσεων όσο και του τελικού προϊόντος (Marsit & Dequin, 2015).

Το πιο διαδεδομένο είδος μαγιάς στην αρτοποιία και το προζύμι είναι ο *S. cerevisiae*, γνωστός και ως «μαγιά αρτοποιού». Από τον 19ο αιώνα, οι ζύμες αρτοποιίας παρασκευάζονται από υποπροϊόντα της παρασκευής ζύθου και χρησιμεύουν σαν καλλιέργεια εκκίνησης. Οι πρώτες ζύμες για τη ζυθοποιία και την αρτοποιία δημιουργήθηκαν στην Αγγλία το 1792 και μέχρι το 1800 ήταν διαθέσιμες στη βόρεια Ευρώπη. Στις Ηνωμένες Πολιτείες, ένα βελτιωμένο στέλεχος ζύμης παρήχθη το 1868, το οποίο επέτρεψε την παρασκευή ψωμιού σε μεγάλη κλίμακα (Heitmann et al., 2018; Carbonetto et al., 2018).

Η δυναμική και ο ρόλος του *S. cerevisiae* φαίνεται και στη ζύμωση του κακάο, τόσο σε πειραματικές έρευνες όπου ο *S. cerevisiae* ήταν η μόνη καλλιέργεια εκκίνησης όσο και σε συγκριτικές μελέτες όπου η παρουσία ή η απουσία του ήταν ο μόνος παράγοντας που χρησιμοποιήθηκε για τη διαφοροποίηση μεταξύ των ομάδων ζύμωσης. Ειδικότερα, έχει παρατηρηθεί ότι η πηκτινολυτικά δραστηριότητα του *S. cerevisiae* βελτίωσε την αποστράγγιση του πολτού έως και 127% σε ζυμώσεις κακάο (Buamah et al., 1997).

Ο *Saccharomyces cerevisiae*, αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή στην εμπορική παραγωγή αιθανόλης μεταξύ των πολυάριθμων ζυμών που παράγουν αιθανόλη μέσω ζύμωσης σακχάρων, με αποτέλεσμα να είναι ουσιαστικά συνώνυμος με την αλκοολική ζύμωση.

Ο *S. cerevisiae* χρησιμοποιεί την αντίδραση γλυκόλυσης για τον καταβολισμό των υδατανθράκων υπό αναερόβιες συνθήκες, φτάνοντας στο στάδιο της παραγωγής

πυρρουμεικού οξέος. Στη συνέχεια, το πυρρουμεικό οξύ υφίσταται μετατροπή του πυρροσταφυλικού αποκαρβουξυλάσης σε ακεταλδεΰδη και διοξειδίο του άνθρακα, το οποίο στη συνέχεια ανάγεται σε αιθανόλη από την αλκοολική αφυδρογόνωση, ενώ ταυτόχρονα απελευθερώνεται NAD⁺. Κατά συνέπεια, οι αντιδράσεις του τελικού σταδίου που καταλήγουν στην αιθανόλη είναι ζωτικής σημασίας και χρησιμεύουν ως θεμέλιο για σημαντικές βιομηχανίες ζύμωσης (Walker, 2004).

2.2 Non-Saccharomyces

Οι ζύμες non-*Saccharomyces* συχνά γνωστές ως μη συμβατικές ζύμες, χρησιμοποιούνται πλέον για μια σειρά βιοτεχνολογικών σκοπών. Όλο και περισσότερες ζύμες non-*Saccharomyces* χρησιμοποιούνται ως ξενιστές για την παραγωγή πρωτεϊνών, βιοκαταλυτών και πολυενζυμικών μονοπατιών για την παρασκευή χημικών ουσιών και μορίων μικρού μοριακού βάρους. Πιο συγκεκριμένα, αποτελούν στελέχη μυκήτων με χαμηλότερη ζυμωτική ικανότητα από τους συμβατικούς μύκητες που χρησιμοποιούνται συχνά στις βιοτεχνολογικές διεργασίες. Οι ζύμες non-*Saccharomyces* χρησιμοποιούνται ως δείκτες βιοελέγχου, και περιβαλλοντικής ποιότητας και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη γεωργία (Johnson, 2013).

Η οινοποίηση με τη συμμετοχή ζυμομυκήτων έχει μελετηθεί διεξοδικά από τότε που ο Γάλλος μικροβιολόγος Louis Pasteur ανακάλυψε τον τρόπο μετατροπής των σταφυλιών σε οίνο (Pretorius, 2000). Οι non-*Saccharomyces* ζύμες που δεν συνδέονται συνήθως με το γλεύκος των σταφυλιών, είναι ένας τομέας που χρειάζεται βελτίωση. Αυτές οι ζύμες έχουν υψηλό μεταβολικό ρυθμό σε όλες τις ζυμώσεις. Στην πραγματικότητα, η τελική ποιότητα του αλκοολούχου ποτού μπορεί να επηρεαστεί σε μεγάλο βαθμό από τους μεταβολίτες αυτών των ζυμών. Αυτές οι ζύμες θεωρήθηκαν αρχικά ως αιτία προβλημάτων στην παραγωγή οίνου. Σήμερα, οι οινοποιοί χρησιμοποιούν τις γηγενείς ζύμες ως θεμελιώδες συστατικό της αυθεντικότητας των οίνων τους και τις προσθέτουν για να προσδώσουν ορισμένες επιθυμητές ιδιότητες (Padilla et al., 2016).

Οι ζύμες non-*Saccharomyces* έχουν βρεθεί σε εξοπλισμό κελαριών καθώς και στον φλοιό των σταφυλιών (Martini, 1993). Τα είδη των μικροοργανισμών που υπάρχουν στον καρπό μεταβάλλουν την οικολογία της ζύμωσης που ακολουθεί, ιδίως στα αρχικά στάδια, παρά το γεγονός ότι βρίσκονται σε ένα περιβάλλον πολύ διαφορετικό από εκείνο του γλεύκους. Σύμφωνα με τον Johnson (2013), απαντώνται στην περιοχή γύρω από τα στόματα του καρπού, τα οποία απελευθερώνουν μικρές ποσότητες εκκρίματος. Κατά τον Pretorius et al. (1999), οι πιο συνηθισμένοι ζυμομύκητες είναι οι *Kloeckera* και *Hanseniaspora*, οι οποίοι συχνά αποτελούν περισσότερο από το 50% των ζυμομυκήτων στους ώριμους καρπούς. Άλλα γένη που έχουν ανακαλυφθεί σε καρπούς περιλαμβάνουν τα *Zygosaccharomyces*, *Pichia*, *Candida*, *Wickerhamomyces*, *Metschnikowia* και *Torulasporea* (Kurtzman, 2012). Υπάρχει μια ποικιλία άλλων ζυμομυκήτων, ορισμένοι από τους οποίους, συμπεριλαμβανομένων των *Kluveromyces*, *Sporidiobolus* και *Hansenula*, επηρεάζουν τις οργανοληπτικές

ιδιότητες των ποτών. Αυτοί οι ζυμομύκητες βρίσκονται σε αφθονία στο γλεύκος των σταφυλιών πριν τον εμβολιασμό με τον *S. cerevisiae* (Jolly et al., 2003).

Επιλεγμένα στελέχη *S. cerevisiae* χρησιμοποιήθηκαν για πολλά χρόνια για να μειωθεί και τελικά να εξαλειφθεί ο ρόλος των ζυμομυκήτων χαμηλής ζυμωτικής ικανότητας στα αλκοολούχα ποτά, καθώς οι non-*Saccharomyces* θεωρήθηκαν ως ζυμομύκητες που δημιουργούσαν αλλοίωση (Andorrà et al., 2010). Αυτή όμως η άποψη άλλαξε, όταν χρησιμοποιήθηκαν σε ζυμώσεις με *S. cerevisiae*, και διαπιστώθηκε ότι αρκετές από τις χημικές ουσίες που παράγονται από αυτές τις ζύμες, είναι επωφελείς και βελτιώνουν την ποιότητα των εν λόγω οίνων (Mateo et al., 1991). Όταν χρησιμοποιούνται καθαρές ζύμες χαμηλής ζυμωτικής ικανότητας σε καλλιέργειες με *S. cerevisiae*, τα αρνητικά χαρακτηριστικά τους είτε καταστέλλονται είτε μπορούν να μεταβληθούν από τον μεταβολισμό των ζυμών *S. cerevisiae* (Ciani & Comitini, 2011). Επομένως, μια συνδυαστική μέθοδος ζύμωσης και με τα δύο είδη ζυμών, κρίνεται ως ιδανική στην οινολογία. Όσον αφορά την ανάπτυξη ορισμένων μεταβολιτών που επηρεάζουν το άρωμα του οίνου, έχουν αναλυθεί ευρέως πολυαριθμα στελέχη που έχουν κατηγοριοποιηθεί γενικά ως είδη που δεν ανήκουν στους *Saccharomyces*. Αρκετές μελέτες που συγκρίνουν την ανάπτυξη και τους μεταβολίτες των ζυμομυκήτων *Saccharomyces* και non-*Saccharomyces* σε διάφορες καλλιέργειες έχουν δείξει πώς διαφέρουν ως προς την ποιότητα. Τα στελέχη και οι μέθοδοι εμβολιασμού έχουν αντίκτυπο στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου (Sodoudi et al., 2012).

2.3 *Zygosaccharomyces bailii*

Ο Lindner ονόμασε το είδος *Saccharomyces bailii* το 1895. Στα χρόνια που ακολούθησαν, το είδος υπέστη αρκετές αναθεωρήσεις της ονομασίας του πριν εγκριθεί η σημερινή ονοματολογία του ως *Zygosaccharomyces bailii* το 1975 (Thomas & Davenport, 1985).

Ο *Zygosaccharomyces bailii* έχει συνδεθεί με την αλλοίωση πολλών διαφορετικών τροφίμων, όπως είναι η μαγιονέζα, τα τουρσιά, τα συμπυκνώματα φρούτων, τα αναψυκτικά και οι οίνοι. Λόγω της εξαιρετικής αντοχής του στα συντηρητικά, στα υψηλά επίπεδα σακχάρων, στα χαμηλά επίπεδα οξέων και στα σχήματα παστερίωσης, ο ζυμομύκητας αυτός θεωρείται ιδιαίτερα προβληματικός (Thomas & Davenport, 1985).

2.3.1 Προέλευση και χαρακτηριστικά

Ο τομέας των τροφίμων μπορεί να υποστεί μεγάλες οικονομικές απώλειες ως αποτέλεσμα της ανάπτυξης του *Z. bailii* σε όξινα τρόφιμα, όπως τα αναψυκτικά, τους χυμούς φρούτων, τα γαλακτοκομικά προϊόντα και τις σάλτσες (Martorell et al., 2007; Stratford, 2006). Ο *Z. bailii* έχει αποδειχθεί ότι έχει ευνοϊκές επιδράσεις στην οينوποίηση όταν πρόκειται για γλεύκος σταφυλιών (Domizio et al., 2011; Romano et al., 2003), αλλά μπορεί, επίσης, να μολύνει το γλεύκος του οίνου κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Η παρουσία ασθενών οργανικών οξέων, διαφόρων συντηρητικών τροφίμων, χαμηλών τιμών pH, υψηλής οσμωτικής πίεσης, υψηλής συγκέντρωσης αιθανόλης και άλλων καταστάσεων που είναι συχνά επιβλαβείς για την ανάπτυξη των κυττάρων, είναι παράγοντες στους οποίους ο ζυμομύκητας είναι εξαιρετικά ανθεκτικός (Martorell et al., 2007; Stratford et al., 2013). Ανάλογα με το στέλεχος, ο *Z. bailii* μπορεί να δεχτεί ασθενή οργανικά οξέα σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 4,55 έως 9,45 mM για το σορβικό οξύ και μεταξύ 375 και 550 mM για το οξικό οξύ. Οι συγκεντρώσεις αυτές είναι υψηλότερες από αυτές που επιτρέπεται βάσει νόμου να χρησιμοποιούνται ως συντηρητικά (Stratford et al., 2013). Οι Martorell et al. (2007) έδειξαν ότι η ζύμη μπορεί να ευδοκιμήσει σε μέσο που περιέχει έως και 72% γλυκόζη (w/v). Δεδομένου ότι το CO₂ που παράγεται κατά την αλκοολική ζύμωση έχει ενοχοποιηθεί για την έκρηξη των κονσερβοποιημένων και εμφιαλωμένων προϊόντων, η έντονη ωσμωτική ανοχή και η υψηλή ικανότητα ζύμωσης επιδεινώνουν τις συνέπειες της αλλοίωσης (Stratford, 2006). Αν και είναι γενικά αποδεκτό ότι ο *Saccharomyces cerevisiae* είναι πιο ανθεκτικός στην αιθανόλη από τον *Z. bailii*, υπάρχουν περιπτώσεις ανάπτυξης σε συνθήκες που περιέχουν 20% αιθανόλη, γεγονός που δείχνει ότι η ανοχή ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των στελεχών (Kalathenos et al., 1995; Thomas & Davenport, 1985). Στην επιμόλυνση του οίνου, έχει παρατηρηθεί, ότι ο *Z. bailii* είναι ικανός να περιορίζει τις κυτταρικές αντιδράσεις, όπως η παραγωγή ακεταλδεΐδης και τη διαπερατότητα των κυτταρικών τοιχωμάτων/μεμβρανών σε επιβλαβείς ουσίες (Park & Bakalinsky, 2000; Thomas & Davenport, 1985). Συγκεντρώσεις διπτανθρακικού μεθυλίου γύρω στα 200 mg L⁻¹ συνήθως δεν επηρεάζουν σημαντικά την ανάπτυξη του *Z. bailii*, αλλά εάν το μέγεθος του εμβολίου είναι μικρό, τα κύτταρα μπορεί να είναι ευαίσθητα σε συγκέντρωση του συντηρητικού τόσο χαμηλή όσο 25 mg L⁻¹ (Costa et al., 2008; Martorell et al., 2007). Στον τομέα της αμπελουργίας, παρουσιάζεται μεγάλη αύξηση του *Z. Bailii* στο σταφύλι, όταν έχουν επέλθει μολύνσεις και ασθένειες, με χαρακτηριστικό παράδειγμα την τεφρή σήψη ύστερα από προσβολή με τον μύκητα *Botrytis cinerea*. (Davenport et al., 1974).

Τα προϊόντα που αλλοιώνονται από τον *Z. bailii* έχουν συνήθως χαμηλό pH, χαμηλή ενεργότητα νερού, επαρκείς ποσότητες ζυμώσιμων σακχάρων ή/και άλλων αφομοιώσιμων ενώσεων άνθρακα (όπως αλκοόλη, γλυκερόλη και οξικό οξύ), μια πηγή αζώτου και βασικών βιταμινών της ομάδας Β και συντηρητικά όπως οξικό, σορβικό και βενζοϊκό οξύ ή διοξείδιο του θείου. Ο τύπος και ο βαθμός αλλοίωση ποικίλλουν ανάλογα με τη χημική σύσταση του τροφίμου και τις φυσικές συνθήκες που περιβάλλουν τη συσκευασία και την αποθήκευση του προϊόντος. Οι συσκευασίες μπορούν να καταστραφούν από την πίεση των αερίων που μπορεί να παράγει ο *Z. bailii*. Η αλλοιωμένη γεύση, η δημιουργία θολωμάτων, η αλλοίωση του χρώματος και η ενανθράκωση είναι παραδείγματα οργανοληπτικών και αισθητηριακών τροποποιήσεων (Thomas & Davenport, 1985).

Εκτός από την άμεση πρόκληση αλλοίωσης των τροφίμων, μπορεί να αλλάξει την υφή και τη σύσταση των τροφίμων, διευκολύνοντας έτσι την ανάπτυξη άλλων βακτηρίων που προκαλούν κι αυτά αλλοίωση των τροφίμων. Για παράδειγμα, ο *Z. bailii* μπορεί να χρησιμοποιήσει το οξικό οξύ για να αυξήσει το pH στα αγγουράκια τουρσί σε σημείο που να μπορούν να αναπτυχθούν εκεί λιγότερο ανθεκτικοί, στα οξέα, μικροοργανισμοί (Thomas & Davenport, 1985). Τα αποξηραμένα φρούτα και τα κολλώδη εκκρίματα από οπωροφόρα δέντρα είναι μεταξύ των φυσικών ενδαιτημάτων του *Z. bailii*, μαζί με εκείνα των συγγενών ζυμομυκήτων αλλοίωσης. Ο *Z. bailii* καταστρέφει μια ποικιλία τροφίμων, γεγονός που αποτελεί ένδειξη της ανθεκτικότητας του σε διάφορα στοιχεία. Διαφορετικά στελέχη καταστρέφουν διαφορετικά είδη προϊόντων (Thomas & Davenport, 1985).

2.3.2 Ζυμωτικά χαρακτηριστικά

Ο φρουκτόφιλος μεταβολισμός του *Z. bailii* και η ανοχή του σε συνθήκες υψηλής οσμωτικής πίεσης είναι τα βασικά χαρακτηριστικά του που προκαλούν σοβαρά προβλήματα αλλοίωσης σε τρόφιμα με υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων (Zott et al., 2008). Σύμφωνα με τους Leyva et al. (1999), ο *Z. bailii* είναι μια Crabtree-θετική ζύμη που, υπό αερόβιες συνθήκες, μπορεί να παράγει αιθανόλη όταν υπάρχει υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα. Ο κύκλος του τρικαρβοξυλικού οξέος (TCA), ο οποίος είναι η τυπική διαδικασία που λαμβάνει χώρα υπό αερόβιες συνθήκες στους περισσότερους ζυμομύκητες, όπως ο *Kluyveromyces spp.* Και δεν χρησιμοποιείται από τον ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* για την παραγωγή βιομάζας. Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό ως φαινόμενο Crabtree (Thomson et al., 2005). Τα περισσότερα είδη που ανήκουν στα γένη *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Debaryomyces*, *Brettanomyces*, *Torulopsis*, *Nematospora* και *Nadsonia*, παρουσιάζουν αυτή τη

συμπεριφορά (De Deken, 1966). Η αύξηση των συγκεντρώσεων γλυκόζης επιταχύνει τη γλυκόλυση, η οποία διασπά τη γλυκόζη και παράγει μια σημαντική ποσότητα ATP μέσω φωσφορυλίωσης. Αυτό μειώνει τη ανάγκη για την αντίδραση οξειδωτικής φωσφορυλίωσης του κύκλου TCA, η οποία πραγματοποιείται μέσω της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων. Έτσι μειώνεται την κατανάλωση οξυγόνου. Λόγω των αντισηπτικών ιδιοτήτων της αιθανόλης, πιστεύεται ότι το φαινόμενο πρωτοεμφανίστηκε ως ανταγωνιστικός μηχανισμός (Thomson et al., 2005). Το φαινόμενο Crabtree καταστέλλει την αναπνοή μέσω της εξαρτώμενης, από το υπόστρωμα, οδού της ζύμωσης (De Deken, 1966). Όταν υπάρχει φρουκτόζη, η αερόβια σύνθεση αιθανόλης είναι πιο εμφανής από ό,τι όταν υπάρχει γλυκόζη, γεγονός που ενδεχομένως υποστηρίζεται από την αυξημένη δραστηριότητα φωσφορυλίωσης της φρουκτόζης. Αυτό το φαινόμενο Crabtree στον *Z. bailii* συνδέεται άμεσα με τη διαθέσιμη πηγή άνθρακα (Merico et al., 2003). Αυτό συνάδει με τη διαφορετική ικανότητα των συστημάτων μεταφοράς γλυκόζης και φρουκτόζης. Ερευνητές διαπίστωσαν, ότι το *Z. bailii* είχε μικρότερη ικανότητα ζύμωσης φρουκτόζης ($0,83 \text{ mol}^{-1}$) σε σύγκριση με τα κύτταρα του *S. cerevisiae*, τα οποία μπορούν να ζυμώσουν γλυκόζη ($1,6 \text{ mol}^{-1}$). Σύμφωνα με τους συγγραφείς, η παράκαμψη της πυρουβικής αφυδρογονάσης του *Z. bailii* οδηγεί αποτελεσματικότερα το πυρουβικό προς την οξειδωτική παρά τη ζυμωτική οδό (Merico et al., 2003; Gombert et al., 2001).

Σύμφωνα με τους Pina et al. (2004) ο *Z. bailii* μεταφέρει φρουκτόζη μέσω ενός ειδικού για την φρουκτόζη μεταφορέα, ενώ η γλυκόζη προσλαμβάνεται από έναν μη ειδικό μεταφορέα σακχάρων εξόζης. Επιπλέον, η φρουκτόζη και η γλυκόζη ενδέχεται να ανταγωνίζονται για το ίδιο σύστημα μεταφοράς και να έχουν ήπια αναστολή του μεταφορέα γλυκόζης. Ο διευκολυντής της φρουκτόζης (Fructose Facilitator *Zygosaccharomyces*, FFZ1), το γονίδιο που κωδικοποιεί για τον μεταφορέα φρουκτόζης στον *Z. bailii*, διακρίθηκε από τη λειτουργική συμπλήρωσή του σε κύτταρα μεταλλαγμένων κυττάρων του *S. cerevisiae*, όπου του προσέδωσε την ικανότητα να αναπτύσσεται σε υποστρώματα φρουκτόζης (Pina et al., 2004). Εξετάζοντας τη ζύμωση του οίνου, είναι εύκολο να δειχθεί πώς η ασυνήθιστη φύση αλλοίωσης του *Z. bailii* συνδέεται με τη μεταφορά φρουκτόζης. Αρκετά στελέχη ζυμομυκήτων του *S. cerevisiae* βρέθηκαν να περιέχουν ένα γονιδιωματικό σύμπλεγμα 17 kb που ανήκε στο *Z. bailii* (Galeote et al., 2013). Η παραγωγή μιας ιμβερτάσης, ενός ενζύμου που καταλύει την υδρόλυση της σακχαρόζης σε γλυκόζη και φρουκτόζη, από τον *Z. bailii*, εκτός από τη χρήση μονομερών σακχάρων εξόζης, αποδείχθηκε ότι επιτρέπει τη χρήση της σακχαρόζης ως πηγή άνθρακα (Arez et al., 2014). Οι Arez et al. (2014) άνοιξαν την πόρτα στη δυνατότητα χαρακτηρισμού της τυπικής αλληλουχίας ενός ελεγχόμενου συστήματος δύο συστατικών, δείχνοντας ότι ο πολτός αγκινάρας Ιερουσαλήμ, επάγει τη μέγιστη δραστηριότητα ιμβερτάσης, ενώ η γλυκόζη και η σακχαρόζη ήταν ασθενείς επαγωγείς του γονιδίου που κωδικοποιεί την ιμβερτάση. Είναι ζωτικής σημασίας να σημειωθεί ότι το χαμηλό pH μπορεί να ευνοήσει τη ζύμωση της σακχαρόζης, η οποία καθυστερεί όταν η δραστηριότητα της ιμβερτάσης απουσιάζει ή είναι ανεπαρκής. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το χαμηλό pH ενθαρρύνει την υδρόλυση του δισακχαρίτη (Thomas & Davenport, 1985).

Ο *Z. bailii* μπορεί να αναπτυχθεί υπό συνθήκες περιορισμού του οξυγόνου, ανάλογα με τη σύνθεση του υποστρώματος ανάπτυξης. Συγκεκριμένα, ο *Z. bailii* αναπτύσσεται πολύ αργά σε συνθετικό μέσο εμπλουτισμένο με εργοστερόλη και Tween 80, αλλά ο *S. cerevisiae* αναπτύσσεται γρήγορα. Ωστόσο, ο *Z. bailii* επεκτείνεται γρήγορα σε σύνθετα μέσα, γεγονός που δείχνει ότι απαιτούνται ορισμένα θρεπτικά συστατικά για την προώθηση της αναερόβιας ανάπτυξης (Rodrigues et al., 2001).

Επιπλέον, ο *Z. bailii* εμφανίζει μια ιδιότητα, η οποία βρίσκεται υπό διερεύνηση από την επιστημονική κοινότητα προκειμένου να υπάρξει αντιμετώπιση ορισμένων ανεπιθύμητων επιδράσεων του, κατά την παραγωγή οίνου. Συγκεκριμένα, το στέλεχος, έχει την δυνατότητα να μειώνει τα εναπομείναντα σάκχαρα των οίνων, στο στάδιο της αποζύμωσης. Συχνά σε περίπτωση καθυστέρησης της αλκοολικής ζύμωσης ή διακοπής της, οι οίνοι αποκτούν αλκοολικό τίτλο χαμηλότερο από τον προσδοκώμενο. Αυτό αντιμετωπίζεται με εκ νέου εμβολιασμό με τον εμπορικό σακχαρομύκητα, όμως ο συγκεκριμένος προτιμά να μεταβολίζει την γλυκόζη και όχι την φρουκτόζη, η οποία απαντάται σε μεγαλύτερες ποσότητες προς το τέλος της ζύμωσης. Σύμφωνα με τους Santos et al 2008, προτείνεται να γίνεται εμβολιασμός με μια φρουκτόφιλη non-*Saccharomyces* ζύμη, όπως ο *Z. bailii* που μπορεί να αναπτυχθεί και υπό συνθήκες υψηλής αλκοόλης, εμφανίζοντας ανοχή ακόμη και πάνω από 18% v/v. Όμως, η χρήση του *Z. bailii* περιορίζεται αφού έχει παρατηρηθεί πως αυξάνει την πτητική οξύτητα (Zuehlke et al. 2015). Ενδεικτικά, έχει αποδειχθεί πως οίνοι που πραγματοποίησαν αλκοολική ζύμωση με *Z. bailii* εμφανίζουν μεγαλύτερη πτητική οξύτητα (0,8-1 g/L) συγκριτικά με αντίστοιχους που είχαν εμβολιαστεί με *S. cerevisiae*(0,71-0,77 g/L)(Zuehlke et al. 2015). Αυτό το γεγονός, αποτελεί αποφευκτικό παράγοντα για την χρήση του *Z. bailii* σε ευρεία κλίμακα και συνήθως προτιμούνται φρουκτόφιλα στελέχη του εμπορικό σακχαρομύκητα. (Santos et al 2008).

Κεφάλαιο 3: Αειφόρος ανάπτυξη στην παραγωγική διαδικασία

3.1 Εισαγωγή

Η φράση «αειφορία» χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά για να περιγράψει την πρακτική να μην αφαιρούνται ποτέ περισσότερα δέντρα από όσα το δάσος μπορεί να αναπληρώσει. Σήμερα, είναι σύνηθες να ορίζεται ως η βιωσιμότητα και η ικανοποίηση των σημερινών αναγκών, χωρίς να τίθενται σε κίνδυνο οι ανάγκες των μελλοντικών γενεών. Η βελτίωση της βιωσιμότητας των παραγωγικών διαδικασιών θα έχει θετικές επιπτώσεις στο περιβάλλον, επειδή έχουν σημαντικό περιβαλλοντικό αντίκτυπο. Για να παραχθεί οποιοδήποτε προϊόν με λιγότερες συνολικές περιβαλλοντικές επιπτώσεις, οι διαδικασίες παραγωγής πρέπει να είναι βιώσιμες (Sharma et al., 2018).

Η αξιολόγηση του κύκλου ζωής (Life Cycle Assessment, LCA) ενός προϊόντος προσδιορίζει τις περιβαλλοντικές επιπτώσεις του. Τα όρια του συστήματος χρησιμεύουν ως βάση για την αξιολόγηση του κύκλου ζωής ενός προϊόντος. Τα ακόλουθα βήματα συνθέτουν τη διαδικασία αξιολόγησης του κύκλου ζωής. Αρχικά, καθορίζεται ο σκοπός της αξιολόγησης του κύκλου ζωής. Ο στόχος θα πρέπει να έχει διατυπωθεί με σαφήνεια σχετικά με τον λόγο για τον οποίο γίνεται η αξιολόγηση. Ο ορισμός του πεδίου εφαρμογής, που ακολουθεί, περιγράφει τα γενικά όρια της λειτουργικής μονάδας και του συστήματος. Εδώ υπάρχουν διάφορες παραδοχές και περιορισμοί. Έπειτα, ακολουθεί η εξέταση του κύκλου ζωής ενός αποθέματος, η οποία περιλαμβάνει τη συλλογή δεδομένων και μερικές μαθηματικές πράξεις. Τέλος, λαμβάνει χώρα η εξέταση του κύκλου ζωής όσον αφορά την εκτίμηση των επιπτώσεων. Μόλις εξαχθούν συμπεράσματα και συστάσεις, τα αποτελέσματα της εκτίμησης των επιπτώσεων του κύκλου ζωής και της ανάλυσης του αποθέματος του κύκλου ζωής, συνδυάζονται (Sharma et al., 2018). Καθοδηγητική αρχή της βιώσιμης ανάπτυξης, είναι η επίτευξη των στόχων της ανθρώπινης ανάπτυξης, με παράλληλη διατήρηση της ικανότητας των φυσικών συστημάτων να παρέχουν τους φυσικούς πόρους και τις υπηρεσίες του οικοσυστήματος, που είναι απαραίτητες για τις ανθρώπινες ανάγκες και την κοινωνία. Μια κατάσταση της κοινωνίας όπου οι συνθήκες διαβίωσης και οι πόροι χρησιμοποιούνται για την ικανοποίηση των ανθρώπινων αναγκών, διατηρώντας παράλληλα την ακεραιότητα και τη σταθερότητα του φυσικού συστήματος, είναι το επιθυμητό αποτέλεσμα. *«Ανάπτυξη που ικανοποιεί τις απαιτήσεις της σημερινής γενιάς χωρίς να θέτει σε κίνδυνο την ικανότητα των μελλοντικών γενεών να ικανοποιήσουν τις δικές τους ανάγκες»* είναι ο ορισμός της βιώσιμης ανάπτυξης που διατυπώθηκε στην έκθεση Brundtland του 1987 (World Commission on Environment and Development, 1987). Καθώς η ιδέα της βιώσιμης

ανάπτυξης αναπτύχθηκε, η έμφαση μετατοπίστηκε περισσότερο προς την προστασία του περιβάλλοντος για τις μελλοντικές γενιές, καθώς και προς την οικονομική και κοινωνική πρόοδο της κοινωνίας.

3.2 Μέτρα για την μείωση του περιβαλλοντικού αποτυπώματος

Η υπερθέρμανση του πλανήτη, η ρύπανση των υδάτων, η επισιτιστική ασφάλεια, η εκθετική αύξηση του πληθυσμού, η ασφάλεια του ενεργειακού εφοδιασμού και άλλες περιβαλλοντικές και κοινωνικές προκλήσεις, κερδίζουν ολοένα και μεγαλύτερη προσοχή κατά τη συζήτηση θεμάτων βιωσιμότητας, με ιδανικό αποτέλεσμα μια περισσότερο βιώσιμη ανάπτυξη. Τις τελευταίες δεκαετίες έχει δημιουργηθεί ένα ευρύ φάσμα τεχνικών και μέσων για την παρακολούθηση της βιωσιμότητας και της βιώσιμης ανάπτυξης, την αξιολόγηση της προόδου προς περισσότερο βιώσιμα συστήματα και τη μέτρηση της βιωσιμότητας (De Benedetto & Klemes, 2008).

Οι περιβαλλοντικές επιπτώσεις της χρήσης πρώτων υλών και ενέργειας, των διαδικασιών παραγωγής, των αγαθών και των υπηρεσιών, αξιολογούνται συνήθως μόνο ως προς το πόσο επιβαρυντικές είναι για το περιβάλλον. Μια ευρύτερη προοπτική, ωστόσο, θα πρέπει, επίσης, να λαμβάνει υπόψη τυχόν δυνητικές μη επιβαρυντικές συνέπειες μιας δραστηριότητας (Cucek et al., 2012e). Όταν η αποφόρτιση μιας δραστηριότητας υπερτερεί της επιβάρυνσης της, μπορεί να θεωρηθεί ότι είναι περιβαλλοντικά βιώσιμη. Για παράδειγμα, όταν τα απορρίμματα μετατρέπονται σε ένα νέο προϊόν (Kravanja & Cucek, 2013). Συνήθως, μόνο οι άμεσες αρνητικές επιπτώσεις (επιβαρύνσεις) στο περιβάλλον μετρώνται με το άμεσο περιβαλλοντικό αποτύπωμα και κάθε στατιστική βιωσιμότητας. Οι άμεσες περιβαλλοντικές μετρήσεις, όπως τα αποτυπώματα (footprints) συνδέονται με την εξόρυξη πόρων, την κατασκευή, τη χρήση, τη συντήρηση, την ανακύκλωση ή/και τη διάθεση υλικών, συμπεριλαμβανομένων όλων των φάσεων διανομής και μεταφοράς. Ωστόσο, όταν ένα σύστημα εμφανίζει σημαντική μη επιβαρυντική επίδραση στο περιβάλλον εκτός από τις άμεσες επιβαρυντικές επιδράσεις του στο περιβάλλον, μπορεί να οδηγήσει σε παραπλανητικές λύσεις εάν ληφθούν υπόψη μόνο οι άμεσες επιδράσεις (Cucek et al., 2013b).

Με την αντικατάσταση των επιβλαβών προϊόντων με φιλικά προς το περιβάλλον, τα έμμεσα αποτυπώματα μειώνουν τον περιβαλλοντικό αντίκτυπο. Η χρήση των απορριμμάτων για την δημιουργία νέων προϊόντων αντί της απόρριψής τους, η χρήση φιλικών προς το περιβάλλον πρώτων υλών, αγαθών και υπηρεσιών στη θέση εκείνων που βλάπτουν το περιβάλλον ή η μετάβαση σε ανανεώσιμες πηγές ενέργειας είναι μερικά παραδείγματα. Ένα μικρότερο αποτύπωμα είναι το έμμεσο αποτέλεσμα. Το οικοσύστημα επιβαρύνεται ή βοηθιέται έμμεσα μέσω του έμμεσου αποτυπώματος (Cucek et al., 2015).

Σύμφωνα με τους Kravanja & Cucek (2013), το συνολικό αποτύπωμα υπολογίζεται ως το άθροισμα του άμεσου και του έμμεσου αποτυπώματος. Όταν λαμβάνονται υπόψη οι συνολικές επιπτώσεις, μπορούν να βρεθούν πιο ρεαλιστικές λύσεις από ό,τι όταν λαμβάνονται υπόψη μόνο οι άμεσες επιπτώσεις. Αντί να προτείνονται απλώς οι λύσεις που επιβαρύνουν λιγότερο, μια κατάλληλη βιώσιμη σύνθεση θα πρέπει να εντοπίζει εκείνες που αποφορτίζουν περισσότερο το περιβάλλον (Cucek et al., 2015).

Σύμφωνα με τους Cucek et al. (2012c), υπάρχουν δύο τύποι αποτυπωμάτων: ολοκληρωμένα περιβαλλοντικά, κοινωνικά ή/και οικονομικά αποτυπώματα και περιβαλλοντικά, οικονομικά ή/και κοινωνικά αποτυπώματα.

Ο όρος «αποτύπωμα» προέρχεται από την εισαγωγή του όρου οικολογικό αποτύπωμα (ecological footprint, EF) (Fang et al., 2014). Από τότε που εισήχθη ο όρος αυτός, έχουν προστεθεί και άλλα περιβαλλοντικά αποτυπώματα. Από την άποψη του κύκλου ζωής, κάθε αποτύπωμα υποδηλώνει συγκεκριμένες κατηγορίες πιέσεων που συνδέονται με μια διαδικασία, ένα προϊόν ή μια δραστηριότητα (Galli et al., 2013). Ορισμένα αποτυπώματα έχουν χαρακτηριστεί ως κρίσιμα αποτυπώματα, διότι είναι κρίσιμοι παράγοντες για τη βιωσιμότητα και τη βιώσιμη ανάπτυξη. Αυτά τα αποτυπώματα περιλαμβάνουν το αποτύπωμα άνθρακα (carbon footprint, CF), το αποτύπωμα νερού (water footprint, WF), το αποτύπωμα ενέργειας (energy footprint, ENF), το αποτύπωμα αζώτου (nitrogen footprint, NF), το αποτύπωμα φωσφόρου (phosphorus footprint, PF), το αποτύπωμα βιοποικιλότητας (biodiversity footprint, BF) και το αποτύπωμα της γης (land footprint, LF) (Galli et al., 2013).

Τρόποι για να μειωθεί το περιβαλλοντικό αποτύπωμα είναι οι εξής (Cucek et al., 2015):

- Τεχνολογικές πρόοδοι ώστε να μειωθούν οι εκπομπές άνθρακα να ελαττωθεί η κατανάλωση ενέργειας και στροφή σε ανανεώσιμες πηγές ενέργειας
- Ανακύκλωση και επαναχρησιμοποίηση των προϊόντων, ώστε να μειωθούν τα απορρίμματα
- Υπεύθυνη και αποτελεσματική χρήση των προϊόντων
- Μείωση της σπατάλης φαγητού
- Στήριξη των τοπικών καταστημάτων
- Υπεύθυνη και αποτελεσματική χρήση του νερού σε όλα τα επίπεδα
- Καλύτερη εξοικονόμηση νερού και διαχείριση
- Αποφυγή της σπατάλης του νερού που προορίζεται για άρδευση και συναφείς ενέργειες
- Ανακύκλωση οργανικών αποβλήτων
- Εφαρμογή αμειψισποράς
- Απομάκρυνση του φωσφόρου από λύματα και βιομηχανικά απόβλητα

- Βελτίωση των λυμάτων και επεξεργασία για την απομάκρυνση ρύπων, ιδιαίτερα των βαρέων μέταλλα
- Χρήση γεωργικών υπολειμμάτων και ζωικών αποβλήτων, ως λίπασμα

Τόσο οι καταναλωτές όσο και οι παραγωγοί μοιράζονται την ευθύνη για τη μείωση του περιβαλλοντικού αποτυπώματος. Όταν οι επιχειρήσεις είναι ανοιχτές σχετικά με τις διαδικασίες παραγωγής τους και οι κυβερνήσεις λαμβάνουν σοβαρά υπόψη τους κανόνες, οι άνθρωποι μπορούν να λάβουν ενημερωμένες αποφάσεις σχετικά με το πώς μπορούν να μειώσουν το περιβαλλοντικό τους αποτύπωμα. Οι καταναλωτές μπορούν να λαμβάνουν τεκμηριωμένες αποφάσεις σχετικά με τις αγορές τους όταν έχουν επαρκείς γνώσεις σχετικά με το πώς συγκεκριμένα συστατικά ή αγαθά επηρεάζουν το περιβαλλοντικό αποτύπωμα. Το οικολογικό αποτύπωμα επηρεάζεται από τις φαινομενικά ασήμαντες, μικρές αποφάσεις που λαμβάνουμε καθημερινά. Επομένως, η λήψη βιώσιμων και υγιεινών αποφάσεων μπορεί να έχει θετικό αντίκτυπο στο περιβάλλον (Cucek et al., 2015).

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 : ΣΚΟΠΟΣ-ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1.Σκοπός -σχεδιασμός πειραμάτων

Τα τελευταία χρόνια, λόγω της ραγδαίας ανάπτυξης της βιοτεχνολογίας και ειδικότερα της τεχνολογίας ζυμώσεων, έχουν προκύψει εναλλακτικά μέσα και μέθοδοι για να διεκπεραιωθεί η εν λόγω διεργασία. Σκοπός της διπλωματικής εργασίας είναι η ζύμωση με τον *Zygosaccharomyces Bailii* σε συνθετικά υποστρώματα- με διαφορετική πηγή σακχάρων στο εκάστοτε δείγμα(μαλτόζη, γλυκόζη και μείγμα σακχάρων με αναλογία 86% μαλτόζη, 9% γλυκόζη και 5% φρουκτόζη επί των ολικών σακχάρων)-σε διαφορετικές θερμοκρασίες ζύμωσης, με τα δείγματα να μελετώνται σε 20°C και 15°C, ώστε να εξεταστούν τα αποτελέσματα των μετρήσεων που θα ακολουθήσουν την ζύμωση. Πιο συγκεκριμένα, θα διερευνηθούν οι βέλτιστες συνθήκες για τον ζυμομύκητα, δηλαδή αυτές στις οποίες θα παρουσιάζει τα βέλτιστα αποτελέσματα σε σύγκριση με τον εμπορικό ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*.

Σκοπός του πειράματος, λοιπόν, είναι η αξιολόγηση της ζυμωτικής ικανότητας του *Zygosaccharomyces Bailii* σε συνδυασμό με την μελέτη ανάπτυξης πληθυσμού, την εξέλιξη του pH και της οξύτητας, την κατανάλωση τόσο των αναγόντων σακχάρων όσο και του αφομοιώσιμου αμμωνιακού αζώτου αλλά και την μελέτη παραγωγής πτητικών ενώσεων, ώστε να καταλήξουμε σε ένα συμπέρασμα πιθανής χρήσης του σε ευρεία κλίμακα στην βιοτεχνολογία. Παράλληλα, έγινε και ένας πειραματικός εμβολιασμός με 1 εκατομμύριο πληθυσμό κυττάρων (αντί για 6 που είναι η προτεινόμενη) με σκοπό την διαπίστωση της απόδοσης σε πολύ μικρότερο πληθυσμό. Προχωρήσαμε σε αυτή την δοκιμή προκειμένου να ελέγξουμε εάν μπορεί ο μύκητας να ανταπεξέλθει σε ζυμώσεις που είναι σχεδιασμένες στα πλαίσια της αειφορίας και του sustainability μοντέλου.

4.2. Στελέχη Ζυμομυκήτων

- *Saccharomyces cerevisiae*.
- *Zygosaccharomyces Bailii*. (απομονώθηκε από οίνο που ζυμώθηκε με γλεύκος της ποικιλίας Ξινόμαυρο).

4.3. Υλικά

- Φυγόκεντρος HERMLE Z 200 A
- ARE Heating Magnetic Stirrer VELP.SCIENTIFICA
- Φασματοφωτόμετρο UV
- Στήλες Vigreux
- Απιοειδείς φιάλες 100 ml
- Διαχωριστικές χοάνες 250 ml

- Όξινο φωσφορικό κάλιο
- Όξινο φωσφορικό κάλιο (Potassium phosphate dibasic puriss) >99% SIGMAALDRICH
- Δισόξινο φωσφορικό κάλιο (POTASSIUM DIHYDROGEN PHOSPHATE) >98% PENTA
- Θειικό αμμώνιο (AMMONIUM SULFATE A.G.) >99.5% PENTA
- Θειικό μαγνήσιο (Magnesium sulfate heptahydrate) >99.5% MERCK
- Θειικός ψευδάργυρος (Zinc sulfate heptahydrate) >99.5% MERCK
- Εκχύλισμα ζύμης (Yeast Extract) LAB
- Γλυκόζη (D-(+)-Glucose), 99% Alfa Aesar
- Φρουκτόζη (D-Fructose) >98.5% Duchefa Biochemies
- Μαλτόζη (D-(+)-Maltose monohydrate) > 99% MERCK
- Κυανό του μεθυλενίου
- NaOH Sodium hydroxide pellets pure <99% MERCK
- Δινιτροσαλικυλικό οξύ (3,5-Dinitrosalicylic acid) 98% SIGMA-ALDRICH
- Potassium sodium tartrate tetrahydrate 99% SIGMA-ALDRICH
- Ένυδρο όξινο φωσφορικό νάτριο (di-Sodium hydrogen phosphate dihydrate) >99.5 MERCK
- Ιωδικό κάλιο (Potassium iodate) >99.7-100% MERCK
- Αιθανόλη (Ethanol) 99.8% ACROS ORGANICS
- Γλυκίνη (Glycine) 98.5 - 101.0 %SERVA
- n-Πεντάνιο (n-Pentane) CARLO ERBA
- Διαιθυλαιθέρας (Diethyl Ether) >99.5% FERAK
- Θειικό νάτριο (Sodium Sulfate, anh. a.r.) Chem-Lab NV
- 3-οκτανόλη
- Φωσφορικό οξύ 10% v/v
- Ισοοκτάνιο Uvasol Isooctane for spectroscopy >99.8% SIGMA-ALDRICH

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:

Συστατικό	Συγκέντρωση (g/L)
Όξινο φωσφορικό κάλιο	1
Δισόξινο φωσφορικό κάλιο	1
Θειικό αμμώνιο	2
Θειικό μαγνήσιο	0.2
Θειικός ψευδάργυρος	0.2
Εκχύλισμα ζύμης	2

Το εκχύλισμα ζύμης είναι σκεύασμα εμπορίου και περιέχει :

- Αμινοξέα
- Πεπτίδια
- Βιταμίνες και
- Υδατάνθρακες

Οι παραπάνω ποσότητες ζυγίστηκαν και στη συνέχεια προστέθηκαν σε νερό και ακολούθησε ήπια ανάδευση. Έπειτα 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 Mix 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.

Και τα τέσσερα ισότοπα συστήματα υποστρώματος-σακχάρου που παρασκευάστηκαν αποστειρώθηκαν σε κλίβανο αποστείρωσης.

4.4.2. Εμβολιασμός υποστρωμάτων

Μετά το πέρας της αποστείρωσης και την ψύξη των υποστρωμάτων (20 °C) 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 εμβολιασμένο υπόστρωμα/γλεύκος να έχει αρχική συγκέντρωση

κυττάρων περίπου ίση με 6×10^6 κύτταρα/mL στο υπόστρωμα και όχι με βάση την μάζα. Για κάθε αιώρημα από τις τρεις ζύμες πραγματοποιήθηκε μέτρηση συγκέντρωσης κυττάρων και βιωσιμότητας 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, ώστε να υπάρχουν 6×10^6 κύτταρα /ml περίπου. Ο εμβολιασμός των υποστρωμάτων πραγματοποιήθηκε υπό ασηπτικές συνθήκες.

4.5. Αναλυτικές μέθοδοι

4.5.1. Μέτρηση πληθυσμού και βιωσιμότητας

Η συγκέντρωση κυττάρων σε ένα δείγμα ανέρχεται σε εκατομμύρια κύτταρα ανά ml και μετρήθηκε με την χρήση μικροσκοπίου με την χρήση πλακιδίου Neubauer (Νεραντζής, 2010).

1. Προετοιμασία δείγματος:

Χρησιμοποιούμε ειδικό αποστειρωμένο σιφώνιο στο οποίο, τοποθετείται 1ml δείγματος, ύστερα από κατάλληλη αραίωση σε δοκιμαστικό σωλήνα και στην συνέχεια προστίθεται 1ml κυανού του μεθυλενίου. Το μίγμα αναδεύεται και αφήνεται για 10 λεπτά.

2. Μέτρηση στο μικροσκόπιο:

Η μεγέθυνση που επιλέγεται στο μικροσκόπιο είναι 40×10 και η μέτρηση πραγματοποιείται με ένα πλακίδιο Neubauer. Το πλακίδιο αποτελείται από 25 μεγάλα τετράγωνα και η μέτρηση πραγματοποιείται σε πέντε από αυτά (εδώ επιλέχθηκε η μέτρηση πέντε τετραγώνων της διαγωνίου). 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 ενεργών (λευκό χρώμα) και των μη ενεργών (μπλε χρώμα) κυττάρων σε συγκεκριμένο αριθμό τετραγώνων.

3. Υπολογισμοί:

Στην συνέχεια σύμφωνα με την εξίσωση που ακολουθούν υπολογίζεται η i η συγκέντρωση των κυττάρων:

$$\text{Συγκέντρωση } C = \frac{n}{N} * D * 0.25 * 106 \text{ κύτταρα/ml}$$

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

4.5.2. Μέτρηση σακχάρων

4.5.2.1. Μέτρηση σακχάρων με την μέθοδο του δινιτρο-σαλικυλικού οξέος (DNS)

Η μέτρηση των αναγωγικών σακχάρων πραγματοποιείται με την φωτομετρική μέθοδο DNS. Τα αναγωγικά σάκχαρα (αναγωγικά είναι και τα τρία βασικά σάκχαρα της μπίρας) καθώς διαθέτουν ένα ελεύθερο ημιακεταλικό υδροξύλιο μπορούν να σχηματίσουν σύμπλοκο μεταξύ αυτού και του δινιτρο-σαλικυλικού οξέος. Η αντίδραση

αυτή είναι δυνατό να πραγματοποιηθεί σε θερμοκρασία μεγαλύτερη των 70ο C. Το σύμπλοκο που σχηματίζεται παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στα 540nm. Τα τρία σάκχαρα που χρησιμοποιούνται στην εν λόγω εργασία (γλυκόζη, φρουκτόζη και μαλτόζη) είναι αναγωγικά, και κατά συνέπεια μπορούν να μετρηθούν με την μέθοδο DNS (Jain et al., 2020).

Παρασκευή αντιδραστήριου:

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

Μεθοδολογία:

1. Σε δοκιμαστικούς σωλήνες (δύο για κάθε συγκέντρωση σακχάρου) προστίθενται 0.5 mL δινιτρο σαλικυλικού οξέος και 0.5 mL δείγματος.
2. Επίσης παρασκευάζεται και το τυφλό διάλυμα, που περιέχει 0.5 mL DNS και 0.5 mL απιονισμένο νερό.
3. Τα δείγματα αναδεύονται καλά και στην συνέχεια τοποθετούνται σε νερό που βράζει για 5 min, ώστε να ξεκινήσει η αντίδραση.
4. Στη συνέχεια σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται 4 mL απιονισμένο νερό. Ρυθμίζεται το φωτόμετρο στα 540nm και μετά τον μηδενισμό του με το τυφλό διάλυμα πραγματοποιείται η μέτρηση των δειγμάτων.
5. Ο υπολογισμός της περιεκτικότητας σε αναγωγικά σάκχαρα γίνεται με βάση τις καμπύλες αναφοράς. Οι καμπύλες αναφοράς παρασκευάστηκαν χωριστά για γλυκόζη και φρουκτόζη από αρχικά διαλύματα 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 100mL προστίθενται :

- 10 g Na₂HPO₄
- 12 ml H₂O
- 6.0 g KH₂PO₄
- 0.5 g νινυδρίνης και
- 0.3 g φρουκτόζης.

Στην συνέχεια η κωνική φιάλη πληρώνεται με απιονισμένο νερό μέχρι την χαραγή.

- Διάλυμα αραίωσης: Ζυγίζονται 2 g KIO₃ και διαλύονται σε 600 mL απιονισμένου νερού και στη συνέχεια προστίθενται 400 mL αιθανόλης (96%). Αποθήκευση στους 5 ο C.
- Πρότυπο πυκνό διάλυμα γλυκίνης (stock solution): Ζυγίζονται 107.2 g γλυκίνης και διαλύονται σε 100 mL απιονισμένου νερού. Αποθήκευση στους 0 ο 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.

Μεθοδολογία:

1. Αρχικά για κάθε ένα από τα δείγματα πραγματοποιείται κατάλληλη αραίωση με απιονισμένο νερό.
2. 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.
3. Στη συνέχεια σε κάθε έναν από τους δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθεται 1 mL από το αντιδραστήριο νινυδρίνης που έχει ήδη παρασκευασθεί.
4. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες σφραγίζονται καλά, ώστε να αποφευχθεί η εξάτμιση και θερμαίνονται σε νερό που βράζει για 16 min.
5. Μετά από ακριβώς 16 min τα δείγματα απομακρύνονται από το θερμό μέσο και αφήνονται να κρυώσουν για 20 min σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 20 οC.
6. Στη συνέχεια σε κάθε έναν από τους δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθενται 5 mL από το διάλυμα αραίωσης.
7. Ρυθμίζεται το φωτόμετρο στα 570 nm και μετά τον μηδενισμό του με απιονισμένο νερό διάλυμα πραγματοποιείται η μέτρηση των δειγμάτων.

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 γλεύκου όσο και από το πρότυπο διάλυμα γλυκίνης.

- Τελικά υπολογίζεται το ελεύθερο αμμωνιακό άζωτο σύμφωνα σε mg/L με την παρακάτω σχέση:

$$FAN = \frac{\text{απορρόφηση δείγματος}}{\text{απορρόφηση του πρότυπου γλυκίνης}} \times 2 \times \text{βαθμός αραίωσης}$$

4.5.4 Μέτρηση pH

Για την μέτρηση του pH γίνεται πρώτα η βαθμονόμηση του πεχαμέτρου με ρυθμιστικά διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης. Ύστερα, ακολουθεί η μέτρηση του άγνωστου δείγματος με την βύθιση των ηλεκτροδίων του οργάνου στο δείγμα και την ένδειξη στην οθόνη του πεχάμετρου.

4.5.5. Διαδικασία εκχύλισης και συμπύκνωσης με στήλη Vigreux

Για την ανάλυση των αρωματικών με αέρια χρωματογραφία πρέπει να προηγηθεί μια διαδικασία εκχύλισης. Στην εν λόγω εργασία επιλέχθηκε η εκχύλιση με στήλη Vigreux. Κατά τη μέθοδο αυτή οι ουσίες που θέλουμε να προσδιορίσουμε μέσω της χρωματογραφίας 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 της μπίρας. 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.
- Σε διαχωριστική χοάνη τοποθετούνται οι οργανικές φάσεις που έχουν συλλεχθεί παραπάνω και προστίθενται περίπου 10 mL απιονισμένο νερό.
- Απορρίπτεται η υδατική φάση και η οργανική τοποθετείται σε ποτήρι ζέσεως.
- Για την απορρόφηση της εναπομένουσας υγρασίας προστίθεται μικρή ποσότητα θειικού νατρίου στο δείγμα.
- Έπειτα από ήπια ανάδευση το δείγμα φιλτράρεται, τοποθετείται σε απιοειδή φιάλη, η οποία έχει προζυγιστεί, και προστίθενται σε αυτό 10 μL 3-οκτανόλη, ως εσωτερικό πρότυπο.
- Η απιοειδής φιάλη συνδέεται με μία στήλη Vigreux και αφήνεται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 35-40ο C για περίπου 45 min.

- Μετά το τέλος της απόσταξης, το δείγμα υφίσταται ταχεία συμπύκνωση με την χρήση αέριου αζώτου μέχρι η τελική μάζα να είναι περίπου ίση με 100 mg και πραγματοποιείται ένεση του δείγματος στη συσκευή GC-MS.

4.5.6 Μέτρηση οξύτητας με τιτλοδότηση

Υλικά:

- κωνική φιάλη 200 – 250 ml
- ποτήρι ζέσεως 50ml
- προχοΐδα
- σιφώνια πλήρωσης 5 – 10 – 20 ml
- απιονισμένο νερό
- διάλυμα NaOH 0,1 M
- διάλυμα φαινολοφθαλείνης
- ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) 7.00
- ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) 4.00

Διαδικασία:

Σε κωνική φιάλη των 250ml, φέρονται 10 ml (απαρωμένου έπειτα από ανακίνηση σε μπουκάλι νερού) δείγματος, προστίθενται περίπου 20 ml απιονισμένου νερού και 4-5 σταγόνες διαλύματος δείκτη φαινολοφθαλείνης. Στην συνέχεια, με συνεχόμενη ανάδευση προσθέτουμε προοδευτικά, από τη προχοΐδα διάλυμα NaOH 0,1 M, μέχρι να εμφανιστεί ροδίζουσα χροιά και να διατηρηθεί για 10 -15 sec. Τελικά, σημειώνουμε τα καταναλωθέντα ml του διαλύματος NaOH 0,1 M και υπολογίζουμε τη ογκομετρούμενη οξύτητα του οίνου. Αξίζει να σημειωθεί πως το τελικό αποτέλεσμα εκφράζεται σε meq/L ή g/L τρυγικού οξέος.

4.5.7 Μέτρηση αιθανόλης με Alex 500

Μετά από βαθμονόμηση του οργάνου και ρύθμιση του για τον προσδιορισμό της αιθανόλης, εισάγονται τουλάχιστον 50-60 mL δείγματος μέσω φίλτρου και αφού έχει προηγηθεί φυγοκέντρηση τους. Ακολουθεί ο υπολογισμός από το όργανο και η μέτρηση ολοκληρώνεται με πέρασμα ενός κύκλου του Alex 500 με νερό ώστε να είναι όσο το δυνατόν ακριβέστερη η επόμενη μέτρηση. Τέλος, το συγκεκριμένο όργανο εμφανίζει την ένδειξη της αλκοόλης σε %v/v.

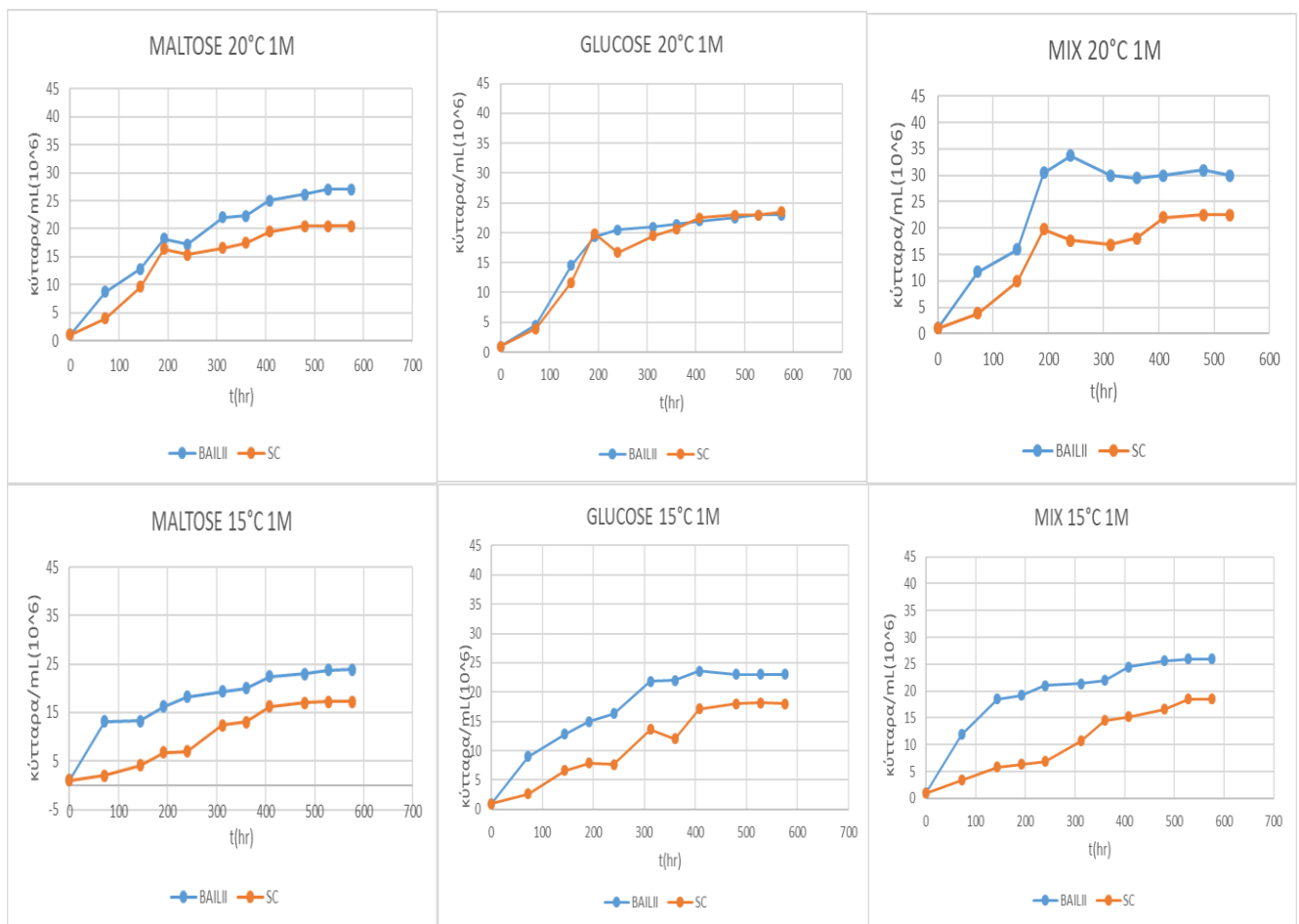
4.5.8 Στατιστική ανάλυση

Σε αυτό το σημείο, πρέπει να επισημάνουμε πως όλες οι μετρήσεις των δειγμάτων και οι αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν, έγιναν με διπλότυπα δείγματα. Ύστερα, κατά το στάδιο της εξαγωγής των αποτελεσμάτων, όλες οι τιμές υποβλήθηκαν σε στατιστικό έλεγχο με ανάλυση της διακύμανσης προκειμένου να διαπιστωθεί η εγκυρότητα τους.

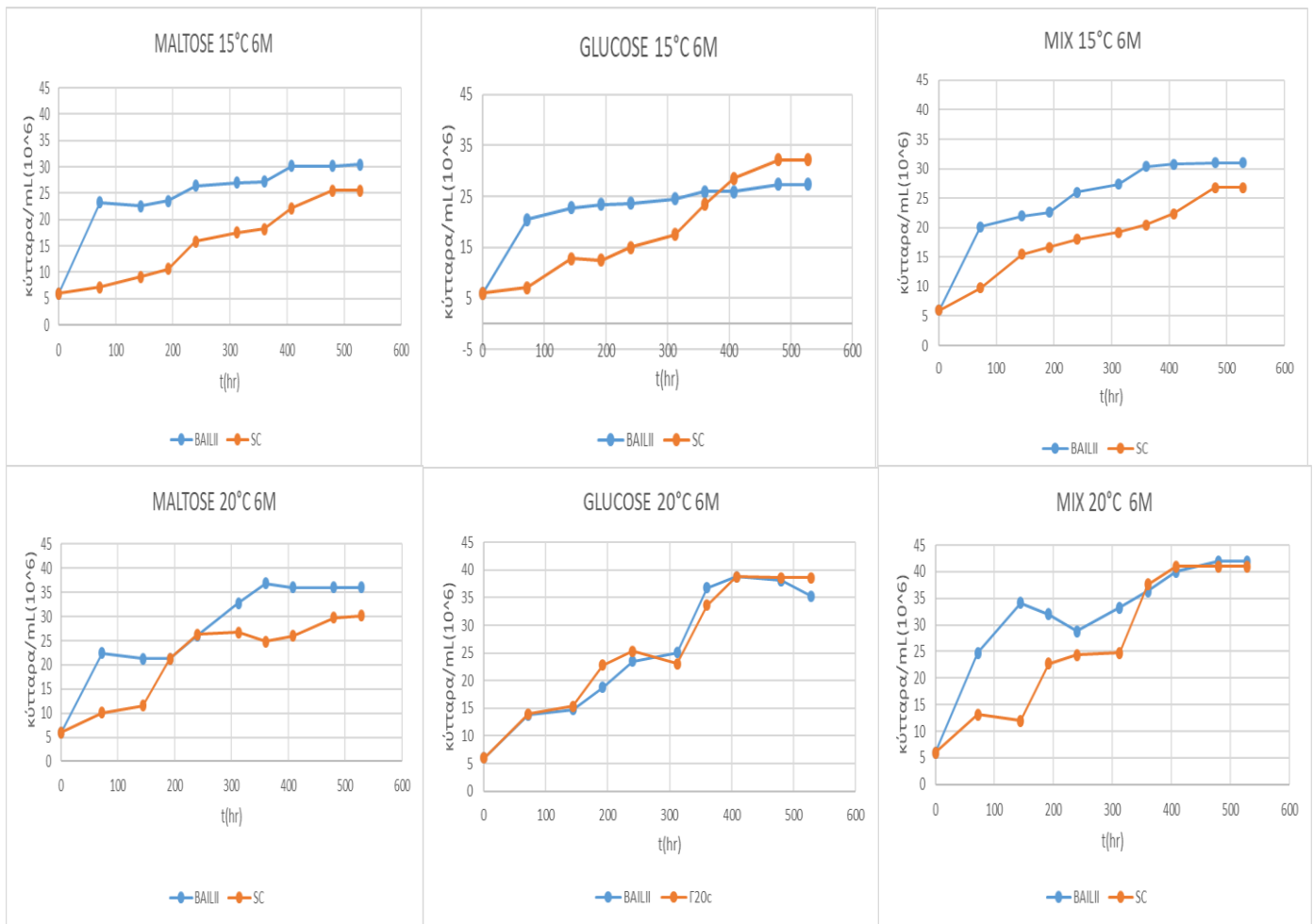
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 : ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ύστερα από την ολοκλήρωση των εργαστηριακών πειραμάτων και των αναλύσεων που εστιάσαμε, ακολούθησε η συγκέντρωση των αποτελεσμάτων και η στατιστική και διαγραμματική απεικόνιση των εν λόγω στοιχείων, τα οποία και παραθέτονται στην παρακάτω ενότητα.

5.1 Κυτταρική ανάπτυξη



Διάγραμμα 1: Η κυτταρική ανάπτυξη του *Zygosaccharomyces Bailii* σε σχέση με τον *Saccharomyces cerevisiae* στους 20°C και στους 15°C σε αρχικό πληθυσμό εμβολιασμού 1x10⁶ κύτταρα/mL.



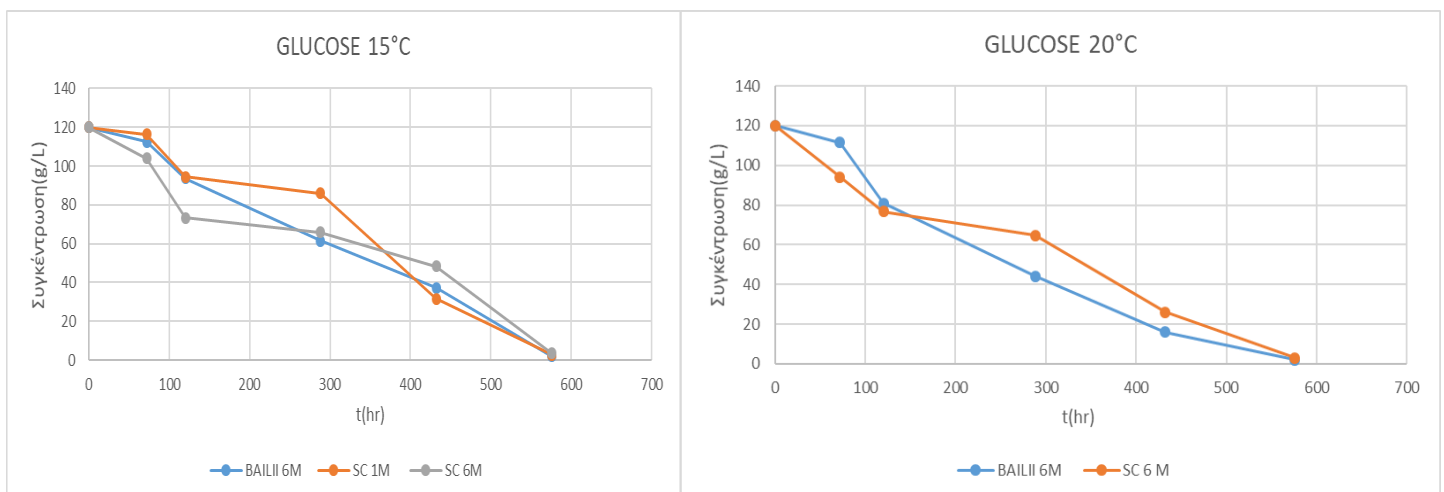
Διάγραμμα 2: Η κυτταρική ανάπτυξη του *Zygosaccharomyces Bailii* σε σχέση με τον *Saccharomyces cerevisiae* στους 20°C και στους 15°C σε αρχικό πληθυσμό εμβολιασμού 6×10^6 κύτταρα/mL.

Στα διαγράμματα 1 και 2, παρουσιάζεται η κυτταρική ανάπτυξη του *Zygosaccharomyces Bailii* σε σχέση με τον *Saccharomyces cerevisiae* στους 20°C και στους 15°C στους διαφορετικούς αρχικούς πληθυσμούς. Γενικά, παρατηρείται η διαφορετική προσαρμογή και ανάπτυξη στις δύο θερμοκρασίες ζύμωσης μεταξύ των σακχάρων αλλά και των συγκεντρώσεων εμβολιασμού των δύο στελεχών. Αρχικά, όσον αφορά στην αρχική συγκέντρωση του 1 εκατομμυρίου κυττάρων, είναι εμφανής η πιο γρήγορη προσαρμογή αλλά και η μεγαλύτερη παραγωγή κυττάρων στο τέλος της διαδικασίας από τον *Zygosaccharomyces Bailii*. Το σάκχαρο της γλυκόζης παρουσιάζει μεγαλύτερη ανάπτυξη μεταξύ των δύο στελεχών ειδικότερα στους 20°C, γεγονός αναμενόμενο, καθώς είναι μια πλήρως δοκιμασμένη συνθήκη και αποτελεί το δείγμα- μάρτυρα του πειράματος. Ύστερα, οι ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν με το μίγμα σακχάρων φαίνεται να δίνουν τον μεγαλύτερο τελικό αριθμό κυττάρων σε ζύμωση του *Zygosaccharomyces Bailii* (30×10^6 κύτταρα/mL) στην υψηλότερη

θερμοκρασία. Η ζύμωση της μαλτόζης παρουσιάζεται η λιγότερο ταχεία και στις δυο θερμοκρασίες. Στην χαμηλότερη θερμοκρασία, ο ρυθμός ανάπτυξης του *Zygosaccharomyces Bailii* κρίνεται ταχύτερος από εκείνον του μάρτυρα. Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, φαίνεται ο *Zygosaccharomyces Bailii* να μπορεί να ανταπεξέλθει ικανοποιητικά και στις δύο θερμοκρασίες αλλά και σε πολύ μικρότερη συγκέντρωση εμβολιασμού από αυτήν που είθισται.

Σχετικά με τις ζυμώσεις των 6×10^6 κύτταρα/mL που παρουσιάζονται στο διάγραμμα 2., παρατηρείται μια χαμηλή ζυμωτική ικανότητα και των δύο στελεχών αν συνοπολογιστεί ότι αποδίδουν περίπου τα ίδια αποτελέσματα σε τελικό αριθμό με τις προηγούμενες ζυμώσεις και έχει εμβολιαστεί η εξαπλάσια αρχική συγκέντρωση. Επιπλέον, παρουσιάζεται παρόμοια ανάπτυξη μεταξύ των δυο στελεχών, με τις τελικές τιμές τους να είναι παρόμοιες όμως, φτάνουν σε μικρότερη τελική συγκέντρωση, συγκριτικά με όσα απεικονίζονται στο διάγραμμα 1. Η ζύμωση του μίγματος σακχάρων στην υψηλότερη θερμοκρασία δίνει το μεγαλύτερο πληθυσμό κυττάρων (42×10^6 και 41×10^6 κύτταρα/mL αντίστοιχα) ενώ όπως και στον προηγούμενο κύκλο ζυμώσεων, η μαλτόζη παρουσιάζει την χαμηλότερη ανάπτυξη μεταξύ των δειγμάτων. Συμπερασματικά, οι ζυμώσεις των 6 εκατομμυρίων, εμφανίζουν ικανοποιητική ανάπτυξη από τον *Z.bailii*, ειδικότερα στην χαμηλότερη θερμοκρασία όπου και δείχνει να έχει μια προτίμηση το στέλεχος. Τέλος, ακόμη και στην ζύμωση με την μικρότερη αρχική συγκέντρωση, φαίνεται αρκετά ικανοποιητικά τα αποτελέσματα που δόθηκαν από την συγκεκριμένη ανάλυση.

5.2 Κατανάλωση σακχάρων



Διάγραμμα 3: Η κατανάλωση της γλυκόζης στην πορεία της ζύμωσης του *Zygosaccharomyces Bailii* σε σχέση με τον *Saccharomyces cerevisiae* σε θερμοκρασία 15°C και 20°C.

Στο παραπάνω διάγραμμα απεικονίζεται η κατανάλωση της γλυκόζης κατά την διάρκεια της ζύμωσης, που υπολογίστηκε μέσω της ανάλυσης αναγόντων σακχάρων DNS. Αξίζει να σημειωθεί πως όλα τα δείγματα έχουν αρχική συγκέντρωση 120 g/L. Όπως αναμένεται (Cabregra et al, 2016) γρηγορότερη κατανάλωση της γλυκόζης από τα στελέχη στην υψηλότερη θερμοκρασία, λόγω αύξησης της ταχύτητας της αντίδρασης. Ο παραπάνω ισχυρισμός φαίνεται να επιβεβαιώνεται και διαγραμματικά, λόγω της ταχύτερης έναρξης κατανάλωσης στην δεξιά συνάρτηση, καθώς και της γρηγορότερης εξομάλυνσης της καμπύλης (ενδεικτικά από τις 400hr και μετά φαίνεται να φτάνει σε μια σχετική στασιμότητα). Από την άλλη, στους 15°C, υπάρχει ένας σταθερός ρυθμός κατανάλωσης. Από το διάγραμμα, συμπεραίνουμε πως ο *Zygosaccharomyces Bailii* μπορεί να καταναλώσει επαρκώς την γλυκόζη και σε 1 και σε 6 εκατομμύρια αρχική συγκέντρωση, με τα υπολειμματικά σάκχαρα σε καθεμία περίπτωση να μην ξεπερνούν τα 3 g/L (με μέγιστη τιμή τα 2,8 g/L του *Saccharomyces cerevisiae* 1×10^6). Τέλος, αξίζει να σχολιαστεί ο αισθητά πιο βραδύς ρυθμός της ζύμωσης των 1×10^6 στους 15°C ο οποίος ωστόσο δεν φαίνεται να επηρεάζει το τελικό αποτέλεσμα.

5.3 pH

ΖΥΜΕΣ	ΑΡΧΙΚΟ pH	ΤΕΛΙΚΟ pH					
		20°C			15°C		
		Μαλτόζη	Γλυκόζη	Μίγμα	Μαλτόζη	Γλυκόζη	Μίγμα
Bailii 1M	4,5±0,10	3,3±0,10	3,3±0,10	3±0,00	3,2±0,10	3,3±0,00	3,2±0,12
Bailii 6M	4,5±0,10	3,5±0,0	3,3±0,10	3,2±0,00	3,4±0,00	3,1±0,00	3,4±0,10
SC 1M	4,5±0,10	3,1±0,10	3,1±0,00	2,9±0,00	3,2±0,00	3,1±0,00	3,2±0,10
SC 6M	4,5±0,10	3,2±0,12	3,3±0,00	2,9±0,10	3,2±0,00	3,1±0,00	3,2±0,10

Πίνακας 1: Οι τελικές τιμές pH στις ζυμώσεις των δύο στελεχών σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και θερμοκρασίες.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η αρχική τιμή pH όλων των συνθετικών υποστρωμάτων, ρυθμίστηκε στο $4,5 \pm 0,10$ κατά το στάδιο της παρασκευής τους. Αναφορικά με τις τελικές τιμές, επιβεβαιώνεται από τα αποτελέσματα ο ισχυρισμός πως ο *Zygosaccharomyces Bailii* τείνει να μειώνει το pH καθώς ευδοκιμεί στις χαμηλές τιμές του (Marcorell et al, 2007; Stratford et al, 2013).

5.4 Ογκομετρούμενη Οξύτητα

ΖΥΜΕΣ	Ογκομετρούμενη Οξύτητα(mg/L τρυγικού οξέος)					
	20°C			15°C		
	Μαλτόζη	Γλυκόζη	Μίγμα	Μαλτόζη	Γλυκόζη	Μίγμα
Bailii 6M	3,64±0,20	3,81±0,31	3,5±0,12	3,82±0,30	4,03±0,22	3,61±0,33

Πίνακας 2: Τελικά αποτελέσματα ογκομετρούμενης οξύτητας του *Z.bailii* σε διαφορετικές θερμοκρασίες

Στον πίνακα 2, παρουσιάζονται οι τελικές τιμές της ογκομετρούμενης οξύτητας, - σε μονάδες οξύτητας σε mg/L τρυγικού οξέος)- όπως προέκυψαν από την ογκομέτρηση. Παρατηρείται μειωμένη τιμή της οξύτητας στην υψηλότερη θερμοκρασία των 20°C γεγονός που δείχνει πως τα οργανικά οξέα εμφανίζουν προτίμηση προς την χαμηλότερη θερμοκρασία. Επίσης, η παραπάνω μέτρηση δείχνει πως η χαμηλότερη οξύτητα παρατηρείται στα δείγματα που ζυμώθηκαν με το μείγμα σακχάρων ως υπόστρωμα. Επομένως, το αποτέλεσμα της εν λόγω μέτρησης κρίνεται θετικό όπως επιβεβαιώνεται και από την μικρή διακύμανση μεταξύ των επαναληπτικών δειγμάτων που μετρήθηκαν.

5.5 Παραγωγή αιθανόλης

ΖΥΜΕΣ	Παραγόμενη αιθανόλη(%v/v)					
	20°C			15°C		
	Μαλτόζη	Γλυκόζη	Μίγμα	Μαλτόζη	Γλυκόζη	Μίγμα
Bailii 6M	4,34%±0,00	4,81%±0,01	3,82%±0,01	3,95%±0,00	4,2%±0,00	3,6%±0,03
SC 6M	5,8%±0,00	6,21%±0,01	5,4%±0,00	5,5%±0,00	6,1%±0,02	5,2%±0,00

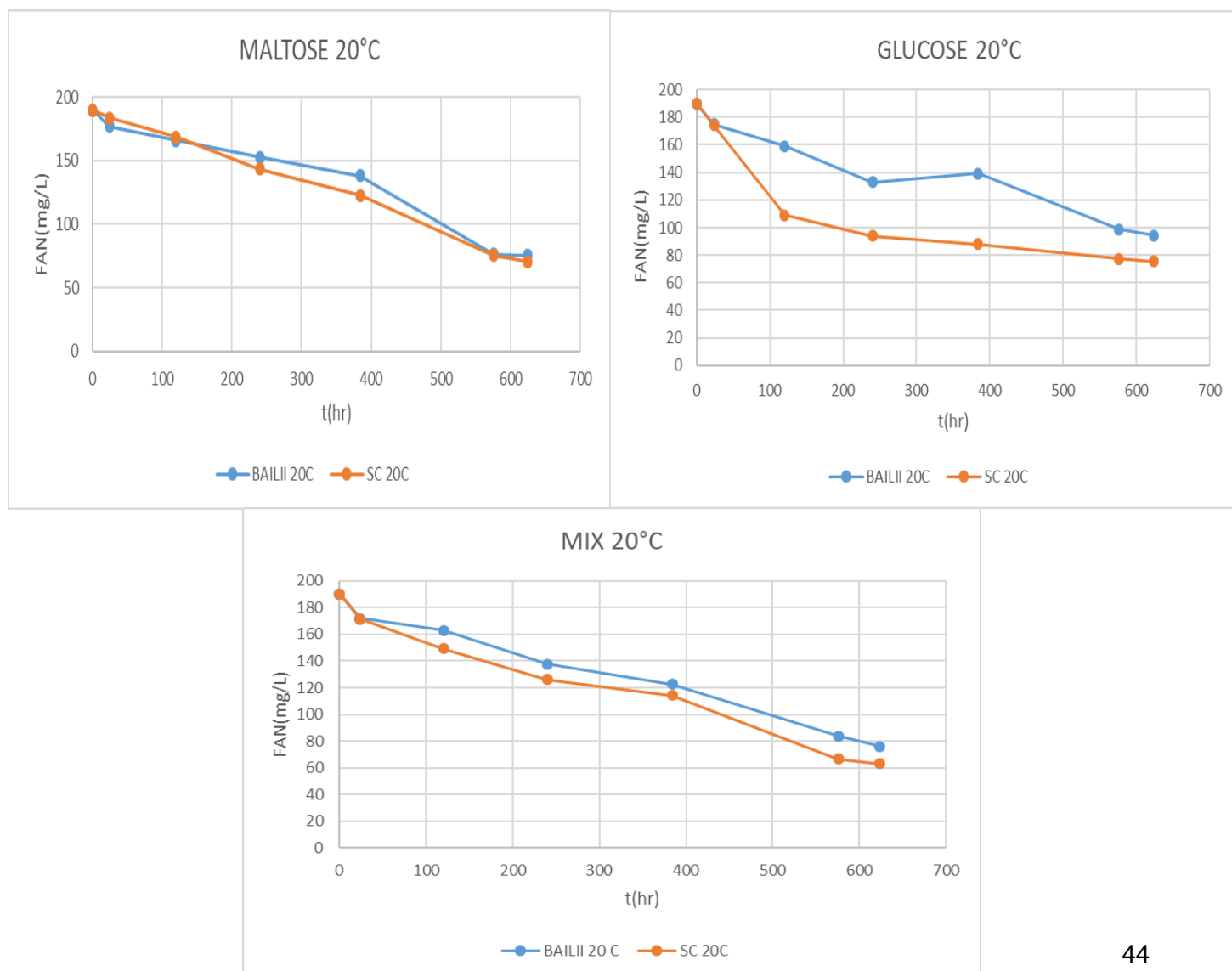
Πίνακας 3: Τελικές τιμές παραγόμενης αιθανόλης των δυο στελεχων σε διαφορετικές θερμοκρασίες και ταξινομημένες ανά σάκχαρο ζύμωσης

Όσον αφορά στην παραγόμενη αιθανόλη, τα αποτελέσματα λήφθηκαν μετά από ανάλυση στο Alex 500. Αρχικά, παρατηρείται μια μικρότερη συγκέντρωση και παραγωγή σε αιθανόλη και στις δύο θερμοκρασίες που ζυμώθηκαν από τον *Zygosaccharomyces Bailii*. Αυτό το αποτέλεσμα, κρίνεται λογικό αφού ο συγκεκριμένος μύκητας, αποτελεί μια non-saccharomyces ζύμη με μικρότερη παραγωγή αλκοόλ από τον συμβατικό σακχαρομύκητα (Ciani & Comitini, 2011). Στην συνέχεια, παρατηρείται μεγαλύτερη παραγωγή σε αλκοόλη στην θερμοκρασία των 20°C κάτι το οποίο είναι συμβατό βάσει βιβλιογραφίας (Gao et al. 2019) οι υψηλότερες θερμοκρασίες ευνοούν την παραγωγή αιθανόλης, λόγω της μείωσης της ενεργότητας του ενζύμου αλκοολική αφυδρογονάση (ADH). Στην συνέχεια, ο *S.cerevisiae* εμφανίζει μικρότερη διακύμανση μεταξύ των δύο θερμοκρασιών που επικρατούσαν. Τέλος, φαίνεται πως η μαλτόζη και το μείγμα σακχάρων δεν παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους, με την παραγωγή τους σε αιθανόλη να κρίνεται αποδεκτή με τις ποσότητες αιθανόλης να πλησιάζουν κοντά στα όρια του μάρτυρα.

5.6 Μέτρηση διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου (FAN)

Το άζωτο θεωρείται ένα από τα σημαντικότερα στοιχεία στην ανάπτυξη ενός κυττάρου, άρα και στην εξέλιξη της ζύμωσης. Η περιεκτικότητά του στο κύτταρο είναι μεταξύ 6 και 9 %w/w. Ο μεταβολισμός των ζυμομυκήτων απαιτεί άζωτο, ως επί το πλείστον υπό την μορφή αμινοξέων, ώστε να μπορεί να γίνει η βιοσύνθεση αζωτούχων ενώσεων και πρωτεϊνικών μορίων. Η απορρόφηση αζώτου μειώνεται όσο πλησιάζει η περάτωση της αλκοολικής ζύμωσης, καθώς επιβραδύνεται και ο πολλαπλασιασμός των ζυμών αντίστοιχα (Russell, 2006).

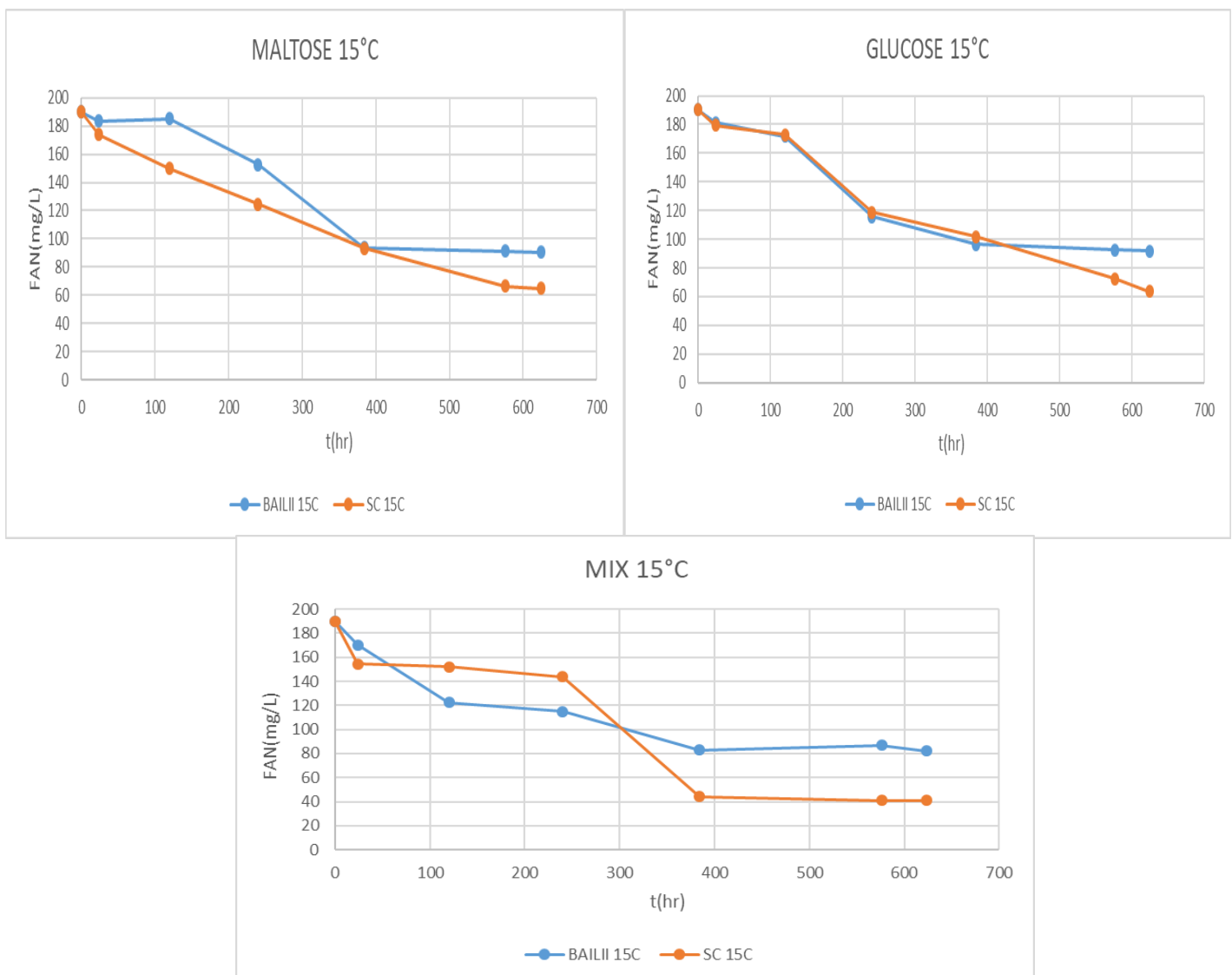
Ως FAN ή διαθέσιμο αμμωνιακό άζωτο, αναφέρεται το ελεύθερο α-αμινο άζωτο και εκφράζεται ως χιλιοστόγραμμα N ανά λίτρο αφομοιώσιμου αζώτου. Πολλά μεγέθη κατά την εξέλιξη της ζύμωσης επηρεάζονται από το FAN ενώ σε αυτό συμπεριλαμβάνονται όλα τα αμινοξέα με εξαίρεση την προλίνη, που δεν αποτελεί α-αμινοξύ και έτσι δεν απορροφάται αναερόβια από τις ζύμες. Στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 4) παρουσιάζονται οι μετρήσεις που ελήφθησαν ύστερα από την μέτρηση του FAN (O'Conner-Cox and Ingledew, 1989).



Διάγραμμα 4: Η κατανάλωση του διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου (FAN) σε ζυμώσεις με τα στελέχη *Saccharomyces cerevisiae* και *Zygosaccharomyces Bailii* και σε συνθήκες θερμοκρασίας 20°C.

Όλες οι ζυμώσεις είχαν σαν αρχική τιμή FAN $190,0 \pm 1,00$ mg/L και εξετάστηκαν οι συγκεντρώσεις του FAN που καταναλώνουν τα δύο στελέχη τόσο σε διαφορετικές θερμοκρασίες όσο και ανά σάκχαρο ζύμωσης. Πιο συγκεκριμένα, στους 20°C παρατηρείται μικρότερη διαφορά στο εναπομείναν άζωτο στις ζυμώσεις της μαλτόζης και του μείγματος σακχάρων. Είναι φανερός ο βραδύτερος ρυθμός και η προσαρμογή του *Z. Bailii*, παρουσιάζεται όμως στην συνέχεια μια ικανοποιητική κατανάλωση από το στέλεχος, όσο προχωράει η ζύμωση .

Το προς εξέταση στέλεχος, φαίνεται στην υψηλή θερμοκρασία να καταναλώνει περισσότερο αφομοιώσιμο άζωτο σε δείγματα που ζυμώθηκαν με υπόστρωμα το μείγμα σακχάρων και την μαλτόζη, που καταγράφηκε τελική συγκέντρωση 75 mg/L και 97 mg/L αντίστοιχα.



Διάγραμμα 5: Η κατανάλωση του διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου (FAN) σε ζυμώσεις με τα στελέχη *Saccharomyces cerevisiae* και *Zygosaccharomyces Bailii* και σε συνθήκες θερμοκρασίας 15°C.

Αναφορικά με τις ζυμώσεις στην θερμοκρασία των 15°C, και ξεκινώντας από την ζύμωση της γλυκόζης, παρατηρείται μια ταυτόσημη καμπύλη και στα δύο στελέχη τα οποία ακολουθούν παρόμοιους ρυθμούς και μάλιστα παρουσιάζουν υψηλότερη κατανάλωση σε σχέση με την υψηλότερη θερμοκρασία. Επίσης, στις ζυμώσεις με μαλτόζη υπάρχει η χαμηλότερη κατανάλωση, άρα και το περισσότερο άζωτο στο τέλος της διεργασίας. Όσον αφορά το μείγμα σακχάρων, παρατηρείται μεγάλη διαφορά στην συμπεριφορά των δύο στελεχών, με τον *Z. Bailii* να καταναλώνει λιγότερο FAN σε σχέση με την υψηλότερη θερμοκρασία και τα δύο στελέχη να έχουν μια μεγάλη διαφορά στην τελική κατανάλωση, όπου ο *Z. Bailii* τερματίζει στα 101 mg/L και τον *Saccharomyces cerevisiae* στα 39 mg/L. Τέλος, η ανάλυση των παραπάνω μετρήσεων και της στατιστικής απεικόνισης του εν λόγω πειράματος, δείχνει την ικανοποιητική αφομοίωση του αζώτου από τον *Z. Bailii*, ειδικότερα στην υψηλότερη θερμοκρασία. Παράλληλα, παρουσιάζεται η προτίμηση του στελέχους στην μαλτόζη και το μείγμα των σακχάρων, όταν συνδυαστούν με την αύξηση της θερμοκρασίας. Σύμφωνα με τον Russell (2006), η απορρόφηση των αμινοξέων εξαρτάται από ποικίλους παράγοντες όπως η ποσότητα των αμινοξέων, η ποσότητα του ποσοστού της απορρόφησης, η συγκέντρωση ανταγωνιστικών αναστολέων, οι φάσεις ανάπτυξης του εκάστοτε ζυμομύκητα και η σειρά προτίμησης των αμινοξέων που έχει το κάθε στέλεχος. Συμπερασματικά, ο *Z. Bailii* παρουσιάζει στην χαμηλή θερμοκρασία λιγότερες ανάγκες σε άζωτο, ενώ στους 20°C η ανάγκη δεν διαφέρει από το συμβατικό σακχαρομύκητα.

5.7 Παραγωγή πτητικών ενώσεων

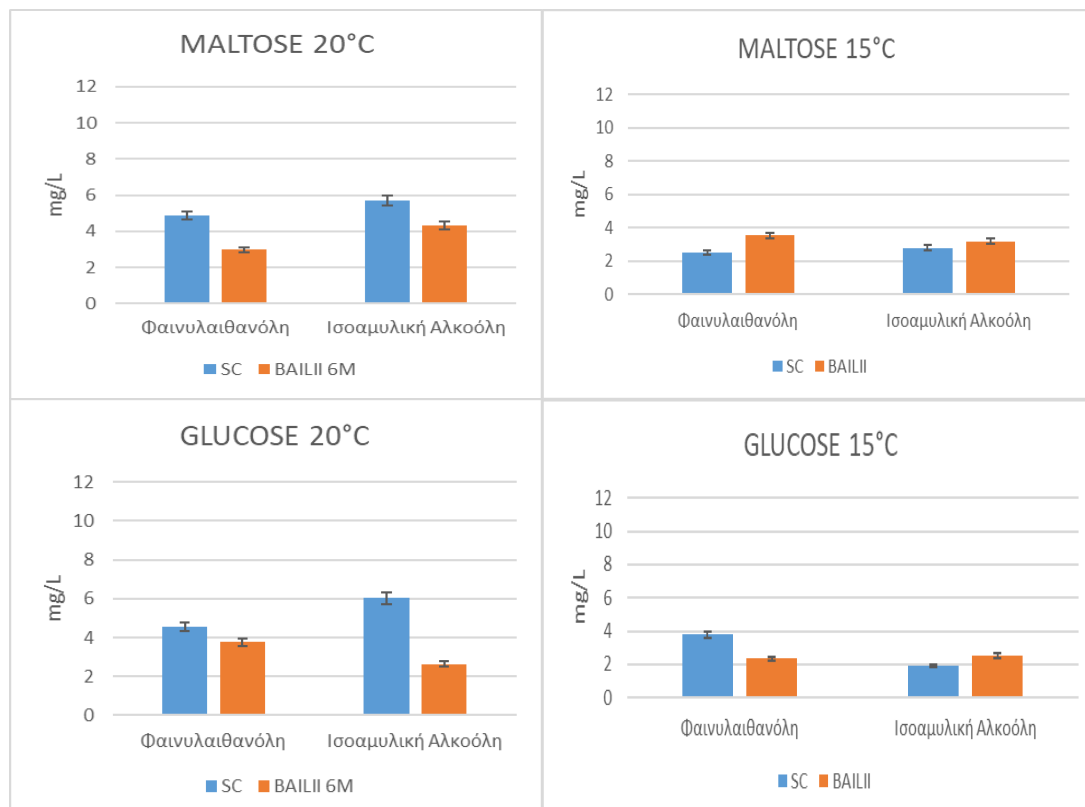
Οι κύριες πτητικές ενώσεις που θα μελετηθούν παρκάτων είναι οι ανώτερες αλκοόλες(ισοαμυλική αλκοόλη, φαινυλαιθανόλη), οι οξικοί εστέρες, τα λιπαρά οξέα μεσαίας αλυσίδας (BCFA) (εξανοϊκό, οκτανοϊκό, δεκανοϊκό, δωδεκανοϊκό, δεκαεξανοϊκό και ισοβουτυρικό οξύ), οι αντίστοιχοι εστέρες τους καθώς και μια επιπλέον κατηγορία άλλων ενώσεων που παρατηρήθηκαν και θα αναφερθούν.

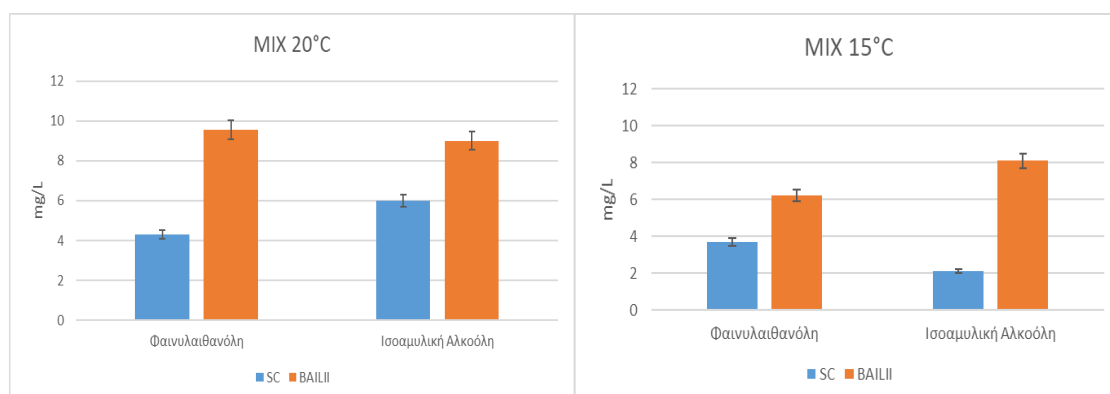
Αξίζει να σημειωθεί πως στις αναλύσεις των αρωματικών, από τα δείγματα στους 20°C αναλύθηκαν αυτά της γλυκόζης και μαλτόζης και μίγματος σε ζύμωση με συμβατικό σακχαρομύκητα ενώ σε αυτά που χρησιμοποιήθηκε ο *Zygosaccharomyces Bailii*, μετρήθηκαν και για τα τρία κύρια αρχικά υποστρώματα. Όλα τα προαναφερθέντα, αφορούσαν δείγμα με αρχικό πληθυσμό τα 6 εκατομμύρια κύτταρα ανά mL. Αντίστοιχα, όσων αφορά τους 15 °C, αναλύθηκαν και συγκρίθηκαν δείγμα που ζυμώθηκαν με τόσο *Zygosaccharomyces Bailii* σε γλυκόζη, μαλτόζη και μείγμα

σε 6 εκατομμύρια κύτταρα ανά mL αρχικού πληθυσμού, όσο και με τον μάρτυρα του κύκλου πειραμάτων, *Saccharomyces cerevisiae*.

5.7.1 Ανώτερες αλκοόλες

Αρχικά, οι κύριες ανώτερες αλκοόλες που ανιχνεύθηκαν μέσω αέριας χρωματογραφίας συνδεδεμένης με φασματομετρία μάζας GC-MS, ήταν η φαινυλαιθανόλη και η ισοαμυλική αλκοόλη. Στο παρακάτω διάγραμμα γίνεται αντιληπτό πως η θερμοκρασία της ζύμωσης επηρεάζει σημαντικά την παραγωγή των ανώτερων αλκοολών αφού παρατηρείται πως με την μείωση της θερμοκρασίας, μειώνεται και η συγκέντρωση των ενώσεων ανεξάρτητα από το στέλεχος που χρησιμοποιείται. Σύμφωνα με τους Pire et al.(2014), η αύξηση της θερμοκρασία προωθεί την σύνθεση των ανώτερων αλκοολών. Ειδικότερα, οι Yukiko et al.(2001) απέδειξαν πως σε υψηλότερες θερμοκρασίες ζυμώσεων, υπάρχουν μεγαλύτερες ποσότητες φαινυλαιθανόλη και ισοαμυλικός αλκοόλης λόγω της υπερ έκφρασης των γονιδίων παραγωγής τους. Επίσης, η παραγωγή των πτητικών ενώσεων κατά την πειραματική διαδικασία σε ζύμωση με *Z.Bailii*, κρίνεται ικανοποιητική και στα τρία υποστρώματα. Ειδικότερα, στις ζυμώσεις με το μείγμα των σακχάρων, παρατηρείται πολύ μεγαλύτερη παραγωγή από το συγκεκριμένο στέλεχος συγκριτικά με τον συμβατικό σακχαρομύκητα, καθώς παρατηρείται και η μεγαλύτερη συγκέντρωση των δύο αυτών ενώσεων. Πιο συγκεκριμένα, όπου η ισοαμυλική αλκοόλη απαντάται στα $9\pm 0,02$ mg/L και η φαινυλαιθανόλη συγκεντρώνεται στα $9,54\pm 0,00$ mg/L στους 20°C .





Διάγραμμα 6: Η συγκέντρωση των ανώτερων αλκοολών(mg/L) στην ζύμωση με το εκάστοτε σάκχαρο και στις δυο θερμοκρασίες στις ζυμώσεις με τα στελέχη *Saccharomyces cerevisiae* και *Zygosaccharomyces Bailii*.

Συμπερασματικά, ο *Zygosaccharomyces Bailii* τείνει να παράγει μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στην πλειοψηφία των δειγμάτων, ενώ παράλληλα φαίνεται να παρουσιάζει προτίμηση στο μείγμα σακχάρων, όπου και παράγει τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ανώτερων αλκοολών.

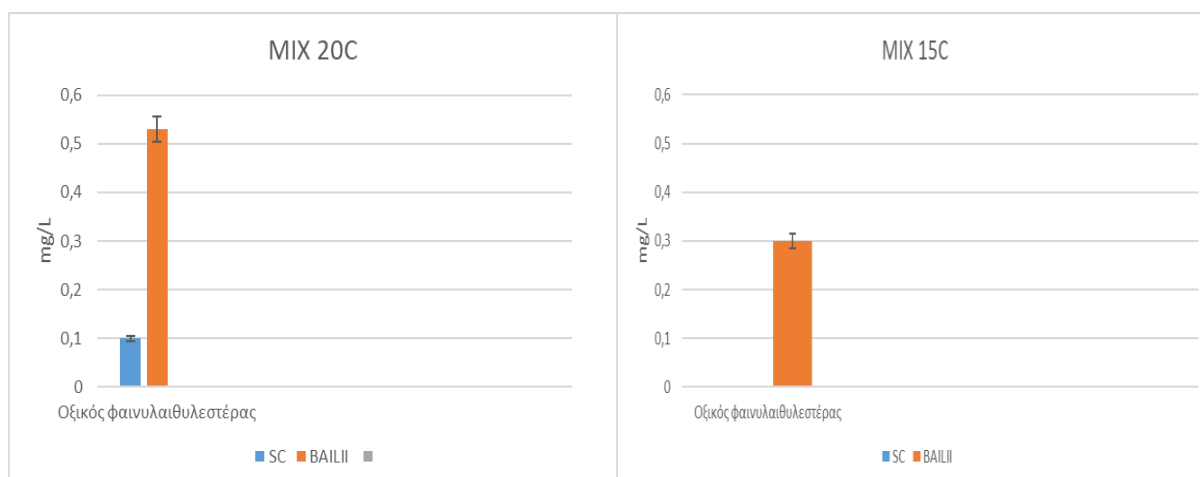
Όμως, τα δείγματα παρουσιάζουν συγκεντρώσεις χαμηλότερες από τα όρια αντίληψης της της ισοαμυλικής αλκοόλης και της φαινυλαιθανόλη (65 και 40 mg/L αντίστοιχα).

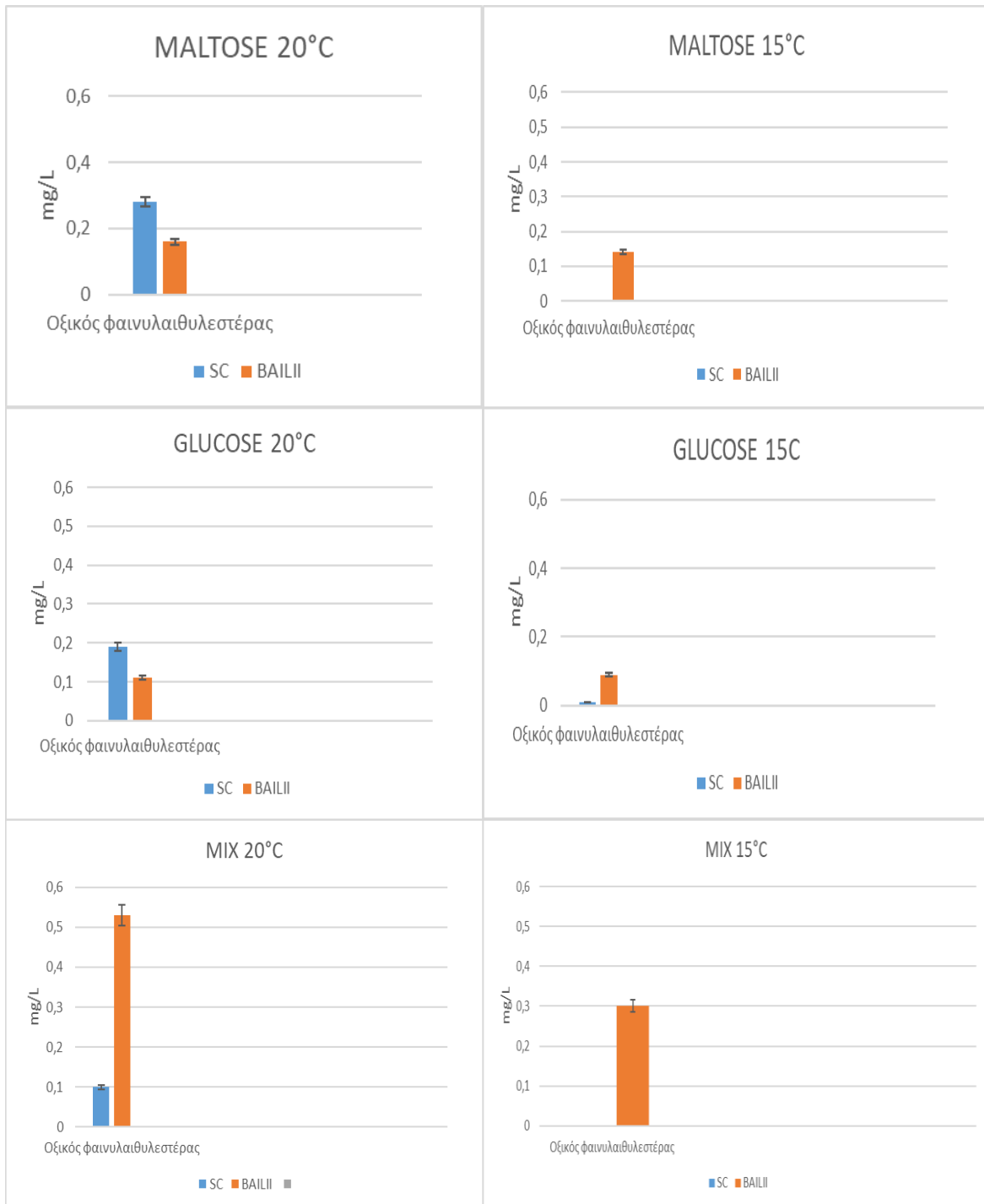
5.7.2 Οξικοί εστέρες

Αρχικά, οι ανώτερες αλκοόλες που προαναφέρθηκαν, εκτός από την συμβολή τους στα αρωματικά χαρακτηριστικά του παραγόμενου προϊόντος, αποτελούν δυνητικό υπόστρωμα για την παραγωγή οξικών εστέρων. Μερικοί από τους παράγοντες που καθορίζουν το συγκεκριμένο φαινόμενο είναι η παρουσία ενζύμων που είτε συνθέτουν είτε διασπούν τους εστέρες, η συγκέντρωση του ακετυλο-coA και μιας ανώτερης αλκοόλης καθώς και η συγκέντρωση των δυο υποστρωμάτων (Dufour et al 2008).

Στο παρόν πείραμα, μελετήθηκε ο οξικός φαινυλαιθυλεστέρας, ο οποίος παρατηρήθηκε πως επηρεάζεται από την θερμοκρασία που επικρατεί στην εκάστοτε ζύμωση. Είναι χαρακτηριστικό πως στους 20°C, υπάρχει σημαντικά μεγαλύτερη παραγωγή του εστέρα, ανεξάρτητα από το στέλεχος που χρησιμοποιείται. Πιο συγκεκριμένα, η ζύμωση με *Z.bailii* στο μείγμα σακχάρων στους 20°C, παράγει υψηλή συγκέντρωση 0,53±0,10 mg/L αποτελώντας την μεγαλύτερη συγκέντρωση από όλα τα υπόλοιπα δείγματα. Όμως, οι ζυμώσεις στους 15°C, έχουν σαν υψηλότερη ποσότητα το 0,30±0,04 mg/L (*Z.bailii* μείγμα) με τις επόμενες μετρήσεις να απαντώνται ακόμη χαμηλότερα. Αυτό το γεγονός, αποδίδεται από την βιβλιογραφία (Dufour et al 2008) στην ταχύτερη ζύμωση σε υψηλότερες θερμοκρασίες, όπου χρησιμοποιείται το υπάρχον ακετυλο-coA για τις ανάγκες σε βιομάζα με αποτέλεσμα να μην υπάρχει η ίδια διαθεσιμότητα για την παραγωγή των εστέρων. Πάντως, το κατώφλι αντίληψης του συγκεκριμένου οξικού εστέρα είναι αρκετά υψηλότερο από αυτό που παρήχθησε (3,8 mg/L), γεγονός που μας οδηγεί στο συμπέρασμα πως δεν επηρέασε σημαντικά σε επίπεδο αρωματικού προφίλ τα δείγματα που αναλύθηκαν.

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί πως ο *Z.bailii* παράγει στην χαμηλότερη θερμοκρασία πολύ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από τον μάρτυρα, αποδिकνύοντας την συμβολή μιας *non-Saccharomyces* ζύμης στην διαμόρφωση του αρωματικού προφίλ ενός οίνου, αλλά και τονίζει την προτίμηση του εξεταζόμενου στελέχους στην χαμηλότερη θερμοκρασία ζύμωσης.





Διάγραμμα 7: Η συγκέντρωση του οξικού φαινυλαιθυλεστέρα στην ζύμωση με το εκάστοτε σάκχαρο και στις δυο θερμοκρασίες στις ζυμώσεις με τα στελέχη *Saccharomyces cerevisiae* και *Zygosaccharomyces Bailii*.

5.7.3 Λιπαρά οξέα μεσαίας αλυσίδας (MCFA) και οι εστέρες τους

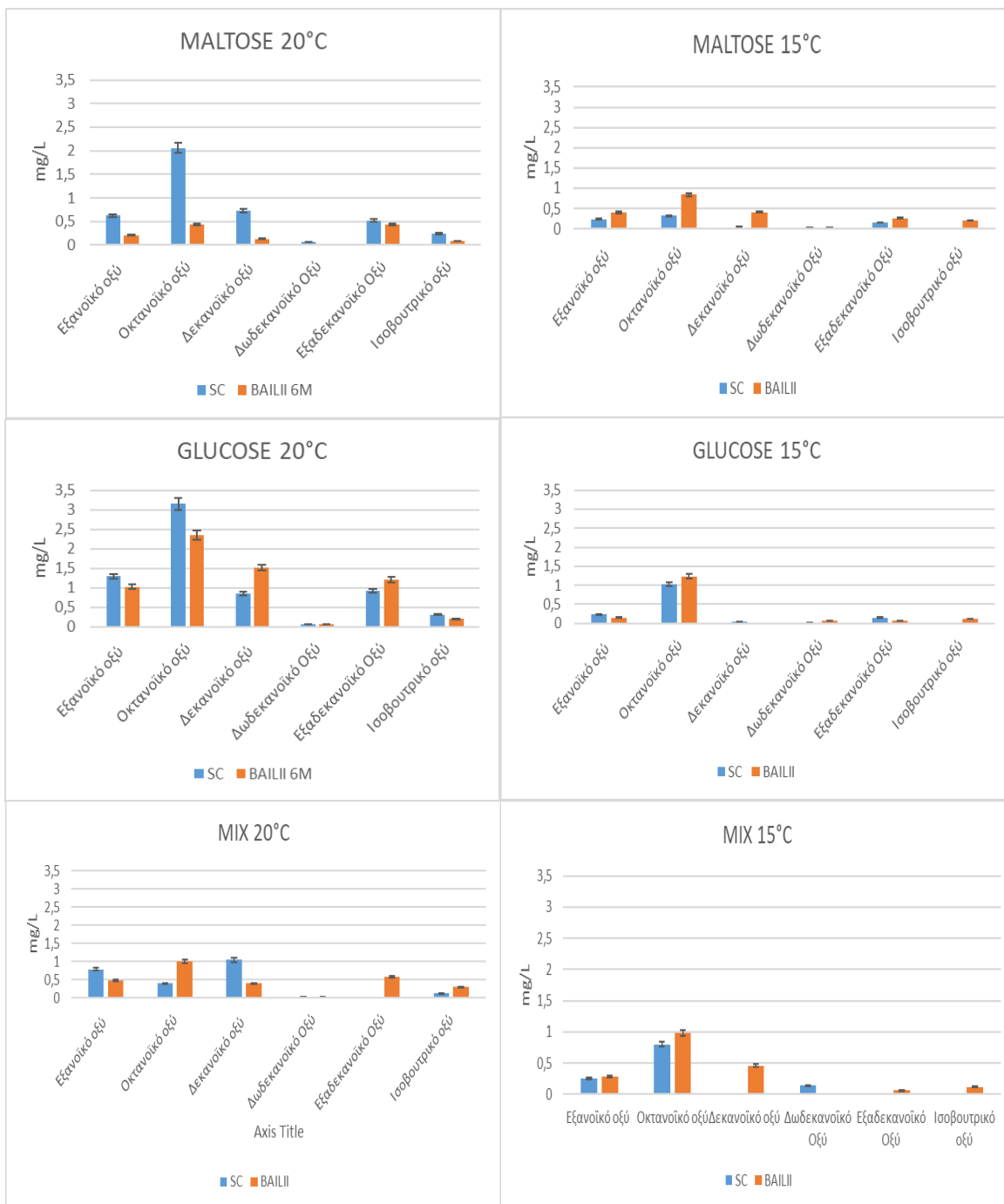
5.7.3.1 Λιπαρά οξέα μεσαίας αλυσίδας (MCFA)

Τα λιπαρά οξέα μεσαίας αλυσίδας είναι ενδιάμεσα προϊόντα επομένως, η συγκέντρωσή τους σε μια ζύμωση δεν εξαρτάται μόνο από το στέλεχος που χρησιμοποιείται αλλά και από την χρήση τους στην σύνθεση των λιπαρών οξέων. (Pires et al. 2014).

Σε αυτό το πείραμα, ανιχνεύθηκαν το ισοβουτυρικό οξύ, το εξανοϊκό οξύ, το οκτανοϊκό οξύ, το δεκανοϊκό οξύ, το δωδεκανοϊκό οξύ και το δεκαεξανοϊκό οξύ. Παρατηρώντας τις συγκεντρώσεις των οξέων, το οκτανοϊκό οξύ παράγεται με σημαντική διαφορά σε υψηλότερες συγκεντρώσεις από τις υπόλοιπες ενώσεις. Όπως διακρίνεται στο διάγραμμα 8, ο *Zygosaccharomyces Bailii* παράγει στην χαμηλότερη θερμοκρασία μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από τον μάρτυρα. Αναφορικά με το οκτανοϊκό οξύ, όταν χρησιμοποιήθηκαν σαν υποστρώματα το μείγμα και η μαλτόζη, ανιχνεύθηκε μικρότερη συγκέντρωση σε σχέση με την γλυκόζη, όπου παρουσιάζει τελική τιμή στα $1,2 \pm 0,10$ mg/L. Στην συγκέντρωση των υπολοίπων ενώσεων που μελετήθηκαν, υπήρξε ικανοποιητική παραγωγή σε ζυμώσεις με μείγμα σακχάρων και μαλτόζη, ξεπερνώντας την τιμή που παρήγαγε η ζύμωση με την γλυκόζη.

Στις ζυμώσεις των 20°C με *Z.bailii* να επιφέρει ικανοποιητικά αποτελέσματα, και στην υψηλή θερμοκρασία ζύμωσης, σε μείγμα και γλυκόζη, με το εξεταζόμενο στέλεχος να μην εμφανίζει σημαντικές διαφορές σχετικά με τον μάρτυρα. Αξίζει να σημειωθεί το γεγονός πως για τα περισσότερα MCFAs και τις ζυμώσεις με μαλτόζη, η θερμοκρασία φαίνεται να επηρεάζει την παραγωγή των αρωματικών ενώσεων αυτών, όπου με την αύξηση της θερμοκρασίας παρατηρούνται μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Επιπλέον, μεταξύ των θερμοκρασιών, παρουσιάζονται διακυμάνσεις στις ποσότητες που παράγονται σχεδόν σε όλα τα οξέα και για τα δύο στελέχη. Αυτό που φαίνεται να ισχύει για τα λιπαρά οξέα, είναι ότι η βέλτιστη παραγωγή θα επιτευχθεί από τον σωστό συνδυασμό στελέχους, θερμοκρασίας αλλά και σακχάρου, καθώς η εκάστοτε ζύμη αντιδρά διαφορετικά σε κάθε συνθήκη.

Όσον αφορά στο δεκανοϊκό οξύ, υπάρχει χαμηλότερη παραγωγή από το κατώφλι ανίχνευσης του (10 mg/L) σε όλα τα δείγματα (Michel et al, 2016). Επίσης, η αρκετά χαμηλότερη συγκέντρωση εξανοϊκού οξέος κυρίως σε ζυμώσεις με *Z.bailii* και στα υποστρώματα ανεξαρτήτως σακχάρου, είναι ενδιαφέρουσα αν και υψηλή η αρχική τους συγκέντρωση αποτελεί αρνητικό στοιχείου στο αρωματικό προφίλ του προϊόντος, αποτελεί υπόστρωμα προς εστεροποίηση, που δυνητικά θα ενισχύσει τον φρουτώδη χαρακτήρα. Τέλος, για το βουτυρικό οξύ, σε όλες τις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν, ανιχνεύθηκε σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες από το κατώφλι ανίχνευσης (0,4 mg/L) (Sheridan et al.2003) και κρίνεται πως δεν επηρεάζει το αρωματικό τους προφίλ.

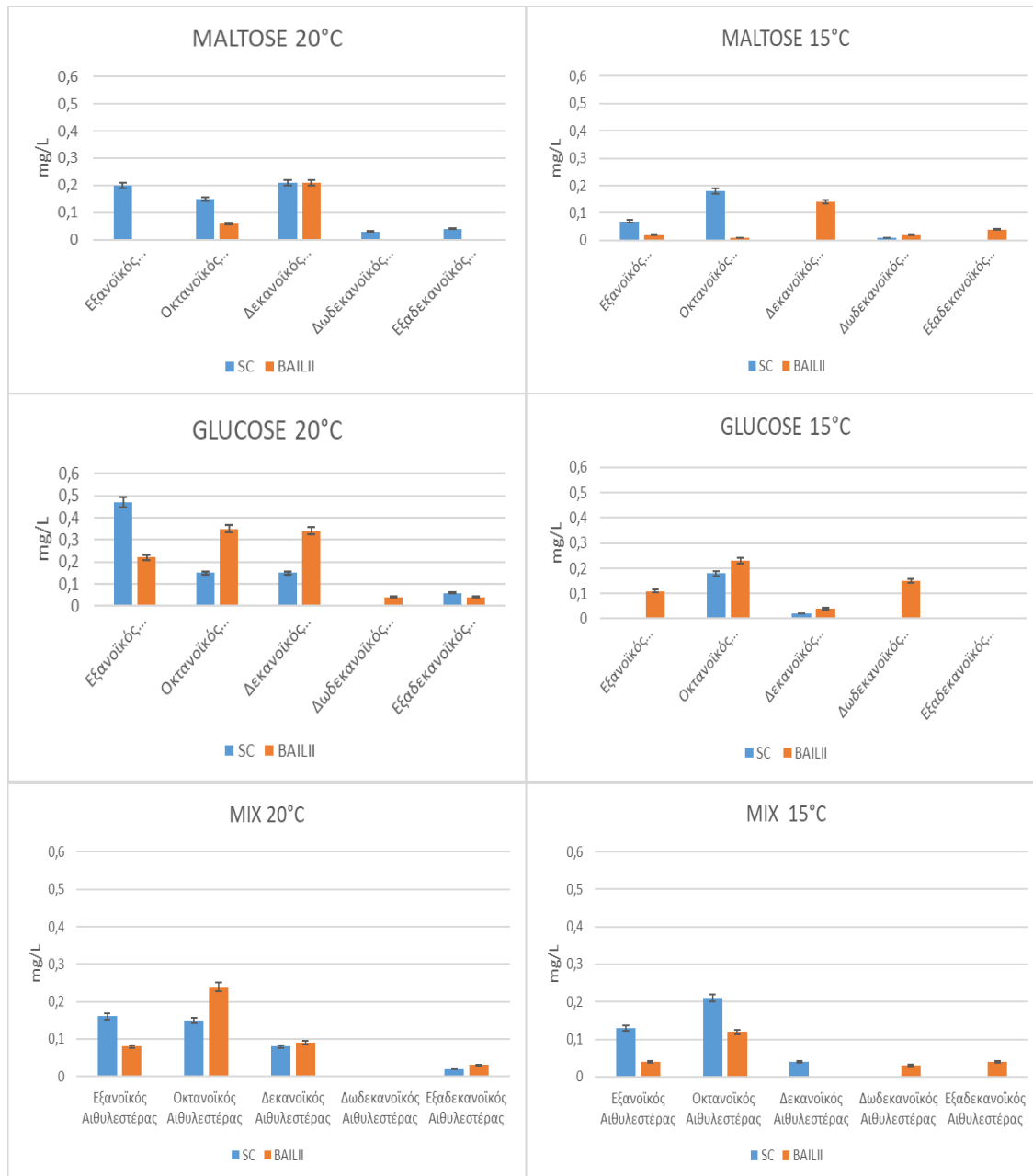


Διάγραμμα 8: Οι συγκεντρώσεις των MCFAs στην ζύμωση με το εκάστοτε σάκχαρο και στις δυο θερμοκρασίες στις ζυμώσεις με τα στελέχη *Saccharomyces cerevisiae* και *Zygosaccharomyces Bailii*.

5.7.3.2 Οι εστέρες των λιπαρών οξέων

Αναφορικά με τους εστέρες των λιπαρών οξέων που αναλύθηκαν, αξίζει να σημειωθεί πως η αντίδραση παραγωγής των παραπάνω ενώσεων(εστεροποίηση) εξαρτάται τόσο από την θερμοκρασία, όσο και από το στέλεχος της ζύμης που χρησιμοποιείται. Είναι γνωστό πως η αύξηση της θερμοκρασίας, ωφελεί την αύξηση στην συγκέντρωση των εστέρων, όμως κάθε στέλεχος αντιδρά διαφορετικά σε αυτή την συνθήκη. Πιο συγκεκριμένα, στο πείραμα που διεξήχθη, παρατηρούνται μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στους 20°C. Ο *Z. bailii*, σαν φρουκτόφιλος μύκητας, είναι λογικό να παρουσιάζει μια προτίμηση στο μείγμα, καθώς είναι και το μόνο που περιέχει την φρουκτόζη σαν σάκχαρο, όπου και κρίνεται πιο αποτελεσματικός στην υψηλότερη θερμοκρασία. Ομοίως, ισχύει και για τα δείγματα που περιέχουν σαν πηγή σακχάρων μαλτόζη, όπου η υψηλή συγκέντρωση έχει μεγαλύτερες τιμές, με κορυφαία την μέτρηση του δεκανοϊκού αιθυλεστέρα στα $0,21 \pm 0,01$ mg/L στην ζύμωση με μαλτόζη.

Όσον αφορά τους 20°C, παρατηρείται συγκέντρωση εξανοϊκού αιθυλεστέρα πάνω από το όριο αντίληψης(0,23 mg/L) σε γλυκόζη και στα δύο δείγματα, ενώ στην μαλτόζη η ζύμωση με *Z. bailii* απαντάται κάτω από το όριο, σε αντίθεση με τον μάρτυρα όπου παρήχθησε μεγαλύτερη ποσότητα, ακριβ στο όριο αντίληψης(0,2 mg/L). Για τον δεκανοϊκό αιθυλεστέρα, προσδίδει φρουτώδη αρώματα στον οίνο και αρώματα μήλου βελτιώνοντας το αρωματικό προφίλ του προϊόντος που θα παραχθεί. Εδώ, παρατηρούνται παρόμοιες συγκεντρώσεις σε γλυκόζη και μαλτόζη και στα δυο στελέχη. Η συγκέντρωση του οκτανοϊκού αιθυλεστέρα παρουσιάζει διακυμάνσεις μεταξύ των σακχάρων. Στην ζύμωση με γλυκόζη στους 20°C δείχνει μια διαφορά της τάξης των 0,2 mg/L με τον *Z.bailii* να παράγει μεγαλύτερη συγκέντρωση, ενώ εκεί που ζυμώθηκε η μαλτόζη, παρουσιάζεται μεγαλύτερη η συγκέντρωση που παράγει ο *Saccharomyces cerevisiae* με διαφορά απο τον *Z.bailii* κατά 0,1 mg/L. Τέλος, φαίνεται η υψηλή θερμοκρασία να είναι παραπάνω αποτελεσματική για την συγκεκριμένη ανάλυση και ο *Z.bailii* παρουσίασε ικανοποιητικά αποτελέσματα για την πλεονόττα των ενώσεων και των σακχάρων, με χαρακτηριστική εξαίρεση το υπόστρωμα της μαλτόζης που πέρα από την αποδεκτή συγκέντρωση δεκανοϊκού αιθυλεστέρα, οι υπόλοιπες ενώσεις παρήχθησαν σε μη αναμενόμενες ποσότητες.



Διάγραμμα 9: Οι συγκεντρώσεις των εστέρων των MCFA στην ζύμωση με το εκάστοτε σάκχαρο και στις δυο θερμοκρασίες στις ζυμώσεις με τα στελέχη *Saccharomyces cerevisiae* και *Zygosaccharomyces Bailii*.

5.7.4 Λοιπές αρωματικές ενώσεις

Οι ζύμες έχουν την τάση να καταναλώνουν πρωτεΐνες με σειρά προτίμησης. Πρώτα, καταναλώνεται η τρυπτοφάνη και η τυροσίνη, οι οποίες αποτελούν πρόδρομες ενώσεις της τρυπτοφάνης και της τυροσίνης αντίστοιχα. Στην οινολογία, έχουν μεγάλη συνεισφορά στον ανθικό χαρακτήρα του οίνου κι έχουν κατώτατα όρια συγκέντρωσης 200 mg/L και 10 mg/L αντίστοιχα, σύμφωνα με τους Li et al (2008).

Στο παρόν πείραμα, απεικονίζονται στον πίνακα 4 παρατηρούμε πως η τρυπτοφόλη απαντάται, στην πλειοψηφία των δειγμάτων να έχουν ανιχνεύσει την εν λόγω ουσία. Παρατηρείται πως αυξημένες συγκεντρώσεις υπάρχουν στις ζυμώσεις του *Zygosaccharomyces Bailii* και ειδικότερα στην υψηλή θερμοκρασία, ανεξαρτήτως σακχάρου.

Ύστερα, ανιχνεύτηκαν ποσότητες μιας ακόμη σημαντικής πτητικής ένωσης για τον οίνο, του οξικού οξέος. Το οξικό οξύ συμβάλλει συνήθως αρνητικά στον οίνο, τόσο στο αρωματικό προφίλ, όσο και στην ζύμωση καθώς η αύξηση του μαρτυρά τυχόν οξικές ζυμώσεις, οι οποίες οδηγούν σε υποβάθμιση του προϊόντος (Engan 1974). Πάντως, στο πείραμα που πραγματοποιήθηκε, εμφανίζεται σε πολύ μικρές ποσότητες-γεγονός που ερμηνεύεται θετικά- με μέγιστη τιμή συγκέντρωσης τα $0,29 \pm 0,0$ mg/L στους 20°C , με υπόστρωμα του *Z.bailii* την γλυκόζη. Σύμφωνα με τους Bisson et al. 1993, το στέλεχος έχει την τάση να παράγει μεγαλύτερες συγκεντρώσεις οξικού οξέος, ως παραπροϊόν της αλκοολικής ζύμωσης.

COMPOUNDS	RT	mg/L								
		15C 6M Bailii			20C 6M Bailii			20C 6M SC		
		M	G	MIX	M	G	MIX	M	G	MIX
Acetic acid	16,57	$0,0 \pm 0,00$	$0,18 \pm 0,10$	$0,0 \pm 0,00$	$0,03 \pm 0,01$	$0,29 \pm 0,10$	$0,03 \pm 0,00$	$0,0 \pm 0,00$	$0,0 \pm 0,00$	$0,02 \pm 0,01$
Tryptophol	85,30	$12 \pm 0,00$	$0,03 \pm 0,01$	$0,0 \pm 0,00$	$0,08 \pm 0,02$	$0,03 \pm 0,00$	$0,22 \pm 0,01$	$0,07 \pm 0,02$	$0,03 \pm 0,00$	$0,01 \pm 0,00$

Πίνακας 4: Οι συγκεντρώσεις άλλων σημαντικών πτητικών ενώσεων σε ζυμώσεις με τα στελέχη *Saccharomyces cerevisiae* και *Zygosaccharomyces Bailii* και σε θερμοκρασίες 20°C και 15°C .

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΕΠΙΛΟΓΟΣ

Συμπερασματικά, ο *Zygosaccharomyces Bailii*, είναι ικανός να ζυμώσει όλα τα κύρια σάκχαρα που χρησιμοποιήθηκαν σαν υποστρώμα και στους 20°C αλλά και στους 15°C. Αρχικά, στην ανάπτυξη πληθυσμού, παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο θερμοκρασιών, εμφανίζοντας ταχύτερη ανάπτυξη σε σχέση με τους 15°C. Αναφορικά με τον πληθυσμό του $1 \cdot 10^6$ κύτταρα/ml., η ζύμωση με τον *Zygosaccharomyces Bailii*, παρουσιάζει υψηλές συγκεντρώσεις και πιο ταχεία περάτωση της ζύμωσης σε όλα τα σάκχαρα, ενώ εμφανίζει μεγάλες συγκεντρώσεις η ζύμωση του μίγματος σε όλες τις συνθήκες στο συγκεκριμένο στέλεχος, εμφανίζοντας προτίμηση στην υψηλότερη θερμοκρασία. Στα $6 \cdot 10^6$ κύτταρα/ml, ο *Zygosaccharomyces Bailii*, εμφανίζει μειωμένο ρυθμό ζύμωσης συγκριτικά με τον συμβατικό σακχαρομύκητα. Παρόλα αυτά, οι τελικοί πληθυσμοί των δειγμάτων ήταν μικρότεροι από το αναμενόμενο, γεγονός που προκαλεί προβληματισμό και αντίθεση σε σχέση με την βιβλιογραφία.

Στην κατανάλωση σακχάρων, όλα τα δείγματα παρουσίασαν τα προσδοκώμενα αποτελέσματα, με εναπομείναντα σάκχαρα < 3 g/L αποδεικνύοντας πως η ζύμωση ήταν επιτυχής. Επιπλέον, στην κατανάλωση αφομοιώσιμου αμμωνιακού αζώτου (FAN), δεν δείχνει μεγάλες αποκλίσεις μεταξύ των δύο στελεχών, ανεξαρτήτου θερμοκρασίας, με μεγαλύτερη διαφορά να φαίνεται στο μείγμα σακχάρων της χαμηλότερης θερμοκρασίας όπου ο *Zygosaccharomyces Bailii* να έχει μικρότερη ανάγκη σε άζωτο, αφήνοντας υπολειμματικό με μια διαφορά της τάξης των 40 mg/L. Γενικότερα, στην εν λόγω μέτρηση βέβαια, παρατηρείται ικανοποιητική προσαρμογή και ρυθμός κατανάλωσης από το εξεταζόμενο στέλεχος

Όσον αφορά στην μέτρηση οξύτητας και pH όπου επαληθεύεται η βιβλιογραφική αναφορά πως ο *Zygosaccharomyces Bailii*, έχει την τάση να μειώνει το pH στα όρια του 3-3,5. Στην παραγωγή αιθανόλης, ο *Zygosaccharomyces Bailii* είναι ικανός να παράγει %vol χωρίς να ξεπερνά τον *S.cerevisiae*.

Στην πλειονότητα των των πτητικών ενώσεων που μελετήθηκαν (MCFA και εστέρες τους, οξικοί εστέρες, ανώτερες αλκοόλες), ο *Zygosaccharomyces Bailii* παράγει ικανοποιητικές και συχνά μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από τον συμβατικό σακχαρομύκητα. Επίσης, υψηλότερες συγκεντρώσεις παρατηρούνται στο μείγμα σακχάρων, ενώ δίνει μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στην χαμηλότερη θερμοκρασία. Από τα αποτελέσματα της αρωματικής ανάλυσης κρίνεται πως υπάρχει ένας διακριτικός φρουτώδεις χαρακτήρας μήλου (λόγω ικανοποιητικής συγκέντρωσης δεκανοϊκού και οκτανοϊκού αιθυλεστέρα) με τιμές κάτω από τα όρια αντίληψης μεν αλλά υψηλότερα από τα υπόλοιπα δείγματα στο μείγμα.

Ο συνδυασμός των αποτελεσμάτων ως προς την ανάπτυξης πληθυσμού κατανάλωσης σακχάρων, και αζώτου, τελικού pH και ποσοστού παραγόμενης αιθανόλη, υποδεικνύει τις ορατές διαφορές μεταξύ των δύο στελεχών, αλλά οδηγεί στο συμπέρασμα πως ο *Zygosaccharomyces Bailii* μπορεί να αποδώσει ικανοποιητικά και άρα δύναται να χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτική ζύμη σε μελλοντικές ζυμώσεις, τόσο

σε καθαρή καλλιέργεια, όσο και σε μικτή ζύμωση. Τέλος, παρατηρείται πως ο *Zygosaccharomyces Bailii* μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε μικρότερη αρχικής συγκέντρωση πληθυσμού ($1 \cdot 10^6$ κύτταρα/ml) για λόγους αειφορίας και μείωση της υπερχρησιμοποίησης των πρώτων υλών, αλλά αυτός ο ισχυρισμός χρειάζεται να μελετηθεί περαιτέρω.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Andorrà, I., Berradre, M., Rozès, N., Mas, A., Guillamón, J. M., & Esteve-Zarzoso, B. (2010). Effect of pure and mixed cultures of the main wine yeast species on grape must fermentations. *European Food Research and Technology*, 231(2), 215-224.
- 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*, 174(6), 2048-2057.
- Barnett, J. A., & Entian, K. D. (2005). A history of research on yeasts 9: regulation of sugar metabolism 1. *Yeast*, 22(11), 835-894.
- Berlowska, J., Kregiel, D., & Rajkowska, K. (2015). Biodiversity of brewery yeast strains and their fermentative activities. *Yeast*, 32(1), 289-300.
- Bond, U. (2009). The genomes of lager yeasts. *Advances in applied microbiology*, 69, 159-182.
- Buamah, R., Dzogbefia, V. P., & Oldham, J. H. (1997). Pure yeast culture fermentation of cocoa (*Theobroma cacao* L): effect on yield of sweatings and cocoa bean quality. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13(4), 457-462.
- Buser, C. C., Newcomb, R. D., Gaskett, A. C., & Goddard, M. R. (2014). Niche construction initiates the evolution of mutualistic interactions. *Ecology Letters*, 17(10), 1257-1264.
- Carbonetto, B., Ramsayer, J., Nidelet, T., Legrand, J., & Sicard, D. (2018). Bakery yeasts, a new model for studies in ecology and evolution. *Yeast*, 35(11), 591-603.
- Cavaliere, D., McGovern, P. E., Hartl, D. L., Mortimer, R., & Polsinelli, M. (2003). Evidence for *S. cerevisiae* fermentation in ancient wine. *Journal of molecular evolution*, 57(1), S226-S232.
- Cho, I. H., & Peterson, D. G. (2013). Erratum to: Chemistry of bread aroma: A review. *Food Science and Biotechnology*, 22(5), 1-1.
- Ciani, M., & Comitini, F. (2011). Non-Saccharomyces wine yeasts have a promising role in biotechnological approaches to winemaking. *Annals of microbiology*, 61(1), 25-32.
- Čuček, L., Klemeš, J. J., & Kravanja, Z. (2012). A review of footprint analysis tools for monitoring impacts on sustainability. *Journal of Cleaner Production*, 34, 9-20.

- Čuček, L., Klemeš, J. J., Varbanov, P. S., & Kravanja, Z. (2013). Dealing with high-dimensionality of criteria in multiobjective optimization of biomass energy supply network. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, *52*(22), 7223-7239.
- Čuček, L., Varbanov, P. S., Klemeš, J. J., & Kravanja, Z. (2012). Total footprints-based multi-criteria optimisation of regional biomass energy supply chains. *Energy*, *44*(1), 135-145.
- De Benedetto, L., & Klemeš, J. (2008). LCA as an environmental assessment tool in waste to energy and contribution to occupational health and safety. *Chemical Engineering Transactions*, *13*, 343-350.
- De Deken, R. H. (1966). The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. *Microbiology*, *44*(2), 149-156.
- De Vuyst, L., & Weckx, S. (2016). The cocoa bean fermentation process: from ecosystem analysis to starter culture development. *Journal of Applied Microbiology*, *121*(1), 5-17.
- 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.
- Fang, K., Heijungs, R., & de Snoo, G. R. (2014). Theoretical exploration for the combination of the ecological, energy, carbon, and water footprints: Overview of a footprint family. *Ecological Indicators*, *36*, 508-518.
- Fleet, G. H. (2007). Yeasts in foods and beverages: impact on product quality and safety. *Current opinion in biotechnology*, *18*(2), 170-175.
- Galeote, V., Bigey, F., Devillers, H., Neuvéglise, C., & Dequin, S. (2013). Genome sequence of the food spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii* CLIB 213T. *Genome Announcements*, *1*(4), e00606-13.
- Galeote, V., Novo, M., Salema-Oom, M., Brion, C., Valério, E., Gonçalves, P., & Dequin, S. (2010). FSY1, a horizontally transferred gene in the *Saccharomyces cerevisiae* EC1118 wine yeast strain, encodes a high-affinity fructose/H⁺ symporter. *Microbiology*, *156*(12), 3754-3761.
- Galli, A., Weinzettel, J., Cranston, G., & Ercin, E. (2013). A footprint family extended MRIO model to support Europe's transition to a one planet economy. *Science of the total environment*, *461*, 813-818.

Gélinas, P. (2016). Aeration and foam control in baker's yeast production: mapping patents. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(2), 371-391.

Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., ... & Oliver, S. G. (1996). Life with 6000 genes. *Science*, 274(5287), 546-567.

Gombert, A. K., Moreira dos Santos, M., Christensen, B., & Nielsen, J. (2001). Network identification and flux quantification in the central metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* under different conditions of glucose repression. *Journal of bacteriology*, 183(4), 1441-1451.

Hahn-Hägerdal, B., Karhumaa, K., Larsson, C. U., Gorwa-Grauslund, M., Görgens, J., & Van Zyl, W. H. (2005). Role of cultivation media in the development of yeast strains for large scale industrial use. *Microbial cell factories*, 4(1), 1-16.

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.

Heitmann, M., Zannini, E., & Arendt, E. (2018). Impact of *Saccharomyces cerevisiae* metabolites produced during fermentation on bread quality parameters: A review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 58(7), 1152-1164.

Hittinger, C. T., Steele, J. L., & Ryder, D. S. (2018). Diverse yeasts for diverse fermented beverages and foods. *Current opinion in biotechnology*, 49, 199-206.

Jespersen, L., Nielsen, D. S., Hønholt, S., & Jakobsen, M. (2005). Occurrence and diversity of yeasts involved in fermentation of West African cocoa beans. *FEMS yeast research*, 5(4-5), 441-453.

Johnson, E. A. (2013). Biotechnology of non-*Saccharomyces* yeasts—the ascomycetes. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(2), 503-517.

Jolly, N. P., Augustyn, O. P. R., & Pretorius, I. S. (2003). The effect of non-*Saccharomyces* yeasts on fermentation and wine quality. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 24(2), 55-62.

Kalathenos, P., Sutherland, J. P., & Roberts, T. A. (1995). Resistance of some wine spoilage yeasts to combinations of ethanol and acids present in wine. *Journal of Applied Bacteriology*, 78(3), 245-250.

Kravanja, Z., & Čuček, L. (2013). Multi-objective optimisation for generating sustainable solutions considering total effects on the environment. *Applied Energy*, 101, 67-80.

Kuanyshev, N., Adamo, G. M., Porro, D., & Branduardi, P. (2017). The spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii*: Foe or friend? *Yeast*, 34(9), 359-370.

Kurtzman, C. P., & Robnett, C. J. (2003). Phylogenetic relationships among yeasts of the 'Saccharomyces complex determined from multi gene sequence analyses. *FEMS yeast research*, 3(4), 417-432.

Kurtzman, C. P., Fell, J. W., & Boekhout, T. (Eds.). (2011). *The yeasts: a taxonomic study*. Elsevier.

Leyva, J. S., Manrique, M., Prats, L., Loureiro-Dias, M. C., & Peinado, J. M. (1999). Regulation of fermentative CO₂ production by the food spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii*. *Enzyme and microbial technology*, 24(5-6), 270-275.

Liang MH, & Jiang JG., (2013). Advancing oleaginous microorganisms to produce lipid via metabolic engineering technology. *Progress in Lipid Research*, 52, 395-408.

Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., Barata, A., & Costa, A. (2008). Evaluation of the inhibitory effect of dimethyl dicarbonate (DMDC) against wine microorganisms.

Marsit, S., & Dequin, S. (2015). Diversity and adaptive evolution of *Saccharomyces* wine yeast: a review. *FEMS Yeast Research*, 15(7), fov067.

Martini, A. (1993). Origin and domestication of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Wine research*, 4(3), 165-176.

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.

Mateo, J. J., Jimenez, M., Huerta, T., & Pastor, A. (1991). Contribution of different yeasts isolated from musts of Monastrell grapes to the aroma of wine. *International Journal of Food Microbiology*, 14(2), 153-160.

McGovern, P. E., Glusker, D. L., Exner, L. J., & Voigt, M. M. (1996). Neolithic resonated wine. *Nature*, 381(6582), 480-481.

Merico, A., Capitanio, D., Vigentini, I., Ranzi, B. M., & Compagno, C. (2003). Aerobic sugar metabolism in the spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii*. *FEMS Yeast Research*, 4(3), 277-283.

Mortimer, R., & Polsinelli, M. (1999). On the origins of wine yeast. *Research in microbiology*, 150(3), 199-204.

Mota-Gutierrez, J., Barbosa-Pereira, L., Ferrocino, I., & Cocolin, L. (2019). Traceability of functional volatile compounds generated on inoculated cocoa fermentation and its potential health benefits. *Nutrients*, 11(4), 884.

- Otterstedt, K., Larsson, C., Bill, R. M., Ståhlberg, A., Boles, E., Hohmann, S., & Gustafsson, L. (2004). Switching the mode of metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO reports*, 5(5), 532-537.
- Padilla, B., Gil, J. V., & Manzanares, P. (2016). Past and future of non-*Saccharomyces* yeasts: From spoilage microorganisms to biotechnological tools for improving wine aroma complexity. *Frontiers in microbiology*, 7, 411.
- Park, H., & Bakalinsky, A. T. (2000). SSU1 mediates sulphite efflux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 16(10), 881-888.
- Patelski, P., Berłowska, J., Dziugan, P., Pielech-Przybylska, K., Balcerek, M., Dziekonska, U., & Kalinowska, H. (2015). Utilisation of sugar beet bagasse for the biosynthesis of yeast SCP. *Journal of Food Engineering*, 167, 32-37.
- Pérez-Torrado, R., Gamero, E., Gómez-Pastor, R., Garre, E., Aranda, A., & Matallana, E. (2015). Yeast biomass, an optimized product with myriad applications in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 46(2), 167-175.
- 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.
- Pretorius, I. S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*, 16(8), 675-729.
- Pretorius, I. S., Van der Westhuizen, T. J., & Augustyn, O. P. H. (1999). Yeast biodiversity in vineyards and wineries and its importance to the South African wine industry. A review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 20(2), 61-70.
- Probst, K. V., Schulte, L. R., Durrett, T. P., Rezac, M. E., & Vadlani, P. V. (2016). Oleaginous yeast: a value-added platform for renewable oils. *Critical reviews in biotechnology*, 36(5), 942-955.
- Pronk, J. T., Yde Steensma, H., & Van Dijken, J. P. (1996). Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 12(16), 1607-1633.
- Purvis, B., Mao, Y., & Robinson, D. (2019). Three pillars of sustainability: in search of conceptual origins. *Sustainability science*, 14(3), 681-695.
- Rodrigues, F., Côrte-Real, M., Leão, C., van Dijken, J. P., & Pronk, J. T. (2001). Oxygen requirements of the food spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii* in synthetic and complex media. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(5), 2123-2128.

Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M., & Capece, A. (2003). Function of yeast species and strains in wine flavor. *International journal of food microbiology*, 86(1-2), 169-180.

Sadoudi, M., Tourdot-Maréchal, R., Rousseaux, S., Steyer, D., Gallardo-Chacón, J. J., Ballester, J., ... & Alexandre, H. (2012). Yeast–yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of non-Saccharomyces and Saccharomyces yeasts. *Food Microbiology*, 32(2), 243-253.

Schleicher, J., Schaafsma, M., & Vira, B. (2018). Will the Sustainable Development Goals address the links between poverty and the natural environment? *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 34, 43-47.

Schwan, R. F. (1998). Cocoa fermentations conducted with a defined microbial cocktail inoculum. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(4), 1477-1483.

Schwan, R. F., & Wheals, A. E. (2004). The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Critical reviews in food science and nutrition*, 44(4), 205-221.

Sharma, R. K., Pallakonda, S., Raju, G., Sarkar, P., Singla, E., & Singh, H. (2018). An approach to evaluate sustainability of a production process based on its LCA and environment impact analysis: A case study on a food product. *Materials today: proceedings*, 5(5), 12467-12473.

Smith, J. E. (2019). Biotechnology.

Soares, E. V. (2011). Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*: a review. *Journal of applied microbiology*, 110(1), 1-18.

Stanbury, T., Whitaker A., & Hall S.J., (1995). Principles of Fermentation Technology

Steensels, J., Snoek, T., Meersman, E., Nicolino, M. P., Voordeckers, K., & Verstrepen, K. J. (2014). Improving industrial yeast strains: exploiting natural and artificial diversity. *FEMS microbiology reviews*, 38(5), 947-995.

Stefanini, I., Dapporto, L., Legras, J. L., Calabretta, A., Di Paola, M., De Filippo, C., ... & Cavalieri, D. (2012). Role of social wasps in *Saccharomyces cerevisiae* ecology and evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(33), 13398-13403.

Stratford, M., Steels, H., Nebe-von-Caron, G., Novodvorska, M., Hayer, K., & Archer, D. B. (2013). Extreme resistance to weak-acid preservatives in the spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii*. *International journal of food microbiology*, 166(1), 126-134.

Suman, G., Nupur, M., Anuradha, S., & Pradeep, B. (2015). Single cell protein production: a review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(9), 251-262.

Thomas, D. S., & Davenport, R. R. (1985). *Zygosaccharomyces baillii*—a profile of characteristics and spoilage activities. *Food Microbiology*, 2(2), 157-169.

Thomson, J. M., Gaucher, E. A., Burgan, M. F., De Kee, D. W., Li, T., Aris, J. P., & Benner, S. A. (2005). Resurrecting ancestral alcohol dehydrogenases from yeast. *Nature genetics*, 37(6), 630-635.

Thomson, J. M., Gaucher, E. A., Burgan, M. F., De Kee, D. W., Li, T., Aris, J. P., & Benner, S. A. (2005). Resurrecting ancestral alcohol dehydrogenases from yeast. *Nature genetics*, 37(6), 630-635.

Verstrepen, K. J., Derdelinckx, G., Verachtert, H., & Delvaux, F. R. (2003). Yeast flocculation: what brewers should know. *Applied microbiology and biotechnology*, 61(3), 197-205.

Von Blottnitz, H., & Curran, M. A. (2007). A review of assessments conducted on bio-ethanol as a transportation fuel from a net energy, greenhouse gas, and environmental life cycle perspective. *Journal of cleaner production*, 15(7), 607-619.

Walker, G. M. (2004). Metals in yeast fermentation processes. *Advances in applied microbiology*, 54, 197-230.

Wood, V. K. M. R., Rutherford, K. M., Ivens, A., Rajandream, M. A., & Barrell, B. (2001). A re- annotation of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Comparative and Functional Genomics*, 2(3), 143-154.

Zott, K., Miot-Sertier, C., Claisse, O., Lombard-Funeral, A., & Masneuf-Pomarede, I. (2008). Dynamics and diversity of non-*Saccharomyces* yeasts during the early stages in winemaking. *International journal of food microbiology*, 125(2), 197-203.

UN, (2022). Sustainable Development Goals Report.

UN, (2022). Sustainable Development Goals.

UN, (2022). THE 17 GOALS.

YB Study, (2021). 5 Factors Affecting the Fermentation Process.

Zuehlke AD, Beebe K, Neckers L, Prince T. Regulation and function of the human HSP90AA1 gene. *Gene*. 2015 Oct 1;570(1):8-16