



Σχολή Επιστημών Τροφίμων

Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ, ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μελέτη της φυσιολογίας και της γενετικής της
ζύμης *Brettanomyces* και οι εφαρμογές της σε ζυμώσεις

MSc Thesis

**Study of the physiology and genetics of the yeast *Brettanomyces* and
its applications in fermentations**

Διευθυντής

Καθ. Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων (ΠΑ.Δ.Α)
Ιωάννης Τσάκνης

Κουκά Γεωργία / Kouka Georgia

Επιβλέπουσα : Μπατρίνου Ανθιμία / Batrinou Anthimia

ΑΙΓΑΛΕΩ/AIGALEO 2021



Faculty of Food Sciences
Department of Food Science and Technology

Master of Science
FOOD INNOVATION, QUALITY AND SAFETY

MSc THESIS

**Study of the physiology and genetics of the yeast
Brettanomyces and its applications in fermentations**

Kouka Georgia

19010

Supervisor : Batrinou Anthimia

AIGALEO 2021

Knowledge is power.
Information is liberating.
Education is the permiss of progress.
In every society. In every family.

Kofi Anan

Έγινε δεκτή

Ο Διευθυντής του ΠΜΣ:

Οι υπογράφωντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία (master thesis) με τίτλο “ **Μελέτη της φυσιολογίας και της γενετικής της ζύμης *Brettanomyces* και οι εφαρμογές της σε ζυμώσεις** ” που παρουσιάστηκε από την **Κουκά Γεωργία**, υποψήφια για τον μεταπτυχιακό τίτλο σπουδών στην ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ, ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

Ημερομηνία:

Όνομα επιβλέποντος: Μπατρίνου Ανθιμία

Ημερομηνία:

Όνομα μέλους εξεταστικής επιτροπής: Κοντελής Σπύρος

Ημερομηνία:

Όνομα μέλους εξεταστικής επιτροπής: Ζουμπουλάκης Παναγιώτης

Δήλωση συγγραφέα Μεταπτυχιακής εργασίας

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Κουκά Γεωργία του Εμμανουήλ με αριθμό μητρώου 19010 φοιτήτρια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών « Καινοτομία, Ποιότητα και Ασφάλει Τροφίμων » του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

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

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

Η Δηλούσα

Κουκά Γεωργία

Δήλωση περί λογοκλοπής / Copyright

Έχοντας πλήρη επίγνωση των συνεπειών του νόμου περί πνευματικής ιδιοκτησίας, δηλώνω ότι είμαι αποκλειστική συγγραφέας της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Δηλώνω, επίσης, ότι αναλαμβάνω όλες τις συνέπειες, όπως αυτές νομίμως ορίζονται, στην περίπτωση που διαπιστωθεί διαχρονικά ότι η εργασία μου αυτή ή τμήμα αυτής αποτελεί προϊόν λογοκλοπής.

Κουκά Γεωργία

Ευχαριστίες

Με το πέρας της εκπόνησης της διπλωματικής αυτής εργασίας του Μεταπτυχιακού "Καινοτομία, Ποιότητα και Ασφάλεια τροφίμων" του τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής (ΠΑ.Δ.Α) θεωρώ ότι οφείλω να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου σε όλους τους ανθρώπους που συνέβαλαν με κάθε τρόπο στην περάτωση της.

Πρώτα και κύρια, λοιπόν, οφείλω ένα τεράστιο ευχαριστώ στην Κ^α Μπατρίνου Ανθιμία, επίκουρη καθηγήτρια του εργαστηρίου Μικροβιολογίας Τροφίμων του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων για τη συμβολή της ως επιβλέπουσα καθηγήτρια της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης για τη διεξαγωγή της. Θα ήθελα να την ευχαριστήσω για την αμέριστη στήριξη της σε οτιδήποτε χρειάστηκα για την εκπόνηση της εργασίας αυτής κατά το πέρας αυτών των δύσκολων καιρών που διανύουμε αλλά και για την κατανόηση της εφόσον το χρονικό διάστημα αυτό ήταν ιδιαίτερως δύσκολο για εμένα.

Έπειτα θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συμφοιτητές μου, εκείνους που υπήρξαν κινητήριοι δύναμη καθ'ολη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών μου αλλά και την Γραμματεία του τμήματος Κ^α Έυανθία Παπαπαύλου, η οποία ήταν πάντοτε εκεί να μας στηρίζει και να συμβάλει στην προσπάθειά μας αυτή, έμπρακτα.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να εκφράσω στην οικογένεια, το συντροφο μου και τους φίλους μου, δίχως των οποίων την συμπαράσταση και την υποστήριξη δεν θα μπορούσα να ολοκληρώσω το κεφάλαιο αυτό.

Περίληψη

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η φυσιολογία, η βιοχημεία, η γενετική και η μεταβολική δραστηριότητα της ζύμης *Brettanomyces*, η οποία συμμετέχει στην αλκοολική ζύμωση και παρουσιάζει προοπτικές παραγωγής ζυμώμενων ποτών και τροφίμων. Έγινε προσπάθεια μελέτης των χαρακτηριστικών αλλά και της δράσης των μικροοργανισμών *Brettanomyces spp.* που θεωρούνται non-*Saccharomyces* ζύμες, αλλά είναι επίσης και βασικοί μικροοργανισμοί αλλοίωσης του κρασιού. Η γνώση του μικροοργανισμού αποκάλυψε ότι είναι μια ζύμη με μεγάλη ανθεκτικότητα αλλά και πολυπλοκότητα, η οποία θα μπορούσε να έχει πολλές δράσεις στη βιομηχανία. Ο *Brettanomyces spp.*, όπου συναντάται συχνά στις αυθόρμητες αλκοολικές διαδικασίες ζύμωσης, καθώς και σε αναψυκτικά, γαλακτοκομικά προϊόντα, τσάι kombucha, μαγιά και ελιές, αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τον M. Custers το 1940 και έχει υποστεί πολλές ανακατατάξεις στην ταξινόμηση του κατά τη διάρκεια των ετών, περιλαμβάνοντας 9 είδη με πιο συχνά αναφερόμενο τον *B. bruxellensis*. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη ζύμωση μπύρας δίνοντας σε αυτή ιδιαίτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και κρασιού επιδρώντας στο άρωμα και τη γεύση του με τον χαρακτηριστικά αναφερόμενο “Brett χαρακτήρα”. Πλέον μελετάται και για τη ζύμωση βιοαιθανόλης αλλά και παραπροϊόντων γάλακτος για την παραγωγή λειτουργικών τροφίμων και ποτών. Λόγω της ανθεκτικότητας του και της ανταγωνιστικής του δράσης ο *Brettanomyces spp.* μπορεί να φέρει εις πέρας ζυμώσεις οι οποίες πραγματοποιούνται υπό αντίξοες συνθήκες. Σε κάθε περίπτωση, ωστόσο, θα πρέπει να προλαμβάνεται ο κίνδυνος της επιμόλυνσης από αυτόν πέραν της ζυμωτικής διαδικασίας και κατά συνέπεια πρέπει πάντοτε να υπάρχουν διεξοδικοί τρόποι ελέγχου και περιορισμού του. Η ανάλυση κάθε χαρακτηριστικού και δράσης του *Brettanomyces spp.* είναι απαραίτητη προκειμένου να διερευνηθούν οι προοπτικές χρήσης του μικροοργανισμού αυτού στην Βιομηχανία Τροφίμων.

Abstract

The present dissertation, studies the physiology, biochemistry, genetics and metabolic activity of *Brettanomyces* yeast, which participates in alcoholic fermentation and presents prospects for the production of fermented beverages and food. An attempt it is also made to study the characteristics and the action of *Brettanomyces spp.* which is considered as a non-Saccharomyces yeast and at the same time is a key microorganism in wine spoilage. It is revealed that *Brettanomyces spp.* is a tolerant microorganism with great durability but also complexity, which could have many applications in the industry. *Brettanomyces spp.* which is often found in spontaneous alcoholic fermentation processes, as well as in soft drinks, dairy products, kombucha tea, yeast and olives, was first mentioned by M. Custers in 1940 and has undergone many reclassifications over the years, now including 9 species with *B. bruxellensis* most commonly reported. It is a microorganism that can be used for the fermentation of beer, giving it special organoleptic characteristics, wine, influencing its aroma and taste as in both fermentations the characteristic "Brett character" is given to the product. It is now being studied for the fermentation of bioethanol and milk by-products for the production of functional foods and beverages. Due to its durability and competitive action *Brettanomyces spp.* could carry out fermentations which take place under adverse conditions. In any case, however, the risk of contamination from it beyond the fermentation process should be prevented and therefore there should always be thorough ways to control and limit it. The analysis of each feature and action of *Brettanomyces spp.* is necessary in order to find out the prospects of using this microorganism in the Food Industry.

Περιεχόμενα	
Δήλωση περί λογοκλοπής / Copyright	6
Ευχαριστίες	7
Περίληψη	8
Abstract	9
1.Εισαγωγή	11
2. Γένος <i>Brettanomyces</i>	13
2.1 Γενικά Χαρακτηριστικά	13
2.2 Είδη <i>Brettanomyces</i>	15
2.3 Βιοχημεία / Φυσιολογία	22
2.4 Γενετική	28
3. Ζυμώσεις	41
3.1 Σημασία <i>Brettanomyces</i> σε ζυμώσεις	41
3.2 <i>Brettanomyces</i> στη μπίρα	41
3.3 <i>Brettanomyces</i> στο κρασί	46
3.4 <i>Brettanomyces</i> σε παραγωγή βιοαιθανόλης	47
3.5 <i>Brettanomyces</i> στην αξιοποίηση παραπροϊόντων	49
3.6 <i>Brettanomyces</i> στην παραγωγή λειτουργικών ποτών	51
3.7 Παραγωγή αρωματικών ενώσεων	52
3.8 Παράγοντες που επηρεάζουν τις ζυμώσεις	67
3.9 Αναστολείς ζυμώσεων	69
3.10 Αλλοιώσεις που προκαλούνται από τον <i>Brettanomyces</i>	70
3.10.1 Μέθοδοι ελέγχου	74
4. Συμπεράσματα	83
Βιβλιογραφία	85

1.Εισαγωγή

Από την αρχαιότητα, οι άνθρωποι βασίστηκαν σε διαδικασίες ζύμωσης ώστε να αποκτηθούν επιθυμητές επιπτώσεις στα τρόφιμα και τα ποτά αλλά και να αυξήσουν τη διάρκεια ζωής και την ασφάλεια τους. Οι μικροοργανισμοί βρίσκοντουσαν φυσικά στην πρώτη ύλη ή και σε άλλους τομείς συγκομιδής και έτσι οι αρχικές διαδικασίες ζύμωσης διεξήχθησαν αυθόρμητα. Πλέον, όμως, οι σύγχρονες διεργασίες ζύμωσης ξεκινούν από μια καλά καθορισμένη, καλλιέργεια εκκίνησης (Barnett και Lichtenthaler, 2001). Ωστόσο, οι ζυμώσεις καθαρής καλλιέργειας απαιτούν την επιλογή ενός μεμονωμένου στελέχους με όλα τα βασικά χαρακτηριστικά που απαιτούνται για αποτελεσματική και υψηλής ποιότητας ζύμωση η οποία είναι αποδεδειγμένα μια δύσκολη διαδικασία. Στερούν, επίσης, τη δημιουργία μιας ξεχωριστή ζύμωσης με πλεονεκτικό προϊόν και αυξημένη πολυπλοκότητα η οποία προέρχεται από μια ποικιλία άγριων, μολυσματικών ζυμών και βακτηριακών ειδών αλλά και τις λεπτές αρωματικές νότες, οι οποίες μπορεί να εξαλειφθούν σε ζυμώσεις καθαρής καλλιέργειας.

Σταδιακά, λοιπόν, ταυτόχρονα με την ανάπτυξη μεθόδων βελτίωσης συγκεκριμένων στελεχών (Steensels et al., 2014a, b), κέρδισαν έδαφος και τεχνικές ζύμωσης μη συμβατικές οι οποίες γίνονται όλο και πιο δημοφιλείς στη βιομηχανία ζύμωσης (Ciani and Comitini, 2011 & Johnson, 2013).

Πολλές από τις μη συμβατικές ζύμες θεωρούνται ακόμη ανεπιθύμητοι οργανισμοί αλλοίωσης ενώ μερικοί από αυτούς μπορούν να έχουν ωφέλιμο ρόλο αυξάνοντας την αποτελεσματικότητα της ζύμωσης, μειώνοντας τον κίνδυνο αλλοίωσης ή αλλάζοντας το πλεονέκτημα του τελικού προϊόντος (Steensels and Verstrepen, 2014). Ένα από αυτά τα μη συμβατικά γένη ζύμης παρασκευής που προσελκύει την προσοχή λόγω των ασυνήθιστων χαρακτηριστικών του είναι ο *Brettanomyces*. Έως τώρα, ο *Brettanomyces* ήταν άρρηκτα συνδεδεμένος κυρίως με την αλλοίωση του κρασιού αλλά αρνητική θεωρούνταν και η επίδραση του στο προϊόν της μπύρας ως μολυσματικός παράγοντας κατά τη ζύμωση, την προετοιμασία και τη διανομή βαρελίσιας μπύρας, λόγω της παραγωγής ενώσεων που θεωρούνται εκτός γεύσης. Η εμφάνιση και η ανάπτυξη του *Brettanomyces spp.* προκαλεί τον επονομαζόμενο "Brettt χαρακτήρα", μια αλλαγή των οργανοληπτικών ιδιοτήτων που εμφανίζεται κυρίως στα κόκκινα κρασιά, αλλά και σε άλλα αλκοολούχα ποτά όπως ο μηλίτης. Από την άλλη πλευρά, παρατηρήθηκαν και θετικές συνεισφορές του στη γεύση και το άρωμα σε συγκεκριμένα είδη όπως οι βελγικές μπύρες lambic και gueuze αλλά και της μπύρας Trappist, των αγγλικών μελισσών και των αμερικανικών δροσερών ειδών μπύρας. Η δραστηριότητα των *Brettanomyces* έχει

συ σχετίζεται με την παραγωγή πτητικών φαινολών, οξικού οξέος και τετραϋδροπυριδινών.

Εκείνος που ανέφερε για πρώτη φορά αυτό το γένος ήταν ο Niels Hjelte Claussen το 1904, στο ζυθοποιείο Carlsberg. Η Claussen απομόνωσε αυτή την ιδιότυπη μαγιά από την μπίρα, όπου θεωρήθηκε υπεύθυνη για την εκτέλεση της δευτερεύουσας ζύμωσης και ανάπτυξης των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών των αγγλικών αποθεμάτων μπίρας (π.χ. άφθονος και διαρκής αφρός, οξέα και πτητικές ουσίες). (Claussen, 1904). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι αυτή η αρχική απομόνωση του *Brettanomyces* επέφερε τον πρώτο πατενταρισμένο μικροοργανισμό στην ιστορία (δίπλωμα ευρεσιτεχνίας Ηνωμένου Βασιλείου GB190328184). Από τότε, τα είδη *Brettanomyces* έχουν απομονωθεί σε οινοποιεία και ζυθοποιεία σε όλο τον κόσμο, καθώς και σε άλλα υποστρώματα όπως σόδες, ελιές, kombucha και μονάδες παραγωγής βιοαιθανόλης. Ωστόσο, έναν αιώνα αργότερα, ο ρόλος των *Brettanomyces* στη βιομηχανία τροφίμων είναι συγκεχυμένος και διφορούμενος (Crauwels et al. 2015a & Steensels et al. 2015).

Το δυναμικό του *Brettanomyces* ως καλλιέργεια εκκίνησης σε βιομηχανικές διαδικασίες ζύμωσης αναγνωρίζεται όλο και περισσότερο. Οι σκληρές περιβαλλοντικές συνθήκες που είναι επιζήμιες για πολλά μικρόβια, όπως υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης, χαμηλό pH, απουσία εύκολα ζυμώσιμων πηγών αζώτου και άνθρακα και χαμηλό οξυγόνο είναι οι παράγοντες που καθιστούν το συγκεκριμένο μικροοργανισμό ιδιαίτερο από τεχνολογικής πλευράς και παρόλο που μπορεί η αντίσταση σε αυτούς τους παράγοντες να μην είναι ασυνήθιστη στα μικρόβια, υπάρχουν μόνο λίγα είδη που συνδυάζουν αντίσταση σε όλους αυτούς τους παράγοντες πίεσης, γεγονός που εξηγεί την υψηλή ανταγωνιστικότητά τους σε αυτές τις θέσεις. Επιπρόσθετα, η μοναδική ενεργειακή του δραστηριότητα και η αμλαστική δραστηριότητα τα καθιστούν πολύ κατάλληλα για την παραγωγή νέων αλκοολούχων ποτών (Daenen et al., 2009). Η υψηλή δραστικότητα εστεράσης, υπεύθυνη για τη βιοσύνθεση των εστέρων που μοιάζουν με φρούτα και απελευθερώνει αρωματικές δραστικές ενώσεις σε απόκριση της δραστικότητας της β-γλυκοσιδάσης θεωρείται ακόμη ένα από τα πλεονεκτικά χαρακτηριστικά του μικροοργανισμού. Στη σεξουαλική του μορφή, αναφέρεται επίσης ως *Dekkera*, ένα γένος που αποτελείται από τα είδη που απαντώνται συχνότερα *Dekkera* / *Brettanomyces bruxellensis* και *Dekkera* / *Brettanomyces anomalus*. Επιπλέον, έχουν περιγραφεί άλλα σεξουαλικά είδη *Brettanomyces*, όπως *Brettanomyces naardenensis*, *Brettanomyces custersianus* και *Brettanomyces nanus* (Tiukova et al., 2019).

2. Γένος *Brettanomyces*

Συνήθως στις αλκοολικές ζυμώσεις, αυτές οι καλλιέργειες εκκίνησης γενικά αποτελούνται από ένα μόνο στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae* ή από στενά συγγενή είδη όπως *S. pastorianus*. Ωστόσο, σε ορισμένες συνθήκες ή για ορισμένες διαδικασίες ζύμωσης, τα φυσιολογικά όρια των στελεχών *Saccharomyces* περιορίζουν την εφαρμογή τους. Παρά το γεγονός ότι περιγράφονται αρκετές μέθοδοι βελτίωσης στελεχών για τον εμπλουτισμό της αρωματικής αποτελεσματικότητας ή της αποτελεσματικότητας της ζύμωσης των στελεχών *S. cerevisiae* (Steensels et al., 2014a, b), αυτές οι τεχνικές έχουν επίσης τους περιορισμούς τους και τις ζύμες μη *Saccharomyces* (ή μη συμβατικές) γίνονται όλο και πιο δημοφιλείς στη βιομηχανία ζύμωσης (Ciani and Comitini, 2011, Cordero-Bueso et al., 2013, Johnson, 2013). Ενώ πολλές από αυτές τις ζύμες εξακολουθούν να στιγματίζονται ως ανεπιθύμητοι οργανισμοί αλλοίωσης, μερικοί από αυτούς μπορούν να έχουν ωφέλιμο ρόλο αυξάνοντας την αποτελεσματικότητα της ζύμωσης, μειώνοντας τον κίνδυνο αλλοίωσης ή αλλάζοντας το πλεονέκτημα του τελικού προϊόντος (Steensels et al, 2014).

2.1 Γενικά Χαρακτηριστικά

Το *Brettanomyces* είναι ένα αναμορφικό γένος ζύμης στην οικογένεια *Saccharomycetaceae* (phylum Ascomycota). Η πρώτη αναφορά στο γένος χρονολογείται από το 1904, όταν ο Niels Hjelte Clausen απομόνωσε τον λεγόμενο «βρετανικό μύκητα» στο ζυθοποιείο Carlsberg, όπου θεωρήθηκε υπεύθυνο για την εκτέλεση μια δευτερεύουσα ζύμωση και ανάπτυξη χαρακτηριστικών γεύσεων σε βρετανικές μπύρες (Clausen, 1904). Μετά από αυτήν την ανακάλυψη, μόλις το 1920, όταν αποκτήθηκαν περισσότερα προϊόντα απομόνωσης από μπύρες του είδους lambic, το *Brettanomyces* προτάθηκε ως γένος (Crauwels et al., 2015). Είναι ενδιαφέρον, ωστόσο, ότι αυτή η αρχική απομόνωση του *Brettanomyces* είχε ως αποτέλεσμα τον πρώτο πατενταρισμένο μικροοργανισμό στην ιστορία (δίπλωμα ευρεσιτεχνίας Ηνωμένου Βασιλείου GB190328184). Στις αξιώσεις του διπλώματος ευρεσιτεχνίας, η Clausen δηλώνει «με την ενασχόληση στην κατασκευή αγγλικών ειδών μπύρας όπως η ale, η stout και η porter, έγινε χρήση νέων ειδών μικροοργανισμών που ονομάζονται *Brettanomyces* (που δεν σχηματίζουν ενδοσπόρια και επομένως διαφέρουν από το *Saccharomycetes*) προκειμένου να παραχθεί η επίγευση και οι συνθήκες που χαρακτηρίζουν αυτές τις μπύρες ». Ο *Brettanomyces* είναι μακρινός συγγενής της κλασικής ζύμης παρασκευής *Saccharomyces cerevisiae* και είναι ιδιαίτερα γνωστός για τον διφορούμενο ρόλο του στη ζύμωση τροφίμων και ποτών. Αντίστοιχα, λοιπόν, εμφανίζει και χαρακτηριστικά τύπου *Saccharomyces*, όπως θετικό αποτέλεσμα

Crabtree, σύνθεση αιθανόλης και ανοχή σε σκληρά περιβάλλοντα. Επιπρόσθετα, εμφανίζει και δραστηριότητες β-γλυκοσιδάσης και εστεράσης, την παραγωγή φαινολικών ενώσεων και τετραϋδροπυριδινών, μαζί με την ικανότητα ζύμωσης δεξτρινών και διάσπασης κυτταροβιόζης από ξύλινα βαρέλια.(Menoncin and Bonato,2019). Ο *Brettanomyces* θεωρείται μια μαγιά αλλοίωσης που πλέον αναφέρεται σε προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση τα οποία κυμαίνονται από τυριά και γάλα που έχει υποστεί ζύμωση έως διάφορα αλκοολούχα ποτά (π.χ. κρασί, μπύρα, μηλίτης και τεκίλα). Ανιχνεύεται επίσης σε χαμηλότερα επίπεδα και σε άλλες πηγές όπως μέλισσες, μύγες φρούτων, ελιές και ανθρακούχα ποτά (Loureiro and Malfeito-Ferreira, 2003). Ταυτόχρονα, έναν αιώνα αργότερα από την πρώτη γνώση του ανθρώπου για το συγκεκριμένο μικροοργανισμό, ο ρόλος των *Brettanomyces* στη βιομηχανία τροφίμων είναι συγκεχυμένος και διαφορούμενος μιας και εξακολουθεί να θεωρείται κυρίως οργανισμός αλλοίωσης του κρασιού, του μηλίτη και των γαλακτοκομικών προϊόντων και να προσθέτει επιθυμητές γεύσεις σε ποτά που έχουν υποστεί ζύμωση. Είναι μια ημι-εξημερωμένη ζύμη, η οποία θεωρείται μη συμβατική και προσελκύει όλο και περισσότερο το ενδιαφέρον της βιομηχανίας. Αυτό το ενδιαφέρον έγκειται κυρίως στην ικανότητα πολλών μη συμβατικών ειδών ζύμης να παράγουν προϊόντα με ένα ιδιαίτερο προφίλ αρώματος. (Crauwels et al,2015). Το μοναδικό, αυτό, αρωματικό του προφίλ καθιστά τις ζύμες *Brettanomyces* εξαιρετικά ελκυστικές για την παραγωγή νέων ειδικών αλκοολούχων ποτών (Daenen et al,2008 b).

Επιπλέον, στη βιομηχανία ζυθοποιίας, υπάρχει ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον για τις ξινές μπύρες που είναι το αποτέλεσμα της αυθόρμητης ζύμωσης που βασίζεται στο φυσικό εμβολιασμό. Υπάρχουν ζυμώσεις όπου ο *Brettanomyces* ζει σε απόλυτη αρμονία με διάφορες άλλες μικροβιακές ομάδες, όπως βακτήρια οξικού οξέος και βακτήρια γαλακτικού οξέος. Πολλά από τα τυπικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της μπύρας αντιπροσωπεύονται από αυτή τη συνύπαρξη. Η γερμανική Berliner Weisse, για παράδειγμα, μια μπύρα σιταριού χαμηλής βαρύτητας που έχει υποστεί ζύμωση με *S. cerevisiae* και *Lactobacillus spp.* σε μικτή καλλιέργεια αλλά πρόσφατα βρέθηκε ότι το παραδοσιακό άρωμα του Berliner Weisse οφείλεται στην πραγματικότητα στη δευτερογενή ζύμωση από τον *Brettanomyces*. Έτσι, οι μοναδικές αρωματικές ιδιότητες του *Brettanomyces* αναγνωρίζονται όλο και περισσότερο, με όλο και περισσότερους βιοτεχνικούς ζυθοποιούς να το προσθέτουν στις ζυμώσεις τους, είτε ως καθαρή καλλιέργεια είτε σε συνδυασμό με πιο παραδοσιακά στελέχη παρασκευής. Η μοναδική ενεργειακή του δραστηριότητα και η αμυλασική τους δραστηριότητα τα καθιστούν κατάλληλα για την παραγωγή νέων αλκοολούχων ποτών (Daenen et al., 2009), ενώ η ανοχή τους σε χαμηλό pH, ο θρεπτικός-αποτελεσματικός μεταβολισμός τους και η ικανότητά τους να παράγουν υψηλή

συγκεντρώσεις αιθανόλης συγκέντρωσαν τα βλέμματα στη βιομηχανία βιοαιθανόλης (Passoth et al., 2007). Ως εκ τούτου, η βιοτεχνολογική ικανότητα του *Brettanomyces* γίνεται ολοένα και πιο εμφανής και ένας αυξανόμενος αριθμός μελετών στοχεύει στο ιδιαίτερο γονιδίωμα *Brettanomyces*, μεταγραφικό, μεταβολισμό, πρωτεόμη και φαινόμενα (Steensels et al., 2015).



Εικόνα 2.1 : Οπτική εικόνα μικροσκοπίου στέλεχους *Brettanomyces* (1000 x)(Suarez et al., 2007)

Ακόμη, η ενδιαφέρουσα φυσιολογία του είδους *Brettanomyces* με την εξαιρετική του ανοχή στο στρες και τον ιδιαίτερο μεταβολισμό του άνθρακα και του αζώτου, δίνει μεγάλες δυνατότητες παραγωγής βιοαιθανόλης σε συνεχείς ζυμωτές. (Steensels et al., 2015).

Επί του παρόντος υπάρχει έντονο ενδιαφέρον για ζύμες μη *Saccharomyces* (ή μη συμβατικές) με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά ικανά να αντικαταστήσουν ή να συνοδεύσουν το *S. cerevisiae* σε συγκεκριμένες βιομηχανικές ζυμώσεις. Το *Brettanomyces* (teleomorph: *Dekkera*), με το *Brettanomyces bruxellensis* ως το πιο συχνά απαντώμενο είδος, είναι μια τέτοια ζύμη.

2.2 Είδη *Brettanomyces*

Η ετυμολογική προέλευση του γένους ζυμομύκητα *Brettanomyces* βρίσκεται στη Μεγάλη Βρετανία όπου ενώ ο Claussen κάλεσε την απομόνωσή του «*Brettanomyces*» (από τις ελληνικές λέξεις Brettano (βρετανική ζυθοποιία) και Myces (μύκητας), αρχικά το χαρακτήρισε ως είδος *Torula*. Ωστόσο, το 1921, οι Kufferath και Van Laer απομόνωσαν ένα στέλεχος ζύμης από βελγικές μπύρες lambic με τα ίδια

χαρακτηριστικά που περιγράφονται από τον Claussen και το ταξινομούν ως *Brettanomyces bruxellensis* (Custers, 1940). Η πρώτη συστηματική έρευνα των ζυμομυκήτων *Brettanomyces* πραγματοποιήθηκε και αναφέρθηκε από τον Mathieu Custers το 1940, ο οποίος χαρακτήρισε 17 διαφορετικά στελέχη, απομονωμένα από αγγλικές και βελγικές μπίρες. Από την πρώτη του περιγραφή, η ταξινόμηση του *Brettanomyces* αποτέλεσε αντικείμενο συζητήσεων και υπήρξαν πολλές ανακατατάξεις κατά τη διάρκεια των ετών (Steensels et al., 2015).

Με τα χρόνια, έχουν προταθεί πολλά διαφορετικά είδη *Brettanomyces* και τα ονόματα αυτών των ειδών χρησιμοποιήθηκαν ελεύθερα σε επιστημονικές δημοσιεύσεις. Επιπλέον, υπήρξαν πολλές ανακατατάξεις με την πάροδο των ετών, καθιστώντας τις άμεσες συγκρίσεις μεταξύ παλιών και πιο πρόσφατων ερευνητικών εργασιών. Αρχικά, η ταξινόμηση βασίστηκε αποκλειστικά σε μερικές, αναμορφωτικές (αναμορφικές) παραλλαγές (Custers, 1940) και έγινε με βάση μια σειρά από φαινοτυπικά χαρακτηριστικά. Ωστόσο, λίγες δεκαετίες αργότερα (το 1960), ο σχηματισμός ασκοσπορίων παρατηρήθηκε σε ορισμένα στελέχη και το γένος *Dekkera* (ένα όνομα που επιλέχθηκε προς τιμήν της Nellie Margaretha Stelling-Dekker, πρωτοπόρου της συστηματικής ζύμης) εισήχθη στην ταξινόμηση ως το τελομορφικό (σεξουαλικό) αντίστοιχο του *Brettanomyces* (Van der Walt, 1984). Έτσι, στις τρέχουσες ταξινομήσεις, οι ζύμες που ανήκουν στο γένος *Brettanomyces* σχηματίζουν μη-σπόρους (anamorph), ενώ το όνομα γένος *Dekkera* περιγράφει παραλλαγές σχηματισμού σπόρων (teleomorph) της μαγιάς. Ωστόσο, χρησιμοποιούνται συχνά ως συνώνυμα. Είναι ενδιαφέρον ότι η διάκριση μεταξύ *Dekkera* και *Brettanomyces* είναι ακόμα κάπως ασαφής, ειδικά επειδή οι τρέχουσες τεχνικές ανίχνευσης μοριακού DNA δεν μπόρεσαν να ανιχνεύσουν συστηματικές διαφορές μεταξύ των καταστάσεων αναμόρφωσης και τελοφόρου (Oelofse et al., 2008). Επιπλέον, σύμφωνα με τον νέο Διεθνή Κωδικό Ονοματολογίας για φύκια, μύκητες και φυτά (ο Κώδικας της Μελβούρνης), στα είδη μυκήτων θα πρέπει να έχει μόνο ένα έγκυρο όνομα. Δεδομένου ότι το όνομα *Brettanomyces* είναι πολύ γνωστό και χρησιμοποιείται πιο συχνά στις επιχειρήσεις τροφίμων και ποτών, πιθανότατα θα έχει προτεραιότητα έναντι του *Dekkera*. Ωστόσο, δεδομένου ότι και οι δύο γενεές χρησιμοποιήθηκαν συχνά τις τελευταίες δεκαετίες, το όνομα *Brettanomyces / Dekkera*. Στην πρώτη έκδοση του εγχειριδίου τους σχετικά με τα χαρακτηριστικά ζύμης και την ταυτοποίηση, ο Barnett και οι συνάδελφοί του περιέγραψαν τα ακόλουθα 9 είδη *Brettanomyces/Dekkera*: *Brettanomyces abstinens*, *Brettanomyces anomalus*, *Brettanomyces claussenii*, *Brettanomyces custersianus*, *Brettanomyces custersii*, *Brettanomyces lambickens*, *Brettanomyces naardenensis* ,

Dekkera bruxellensis και *Dekkera intermedia* (Barnett et al., 1983). Επί του παρόντος, περιγράφονται πέντε είδη *Brettanomyces* / *Dekkera*, με βάση τη μοριακή ανάλυση των γενών: τα αναμορφικά *B. bruxellensis*, *B. anomalus*, *B. custersianus*, *B. Naardenensis* και *B. nanus*, με υπάρχοντα τελούντα για τα δύο πρώτα είδη, *D. bruxellensis* και *D. anomala* (Steensels et al, 2015).

Δεδομένου ότι το *B. bruxellensis* είναι το πιο γνωστό είδος του γένους *Brettanomyces*, η πλειονότητα των μοριακών / βιοχημικών δεδομένων που υπάρχουν σχετίζονται με αυτό το είδος. (Menoncin and Bonato, 2019). Το όνομα του είδους «*bruxellensis*» (Λατινικά: από τις Βρυξέλλες) προτάθηκε για να αποτίσει φόρο τιμής στο ρόλο αυτού του είδους στην παραγωγή βελγικών μπύρας *lambic* και *gueuze*, οι οποίες παρασκευάζονται παραδοσιακά στην περιοχή των Βρυξελλών (Βέλγιο). Τα επόμενα χρόνια, το *B. bruxellensis* έχει απομονωθεί από διάφορες βιομηχανικές ζυμώσεις και προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση, όπως κρασί (Peynaud and Domercq, 1956), μηλίτης (Coton et al, 2006) τσάι kombucha (Teoh et al, 2004), κεφίρ (Laureys and de Vuyst, 2014) και ελιές (Coton et al, 2006). Επιπλέον, το είδος συχνά απομονώνεται ως μολυσματικό μέσο σε χώρους παραγωγής βιοαιθανόλης (Beckner et al, 2011). Η μόνη πηγή από την οποία απομονώθηκε το *B. bruxellensis* που δεν σχετίζεται με τις βιομηχανικές ρυθμίσεις είναι τα μούρα σταφυλιών (Renouf and Lonvaud-Funel, 2007), γεγονός που δείχνει τη στενή σχέση του με τις τεχνητές οικολογικές θέσεις.

Διάφορα βιοχημικά και μοριακά χαρακτηριστικά έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανασυγκρότηση της φυλετικής ιστορίας του *Brettanomyces*. Τα δεδομένα περιλαμβάνουν κυτταρική μορφολογία, φυσιολογικές συγκρίσεις (δηλαδή μεταβολισμό διαφορετικών πηγών άνθρακα), πολυμορφισμούς απλού νουκλεοτιδίου στο γονίδιο συνένζυμο Q, περιεχόμενο G + C και ομοιότητες DNA (π.χ. rDNA 26S), ισοένζυμα και τύπος κονιδιογένεσης (Van der Walt, 1984). Μία ανασυγκρότηση των φυλογενών που βασίζεται σε μεγάλο αριθμό ορθολογικών γονιδίων τοποθετεί το *Brettanomyces* σε μια ομάδα με, μεταξύ άλλων, το *Ogataea polymorpha*, που φαίνεται να έχει αποκλίνει από τον πρόγονο του λεγόμενου «CTG-clade» (που περιέχει π.χ. *Candida albicans*, *Debaryomyces hansenii* and *Sheffersomyces stipitis* [Butler et al, 2009]), αφού μοιράστηκε έναν κοινό πρόγονο με τον *S. cerevisiae* (Curtin and Pretorius, 2014). Επί του παρόντος, η αλληλουχία γονιδιώματος επόμενης γενιάς παρέχει ευκολότερη και ταχύτερη μέθοδο σύγκρισης ειδών μέσω ανάλυσης ορθολογικών γονιδίων, διευκολύνοντας έτσι τις διακρίσεις μεταξύ ειδών (Curtin and Pretorius, 2014). Η τρέχουσα φυλογενότητα τοποθετεί αυτό το γένος μέσα στη διατομή των μεθυλοτροπικών ειδών *Komagataella (Pichia) pastoris*, *Kuraishia capsulata* και *Ogataea polymorpha*,

σχηματίζοντας έτσι μια «ενδιάμεση» εξελικτική ομάδα μεταξύ *Saccharomycetaceae* και κλάδου CTG (ορίζεται από όλα τα είδη ζύμης που μεταφράζουν το κωδικόνιο CTG ως σερίνη αντί για λευκίνη) . Ωστόσο, μια ανάλυση πολυγενών φυλογενότητας τοποθέτησε τον *K. Pastoris* έξω από τον κλάδο που περιέχει *Brettanomyces* (Kurtzman et al, 2013).

Η ταξινόμηση και η ονοματολογία των ειδών του γένους *Brettanomyces* προκαλεί σύγχυση, καθώς οι κατασκευαστές ζύμης έχουν εφαρμόσει άλλα ονόματα ειδών που είναι λανθασμένα και ανήκουν σε παλαιότερη ονοματολογία. Για παράδειγμα, το *B. lambicus*, που είναι ένας σημαντικός μικροοργανισμός στις αυθόρμητα ζυμωμένες lambic μπύρες και το *Kombucha*. Ωστόσο, αντί του *B. lambicus*, η μαγιά είναι ένα στέλεχος του είδους *B. bruxellensis* (Molina et, 1993). Άλλα συνώνυμα που υπάρχουν στη βιβλιογραφία για αυτό το είδος είναι τα *B. abstinens*, *B. custersii* και *B.intermedius* . Το *Brettanomyces anomalus* έχει μόνο ένα εναλλακτικό όνομα στο *B. clausenii* (Barnett et al, 2001). Επιπλέον, η τελεομορφική μορφή, *D. bruxellensis* έχει ένα συνώνυμο, το οποίο σε ορισμένες μελέτες αναφέρεται ως *D. intermedia* .

Πίνακας 2.1 : Επισκόπηση παλαιών και νέων ταξινομικών ταξινομήσεων των *Brettanomyces* και Είδος *Dekkera*. B = *Brettanomyces*, D = *Dekkera*, C = *Candida*, NA = μη διαθέσιμο (Steensels et al., 2015).

Παλιά ταξινόμηση	Υπόστρωμα απομόνωσης	Νέα ταξινόμηση
<i>B. Sphaericus</i>	Άλμη αγγουριού	<i>C. etchellsii</i>
<i>B. Petrophilum</i>	NA	<i>C. parapsilosis</i>
<i>B. Italicus</i> (ποικιλίες <i>membranifaciens</i>)	Κρασί	<i>C. stellata</i>
<i>B. Versatilis</i>	Άλμη αγγουριού	<i>Γ. Versatilis</i>
<i>Δ. Custersiana</i>	Μπύρα	<i>B. Custersianus</i>
<i>B. Custersianus</i>	Μπύρα, ελιές, ανθρακούχα ποτά, κρασί	
<i>Δ. Naardenensis</i>	Ανθρακούχα αναψυκτικά	<i>B. Naardenensis</i>
<i>B. Naardenensis</i>	Ανθρακούχα ποτά, μπύρα	
<i>B. Nanus</i>	Μπύρα	<i>B. Nanus</i>
<i>D.Nanan</i>	Μπύρα	
<i>Eeniella nana</i>	Μπύρα	
<i>B. Nonanus</i>	Μπύρα	
<i>B. Anomalous</i>	Μπύρα, μηλίτης, κεράσι, τεκίλα	<i>b.Anomalous/D.Anomala</i>
<i>B. Cidri</i>	Μηλίτης	
<i>B. dublin (i) ensis</i>	Μπύρα	
<i>Candida beijingsensis</i>	NA	
<i>Κυλινδρική Torulopsis</i>	Μπύρα	
<i>Monilia vini</i>	Κρασί	
<i>Mycotorula clausenii</i>	NA	
<i>Oospora vini</i>	Κρασί	
<i>D.anomala</i>	Ανθρακούχα ποτά, κεφίρ, μπύρα, κρασί σέρι, μηλίτης	
<i>B./D. abstinens</i>	Ανθρακούχα αναψυκτικά	<i>B./D. bruxellensis</i>
<i>B. Bruxellensis var. vini / bruxellen- sis / lentus / non-membranifaciens</i>	Μπύρα	
<i>B. Custersii</i>	Μπύρα, κρασί, μαγιά	
<i>B. ενδιάμεσο</i>	Ανθρακούχο ποτό, μπύρα, κρασί	
<i>B. Lambicus</i>	Μπύρα	
<i>B. patavinus</i>	Κρασί	
<i>B. Schanderii</i>	Μπύρα	
<i>B. vini</i>	Κρασί	
<i>Δ. intermedia</i>	Μπύρα τσαγιού	
<i>Δ. lambica</i>	Μπύρα	

<i>Intercedia Mycotorula</i>	Κρασί	
<i>B./D. bruxellensis</i>	Kefir, sherry wine, kombucha, μηλίτης, βιοαιθανόλη, μαγιά, γιαούρτι, μαύρες ελιές, ανθρακούχα ποτά	

Πίνακας 2.2: Επισκόπηση παλαιών και νέων ταξινομικών ταξινομήσεων των ειδών *Brettanomyces* και *Dekkera*. Η αρχική πηγή απομόνωσης αναφέρεται για κάθε είδος.

B = *Brettanomyces*, *D* = *Dekkera*, *C* = *Candida*, *NA* = μη διαθέσιμο (Steensels et al., 2015).

Παλιά ταξινόμηση	Υπόστρωμα απομόνωσης	Νέα ταξινόμηση
<i>B. sphaericus</i>	Αλατόνερο αγγουριού	<i>C. etchellsii</i>
<i>B. petrophilum</i>	NA	<i>C. parapsilosis</i>
<i>B. italicus</i> (var. <i>membranifaciens</i>)	Κρασί	<i>C. stellata</i>
<i>B. versatilis</i>	Αλατόνερο αγγουριού	<i>C. versatilis</i>
<i>D. custersiana</i>	Μπύρα	<i>B. custersianus</i>
<i>B. custersianus</i>	Μπύρα, Ελιές (CBS 8347), Ανθρακούχο ποτό, Κρασί	
<i>D. naardenensis</i>	Ανθρακούχο ποτό	<i>B. naardenensis</i>
<i>B. naardenensis</i>	Ανθρακούχο ποτό, Μπύρα	
<i>B. nanus</i>	Μπύρα	<i>B. nanus</i>
<i>D. nana</i>	Μπύρα	
<i>E. nana</i>	Μπύρα	
<i>B. nonanus</i>	Μπύρα	
<i>B. anomalus</i>	Μπύρα, Μηλίτης, Κρασί σέρι, Τεκίλα	<i>D. anomala</i>
<i>B. cidri</i>	Μηλίτης	
<i>B/D clausenii</i> (var. <i>clausenii/sablieri</i>)	Μηλίτης, Μπύρα, Κρασί σέρι	
<i>B. dublin(i)ensis</i>	Μπύρα	
<i>Candida beijingsis</i>	NA	
<i>Torulopsis cylindrica</i>	Μπύρα	
<i>Monilia vini</i>	Κρασί	
<i>Mycotorula clausenii</i>	NA	
<i>Oospora vini</i>	Κρασί	
<i>D. anomala</i>	Ανθρακούχο ποτό, Κεφίρ, Μπύρα, Κρασί σέρι, Μηλίτης	<i>D. bruxellensis</i>
<i>B/D abstitens</i>	Ανθρακούχο ποτό , Μπύρα	

<i>B. bruxellensis</i> var. <i>vini</i> / <i>bruxellensis</i> / <i>lentus</i> / <i>non-</i> <i>membranifaciens</i>	Μπύρα	
<i>B. custersii</i>	Μπύρα, Κρασί, Μαγιά ψωμιού	
<i>B. intermedius</i>	Ανθρακούχο ποτό, Μπύρα, Κρασί	
<i>B. lambicus</i>	Μπύρα	
<i>B. patavinus</i>	Κρασί	
<i>B. schanderlii</i>	Μπύρα, Κρασί	
<i>B. vini</i>	Κρασί	
<i>D. intermedia</i>	Μπύρα τσαγιού	
<i>D. lambica</i>	Μπύρα	
<i>Mycotorula intermedia</i>	Κρασί	
<i>B/D bruxellensis</i>	Κεφίρ, Κρασί σέρι, Kombucha, Μηλίτης, Κρασί, Βιαιθανόλη, Sourdough, Γιαούρτι, Μαύρες ελιές , Ανθρακούχο ποτό	
<i>D. anomala</i>	Ανθρακούχο ποτό, Κεφίρ, Μπύρα, Κρασί σέρι, Μηλίτης	<i>D. bruxellensis</i>
<i>B/D abstitens</i>	Ανθρακούχο ποτό , Μπύρα	
<i>B. bruxellensis</i> var. <i>vini/bruxellensis/lentus/non-</i> <i>membranifaciens</i>	Μπύρα	
<i>B. custersii</i>	Μπύρα, Κρασί, Μαγιά ψωμιού	
<i>B. intermedius</i>	Ανθρακούχο ποτό, Μπύρα, Κρασί	
<i>B. lambicus</i>	Μπύρα	
<i>B. patavinus</i>	Κρασί	
<i>B. schanderlii</i>	Μπύρα, Κρασί	
<i>B. vini</i>	Κρασί	
<i>D. intermedia</i>	Μπύρα τσαγιού	
<i>D. lambica</i>	Μπύρα	
<i>Mycotorula intermedia</i>	Κρασί	
<i>B/D bruxellensis</i>	Κεφίρ, Κρασί σέρι, Kombucha, Μηλίτης, Κρασί, Βιαιθανόλη, Sourdough, Γιαούρτι, Μαύρες ελιές , Ανθρακούχο ποτό	

2.3 Βιοχημεία / Φυσιολογία

Οι πλέον γνωστές θέσεις στις οποίες αποικίζονται ο *Brettanomyces spp.* είναι τόσο αυθόρμητες αλκοολικές διαδικασίες ζύμωσης, καθώς και αναψυκτικά, γαλακτοκομικά προϊόντα, τσάι kombucha, μαγιά και ελιές . Αυτές οι θέσεις χαρακτηρίζονται από ποικίλους συνδυασμούς περιβαλλοντικών πιέσεων: υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης, χαμηλό pH, απουσία εύκολα ζυμώσιμων πηγών αζώτου και άνθρακα, χαμηλό οξυγόνο κ.λπ. (Steensels et al, 2015). Η ανάπτυξη, η παραγωγικότητα και η παραγωγή αιθανόλης επηρεάζονται ελαφρώς από τη θερμοκρασία (Blomqvist et al., 2010), καθιστώντας το *Brettanomyces* πολύ κατάλληλο για να ευδοκιμήσει σε διαφορετικές διαδικασίες ζύμωσης. Περαιτέρω, αρκετά στελέχη *Brettanomyces* έχουν αναπτύξει αντοχή έναντι του θειώδους άλατος (Conterno et al., 2006), το οποίο χρησιμοποιείται συνήθως ως απολυμαντικό στη βιομηχανία οίνου, όπου δεν υπάρχει βήμα βρασμού για την απολύμανση του μέσου ζύμωσης όπως στην παρασκευή μπύρας. Τα περισσότερα στελέχη *Brettanomyces* είναι ανθεκτικά σε υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης (έως 14,5-15% (v / v) , ένα χαρακτηριστικό που απαιτείται για την επιβίωση σε ένα περιβάλλον ζύμωσης. Φαίνεται, επίσης, να έχει αναπτυχθεί μια πρόσθετη στρατηγική για την εξουδετέρωση άλλων μικροβίων. Εκτός από την παραγωγή αιθανόλης, είναι επίσης σε θέση να παράγουν, να συσσωρεύουν και να καταναλώνουν αργότερα οξικό οξύ σε αερόβιες συνθήκες και να αντέχουν στο προκύπτον χαμηλό pH (Rozpedowska et al., 2011). Περαιτέρω, είναι σε θέση να αντέξει σε περιβάλλον φτωχό σε θρεπτικά συστατικά. Για παράδειγμα, ενώ χρησιμοποιούνται κατά προτίμηση ιόντα αμμωνίου ως πηγή αζώτου, ορισμένα στελέχη μπορούν επίσης να χρησιμοποιήσουν το νιτρικό ως μοναδική πηγή αζώτου (Crauwels et al., 2014 and Conterno et al., 2006) παρέχοντας ένα ανταγωνιστικό πλεονέκτημα σε φτωχές θέσεις αζώτου (όπως αναψυκτικά ή αργά στάδια ζύμωσης μπύρας και κρασιού) σε άλλες ζύμες που δεν μπορούν να χρησιμοποιήσουν νιτρικά άλατα όπως το *S. cerevisiae* (de Barros Pita U. et al., 2011).

Επιπλέον, ορισμένα στελέχη *Brettanomyces* έχουν την ικανότητα να υδρολύουν την κυτταροβιόζη μέσω της δραστηριότητας της β-γλυκοσιδάσης, και να τη ζυμώνουν περαιτέρω σε αιθανόλη (Moon et al., 2001) . Η κυτταροβιόζη είναι ένας δισακχαρίτης που λαμβάνεται με υδρόλυση της κυτταρίνης, ένα σύνθετο σάκχαρο που υπάρχει, για παράδειγμα, στο ξύλο, και μπορεί να ληφθεί από τη μαγιά από το εσωτερικό τοίχωμα των ξύλινων βαρελιών, και έτσι να εξηγήσει πώς το *Brettanomyces* μπορεί να επιβιώσει για χρόνια σε ξύλινα βαρέλια . Ο *Brettanomyces* είναι, επιπρόσθετα, σε θέση να χρησιμοποιεί και να ζυμώνει ένα ευρύ φάσμα πηγών άνθρακα, το οποίο, ωστόσο, είναι

μεταβλητό μεταξύ των στελεχών. Επιπλέον, διαφορετικά σάκχαρα φαίνεται να ζυμώνονται με διαφορετικούς ρυθμούς. Για παράδειγμα, το *B. bruxellensis* είναι ικανό να ζυμώσει τη μαλτόζη και τη φρουκτόζη, αλλά με χαμηλότερο ρυθμό σε σύγκριση με τη γλυκόζη (Blomqvist et al., 2010). Επιπλέον, το *B. bruxellensis* δείχνει πολύ αποτελεσματική χρήση σακχαρόζης που μπορεί να είναι το κλειδί για την υψηλή ανταγωνιστικότητα του *B. bruxellensis* σε ζυμώσεις με βάση τη σακχαρόζη (de Barros Pita U. et al., 2011). Περαιτέρω, το *B. Bruxellensis* δείχνει υψηλότερη συγγένεια για τη γλυκόζη σε συνθήκες περιορισμού του άνθρακα. Ο *Brettanomyces* είναι επίσης σε θέση να αποικοδομήσει και να ζυμώσει πιο πολύπλοκα σάκχαρα που δεν ζυμώνονται από *Saccharomyces* όπως η κυτταροκαί οι δεξτρίνες. Οι δεξτρίνες όπως η μαλτοτετραόζη και η μαλτοπενταόζη συχνά υπάρχουν ως υπολειμματικά σάκχαρα μετά την κύρια αλκοολική ζύμωση από την *Saccharomyces*. Χρησιμοποιώντας τη δραστηριότητα της α-γλυκοσιδάσης, το *Brettanomyces* είναι σε θέση να υδρολύσει αυτά τα σάκχαρα (Kumara et al., 1993), αποδίδοντας υπερθερμικές μπίρες με ελαφρώς υψηλότερα επίπεδα αιθανόλης και χαμηλότερα θερμιδικά περιεχόμενα.

Πίνακας 2.3 : Μια επισκόπηση των κυριότερων γενετικών, φαινοτύπων και μεταβολικών χαρακτηριστικών των στελεχών παρασκευής ειδών *Brettanomyces* σε σύγκριση με τα *Saccharomyces cerevisiae* και *Saccharomyces pastorianus* (Menoncin and Bonato, 2019)

Χαρακτηριστικό γνώρισμα	Είδη <i>Brettanomyces</i> species	<i>S. cerevisiae</i> (ζυμομύκητα)	<i>S. pastorianus</i> (μαγιά lager)
Πολυπλοειδές (ανευπλοειδία/ευφλοειδές) γονιδίωμα	Ναι	Ναι	Ναι
Μεταβολισμός νιτρικών	Ναι	Όχι	Όχι
Σχηματισμός ψευδόφυτων (πελλετ / βιοφίλμ)	Ναι	Ναι	Όχι
Επίδραση Crabtree	Ναι	Ναι	Ναι
Custer εφέ	Ναι	Όχι	Όχι
Δραστηριότητα α-γλυκοσιδάσης	Ναι	Ναι	Όχι
Κατανάλωση σακχαρόζης	Ναι	Ναι	Ναι
Μεταβολισμός γλυκόζης	Ναι	Ναι	Ναι
Μεταβολισμός φρουκτόζης	Ναι	Ναι	Ναι

Μεταβολισμός μαλτόζης	Ναι	Ναι	Ναι
Μεταβολισμός μαλτοτριόζης	Ναι	Ναι	Ναι
Μεταβολισμός δεξτρίνης	Ναι	Ναι	Όχι
Μεταβολισμός κυτταροβιόζης	Ναι	Όχι	Όχι
Μεταβολισμός γαλακτόζης	Ναι	Ναι	Ναι

- Επίδραση Crabtree

Όπως το *S. cerevisiae*, τα είδη *Brettanomyces* εμφανίζουν το αποτέλεσμα Crabtree, δηλαδή ευνοεί τη ζύμωση έναντι της αναπνοής παρουσία οξυγόνου, επιτρέποντας στη ζύμη να αντισταθμίσει άλλους, ευαίσθητους στην αιθανόλη μικροοργανισμούς (Rozpedowska et al., 2011). Ως εκ τούτου, τα περισσότερα στελέχη *Brettanomyces* είναι ανθεκτικά σε υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης (έως 14,5-15% (v/v) , ένα χαρακτηριστικό που απαιτείται για την επιβίωση σε ένα περιβάλλον ζύμωσης. Συγκεκριμένα, υπό αερόβιες συνθήκες, η αναπνευστική ανάπτυξη καταστέλλεται («καταστολή καταβολίτη») παρουσία ζυμώσιμης πηγής άνθρακα σε συγκεντρώσεις > 0,3% (De Deken, 1966). Το αποτέλεσμα Crabtree μας αποδεικνύει ότι ο ζυμομύκητας μπορεί να αφομοιώνει γρήγορα τη γλυκόζη και να παράγει αιθανόλη, αναστέλλοντας έτσι την ανάπτυξη ανταγωνιστικών μικροοργανισμών. Το φαινόμενο Crabtree είναι μέρος της στρατηγικής «φτιάχνω-συσσωρεύω-καταναλώνω» που χρησιμοποιείται από μικροοργανισμούς, όπου - υπό αερόβιες συνθήκες - η αιθανόλη καταναλώνεται μέσω αναπνοής μετά από εξάντληση της γλυκόζης (Rozeedowska et al, 2011). Το αποτέλεσμα Crabtree παρέχει επίσης περισσότερο ATP από τον αερόβιο μεταβολισμό όταν υπάρχουν υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης λόγω της γρήγορης διάσπασης της γλυκόζης μέσω γλυκολυτικών / ζυμωτικών οδών . Γονίδια που συνδέονται με ταχεία ανάπτυξη (κωδικοποιούμενα ένζυμα που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση του rRNA, το σχηματισμό πυριμιδινών, ελικοσών RNA και πρωτεϊνών που συνδέονται με τη βιογένεση και μεταφορά RNA), την αναπνοή (κωδικοποίηση μιτοχονδριακών ριβοσωμικών πρωτεϊνών) και απαραίτητες πρωτεΐνες για το μιτοχονδριακό αναπνευστικό σύμπλεγμα και μεταφορά ιόντων να οξειδάση κυτοχρώματος) έχουν ένα σταθερό μοτίβο υποκινητή (AATTTT) σε στενά συγγενή είδη *S. cerevisiae* και *B. bruxellensis* (δηλ. *Kluyveromyces lactis*, *Ashbya gossypii*, *Candida albicans*, *Debaryomyces hansenii* και *K. waltii*). Παρ'όλα αυτά, οι *S. cerevisiae* και *Brettanomyces* υποβλήθηκαν σε αναδιάρθρωση του προαγωγέα, με αποτέλεσμα την απώλεια αυτού του μοτίβου σε αυτά τα γονίδια που σχετίζονται με την αναπνοή. Το μοτίβο AATTTT απουσιάζει σε μόνιμη θέση σε γονίδια που συνδέονται με την αναπνοή σε *S. cerevisiae* και *B. bruxellensis* (~ 90% των

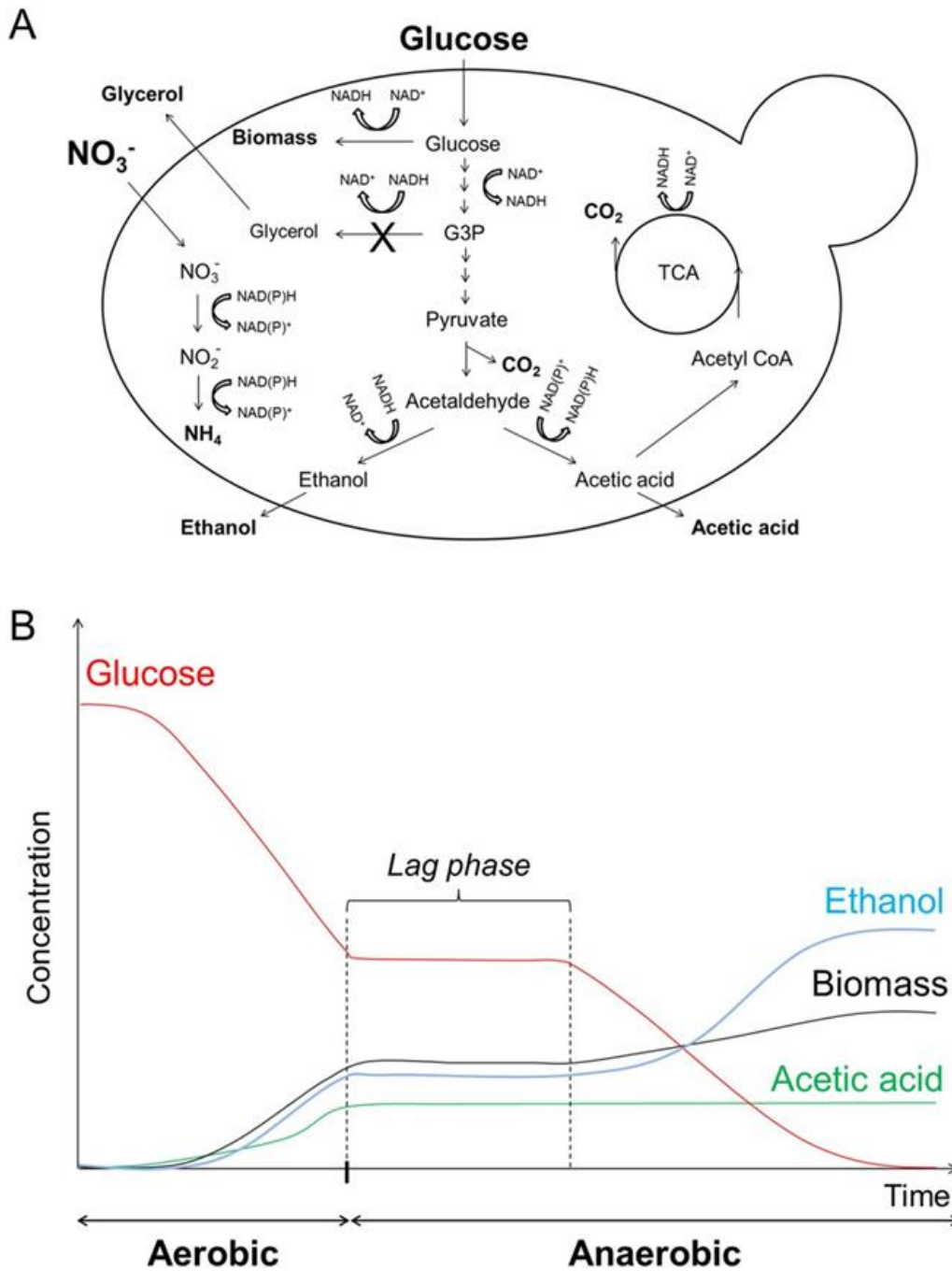
γονιδίων). Έτσι, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της γονιδιακής έκφρασης που σχετίζεται με την αναπνοή κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των κυττάρων σε ένα μέσο που περιέχει ζυμώσιμες πηγές άνθρακα, καθώς τα γονίδια που σχετίζονται με τη ζύμωση εκφράζονται σε υψηλότερα επίπεδα από τα γονίδια που σχετίζονται με την αναπνοή (Menoncin και Bonato, 2019).

- Custer εφέ

Οι αναερόβιες συνθήκες στα είδη *Brettanomyces* αναστέλλουν τη ζύμωση γλυκόζης σε αιθανόλη (Carrascosai et al, 1981). Η ζύμωση γλυκόζης διεγείρεται παρουσία οξυγόνου ή οργανικών (H^+) αποδεκτών (π.χ. ακετόνη, ακετόνη και διϋδροξυακετόνη) (Wijsman et al, 1984). Η αδυναμία ζύμωσης σακχάρων απουσία οξυγόνου ονομαζόταν «αρνητικό αποτέλεσμα Pasteur» ή «φαινόμενο Custers». Το αρνητικό αποτέλεσμα του Pasteur περιγράφηκε αρχικά από τον Mathieu Custers, μαθητή στο εργαστήριο του Albert Kluyver στο Delft (Custers, 1940). Τα αποτελέσματα αργότερα επιβεβαιώθηκαν και αναλύθηκαν περαιτέρω από τους Scheffers και συνεργάτες, οι οποίοι μετονόμασαν το φαινόμενο σε «φαινόμενο Custers» (Scheffers, 1961). Οι βιοχημικοί και μοριακοί μηχανισμοί που οδηγούν το φαινόμενο Custers δεν έχουν ακόμη κατανοηθεί πλήρως. Ωστόσο, η συνεχής παραγωγή οξικού οξέος από ακετάλη-αφυδίνη προάγει τη συσσώρευση του NADH, προκαλώντας μια οξειδοαναγωγική ανισορροπία που αναστέλλει τη γλυκόλυση και τη ζύμωση. Αυτή η ανισορροπία παρατείνει τη φάση καθυστέρησης όταν τα κύτταρα αλλάζουν από αερόβιο σε αναερόβιο περιβάλλον, το οποίο μπορεί να βελτιωθεί με την προσθήκη των αποδεκτών H^+ . Παρουσία υποδοχέων οξυγόνου / H^+ , τα NADH και NADPH οξειδώνονται κατά τον αερόβιο μεταβολισμό, αποκαθιστώντας την ισορροπία της οξειδοαναγωγής. Επιπρόσθετα, τα κύτταρα *Brettanomyces* εκθέτουν NADH ουμπικινόνη ρεδουκτάση (μέρος του μιτοχονδριακού συμπλόκου σε υψηλά επίπεδα όταν αναπτύσσονται σε ημι-αναερόβιο μέσο (Tiukova et al, 2013). Έτσι, σε ημι-αναερόβια περιβάλλοντα, εκφράζονται περισσότερα ένζυμα που παράγουν NADH από τα ένζυμα που παράγουν NAD^+ , γεγονός που εξηγεί γιατί συμβαίνει η ανισορροπία $NAD^+ / NADH$. Ωστόσο, ορισμένα μονοπάτια αποκαθιστούν μερικώς και αργά την ισορροπία $NAD^+ / NADH$. Αυτοί οι μηχανισμοί περιλαμβάνουν την οξείδωση του NADH, παρέχοντας έτσι το NAD^+ για το μεταβολισμό του 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη έως 1,3-διφωσφογλυκερικό άλας κατά τη διάρκεια της γλυκόλυσης. Ένα από αυτά τα χαρακτηριστικά είναι η ικανότητα της ζύμης να χρησιμοποιεί το νιτρικό ως μοναδική πηγή αζώτου, καθώς η αφομοίωση και ο μεταβολισμός νιτρικών απαιτούν το NADH και το NADPH ως δότες ηλεκτρονίων. Είναι ενδιαφέρον ότι ο μεταβολισμός των νιτρικών

αλάτων καταργεί το φαινόμενο Custers, βελτιώνοντας έτσι τη ζύμωση σε αναερόβια περιβάλλοντα (Galafassi et al, 2013).

Το *Saccharomyces cerevisiae* δεν εμφανίζει το φαινόμενο Custers, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα χαρακτηριστικά ζύμωσης του *Brettanomyces* εξελίχθηκαν με διαφορετικό τρόπο. Ο φαινότυπος *Brettanomyces* είναι αυστηρά συνδεδεμένος με οξυγόνο, και ως εκ τούτου υψηλά επίπεδα διαλυμένου οξυγόνου σε μύκητα θα πρέπει να θεωρούνται ότι ενθαρρύνουν την ανάπτυξη και το μεταβολισμό, ιδιαίτερα όταν το *Brettanomyces* επιλέγεται για πρωτογενή ζύμωση (Menoncin και Bonato,2019).



Εικόνα 2.2 (A) : Το φαινόμενο Custers του *B. bruxellensis*.

(A) Σχηματική επισκόπηση των κύριων παραγόντων που επηρεάζουν την ισορροπία και το μοτίβο ανάπτυξης. Η ισορροπία οξειδοαναγωγής είναι ο κύριος υπεύθυνος για το φαινόμενο Custers που παρατηρείται στο *B.bruxellensis*, το οποίο μπορεί να ζυμώσει τη γλυκόζη σε αιθανόλη πιο γρήγορα σε αερόβιες από τις αναερόβιες συνθήκες. Η μετατροπή της 3-φωσφορικής γλυκόζης (G3P) σε γλυκερόλη είναι συνήθως περιορισμένη ή ακόμη και απουσιάζει σε *B.bruxellensis*, λόγω περιορισμένης (ή απουσίας) δραστηριότητας 3-φωσφορικής γλυκερόλης φωσφατάσης (υποδεικνύεται με X). Η εξομοίωση με νιτρικά άλατα καταργεί το φαινόμενο Custers επιτρέποντας στο κύτταρο να αναπληρώσει τη συγκέντρωση NAD(P)H μέσω της μείωσης του νιτρικού σε αμμώνιο .

Εικόνα 2.2 (B) : Το φαινόμενο Custers του *B. bruxellensis*.

Επίδραση της μετάβασης από τις αερόβιες σε αναερόβιες συνθήκες καλλιέργειας στην κινητική ανάπτυξης του *B. bruxellensis*. Η φάση υστέρησης κατά τη μετάβαση από ένα αερόβιο σε αναερόβιο περιβάλλον προκαλείται από την απόφραξη της γλυκόλυσης λόγω έλλειψης NAD⁺. Μόνο όταν ενεργοποιηθούν άλλες (αργές) διαδρομές ενδοκυτταρικής επαν-οξειδωσης NADH, το *B. bruxellensis* θα μπορέσει να ξεφύγει από αυτή τη φάση υστέρησης και θα αρχίσει να παράγει ξανά αιθανόλη (χωρίς να παράγει οξικό οξύ). (Steensels et al, 2015)

- Σύνθεση οξικού οξέος

Τα είδη *Brettanomyces* μπορούν να συνθέσουν σημαντικές ποσότητες οξικού οξέος και ενδεχομένως να χρησιμοποιήσουν αυτήν την ένωση ως μη ζυμωτική πηγή άνθρακα (Gamero et al, 2014). Το οξικό οξύ καθιστά πιο όξινο το μέσο, αναστέλλοντας την ανάπτυξη πιθανών μικροβιακών ανταγωνιστών. Το *B. bruxellensis* μπορεί να αυξηθεί σε pH 2,3, σε σύγκριση με το *S. cerevisiae*, το οποίο περιορίζεται σε pH 3,2 (Rozpedowska et al, 2011). Υψηλές αποδόσεις οξικού οξέος στο *Brettanomyces* σχετίζονται με τον ζυμωτικό μεταβολισμό. Η ακεταλδεΐδη παράγεται από πυροσταφυλικό και οξειδώνεται ενζυματικά σε οξικό άλας σε απόκριση της δραστηριότητας αφυδρογονάσης NAD⁺ -αλδεΐδης. Δεδομένου ότι η δραστηριότητα ακετυλο-CoA συνθετάσης καταστέλλεται έντονα σε περιβάλλοντα πλούσια σε σάκχαρα σε απόκριση του φαινομένου Crabtree, παράγονται υπερβολικές ποσότητες οξικού οξέος όταν η ακεταλδεΐδη διοχετεύεται προς βιοσύνθεση οξικού αντί της ακετυλο-CoA. Η βιοσύνθεση του οξικού προκαλείται στο *B. Anomala* IGC 5153 παρουσία 2% (β / ο) γλυκόζης, ενώ το οξικό οξύ δεν συντίθεται σε μέσο καλλιέργειας με χαμηλές συγκεντρώσεις σακχάρου. Αντιθέτως, το ακετογονικό *B. Abstinens* (επί του παρόντος *B. Bruxellensis*) φέρεται να δείχνει δραστηριότητα NAD⁺ - αλδεΐδικής αφυδρογονάσης ακόμη και παρουσία χαμηλών συγκεντρώσεων γλυκόζης, δηλ. 0,3% (β / ο) (Menoncin και Bonato, 2019).

2.4 Γενετική

Γονιδίωμα *Brettanomyces*

Τα γονιδιώματα αλληλουχίας διαφορετικών ειδών *Brettanomyces* είναι σήμερα λίγα σε αριθμό και αυτό περιορίζει την εκτίμηση της ταξινομικής ποικιλομορφίας του γένους *Brettanomyces*. Οι κύριες πληροφορίες γονιδιώματος που είναι διαθέσιμες για ερευνητές έχουν ληφθεί από το *B. bruxellensis* (στελέχη AWRI1499, CBS2499, AWRI1608, AWRI1613, YV397, CBS2796, BioProject PRJEB11548 και PRJEB21262).

Έχουν επίσης αναφερθεί οι αλληλουχίες γονιδιώματος από τους *B. anomalus* (YV396) και *B. naardenensis* (CBS7540) (Menoncin και Bonato,2019). Το 2007, ο Woolfit και οι συνεργάτες του δημοσίευσαν την πρώτη διερευνητική έρευνα γονιδιώματος για το γαλλικό στέλεχος αλλοίωσης κρασιού CBS 2499, παρέχοντας μια πρώτη ματιά στην περίεργη φύση του γονιδιώματος *B.bruxellensis* (Woolfit et al, 2007).

Η έλλειψη περισσότερων αλληλουχιών γονιδιώματος και ειδικά ενός καλά καθορισμένου ορισμού αλληλουχίας για την ταξινομική βαθμίδα του *Brettanomyces* έχει περιορίσει άλλες μελέτες υψηλής απόδοσης, συμπεριλαμβανομένων των μεταγραφικών και πρωτεομών. Παρά την έλλειψη δεδομένων γονιδιώματος, πραγματοποιήθηκαν ορισμένες αρχικές μελέτες εστιάζοντας στη δομή και την οργάνωση του γονιδιώματος. Σε δύο μελέτες παρακολούθησης, το γονιδίωμα του CBS2499 αναλύθηκε και στη συνέχεια επανατέθηκε σε υψηλότερη απόδοση (Hellborg and Piskur, 2009, Piskur et al., 2012), επιτρέποντας την ταυτοποίηση 5600 γονιδίων, από τα οποία το 75% είχαν επεξηγηθεί λειτουργικά. Το *B. bruxellensis* έχει περίπου 5400 γονίδια με παρόμοια ιντρόνια με το *S. cerevisiae* και τον αιματοκύκητα (~ 4% των γονιδίων) (Menoncin και Bonato,2019). Πολλά από αυτά τα γονίδια τα οποία κωδικοποιούν ένζυμα και μεταφορείς που σχετίζονται με το μεταβολισμό του αζώτου και των λιπιδίων είναι ο λόγος που επιτρέπεται η ζύμη να επιβιώσει σε περιβάλλοντα με χαμηλά θρεπτικά συστατικά. Όπως το *S. cerevisiae*, το γένος *Brettanomyces* είναι ικανό να σχηματίσει μικροκαλλιέργειες που προκύπτουν από μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό DNA και προκαλούν αναπνευστική ανεπάρκεια . Περίπου την ίδια ώρα, ένα δεύτερο αλλοιογόνο του κρασιού *B. bruxellensis* (AWRI1499) δημοσιεύθηκε από το Australian Wine Research Institute (Curtin et al., 2012b).

Το πρώτο γονιδίωμα στελέχους *B.bruxellensis* που προέρχεται από μπίρα (ST05.12 / 22) (Crauwels et al., 2014) και το προσχέδιο γονιδιώματος αλλοιογόνου κρασιού (LAMAP2480) Χιλής (Valdes et al., 2014) δημοσιεύθηκαν και πραγματοποιήθηκε μια εις βάθος σύγκριση της γονιδιωματικής δομής τεσσάρων απομονωμένων κρασιών, συμπεριλαμβανομένων των προηγουμένως αλληλουχούμενων AWRI1499 και CBS2499 σε συνδυασμό με πρόσφατης (εκ νέου) αλληλουχίας AWRI1608 και AWRI1613, (Borneman et al., 2014). Αυτές οι μελέτες αποκάλυψαν ότι παρόλο που τα περισσότερα στελέχη *B.bruxellensis* έχουν παρόμοια γενικά χαρακτηριστικά, το γενετικό περιεχόμενο (πολυπλοκότητα, καρυότυπος κτλ) μπορεί να ποικίλλει σημαντικά (Steensels et al,2015). Η συγκριτική ανάλυση των αλληλουχιών *B.bruxellensis* αποκάλυψε κάποιες ενδιαφέρουσες γονιδιωματικές ιδιότητες που θα μπορούσαν να συνδεθούν με τη συμπεριφορά τους και τις οικολογικές

τους θέσεις. Από τη σύγκριση των αναλογιών αλληλόμορφων σε ετερόζυγες θέσεις για τα πέντε στελέχη *B. bruxellensis* (AWRI1499, CBS2499, AWRI1608, AWRI1613 και YV397), έχει προταθεί ένα τριπλό γονιδίωμα για τα AWRI1499 και CBS2499 και ένα διπλοειδές γονιδίωμα για τα AWRI1613 και YV397. Τα στελέχη *B. bruxellensis* με ένα τριπλοειδές γονιδίωμα φέρουν δύο αντίγραφα ενός κοινού χρωμοσώματος και ένα ασυνήθιστο σύνολο άλλων χρωμοσωμάτων. Η παρουσία του τρίτου αντιγράφου χρωμοσώματος πιθανώς συνδέεται με την αντοχή στα θειώδη άλατα στα οينوποιεία (Menoncin και Bonato, 2019). Παρομοίως, η εμφάνισή του παρέχει επιλεκτικά πλεονεκτήματα σε περιβάλλον με έλλειψη θρεπτικών συστατικών και στρες, όπως η μπύρα, όπου υπάρχουν περιορισμένες ποσότητες υδατανθράκων και αμινοξέων, ασκώντας έτσι μια ισχυρή θετική επιλογή για τη διατήρηση της πολυπλοειδίας. Επιπλέον, η πολυπλοειδία του *Brettanomyces* επισημαίνει διακριτά συμβάντα υβριδισμού που συνέβησαν σε διαφορετικές γεωγραφικές τοποθεσίες. Επιπλέον, η πλαστικότητα στη χρωμοσωμική δομή σε σχέση με ασυνήθιστα κεντρομερή ενισχύει την εμφάνιση υβριδισμού. Έχουν αναφερθεί τρεις γενετικές συστάδες για στελέχη *B. bruxellensis* μέσω ανάλυσης 1488 στελεχών χρησιμοποιώντας μικρο-δορυφορικό γονότυπο: AWRI1499-τύπου, AWRI1608-like και CBS 2499-like ομάδες. Επίσης, το *B. bruxellensis* μπορεί να θεωρηθεί ταξινομικό σύμπλεγμα διπλοειδούς-τριπλοειδούς με συνύπαρξη υποπληθυσμών που περιέχουν διαφορετικούς αριθμούς πλοειδίας (Menoncin και Bonato, 2019).

Παρόλο που τα είδη *Brettanomyces* δεν αναπαρήγαγαν ολόκληρο το γονιδίωμα, δείχνουν πολλές περιπτώσεις παραλλαγής αριθμού αντιγράφων λόγω τοπικών αντιγράφων, για παράδειγμα στο στέλεχος CBS2499. Παρόμοια με προηγούμενες εκθέσεις στο *S. cerevisiae* (Brown et al., 2010), τέτοιες παραλλαγές αριθμού αντιγράφων είναι συχνές στα υπομερή και συχνά περιλαμβάνουν γονίδια που εμπλέκονται στον μεταβολισμό του σακχάρου, υποδεικνύοντας ότι θα μπορούσε να βοηθήσει στην αποτελεσματική χρήση συγκεκριμένης πηγής άνθρακα (Borneman et al., 2014). Εκτός από την παραλλαγή του αριθμού αντιγράφων, παρατηρήθηκαν επίσης μικτές χρωμοσωμικές αναδιατάξεις: η σύγκριση του καρυότυπου 30 διαφορετικών στελεχών αποκάλυψε αξιοσημείωτες ενδοσκοπικές διαφορές (Hellborg και Piskur, 2009).

Ενώ η γενική ρύθμιση του χρωμοσώματος συνήθως διατηρείται καλά μεταξύ των πληθυσμών μυκήτων που ανήκουν στο ίδιο είδος (π.χ. διαφορετικά στελέχη του *S. cerevisiae* είναι γραμμικά και αποτελούνται από 16 χρωμοσώματα), η διαμόρφωση χρωμοσωμάτων των στελεχών *B. bruxellensis* βρέθηκε να είναι πολύ πιο μεταβλητή.

Τα στελέχη *B. bruxellensis* μπορούν να περιέχουν μεταξύ 4 και 9 χρωμοσωμάτων, και το μέγεθος αυτών των χρωμοσωμάτων μπορεί να κυμαίνεται από 1 έως 6 Mbp. Αυτό υποδηλώνει ότι τα είδη *Brettanomyces* ενδέχεται να χρησιμοποιούν συχνές διαφορές στη δομή του χρωμοσώματος για να αυξήσουν τη μεταβλητότητα και την ανταγωνιστικότητά τους στο γονιδίωμα. Παρόλο που η γονιδιωματική μεταβλητότητα είναι ωφέλιμη για την προσαρμοστικότητα των ειδών, μπορεί να παρεμποδίσει τη σεξουαλική αναπαραγωγή και να οδηγήσει στο σχηματισμό ενός νέου είδους. Η απλοτυπία δειγματοληψίας του AWRI1499 αποκάλυψε ότι το γονιδίωμα περιλαμβάνει ένα ετερόζυγο διπλοειδές γονιδίωμα, σε συνδυασμό με ένα διαφορετικό απλοειδές γονιδίωμα. Αυτό υποδηλώνει ένα συμβάν υβριδοποίησης δύο ειδών ή ξεχωριστών υποειδών του *B. bruxellensis*, του διπλοειδούς και του απλοειδούς. Υποστηρίχθηκε ότι αυτό το επιπλέον απλοειδές γονιδίωμα μπορεί να προσφέρει ένα επιλεκτικό πλεονέκτημα σε ένα οινοποιείο, καθώς αυτή η τριπλοειδής γονιδιωματική δομή ανιχνεύτηκε στο 92% όλων των απομονωμένων κρασιών της Αυστραλίας. Αποδείχθηκε, ακόμη, ότι τα κλάσματα απλοειδούς γονιδιώματος των AWRI1608 και AWRI1499 ήταν φυλογενετικά μακρινά, υπονοώντας δύο ανεξάρτητα συμβάντα υβριδισμού (Borneman et al., 2014). Τα γεγονότα υβριδισμού μεταξύ των ειδών δεν είναι σπάνια στους μύκητες και παρατηρούνται επίσης στο *Saccharomyces sensu rigo clade*. Για παράδειγμα, η ζύμη μπύρας lager *Saccharomyces pastorianus* είναι ένα υβρίδιο μεταξύ των ειδών *S. cerevisiae* και *S. eubayanus* (Libkind et al., 2011). Δεδομένου ότι τα νεοσυσταθέντα υβριδικά γονιδιώματα τείνουν να είναι πολύ ασταθή (όπως φαίνεται συχνά για τα υβρίδια *Saccharomyces* (Antunovics et al., 2005)), οι μηχανισμοί που οδηγούν στη σταθεροποίηση του γονιδιώματος θα μπορούσαν να εξηγήσουν την ακραία μεταβλητότητα του καρυστύπου που παρατηρήθηκε στο *B. Bruxellensis* (Steensels et al., 2015).

Γενικότερα, τα είδη *Brettanomyces* έχουν αναφερθεί ότι ανέχονται περισσότερο stress από το *S. cerevisiae*. Πράγματι, το *Brettanomyces* εμφανίζει ανάπτυξη μετά από την πρώτη ζύμωση από *S. cerevisiae* τόσο σε μπύρα όσο και σε κρασί, τα οποία περιέχουν υψηλά επίπεδα αιθανόλης και λίγο ή καθόλου διαλυμένο οξυγόνο (Curtin et al., 2007). Η ικανότητα των ειδών *Brettanomyces* να επιβιώσουν σε τέτοια περιβάλλοντα συνδέεται με τη δομή / σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος και την παρουσία πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην πρόσφυση, στην ανάπτυξη κυτταρικού τοιχώματος και στην ανάπτυξη ψευδοϋπόφυσης (Menoncin και Bonato, 2019). Επιπλέον, το *Brettanomyces* μπορεί να χρησιμοποιήσει πηγές αζώτου πιο αποτελεσματικά από το *S. cerevisiae* (de Barros et al., 2011). Σε περιβάλλον μπύρας, ο μεταβολισμός των νιτρικών μπορεί να είναι

σημαντικός για την υποστήριξη του *Brettanomyces*, καθώς ο λυκίσκος μπορεί να παρέχει σημαντικές ποσότητες νιτρικών (έως 87 mg / mL) στο μύλο. Ωστόσο, δεν μπορούν όλα τα στελέχη *Brettanomyces* να χρησιμοποιούν νιτρικά ως μοναδική πηγή αζώτου (Crauwels et al, 2014). Η ικανότητα χρήσης νιτρικών αλάτων οφείλεται στην παρουσία γονιδίων που κωδικοποιούν μεταφορέα νιτρικών (YNT1), νιτρικές αναγωγές (YNR1) και νιτρώδη αναγωγή (YNR1), μαζί με δύο παράγοντες μεταγραφής σημαντικούς για τη χρήση νιτρικών (YNA1 και YNA2). Τα στελέχη *B.bruxellensis* που έχουν αυτό το σύμπλεγμα γονιδίων, που περιέχει έναν μεταφορέα νιτρικών, αναγωγή νιτρικού, αναγωγή νιτρώδους και τους δύο παράγοντες μεταγραφής τύπου Zn (II) 2 Cys6 (Borneman et al., 2014, Woolfit et al., 2007), προσφέρουν ένα σημαντικό πλεονέκτημα σε σχέση με άλλα είδη, όπως *S. cerevisiae*, σε περιβάλλοντα χαμηλού αζώτου όπως η μελάσα. Παρά τα σαφή πλεονεκτήματα της ικανότητας χρήσης νιτρικών σε συγκεκριμένες θέσεις, η σχέση κόστους-οφέλους της χρήσης νιτρικών μπορεί να ευνοήσει την απώλεια αυτού του χαρακτηριστικού σε ορισμένες θέσεις και να εξηγήσει την παρατηρούμενη ποικιλομορφία αυτού του χαρακτηριστικού μεταξύ διαφορετικών στελεχών (Crauwels et al., 2014). Ωστόσο, για να υποστηρίξουμε αυτήν την υπόθεση, απαιτείται περισσότερη έρευνα χρησιμοποιώντας μια ευρεία συλλογή οικολογικά και γεωγραφικά διαφορετικών στελεχών. Περαιτέρω, η ανάλυση περιεχομένου γονιδίου αποκάλυψε σχετικό εμπλουτισμό γονιδίων που σχετίζονται με κυτταρική μεμβράνη σε σύγκριση με στενά συγγενή είδη και *S. cerevisiae*. Αν και δεν έχουν ακόμη αποδειχθεί για το *Brettanomyces*, αυτά τα γονίδια θα μπορούσαν να είναι πλεονεκτικά για την επιβίωση σε κρασί ή μπίρα που αποθηκεύονται σε δρύινα βαρέλια, όπου αυτά τα γονίδια μπορούν να μεσολαβούν στην προσκόλληση των κυττάρων στα βαρέλια και να τα προστατεύσουν από το ξέπλυμα κατά τον καθαρισμό των βαρελιών (Joseph C. et al, 2007).

Επίσης, αρκετά γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που σχετίζονται με μεμβράνες που περιλαμβάνονται στον εναλλακτικό μεταβολισμό του άνθρακα υπάρχουν στο γένος, επιτρέποντας στον *Brettanomyces* να χρησιμοποιεί χιτίνη, N-ακετυλογλυκοζαμίνη, γαλακτόζη, μαννόζη και λακτόζη (Crauwels et al, 2014) και ένζυμα οξειδοοδουκτάσης (Curtin et al., 2012b). Επιπλέον, σημαντικά γονίδια που εμπλέκονται στην ανοχή στο στρες, όπως τα ATP1, ERG6 και VPS34, μαζί με τους ρυθμιστές στρες MSN4, SNF1, HSP82 και NTH1, έχουν χαρακτηριστεί στο *B. bruxellensis* (Menoncin και Bonato, 2019). Ο (γενεαλογικός-ειδικός) πολλαπλασιασμός των γονιδίων οξειδοοδουκτάσης αντικατοπτρίζει μια στρατηγική που εξελίχθηκε για να επιτρέψει την επιβίωση σε αναερόβιες συνθήκες όπου το είδος έχει εξασθενημένη ικανότητα

αναγέννησης NAD (P) + και μπορεί να εξηγήσει την ικανότητά του να παράγει οξικό υπό αερόβιες συνθήκες, ένα χαρακτηριστικό σχετίζονται με το λεγόμενο φαινόμενο "Custers" και την παραγωγή ορισμένων βασικών αρωματικών ενώσεων (όπως ισοβαλερικό οξύ) (Curtin et al., 2012b, Piskur et al., 2012) .Είναι ενδιαφέρον ότι όχι μόνο η ίδια η αλληλουχία DNA, αλλά και το γενικό σχήμα του γονιδιώματος δείχνουν αρκετά αξιοσημείωτα χαρακτηριστικά. Είναι ενδιαφέρον ότι πολλά από τα εμπλουτισμένα γονίδια που σχετίζονται με τη μεμβράνη (π.χ. ΣΧ. 2, FLO1, FLO5, FLO9, HKR1, MUC1,κ.α) μπορεί να είναι πλεονεκτικά για την επιβίωση σε κρασί ή μπύρα που διατηρούνται σε δρύινα βαρέλια, όπου θα μπορούσαν να μεσολαβούν στην πρόσφυση των κυττάρων στο εσωτερικό τοίχωμα του βαρελιού και να τα προστατεύσει από το πλύσιμο κατά τη διάρκεια καθαρισμού υψηλής πίεσης (Christiaens et al., 2012, Joseph et al., 2007).

Η ικανότητα των ειδών *Brettanomyces* να χρησιμοποιούν πολύ μικρές ποσότητες θρεπτικών ουσιών παρέχει κάποια εξήγηση για το γιατί αυτό το γένος είναι σε θέση να επιβιώσει σε καταστάσεις όπου τα είδη *Saccharomyces* δεν μπορούν να επιβιώσουν. Είναι σημαντικό ότι τα είδη *Brettanomyces* έχουν την ικανότητα να ανέχονται ενώσεις προερχόμενες από θείο, ιδιαίτερα διοξειδίο του θείου (Menoncin και Bonato, 2019).

Πίνακας 2.4 : Λεπτομέρειες για τα έξι γονιδιώματα *Brettanomyces* που ακολουθούνται τώρα. ΔΠ=Δεν Περιγράφεται

Είδος	Curtin et al. (2012b)	Piskur et al. (2012)	Crauwels et al. (2014)	Borneman et al. (2014)	Borneman et al. (2014)	Valdes et al. (2014)
	<i>B/D bruxellensis</i>	<i>B/D bruxellensis</i>	<i>B/D bruxellensis</i>	<i>B/D bruxellensis</i>	<i>B/D bruxellensis</i>	<i>B/D bruxellensis</i>
Κωδικός αποτυπώματος	AWRI1499	CBS2499	ST05.12/22	AWRI 1608	AWRI 1613	LAMAP 2480
Οικολογική θέση	κρασί	κρασί	μπύρα	κρασί	κρασί	κρασί
Χώρα προέλευσης	Αυστραλία	Γαλλία	Βέλγιο	Αυστραλία	Αυστραλία	Χιλή
Μέγεθος γονιδιώματος	12.7	13.4	13.0	ΔΠ	ΔΠ	ΔΠ
Μέση κάλυψη	26x	128x	100–110x	61x	68x	26x
πλοειδία	τριπλοειδές	διπλοειδές	διπλοειδές	τριπλοειδές	διπλοειδές	ΔΠ

◦ Φαινότυπος *Brettanomyces*

Το *Brettanomyces* είναι ένας καλά προσαρμοσμένος ειδικός μικροοργανισμός για ζύμωση. Λόγω της ποικιλομορφίας που περιγράφηκε ανωτέρω είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι δεν μοιράζονται όλα αυτά τα είδη *Brettanomyces* τον ίδιο φαινότυπο. Το πρότυπο ανάπτυξης και ζύμωσης του *Brettanomyces* επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από

περιβαλλοντικούς παράγοντες (Steensels et al, 2015). Ο *B. Bruxellensis* ως το πιο ευρέως διαδεδομένο είδος του και καλύτερα μελετημένο είναι εκείνο που θα δώσει τις περισσότερες πληροφορίες για το πως δρα σε συγκεκριμένες συνθήκες. Ακόμα κι αν οι γενεαλογίες των *B. bruxellensis* και *S. cerevisiae* διαχωρίστηκαν πριν από περίπου 200 εκατομμύρια χρόνια, και οι δύο μοιράζονται αρκετά περίεργα και μάλλον ασυνήθιστα χαρακτηριστικά (υψηλή αντοχή στην οσμωτική πίεση και την αιθανόλη και ανάπτυξη σε περιβάλλοντα περιορισμένου οξυγόνου και χαμηλού pH) που τους επιτρέπουν να ευδοκιμήσουν σε πολλά περιβάλλοντα αλκοολικής ζύμωσης. Παρά το γεγονός ότι ορισμένα από αυτά τα χαρακτηριστικά είναι συνηθισμένα σε όλα τα γένη ζύμης, αυτοί οι παράγοντες σπάνια συνδυάζονται σε ένα είδος (Piskur et al., 2006).

- Επίδραση οξυγόνου

Η διαθεσιμότητα οξυγόνου επηρεάζει έντονα τη συμπεριφορά του *Brettanomyces*. Παρόμοια με το *S. cerevisiae*, τα συνηθέστερα μελετημένα είδη *Brettanomyces* (*B. bruxellensis* και *B. anomala*) είναι προαιρετικά αναερόβια. Είναι ενδιαφέρον, σε αντίθεση με το φαινόμενο Pasteur που θέτει ότι οι ζύμες προτιμούν γενικά την αναπνοή από τη ζύμωση εάν υπάρχει οξυγόνο και το οποίο παρατηρείται στο *Saccharomyces spp.*, όταν οι συγκεντρώσεις σακχάρου είναι χαμηλές, ο μεταβολισμός των υδατανθράκων του *B. bruxellensis* υποβάλλεται σε «αρνητικό αποτέλεσμα Pasteur», που σημαίνει ότι η ζύμωση της γλυκόζης σε αιθανόλη εμποδίζεται σε πλήρως αναερόβιες συνθήκες και διεγείρεται παρουσία οξυγόνου (Barnett et al, 2005, Wijsman et al., 1984, Wikén et al., 1961). Φαίνεται να εμπλέκονται διάφοροι παράγοντες, που σχετίζονται με την αδυναμία του *B. bruxellensis* να αποκαταστήσει ή να διατηρήσει την εσωτερική ισορροπία οξειδοαναγωγής όταν εισήχθη σε αναερόβιες συνθήκες. Όπως περιγράφηκε νωρίτερα, το *B. bruxellensis* παράγει υψηλές ποσότητες οξικού οξέος σε αερόβιες συνθήκες μέσω μιας αφυδρογονάσης NAD + -αλδεΐδης. Αυτή η μη αναστρέψιμη οξειδωτική μετατροπή από ακεταλδεΐδη σε οξικό οξύ παράγει NADH. Όταν υπάρχει οξυγόνο ή άλλος εξωτερικός υποδοχέας ηλεκτρονίων, αυτός ο NADH μπορεί εύκολα να μετατραπεί σε NAD + (Scheffers, 1961). Ωστόσο, όταν μεταφέρεται από αερόβιο σε αναερόβιο περιβάλλον, η έλλειψη NAD + που προκαλείται από τη μετατροπή της ακεταλδεΐδης σε οξικό οξύ οδηγεί γρήγορα σε απόφραξη της γλυκόλυσης (Wijsman et al., 1984). Ενώ αρκετές ζύμες όπως το *S. cerevisiae* μπορούν να αποκαταστήσουν την ισορροπία της οξειδοαναγωγής τους σε αναερόβιες συνθήκες παράγοντας δευτερογενείς μεταβολίτες όπως η γλυκερόλη, το *B. bruxellensis* δεν είναι σε θέση να το κάνει αυτό, πιθανώς επειδή στερούνται (ή παρουσιάζουν μόνο πολύ περιορισμένη)

δραστικότητα φωσφατάσης 3-φωσφορικής γλυκερόλης (Tiukova et al., 2013; Wijnsman et al., 1984).

Παρά το γεγονός ότι αυτή η αδυναμία παραγωγής γλυκερίνης δίνει στο *B. bruxellensis* ανταγωνιστικό πλεονέκτημα έναντι του *S. cerevisiae* σε περιβάλλον ζύμωσης που περιορίζει τα θρεπτικά συστατικά (δεδομένου ότι η παραγωγή γλυκερόλης είναι μια διαδικασία που καταναλώνει ενέργεια), μειώνει την ταχύτητα ανάπτυξης σε αναερόβιες συνθήκες και προκαλεί σημαντική καθυστέρηση όταν τα κύτταρα μεταφέρονται από αερόβιο σε αναερόβιο περιβάλλον .

Μια επιπλέον αιτία του φαινομένου Custers αποκαλύφθηκε με προσδιορισμό αλληλουχίας RNA του *B. bruxellensis* που αναπτύχθηκε σε μικροαεροβικές συνθήκες (Tiukova et al., 2013). Αυτή η μελέτη αποκάλυψε την παρουσία και την εξαιρετικά υψηλή έκφραση του αναπνευστικού συμπλόκου I NADH- αναγωγή ουβικινόνης σε συνθήκες περιορισμένου οξυγόνου, κάτι που είναι ασυνήθιστο για τις θετικές ζύμες Crabtree (Procházka et al., 2010). Η δραστηριότητα αυτού του συμπλόκου της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας (η οποία απουσιάζει από το *S. cerevisiae*) οδηγεί σε πιο αποτελεσματικό μεταβολισμό σε συνθήκες χαμηλού οξυγόνου, περιοριστικές θρεπτικές ουσίες, καθώς περισσότερη ATP μπορεί να παραχθεί μέσω αναπνοής (Leite et al., 2013). Αυτή η σχετικά υψηλή έκφραση των ενζύμων που παράγουν NADH (σε σύγκριση με τα ένζυμα που δημιουργούν NAD⁺) υποστηρίζει περαιτέρω τον πρωταρχικό ρόλο της ανισοροπίας της οξειδοαναγωγής στο φαινόμενο Custers. Μόνο όταν ενεργοποιούνται άλλες (αργές) οδοί ενδοκυτταρικής επαναοξείδωσης του NADH, όπως μείωση υδροξυτυρενίων στα παράγωγα αιθυλίου τους ή ένας εξωτερικός δέκτης ηλεκτρονίων, όπως η ακετοΐνη (Scheffers, 1966), προστίθεται, το *B. bruxellensis* θα είναι σε θέση να ξεφύγει από την αερόβια προς την αναερόβια φάση καθυστέρησης και θα αρχίσει να παράγει ξανά αιθανόλη (χωρίς παραγωγή οξικού οξέος) (Steensels et al., 2015). Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι δεν δρουν όλα τα είδη του *Brettanomyces* εκφράζοντας τον ίδιο φαινότυπο στην επίδραση του οξυγόνου, για παράδειγμα, ο *B. naardenensis*, δεν είναι σε θέση να αναπτυχθεί απουσία οξυγόνου (Rozpedowska et al., 2011).

- Πηγή αζώτου

Ένα από τα πιο συναρπαστικά χαρακτηριστικά του *B. bruxellensis* είναι η ικανότητά του να αντισταθμίζει το *S. cerevisiae*, κατ'εξοχήν, σε ορισμένες συνθήκες ζύμωσης, όπως σε μονάδες παραγωγής αιθανόλης στη Σουηδία και τη Βραζιλία (Passoth et al., 2007). Τα χαρακτηριστικά και η διαθεσιμότητα της πηγής αζώτου συχνά προτείνονται να είναι καθοριστικοί παράγοντες για το ποσοστό επιτυχίας των αυτόχθονων οργανισμών σε αυτές τις θέσεις. Σύμφωνα με αυτήν τη θεωρία, προτάθηκε

ότι το *B. bruxellensis* μπορεί να χρησιμοποιήσει τις διαθέσιμες πηγές αζώτου πιο αποτελεσματικά σε σύγκριση με το *S. cerevisiae* (Conterno et al., 2006, de Barros Pita et al., 2011). Σε αντίθεση με το *S. cerevisiae*, το *B. bruxellensis* είναι ικανό να χρησιμοποιήσει το νιτρικό άλας ως μοναδική πηγή αζώτου και μπορεί επίσης να το καταναλώσει μαζί με άλλες πηγές (de Barros Pita et al., 2011).

Παρά το γεγονός ότι ο μεταβολισμός των νιτρικών αλάτων απαιτεί ενέργεια και ως εκ τούτου προκαλεί μειωμένη ανάπτυξη των κυττάρων και παραγωγή αιθανόλης σε συνθήκες περιορισμένες σε οξυγόνο, παρέχει στον *B. bruxellensis* πλεονέκτημα σε ζυμώσεις βιοαιθανόλης όπου η σχετική ποσότητα νιτρικών μπορεί να είναι υψηλή (de Barros Pita et al., 2013). Πράγματι, αυτό το χαρακτηριστικό δείχνει μια υψηλή μεταβλητότητα μεταξύ διαφορετικών στελεχών *B. bruxellensis* (Conterno et al., 2006, Crauwels et al., 2014), που πιθανώς εξηγείται από τις (μερικές φορές μειονεκτικές) φυσιολογικές επιδράσεις της χρήσης νιτρικών (Borneman et al., 2014, Galafassi et al., 2013). Σε αναερόβιες συνθήκες, είναι ενδιαφέρουσα η παρουσία νιτρικών στο μέσο ζύμωσης που επιτρέπει την παραγωγή οξικού οξέος (συνήθως δεν αντιμετωπίζεται σε αναερόβιες συνθήκες) και ταυτόχρονα καταργεί το φαινόμενο Custers. Επιπλέον, το οξικό οξύ (και όχι η αιθανόλη) είναι ο κύριος μεταβολίτης που παράγεται από τη γλυκόζη σε αερόβιες συνθήκες όταν μόνο νιτρικό υπάρχει ως πηγή αζώτου. Και τα δύο φαινόμενα οφείλονται πιθανώς στη δραστηριότητα των νιτρικών και της νιτρώδους αναγωγής, οι οποίες χρησιμοποιούν το NAD(P)H ως δότες ηλεκτρονίων και λειτουργούν ως οξειδοαναγωγική βαλβίδα σε αναερόβιες συνθήκες ή ανταγωνίζονται με την αφυδρογονάση αλκοόλης για το NADH σε αερόβιες συνθήκες. Παρά τα σαφή πλεονεκτήματα της χρήσης νιτρικών σε συγκεκριμένες θέσεις, όπως ορισμένες ζυμώσεις βιοαιθανόλης, το ισοζύγιο κόστους-ωφέλειας της χρήσης νιτρικών μπορεί να ευνοήσει την απώλεια αυτού του χαρακτηριστικού σε ορισμένες θέσεις και να εξηγήσει την παρατηρούμενη ποικιλομορφία αυτού του χαρακτηριστικού μεταξύ διαφορετικών στελεχών, παρόλο που περαιτέρω απαιτείται έρευνα για τη διερεύνηση αυτής της υπόθεσης (Steensels et al., 2015).

- Πηγή άνθρακα

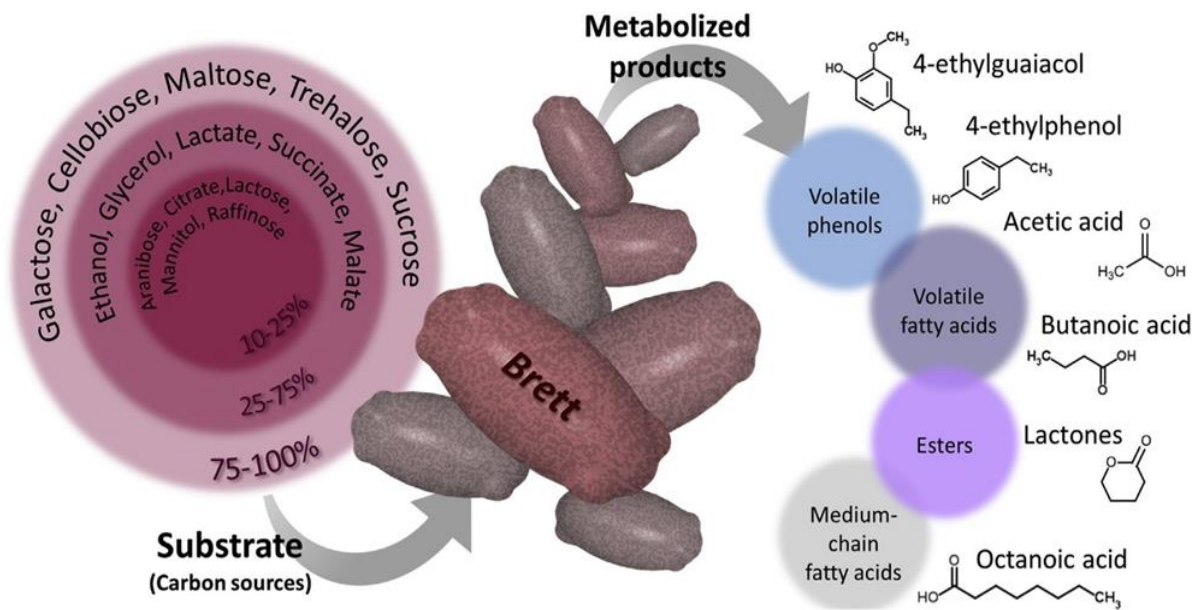
Το *Brettanomyces* είναι σε θέση να ζυμώνει ένα ευρύ φάσμα πηγών άνθρακα, αλλά το κάθε ένα, με πολύ διαφορετικούς ρυθμούς. Ο *B. bruxellensis* έχει αποδειχτεί ότι είναι σε θέση να ζυμώνει μαλτόζη και φρουκτόζη, αν και με χαμηλότερο ρυθμό σε σύγκριση με τη γλυκόζη (Blomqvist, 2011, de Barros Pita et al., 2013). Η αποτελεσματική κατανάλωση σακχαρόζης εξαρτάται από την έκφραση ενός μεταφορέα σακχαρόζης υψηλής απόδοσης (για τον οποίο δεν υπάρχουν ομόλογα στο *S. cerevisiae*) και μπορεί

να είναι το κλειδί για την υψηλή ανταγωνιστικότητα αυτής της ζύμης σε ζυμώσεις με βάση τη σακχαρόζη (de Barros Pita et al., 2011, Tiukova et al., 2013).

Επιπρόσθετα, προτάθηκε ότι μια υψηλότερη ικανότητα γλυκόζης του *B. bruxellensis* σε περιοριστικές συνθήκες άνθρακα (πιθανώς μεσολαβείται από το ορθόλογο του γονιδίου *Candida albicans* HGT1, που κωδικοποιεί έναν μεταφορέα γλυκόζης υψηλής ικανότητας H⁺ -symport) μπορεί τουλάχιστον να εξηγήσει εν μέρει την επιτυχία της στις καλλιέργειες βιοαιθανόλης (Leite et al., 2013). Είναι ενδιαφέρον ότι η ικανότητα ζύμωσης της γαλακτόζης φάνηκε να ποικίλλει μεταξύ των στελεχών *B. bruxellensis* (Crauwels et al., 2014). Η ίδια μεταβλητότητα συναντήθηκε στο *Saccharomyces kudriavzevii*, με ιαπωνικά (αλλά όχι ευρωπαϊκά) προϊόντα απομόνωσης να μην μπορούν να χρησιμοποιήσουν γαλακτόζη. Υποτίθεται ότι το κόστος της ύπαρξης μιας λειτουργικής οδού γαλακτόζης είχε ως αποτέλεσμα επιλεκτική πίεση στον ιαπωνικό πληθυσμό *S. kudriavzevii*, με αποτέλεσμα την απώλεια λειτουργίας όλων των μονοπατιών της διαδρομής (Hittinger et al., 2010). Ωστόσο, δεν είναι σαφές εάν υπάρχει παρόμοια επιλεκτική πίεση στο *B. bruxellensis* (Borneman et al., 2014).

Ίσως το πιο σημαντικό χαρακτηριστικό είναι πως ο *Brettanomyces* μπορεί επίσης να αποικοδομήσει και να ζυμώσει σύνθετα σάκχαρα που δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν εύκολα για το *Saccharomyces spp.*, Όπως η κυτταροβιόζη και οι δεξτρίνες. Η κυτταροβιόζη, ένας δισακχαρίτης που υπάρχει σε υποστρώματα βιοαιθανόλης δευτέρης γενιάς [σχηματίζεται από την ατελή υδρόλυση (λιγνο)κυτταρίνης] και ξύλου (π.χ. σε βαρέλια που χρησιμοποιούνται σε ζύμωση κρασιού ή μπύρας), μπορεί να αποδομηθεί από β-γλυκοσιδάση, ένα ένζυμο συχνά παράγεται από *Brettanomyces* (Blondin et al., 1983, Moon et al., 2001). Το στέλεχος *B. bruxellensis* GDB284 αποδείχτηκε πως είναι ένα στέλεχος ικανό να μεταβολίζει την κυτταροβιόζη, προτάθηκε πρόσφατα ως καλλιέργεια εκκίνησης για την παραγωγή βιοαιθανόλης της Βραζιλίας (Reis et al., 2014).

Οι δεξτρίνες, όπως η μαλτοτετραόζη και η μαλτοπενταζόζη, υπάρχουν ως υπολειμματικά σάκχαρα μετά την κύρια ζύμωση της μπύρας. Το *Brettanomyces* παράγει α-γλυκοσιδάση, επιτρέποντάς τους να υδρολύσουν αυτά τα σύνθετα σάκχαρα σε μονάδες γλυκόζης (Kumara et al., 1993, Kumara and Verachtert, 1991), αποδίδοντας μπύρες «υπερθερμικές» (υπερ-ζυμωμένες) με ελαφρώς υψηλότερα επίπεδα αιθανόλης και χαμηλότερες συγκεντρώσεις υπολειμματικών σακχάρων (και επομένως χαμηλότερη περιεκτικότητα σε θερμίδες) (Steensels et al., 2015).



Εικόνα 2.3: Πηγές άνθρακα προσβάσιμες από το *Brettanomyces* και τα σημαντικότερα μεταβολικά προϊόντα (Freer, 2002).

- Διοξειδίο του θείου

Η αντοχή που έχει αποδείξει ο *Brettanomyces* στο διοξειδίο του θείου είναι περιγράφεται ως μια βιώσιμη αλλά μη καλλιεργούμενη κατάσταση (VBNC) (Steensels et al., 2015). Η επίδραση του στον μεταβολισμό του *Brettanomyces* έχει ιδιαίτερη σημασία για τη βιομηχανία οίνου, όπου δεν υπάρχει στάδιο βρασμού για την απολύμανση του μέσου ζύμωσης (όπως π.χ. στην παρασκευή μπύρας) και η χρήση συντηρητικών, όπως το διοξειδίο του θείου, είναι ο πιο κοινός τρόπος για τον έλεγχο της μικροβιακής μόλυνσης. Επομένως, αρκετές ομάδες έχουν διερευνήσει την ευαισθησία του *Brettanomyces* και ειδικά του *B. bruxellensis*, σε αυτό (Agnolucci et al., 2010, Curtin et al., 2012a, Duckitt, 2012).

Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του κρασιού, διάφορα είδη ζύμης μπορούν να εισέλθουν σε μια λεγόμενη βιώσιμη αλλά μη καλλιεργούμενη κατάσταση (VBNC) μετά από έντονο στρες (Salma et al., 2013, Serpaggi et al., 2012). Το VBNC έχει περιγραφεί ως φυσιολογική κατάσταση όπου τα κύτταρα εμφανίζουν χαμηλά επίπεδα μεταβολικής δραστηριότητας αλλά δεν μπορούν να αναπτυχθούν ή να πολλαπλασιαστούν σε μη επιλεκτικά μέσα. Αυτή η κατάσταση περιγράφεται συχνά σε βακτήρια, αλλά είναι πιο σπάνια (ή τουλάχιστον λιγότερο συχνά αναφέρεται) σε ζύμες. Ωστόσο, το SO₂

αποδείχθηκε ότι προκαλεί απώλεια καλλιέργειας αλλά διατηρεί τη βιωσιμότητα σε είδη ζυμομυκήτων που σχετίζονται με το κρασί, όπως *S. cerevisiae* (Salma et al., 2013) και *B. bruxellensis* (Agnolucci et al., 2010, du Toit et al., 2005, Serpaggi et al., 2012, Zuehlke and Edwards, 2013). Επιπλέον, αποδείχθηκε ότι αυτή η κατάσταση ήταν αναστρέψιμη, καθώς η απομάκρυνση του στρες αυξάνοντας το pH του μέσου (για μείωση της συγκέντρωσης τοξικού SO₂) επέτρεψε στα κύτταρα ζύμης VBNC να αναγεννηθούν (Salma et al., 2013, Serpaggi et al., 2012). Ωστόσο, οι αναφορές για την επίδραση του διοξειδίου του θείου στην αδρανοποίηση του *B. bruxellensis* είναι συχνά αντιφατικές (Chatonnet et al., 1992, Gerbeaux et al., 2002). Πράγματι, η φύση που εξαρτάται από το στέλεχος αυτού του χαρακτηριστικού, τονίζεται από τον Curtin και την ομάδα του (Curtin et al. 2012a), ο οποίος διαπίστωσε ότι η μέγιστη ανοχή σε θείο για τα 41 δοκιμασμένα στελέχη *B. bruxellensis* ποικίλλουν σε εύρος τιμών. Πρόσφατα, μια παρόμοια δοκιμή πραγματοποιήθηκε από τους Vigentini και τους συναδέλφους του, ο οποίος δοκίμασε 108 στελέχη *B. bruxellensis* για ανοχή στο διοξείδιο του θείου. Επιβεβαίωσαν και αυτοί, λοιπόν, την αξιοσημείωτη μεταβλητότητα μεταξύ των ειδών και εντόπισαν δύο στελέχη που θα μπορούσαν να ανεχθούν έως 0,6 mg L⁻¹ μοριακού SO₂ (Vigentini et al., 2013). Ο αρωματικός χαρακτηρισμός μολυσμένων οίνων αποκάλυψε ότι τα κύτταρα VBNC *Brettanomyces* διατηρούν συχνά την ικανότητα χαλάρωσης και συνεχίζουν να παράγουν (χαμηλές συγκεντρώσεις) πτητικών φαινολών (Agnolucci et al., 2010, Serpaggi et al., 2012), αν και τα αποτελέσματα είναι μερικές φορές αντιφατικά (Zuehlke and Edwards, 2013).

Αρκετές πρόσφατες μελέτες διερεύνησαν τις φυσιολογικές μεταβολές του *B. bruxellensis* μετά το stress του διοξειδίου του θείου και την είσοδο VBNC. Η κυτταροτοξικότητα του θείου σε φυτά και άλλα ευκαρυωτικά προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες (όπως OH[•] και H₂O₂) που σχηματίζονται όταν το SO₂ μετατρέπεται από HSO₃⁻ ή SO₂⁻ σε SO₂⁻ και επομένως θα μπορούσε να προκαλέσει οξειδωτικό στρες και συνεπώς αυξημένη ζήτηση NADPH (Vigentini et al., 2013). Μελέτες που στοχεύουν το μεταβολώμα (Vigentini et al., 2013) και το πρωτόμετρο (Serpaggi et al., 2012) των κυττάρων B2D με έμφαση σε διοξείδιο του θείου φαίνεται να υποστηρίζουν αυτήν την υπόθεση. Οι Serpaggi και οι συνεργάτες του (Serpaggi et al., 2012) απέδειξαν ότι υπάρχει μειωμένη γλυκολυτική ροή σε συνδυασμό με αλλαγές στην ομοιόσταση των οξειδοαναγωγικών κυττάρων και στους μηχανισμούς προστασίας στα κύτταρα VBNC (υπαινιγμός για τη διατήρηση ορισμένων μοριακών μηχανισμών μεγάλης κλίμακας μεταξύ ζύμης και βακτηρίων κατά την είσοδο σε κατάσταση VBNC). Πρόσφατα, (Vigentini et al., 2013) εντοπίστηκαν αρκετές μεταβολικές αλλαγές σε απόκριση στο στρες

διοξειδίου του θείου, οι περισσότερες από τις οποίες έδειχναν αυξημένη ζήτηση NAD(P)H. Συγκεκριμένα, παρατήρησαν μια μείωση στα επίπεδα των κυτταροπλασματικών πολυολών και μια μεταβολή των μεταβολιτών που συμμετείχαν στην οδό γλυκεροφωσφολιπιδίων (γλυκερόλη-3-φωσφορική και μυο-ινοσιτόλη) όταν τα κύτταρα εκτέθηκαν σε υποθανατικές συγκεντρώσεις διοξειδίου του θείου. Οι συγγραφείς δεν εντόπισαν μεταβολή στην οδό της φωσφορικής πεντόζης, η οποία οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η χρήση του NADPH θα μπορούσε να εκτραπεί σε άλλες οδούς (Vigentini et al., 2013). Επιπλέον, παρατήρησαν αυξημένη συγκέντρωση ορισμένων αμινοξέων (αλανίνη, γλουταμικό οξύ, γλυκίνη, προλίνη, 5-οξοπρολίνη, σερίνη και βαλίνη), η οποία θα μπορούσε να οφείλεται σε γενική καταστολή της πρωτεϊνικής σύνθεσης, σε αυξημένες οδούς γλυκολυτικού ή τρικαρβοξυλικού οξέος ή στον μηχανισμό αποτοξίνωσης (Vigentini et al., 2013).

- Θερμοκρασία

Οι βέλτιστοι ρυθμοί αύξησης του *Brettanomyces* κυμαίνονται γενικά μεταξύ 25°C και 28 ° C (Fugelsang and Edwards, 2007, Zuehlke and Edwards, 2013). Αρκετές μελέτες έδειξαν ότι η απόδοση αιθανόλης, η παραγωγικότητα και η ανάπτυξη γενικά επηρεάζονται οριακά από τη θερμοκρασία (Blomqvist et al., 2010, Brandam et al., 2008). Μια μελέτη των Blomqvist και συνεργατών (Blomqvist et al., 2010) απέδειξε ότι η παραγωγικότητα του *B. bruxellensis* CBS11269 εξαρτάται πολύ ελαφρώς από τη θερμοκρασία μεταξύ 25 ° C και 37 ° C, ακόμη και σε ποικίλες τιμές pH. Αυτή η ευελιξία μπορεί να εξηγήσει περαιτέρω την ανθεκτικότητα του *Brettanomyces* σε γρήγορα μεταβαλλόμενα περιβάλλοντα όπως οι διαδικασίες ζύμωσης (Steensels et al, 2015).

- Αιθανόλη

Τα περισσότερα στελέχη *Brettanomyces* εμφανίζουν υψηλή αντίσταση έναντι της αιθανόλης, ένα χαρακτηριστικό που είναι κρίσιμο για την επιβίωση σε ένα περιβάλλον ζύμωσης. Ωστόσο, σε γενικές γραμμές, το *Brettanomyces* είναι ελαφρώς πιο ευαίσθητο σε σύγκριση με τα περισσότερα στελέχη *S. Cerevisiae*. Στο *B. bruxellensis*, τα πειράματα σε συνθετικά μέσα δείχνουν ότι το 14,5-15,0% (v v - 1) της αιθανόλης είναι πιθανό να είναι το ανώτερο όριο που επιτρέπει την αύξηση της *Brettanomyces* στα κρασιά. Ωστόσο, αυτό το χαρακτηριστικό εξαρτάται από το στέλεχος και από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως το pH και η συγκέντρωση ελεύθερου θείου (Sturm et al., 2014). Είναι σημαντικό ότι διαφορετικά επίπεδα στο στρες αιθανόλης επηρεάζουν την παραγωγή *Brettanomyces*, με θετική συσχέτιση μεταξύ της πίεσης της αιθανόλης και της παραγωγής αρκετών αιθυλεστέρων, φαινυλαιθανόλης και 4-αιθυλογουαϊακόλης .

3. Ζυμώσεις

3.1 Σημασία *Brettanomyces* σε ζυμώσεις

Ο *Brettanomyces spp.* έχει απομονωθεί οικολογικά από αυθόρμητες διαδικασίες ζύμωσης όπως αυτές των οινοπνευματωδών ποτών (μπύρα, κρασί, μηλίτης, τεκίλα), αναψυκτικών, γαλακτοκομικών προϊόντων, kombucha, ξινών ζυμών και ελιών. Σήμερα, έχει αναγνωριστεί η σημασία των ειδών *Brettanomyces* στη ζύμωση μπύρας, κρασιού και βιοαιθανόλης (Colomer et al, 2018) αλλά τα μοριακά και βιοχημικά χαρακτηριστικά αυτών των ειδών που απαιτούνται για την παρασκευή είναι ελάχιστα κατανοητά μιας και ο ρόλος του *Brettanomyces* σε αυτές τις ζυμώσεις είναι συχνά διαφορούμενος, όπως έχει αναφερθεί.

Γενικά τα είδη *Brettanomyces* μοιράζονται πολυάριθμους φαινοτύπους με το *S. cerevisiae* που ενδιαφέρουν τη βιομηχανία παρασκευής, συμπεριλαμβανομένης της βιοχημικές και μοριακές πτυχές (μεταγραφική πλαστικότητα για την αντιμετώπιση των προβλημάτων που προκαλούν στρες) (Rozpedowska et al, 2011).

Ο συνδυασμός σε υψηλή ανοχή στην αιθανόλη, η δυνατότητα ανάπτυξης σε αναερόβιες συνθήκες με ευρύ φάσμα πηγών άνθρακα, έχοντας την ικανότητα να χρησιμοποιεί σύνθετους υδατάνθρακες (όπως μαλτοτετραόζη και μαλτοπενταζόζη), και με πηγή αζώτου ακόμη και αποκλειστικά το νιτρικό, η αντοχή στο διοξείδιο του θείου και παράγοντας οξικό οξύ ώστε να αναστέλλει την ανάπτυξη άλλων μικροβίων, καθιστά τον *Brettanomyces* έναν ιδιαίτερα ενδιαφέρον μικροοργανισμό. Παρακάτω θα περιγραφεί η ζύμωση χαρακτηριστικών προϊόντων του ώστε να διαπιστωθεί πως επιδρά στο καθένα ξεχωριστά.

3.2 *Brettanomyces* στη μπύρα

Η μπύρα, ένα από τα παλαιότερα βιοτεχνολογικά προϊόντα, έχει σημαντικό θρεπτικό, κοινωνικό, επιστημονικό και οικονομικό αντίκτυπο. Η μπύρα συνδυάζει βύνη δημητριακών, λυκίσκο ή / και διαφορετικά βότανα και νερό για να δημιουργήσει βύνη που ζυμώνεται από γηγενείς ζύμες / βακτήρια ή, πιο συχνά, από καθαρές καλλιέργειες των ειδών *Saccharomyces*. Σύμφωνα με τα αρχαιολογικά δεδομένα, η μπύρα μπορεί να εντοπιστεί στις πρώτες γεωργικές κοινωνίες πριν από 10.000 χρόνια, που συμπίπτει με την εξημέρωση των δημητριακών. Επί του παρόντος, η κατανάλωση μπύρας αυξάνεται γενικά παγκοσμίως και η βιομηχανία ζυθοποιίας παρουσιάζει ευρεία ανάπτυξη (Menoncin και Bonato, 2019).

Διάφορα είδη ζύμης ανακαλύφθηκαν μόνο ότι είναι υπεύθυνα για τη ζύμωση μπύρας τη δεκαετία του 1860 ως συνέπεια της εργασίας του Louis Pasteur (Barnett, 1998). Η αναγνώριση της ζύμης και η εξημέρωσή της επέτρεψαν καλύτερο έλεγχο της

διαδικασίας ζύμωσης και βελτίωση της ποιότητας του τελικού προϊόντος, οδηγώντας στην επιλογή μιας πληθώρας στελεχών ζύμης που χρησιμοποιούνται στην παρασκευή (Boulton and Quain, 2001). Αυτά τα στελέχη ζύμης περιλαμβάνουν *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pastorianus* και ημι-εξημερωμένα μη συμβατικά είδη (Bokulich and Bamforth, 2013). Ένα μη συμβατικό γένος ζύμης παρασκευής που προσελκύει την προσοχή λόγω των ασυνήθιστων χαρακτηριστικών του είναι το *Brettanomyces* (Michel et al, 2016). Ο Niels Hjelte Claussen ανέφερε για πρώτη φορά αυτό το γένος το 1904, ενώ έψαχνε στο Carlsberg Brewery για μια εξήγηση για τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των αγγλικών αποθεμάτων μπίρας (π.χ. άφθονος και διαρκής αφρός, οξέα και πτητικές ουσίες (Claussen, 1904).

Ενώ, λοιπόν, η συντριπτική πλειονότητα των ειδών μπίρας παρασκευάζεται από καθαρές καλλιέργειες των ζυμών *S. cerevisiae* (*ale*) ή *S. pastorianus* (*lager*), κάποιοι τύποι μπίρας βασίζονται σε φυσικό εμβολιασμό (Bokulich and Bamforth, 2013, Martens et al., 1997; Verachtert, 1992). Παρόλο που παράγονται πολλοί τύποι τέτοιων ειδών μπίρας, κυρίως στην Αφρική (π.χ. Kayode et al., 2011, Sawadogo-Lingani et al., 2007), τα πιο γνωστά είναι οι μπίρες *lambic* και *gueuze* που παράγονται στη γύρω περιοχή των Βρυξελλών, στο Βέλγιο. Λόγω των μοναδικών αισθητήριων χαρακτηριστικών τους, πολλές ζυθοποιίες σε όλο τον κόσμο μιμούνται τη διαδικασία παραγωγής τους και αναπτύσσουν παρόμοια στυλ μπίρας, όπως το American Coolship Ales (Bokulich et al., 2012). Οι μπίρες τύπου *lambic* χαρακτηρίζονται από έναν πολύ μεγάλο χρόνο ζύμωσης και μια πλούσια, περίπλοκη επίγευση με ιδιαίτερους τόνους που σχετίζονται με την πλούσια βακτηριακή και μυκητιακή ανάπτυξη που ευδοκιμεί κατά τη διάρκεια αυτών των ζυμώσεων. Το μικροβίωμα σε αυτές τις ζυμώσεις είναι πολύπλοκο, με πολλά γένη ζύμης και βακτηρίων να συνυπάρχουν και να ποικίλλουν με την πάροδο του χρόνου (Steensels and Verstrepen, 2014). Το είδος μπίρας *lambic* περιγράφηκε διεξοδικά το 1977 (Van Oevelen et al., 1977) και πρόσφατα διερευνήθηκε εκ νέου χρησιμοποιώντας σύγχρονες τεχνικές. Αυτές οι μελέτες δείχνουν ότι ο μικροβιακός πληθυσμός αποτελείται κυρίως από ζύμες και LAB (κυρίως *Lactobacilli* και *Pediococci*). Ενώ το μεγαλύτερο μέρος της αλκοολικής ζύμωσης πραγματοποιείται από το *S. cerevisiae*, σε μεταγενέστερα στάδια, όταν εξαντλούνται οι περισσότεροι μικρού μήκους ολιγοσακχαρίτες όπως η μαλτόζη και η μαλτοτριόζη, ο *S. cerevisiae* σταδιακά αντισταθμίζεται από *Brettanomyces*. Κυρίως, δε από τον *B. Bruxellensis* και είναι μια διαδικασία που συμβαίνει συνήθως μετά από 4-8 μήνες (Bokulich et al., 2012, Van Oevelen et al., 1977). Το *Brettanomyces* διατηρεί το πιο διαδεδομένο γένος ζύμης μέχρι το τέλος της ζύμωσης. Κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης της ζύμωσης (που ονομάζεται περίοδος ωρίμανσης), η συγκεκριμένη μεταβολική

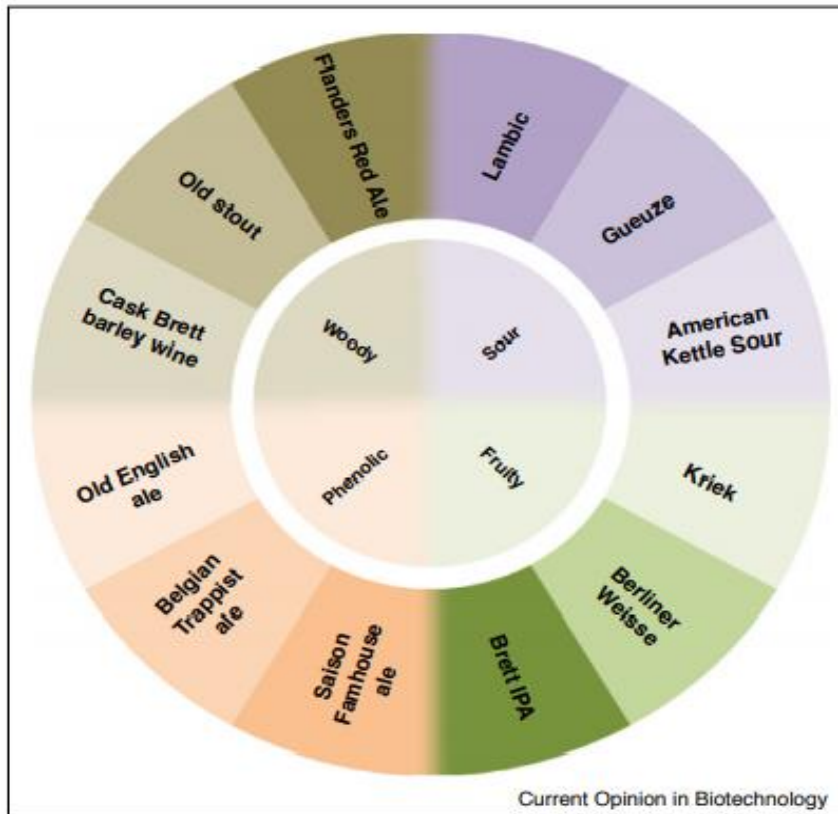
δραστηριότητα του *Brettanomyces*, συμπεριλαμβάνει την εστεράση, την β-γλυκοσιδάση, την α-γλυκοσιδάση και τη δραστηριότητα VPR και καθώς ο μεταβολισμός που σχετίζεται με τα βακτήρια LAB προκαλεί δραστικές αλλαγές στο οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του ποτού, οδηγεί σε ένα ποτό με μια μοναδική επίγευση (Verachtert, 1992). Η υψηλή δραστικότητα εστεράσης, υπεύθυνη για τη βιοσύνθεση των εστέρων που έχουν φρουτώδη γεύση (Sraeren et al, 1982). Επιπλέον, ο *Brettanomyces* απελευθερώνει αρωματικές δραστικές ενώσεις σε απόκριση της δραστικότητας της β-γλυκοσιδάσης, η οποία αποικοδομεί τους γλυκοζίτες από λυκίσκο ή φρούτα σε αγλυκόνες (π.χ. λινολοόλη) (Daenen et al, 2008a). Επιπλέον, τα είδη *Brettanomyces* παράγουν φαινόλες κεραμιδιών από βότανα όπως 4-βινυλογουαϊακόλη (γεύση γαρίφαλου) και τετραϋδροπυριδίνες (γεύση τύπου μπισκότου mousy / cracker) (Kosel et al, 2014). Μαζί, αυτές οι μελέτες αποκάλυψαν ένα σταθερό μικροβιακό πρόγραμμα που παρέχεται μεταξύ διαδοχικών παρτίδων.

Επιπλέον, ο πυρήνας του μικροβιώματος είναι συνεπής σε διαφορετικές περιοχές: τα κυρίαρχα είδη (όπως *S. cerevisiae* και *B. bruxellensis*) βρέθηκαν σε όλες τις ζυμώσεις, ενώ η παρουσία άλλων ειδών, όπως τα εντεροβακτήρια στην έναρξη της ζύμωσης, αποδείχθηκε ότι εξαρτώνται από την περιοχή. Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν την παρουσία ενός συγκεκριμένου, σταθερού μικροβιώματος ζυθοποιίας που διατηρείται στα μηχανήματα, τα βαρέλια, τις δεξαμενές και άλλες επιφάνειες του ζυθοποιείου.

Γενικά, η διαδικασία ζύμωσης μπίρας αποτελείται από τέσσερις φάσεις, καθεμία από τις οποίες χαρακτηρίζεται από μια τυπική μικροβιακή κοινότητα. Η αρχική φάση ξεκινά μετά από 3 έως 7 ημέρες ζύμωσης και συνεχίζεται έως 30 έως 40 ημέρες. Αυτή η φάση χαρακτηρίζεται από μια ευρεία μικροβιακή ποικιλομορφία που αποτελείται κυρίως από *Enterobacteriaceae* (Martens et al, 1991) μαζί με ζύμες όπως *Kluyveromyces sp.*, *Naumovia dairensis*, *Pichia sp.*, *Rhodotorula sp.* και *Saccharomyces uvarum*, προκαλώντας πτώση του pH (κάτω στο pH 4,6) και ελαφρά αύξηση της συγκέντρωσης αιθανόλης. Στη συνέχεια, η κύρια ζύμωση χαρακτηρίζεται από την παρουσία ειδών *Saccharomyces* όπως το *S. cerevisiae*, *S. bayanus* και *S. uvarum*, και οδηγεί σε αύξηση της συγκέντρωσης αιθανόλης (Verachtert and Iserentant 1995). Μετά από τρεις έως τέσσερις μήνες ζύμωσης, λαμβάνει χώρα η φάση οξίνισης η οποία χαρακτηρίζεται από υψηλή πυκνότητα βακτηρίων γαλακτικού οξέος, δηλαδή *Pediococcus spp.*, και (σε μικρότερους αριθμούς) βακτήρια οξικού οξέος, παρέχοντας ξινή γεύση στην μπίρα. Μετά από τέσσερις έως οκτώ μήνες ζύμωσης, οι περισσότεροι μονο-, δι- και τρισακχαρίτες (όπως γλυκόζη, φρουκτόζη, σακχαρόζη, μαλτόζη και μαλτο-

τρίοζη) εξαντλούνται και η συγκέντρωση αιθανόλης έχει αυξηθεί σε περίπου 5-6% ο / ο. Αυτό το ιδιαίτερα ειδικό περιβάλλον προκαλεί μετατόπιση στην κοινότητα ζύμης από *Saccharomyces* σε *Brettanomyces spp.* (ως επί το πλείστον *B. Bruxellensis*) . Το *Brettanomyces* συνδυάζει υψηλή ανοχή στην αιθανόλη και την ικανότητα να χρησιμοποιεί σύνθετους υδατάνθρακες όπως μαλτοτετραόζη και μαλτοπενταζόζη, ενώ μπορεί να φτάσει σε αριθμούς κυττάρων 104-105 κύτταρα ανά ml, επιτρέποντάς τους να προσδιορίσουν το τυπικό . Η τελική φάση ωρίμανσης, κατά τη διάρκεια της οποίας εξασθενεί σταδιακά το μύκητα, ξεκινά μετά από δέκα μήνες ζύμωσης και χαρακτηρίζεται από μείωση βακτηρίων γαλακτικού οξέος (Verachtert and Iserentant 1995). Το *B. bruxellensis* διαδραματίζει ουσιαστικό ρόλο στις διαδικασίες ζύμωσης μπίρας που βασίζονται σε ένα φυσικό εμβόλιο, όπως το είδος και gueze. Άλλα παραδείγματα στυλ μπίρας που περιλαμβάνουν ζύμες *Brettanomyces* περιλαμβάνουν όξινες μπύρες που παράγονται στη βορειοδυτική Φλάνδρα (Βέλγιο), αμερικανικές μπύρες ψυχαγωγίας εμπνευσμένες από μπύρες lambic, μπύρες σιταριού τύπου Βερολίνου και ορισμένες βελγικές μπύρες Trappist (και άλλες μπύρες) με μπουκάλι παραπομπή από τον *Brettanomyces* (Martens et al, 1997).

Οι μπύρες lambic, χαρακτηριστικό είδος του οποίου υπεύθυνος για την τελική της γέυση είναι ο *Brettanomyces* είναι από τους παλαιότερους τύπους μπίρας που παρασκευάζονται ακόμη και παραδοσιακά παρασκευάζονται κατά τους ψυχρότερους μήνες του έτους (Οκτώβριος έως Μάρτιος). Απαιτούνται κρύες νύχτες για να μειωθεί η θερμοκρασία του μαγειρεμένου μούστου κατά τη διάρκεια της νύχτας σε περίπου 20 ° C στο λεγόμενο «δροσερό». Ακολούθως, το ψυχρό μούστο θεωρείται ότι εμβολιάζεται με συγκεκριμένα μικρόβια από τον αέρα ή το περιβάλλον της ζυθοποιίας και μεταφέρεται σε ξύλινα βαρέλια τα οποία αποθηκεύονται σε κελάρι ή σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος, δηλ. Συνήθως μεταξύ 10 και 25 ° C. Στη συνέχεια, το ζύμωμα του μούστου και η μπίρα αρνί ωριμάζουν στα ίδια βαρέλια. Το τελικό προϊόν είναι μια μη ανθρακούχα ξινή μπίρα λάμπι που χρησιμεύει κυρίως ως βάση για μπύρες gueuze ή φρούτων lambic που αναφέρονται στη φιάλη. Σε ορισμένες βιομηχανικές διεργασίες, όπως οι βελγικές ζυμώσεις Lambic ή το American Coolship Ale, η παρουσία του *B. bruxellensis* και του αρώματος του προϊόντος θεωρείται απαραίτητη και ωφέλιμη, ενώ οι ίδιες ενώσεις αρώματος θεωρείται ως απώλεια όταν συμβαίνει στο κρασί) (Crauwels et al, 2015).



Εικόνα 3.1 : Στυλ μύρας *Brettanomyces*. Εμφανίζονται τα πιο συνηθισμένα στυλ μύρας στα οποία μπορεί να συνεισφέρει το είδος *Brettanomyces* με τις αρωματικές του ιδιότητες. Τα στυλ μύρας *Brettanomyces* έχουν τακτοποιηθεί με βάση την πιο κυρίαρχη γεύση τους από τις 4 πιο κοινές οργανοληπτικές ιδιότητες ξυλώδη, ξινή, φαινολική και φρουτώδη που βρίσκονται στις μύρες *Brettanomyces*. Παρ' όλα αυτά, κάθε στυλ μύρας έχει σημαντική πολυπλοκότητα και μπορεί να εμφανίζει χαρακτήρες από άλλες κατηγορίες (Colomer et al, 2018)

Ο *Brettanomyces* μπορεί επίσης να επηρεάσει αρνητικά τις μύρες ως μολυσματικό παράγοντα κατά τη ζύμωση, τη ρύθμιση και τη διανομή βαρελίσιας μύρας, παράγοντας ενώσεις που θεωρούνται εκτός γεύσης (Shimotsu et al, 2015). Από την άλλη πλευρά, οι θετικές συνεισφορές του *Brettanomyces* στη γεύση, το άρωμα και την εξασθένηση αναγνωρίζονται καλά στις βελγικές μύρες όπως το lambic και το gueuze (Roos et al, 2018). Επιπλέον, αυτό το γένος έχει σημαντικό ρόλο στη δευτερεύουσα προετοιμασία της μύρας Trappist, των αγγλικών μελισσών και των αμερικανικών δροσερών ειδών μύρας.

- Φαινόμενο Crabtree

Το φαινόμενο Crabtree είναι ένα σημαντικό χαρακτηριστικό σε αναδυόμενες μη συμβατικές ζύμες που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία ζυθοποιίας, καθώς παρέχει την ικανότητα παραγωγής αιθανόλης σε αξιολογές ποσότητες (5-15% ABV). Η απόδοση αιθανόλης μπορεί να είναι > 14% (ο / ο) σε ζυμώσεις χρησιμοποιώντας *B. bruxellensis* (De Deken, 1966). Ως εκ τούτου, παρόλο που θα έχει αντίκτυπο στη γεύση, το

Brettanomyces μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην κατασκευή μπύρας υψηλής βαρύτητας που περιέχουν υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης (Galafassi et al, 2010).

- Custer εφέ

Επιπρόσθετα από οσα έχουν αναφερθεί, οι αντιδράσεις που περιλαμβάνουν την οξειδωση NADH / NADPH περιλαμβάνουν τον μεταβολισμό των υδροξυκινναμικών οξέων (ρ-κουμαρικά και φουρουλικά οξέα) που υπάρχουν στην μπύρα (Menoncin και Bonato,2019).

- Σύνθεση οξικού οξέος

Η παρουσία οξικού οξέος θεωρείται θετικό χαρακτηριστικό σε ορισμένους τύπους μπύρας, ιδίως σε αυθόρμητες ζυμωμένες μπύρες ηλικίας βαρελιού όπως lambic, gueze, Φλάνδρα και μπύρες Coolship. Η ποσότητα του οξικού οξέος που παράγεται σχετίζεται με τον τρόπο διαχείρισης της διαδικασίας, ιδιαίτερα την επιλογή του στελέχους ζύμης και την αρχική οξυγόνωση του μούστου. Μια υψηλή συγκέντρωση οξυγόνου διεγείρει την ανάπτυξη του *Brettanomyces* και τη σύνθεση του οξικού οξέος, και συνεπώς το μύκητα με υψηλά αρχικά επίπεδα οξυγόνου θα περιέχει υψηλότερες συγκεντρώσεις οξικού οξέος και θα σχηματίσει περισσότερους εστέρες που εξαρτώνται από οξικά (Tonsmeire, 2014).

3.3 *Brettanomyces* στο κρασί

Ενώ η παρουσία τους σε αυτές τις ειδικές μπύρες είναι επιτακτική, οι ζύμες *Brettanomyces* θεωρούνται επίσης μερικά από τα χειρότερα μικρόβια αλκοολισμού στο κρασί, προκαλώντας σημαντικές οικονομικές απώλειες (Loureiro και Malfeito-Ferreira, 2003). Όπως και με την μπύρα, οι γεύσεις του κρασιού είναι προϊόντα πολύπλοκων αλληλεπιδράσεων μεταξύ πολλών μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων *S. cerevisiae* και μερικοί άλλοι. Ενώ οι ζυμομύκητες *Saccharomyces* είναι οι πιο συνηθισμένοι οδηγοί ζύμωσης κρασιού, άλλοι οργανισμοί, όπως μύκητες, βακτήρια ή άγριες ζύμες μπορούν να μολύνουν τις ζυμώσεις, μερικές φορές με αποτέλεσμα την παρεκκλίνουσα ζύμωση και τα τη δημιουργία άλλων προφίλ επίγευσης. Αυτά τα μικρόβια μπορεί να υπάρχουν ως μολυσματικοί παράγοντες στην καλλιέργεια εκκίνησης, να εμφανίζονται φυσικά σε δέρματα σταφυλιών, να εισάγονται από έντομα ή να έχουν έναν κύριο βιότοπο στο ίδιο το οινοποιείο, όπου μπορούν να επιβιώσουν στους τοίχους, τις πρέσες, τις δεξαμενές ζύμωσης ή σε το ξύλο των βαρελιών παλαίωσης (Fugelsang and Edwards, 2007), επιτρέποντάς τους να αποικίσουν το γλεύκος σταφυλιού ζύμωσης ή το κρασί που ωριμάζει. Το *B. bruxellensis* είναι ένα τέτοιο είδος, το οποίο μπορεί να επιβιώσει για μεγάλο χρονικό διάστημα στο οινοποιείο και να επηρεάσει αρνητικά την ποιότητα του κρασιού. Πιο συγκεκριμένα, το *B. bruxellensis* μπορεί να κάνει μια

δευτερεύουσα ζύμωση αφού το *S. cerevisiae* έχει ολοκληρώσει την αλκοολική ζύμωση, αλλάζοντας το προφίλ γεύσης.

Ωστόσο, για τη μείωση του κινδύνου μόλυνσης, συχνά εφαρμόζονται συγκεκριμένες προληπτικές πρακτικές. Ενώ ο συνδυασμός συνθηκών καταπόνησης που σχετίζονται με το κρασί (π.χ. οι υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης, θείου και οσμωτικών κυττάρων) αποτρέπει τον πολλαπλασιασμό των περισσότερων μολυσματικών ουσιών, ορισμένα είδη *Brettanomyces* είναι πολύ ανεκτικά σε αυτές τις συνθήκες και κατά συνέπεια, εξακολουθούν να εντοπίζονται συχνά σε ζύμωση κρασιού. Στη συντριπτική πλειονότητα των περιπτώσεων, δεν είναι επιθυμητή η παρουσία *Brettanomyces* στις καλλιέργειες οίνου. Πολλές μελέτες έχουν ως εκ τούτου επικεντρωθεί σε μεθόδους για την ανίχνευση κυττάρων *Brettanomyces* σε ζύμωση κρασιού, με στόχο την ανακάλυψη μολύνσεων πολύ νωρίς στη διαδικασία της οινοποίησης (Cecchini et al., 2013, Cocolin et al., 2004). Ωστόσο, σε χαμηλά επίπεδα, ορισμένοι οινοποιοί συμφωνούν ότι η παρουσία αυτών των ενώσεων μπορεί να έχει θετική επίδραση στο κρασί, συμβάλλοντας στην πολυπλοκότητα και δίνοντας έναν χαρακτήρα ηλικίας σε μερικά νεαρά κόκκινα κρασιά. Ορισμένα κρασιά βασίζονται ακόμη και στο *Brettanomyces* για να δώσουν το χαρακτηριστικό τους χαρακτηριστικό άρωμα, όπως τα γαλλικά κρασιά Château de Beaucastel, καθώς μπορεί να προσθέσει θετικά εφέ όπως η αισθητηριακή πολυπλοκότητα και να μεταδώσει ώριμους χαρακτήρες σε μερικά νεαρά κόκκινα κρασιά (Loureiro and Malfeito-Ferreira, 2003). Επιπλέον, πολλά στελέχη *Brettanomyces* είναι ικανά να απελευθερώσουν ευνοϊκές ενώσεις για την επίγευση του προϊόντος (όπως τερπένια και νορισοπρενοειδή) από φυσικούς γλυκοσίτες σταφυλιών.

Σε γενικές γραμμές, οι οινοποιοί εξακολουθούν να πολεμούν τον *Brettanomyces* και ο εμβολιασμός αυτών των ζυμών εφόσον όταν τα επίπεδα των πτητικών ενώσεων υπερβαίνουν κατά πολύ το αισθητήριο όριο, η αντίληψη είναι σχεδόν πάντα αρνητική.

3.4 *Brettanomyces* σε παραγωγή βιοαιθανόλης

Ο *Brettanomyces spp.* έχει εισαχθεί σε διάφορα υποστρώματα για παραγωγή βιοαιθανόλης και ροών αποβλήτων ζύμωσης. Το γένος αυτό έχει μελετηθεί για τη χρήση του στη δημιουργία αιθανόλης από ανανεώσιμες πηγές λόγω της ικανότητάς του να επιβιώνει σε χαμηλό pH και να ζυμώνει διάφορα μη παραδοσιακά υποστρώματα. Απομονώθηκε ακόμη και ως μολυσματικός παράγοντας από βιομηχανικές ζυμώσεις αιθανόλης. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.1, *Brettanomyces spp.* μπορεί να αναπτυχθεί σε μια ποικιλία υποστρωμάτων και σε ένα ευρύ φάσμα συνθηκών καλλιέργειας σε σχέση

με τη θερμοκρασία και το pH. Η ικανότητα ανάπτυξης σε αυτά τα διάφορα υποστρώματα είναι ποικίλη και εξαρτάται από το στέλεχος (Lawton et al,2021).

Ο *Brettanomyces spp.* μπορεί να ζυμώσει τη γλυκόζη σε αιθανόλη υπό αναερόβιες συνθήκες. Ορισμένα είδη εμφανίζουν επίσης το αποτέλεσμα Crabtree, παρόμοιο με το *S. cerevisiae*, όπου η ζύμωση της γλυκόζης σε αιθανόλη συμβαίνει ακόμη και σε αερόβιες συνθήκες όταν η ζάχαρη είναι άφθονη. Αυτό το χαρακτηριστικό δεν είναι κοινό από όλα τα είδη του γένους. Επιπλέον, υπό αερόβιες συνθήκες, ορισμένα είδη *Brettanomyces* μπορούν να παράγουν υψηλά επίπεδα οξικού οξέος. Εφόσον ο *Brettanomyces spp.* θεωρείται μικροοργανισμός αλλοίωσης κρασιού, η παραγωγή οξικού οξέος, ένα ανεπιθύμητο χαρακτηριστικό στο κρασί, έχει μελετηθεί καλά. Κατά την εξέταση της βιομηχανίας ποτών που έχει υποστεί ζύμωση στο σύνολό της, η αιθανόλη και το οξικό οξύ είναι πολύτιμα τελικά μεταβολικά προϊόντα. Υπάρχουν αρκετές μελέτες που αξιολογούν την παραγωγή αιθανόλης ή οξικού οξέος με *B. clausenii* και *B. bruxellensis* στη γλυκόζη.

Πίνακας 3. 1: Ανάπτυξη σε διαφορετικά υποστρώματα (Lawton et al,2021).

Ανάπτυξη σε ποικίλα υποστρώματα					
Είδη	Γλυκόζη	Γαλακτόζη	Σουκρόζη	Μαλτόζη	Λακτόζη
<i>B. bruxellensis</i>	+	✓	✓	✓	✓
<i>B. clausenii</i>	+	+	+	✓	✓
Σειρά ανάπτυξης					
Θερμοκρασία (°C)			pH		
15-37			3.0-6.5		

Το *B. Bruxellensis* είναι συχνά απομονωμένο από περιοχές παραγωγής βιοαιθανόλης (Beckner et al., 2011, Passoth et al., 2007) εφόσον έχει τη δυνατότητα να προσαρμόζεται πολύ καλά στις σκληρές συνθήκες των δεξαμενών ζύμωσης βιοαιθανόλης (Blomqvist, 2011). Επιπλέον, υποστηρίχθηκε ότι η παρουσία τους οφείλεται τουλάχιστον εν μέρει στην ανοχή τους στους LAB (ή στους μεταβολίτες που σχετίζονται με LAB). Το LAB συναντάται συχνά σε αυτούς τους τύπους ζυμώσεων, δεδομένου ότι είναι σε θέση να καταναλώνουν τα σάκχαρα πεντόζης που απελευθερώνονται κατά την προκατεργασία της λιγνοκυταρινικής βιομάζας και οι περισσότερες ζύμες δεν είναι (Passoth et al., 2007). Επί του παρόντος, το *Brettanomyces* θεωρείται ως ανεπιθύμητος οργανισμός αλλοίωσης βιοαιθανόλης. Ωστόσο, η πρόσφατη ανακάλυψη ενός στελέχους *B. bruxellensis* ως ο μοναδικός

οργανισμός παραγωγής που είναι ενεργός σε ένα συνεχές βιομηχανικό εργοστάσιο αλκοόλης με βάση το άμυλο, υποδηλώνει ότι μπορεί στην πραγματικότητα να είναι ένας ευνοϊκός συντελεστής ή ακόμη και ο μοναδικός οδηγός των ζυμών βιοαιθανόλης (Passoth et al., 2007, Reis et al., 2014). Αυτή η ανακάλυψη υποδηλώνει ότι κατά τη διάρκεια της ζύμωσης υψηλής αιθανόλης, το *B. bruxellensis* ξεπέρασε το στέλεχος *S. cerevisiae*, με το οποίο είχε εμβολιαστεί η καλλιέργεια, χωρίς να επηρεάσει την απόδοση της αιθανόλης. Επιπλέον, πολλά ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά του *B. bruxellensis*, όπως η ικανότητά του να καταναλώνει νιτρικά και άλλες πηγές αζώτου και την ικανότητά του να χρησιμοποιεί δεξτρίνες και κυτταροβιοζή ως πηγή άνθρακα θα μπορούσε να διευρύνει το εύρος του υποστρώματος για βιομηχανική παραγωγή βιοαιθανόλης. Η άμεση εφαρμογή αυτού του είδους ως καλλιέργεια εκκίνησης σε χώρους ζύμωσης βιοαιθανόλης εξακολουθεί να μελετάται.

3.5 *Brettanomyces* στην αξιοποίηση παραπροϊόντων

Πιθανές επιλογές υποστρώματος για ζύμωση περιλαμβάνουν, ακόμη, γαλακτοκομικά απόβλητα όπως ορός γάλακτος. Τα υποπροϊόντα από γαλακτοκομικές διεργασίες (π.χ. παραγωγή τυριών και γιαουρτιού) παρουσιάζουν πλεόνασμα παγκοσμίως λόγω της μεγάλης αναλογίας υποπροϊόντων προς προϊόν. Το οξύ γάλακτος ειδικότερα, μια ροή αποβλήτων από την ελληνική παραγωγή γιαουρτιού, θέτει επί του παρόντος ένα μεγάλο ζήτημα απόρριψης για τη γαλακτοκομική βιομηχανία λόγω του χαμηλού pH και της υψηλής ζήτησης βιολογικού οξυγόνου, καθιστώντας το ακατάλληλο για άμεση απόρριψη. Ο γλυκός ορός γάλακτος, από την παραγωγή τυριού, χρησιμοποιείται σε μεγάλο βαθμό στην παραγωγή σκόνης ορού γάλακτος για την περιεκτικότητά του σε πρωτεΐνες. Χαμηλότερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες λόγω της διαδικασίας παρασκευής του ελληνικού γιαουρτιού, ο ορός γάλακτος περιέχει ακόμα πολύτιμα συστατικά όπως βιταμίνες, μέταλλα και ζάχαρη. Η κύρια ζάχαρη που υπάρχει στον ορό γάλακτος, καθώς και ο τυρογάλακτος, η λακτόζη, είναι ένα πιθανό υπόστρωμα για ζύμωση με *Brettanomyces spp.* (Lawton et al, 2021).

Τις τελευταίες δεκαετίες, η πρόοδος της χρήσης του ορού γάλακτος της σε ποτά ως θεραπευτική αγωγή, αυξάνεται. Ο ορός γάλακτος έχει χρησιμοποιηθεί ως βάση σε ποτά με πρόσθετες γεύσεις, αλλά συχνά, η γαλακτοκομική γεύση, το χαμηλό pH και άλλες εγγενείς γεύσεις μπορούν να αποβούν αρνητικά για τους καταναλωτές. Η ζύμωση ορού γάλακτος με τη χρήση βακτηρίων και ζύμης για την παραγωγή αλκοολούχων ποτών και ποτών που περιέχουν οξικό οξύ είναι μια επιλογή όχι μόνο να ξεπεραστεί αυτό το πρόβλημα αλλά και να προστεθούν λειτουργικές ιδιότητες στα προϊόντα. Ο ορός

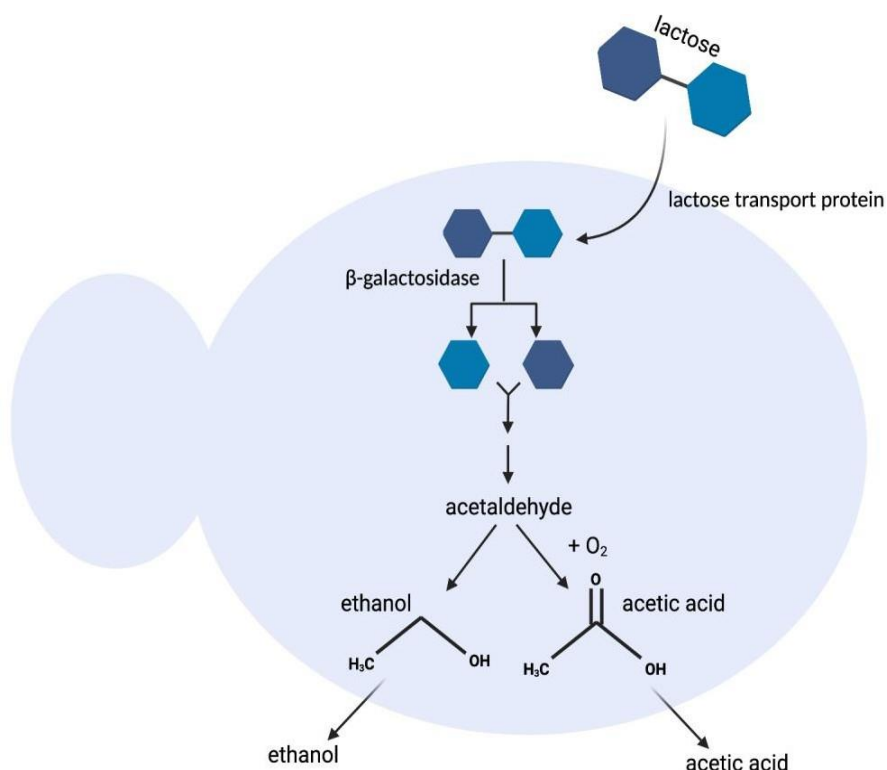
γάλακτος έχει υποστεί ζύμωση με βακτήρια γαλακτικού οξέος για την παραγωγή δυνητικά προβιοτικών προϊόντων. Έχει επίσης υποστεί ζύμωση χρησιμοποιώντας μη παραδοσιακές μεθόδους για την παραγωγή προϊόντων που περιέχουν αιθανόλη ή οξικό οξύ. Με τη βασική συνιστώσα της λακτόζης, αυτό γίνεται με διάφορους τρόπους: χρήση ζύμης χωρίς *Saccharomyces*, αρχική υδρόλυση λακτόζης και επακόλουθη ζύμωση με *S. cerevisiae* ή μέσω ανασυνδυασμένων μεθόδων.

Επί του παρόντος, υπάρχουν λίγες μελέτες που εστιάζουν στη λακτόζη ως υπόστρωμα για παραγωγή αιθανόλης ή οξικού οξέος από το *Brettanomyces*, παρά τη γνώση ότι το είδος *B. clausenii* έχει την ικανότητα να καταναλώνει λακτόζη. Στο παρελθόν έχει παρουσιαστεί τόσο η ανάπτυξη του *B. clausenii* σε τυρόγαλα και παραγωγή β-γαλακτοσιδάσης από τη μαγιά όσο και η χρήση του *B. clausenii* αλλά και άλλων ειδών ζύμης για παραγωγή αιθανόλης σε διάφορες ποσότητες λακτόζης. Πρόσφατα, το *B. clausenii* έχει αποδειχθεί ότι παράγει αιθανόλη και οξικό οξύ από συνθετικά μέσα λακτόζης και γαλακτοκομικά απόβλητα. Αυτό δημιουργεί μια πιθανή ευκαιρία για παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας από γαλακτοκομικά υποπροϊόντα και επέκταση στην κατηγορία των ζυμωμένων λειτουργικών ποτών (Lawton et al, 2021).

Οι υπάρχουσες γενετικές μελέτες εντοπίζουν γονίδια που ενδέχεται να εμπλέκονται σε ορισμένες πτυχές του μεταβολισμού για τη δραστηριότητα υδρόλυσης λακτόζης για το γένος. Ο *B. clausenii* είναι συχνά το είδος που αναγνωρίζεται ότι έχει τον φαινότυπο με την ικανότητα ανάπτυξης και ζύμωσης της λακτόζης. Υπάρχουν κάποιες αναφορές για μεταβολισμό της λακτόζης του *B. Bruxellensis*, ενώ οι κλασικοί ορισμοί λένε ότι δεν μπορεί. Το *B. nanus* ορίζεται ως μεταβλητή για την ανάπτυξη στη λακτόζη. Όσον αφορά τη γενετική ανάλυση για το μεταβολισμό της λακτόζης, αρκετές μελέτες έχουν εντοπίσει γονίδια μέσω αλληλουχίας γονιδιώματος που θα μπορούσαν ενδεχομένως να επιτρέψουν την ανάπτυξη ή τη ζύμωση της λακτόζης. Μια πιθανή β-γαλακτοσιδάση έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία μέσω αναλύσεων προσδιορισμού αλληλουχίας ολόκληρου του γονιδιώματος του *B. bruxellensis* καθώς και του *B. nanus*. Επιπρόσθετα, μια β-γλυκοσιδάση έχει εντοπιστεί και στα *B. bruxellensis* και *B. clausenii*. Αν και δεν θεωρείται παραδοσιακά ως λακτάση, οι β-γλυκοσιδάσες μπορούν να έχουν δραστηριότητα έναντι της λακτόζης αν και με χαμηλότερη δραστηριότητα β-γαλακτοσιδάσης. Ακόμα μία β-γλυκοσιδάση απομονώθηκε και χαρακτηρίσε τον *B. anomalus*. Μέσω της διερεύνησης των διαφορών στον γονότυπο και τον φαινότυπο διαφόρων στελεχών του *B. bruxellensis*, ο Crauwels με τους συνεργάτες του, βρήκαν αρκετά στελέχη που εμφάνισαν μεταβολική δράση λακτόζης (Crauwels et al, 2014).

Ωστόσο, από τα επτά στελέχη θετικά στη λακτόζη που υποδείχθηκαν, δύο από αυτά δεν είχαν την υποθετική β-γαλακτοσιδάση καθώς και την αρχική β-γλυκοσιδάση που αναγνωρίστηκε σε άλλα στελέχη, αλλά βρέθηκε να έχουν ομόλογο β-γλυκοσιδάση.

Το Σχήμα 3.1 δείχνει την οδό λακτόζης για παραγωγή αιθανόλης και οξικού οξέος σε στελέχη *B. Clausсенii*. Πιο αναλυτικές μελέτες, ωστόσο, απαιτούνται για τα γονιδιώματα του *Brettanomyces spp.* απαιτούνται για την επέκταση της γνώσης της μεταβολικής δραστηριότητας σε αυτό το γένος και για τη διερεύνηση των διαφορών στη δραστηριότητα υδρόλυσης λακτόζης, ειδικά σε επίπεδο στελεχών και ειδών (Lawton et al,2021).



Σχήμα 3.1 : Οδός για την παραγωγή αιθανόλης / οξικού οξέος σε λακτόζη χρησιμοποιώντας στελέχη *B. clausсенii*. Η προτεινόμενη χρήση λακτόζης θα συνεπάγεται μεταφορά εντός του κυττάρου μέσω πρωτεΐνης μεταφοράς λακτόζης και διάσπαση από μια β-γαλακτοσιδάση. Η επακόλουθη αερόβια ή αναερόβια ζύμωση γλυκόζης και γαλακτόζης θα οδηγούσε στην παραγωγή οξικού οξέος και / ή αιθανόλης (Steensels et al. 2015 & Galafassi et al. 2013)

3.6 *Brettanomyces* στην παραγωγή λειτουργικών ποτών

Βάσει των προαναφερθέντων, ωστόσο, δίνεται η ευκαιρία αξιοποίησης της δύναμης υδρόλυσης της λακτόζης και της χρήσης του *B. clausсенii* για νέα ποτά που έχουν υποστεί ζύμωση με βάση τα γαλακτοκομικά προϊόντα.

Η δυνατότητα αυτής της μαγιάς να επιβιώσει σε σκληρές συνθήκες, όπως το περιβάλλον χαμηλού pH του ορού γάλακτος σε συνδυασμό με τη δυνατότητα της να παράγει ευεργετικά υποπροϊόντα (οξικό οξύ) ενώ μπορεί να τους προσδώσει μοναδικές αρωματικές ενώσεις, δίνει την ικανότητα να παράγει ποτά που έχουν υποστεί ζύμωση, αλκοολούχα και μη αλκοολούχα, τα οποία έχουν ευεργετικές ιδιότητες λόγω της παραγωγής οξικού οξέος.

Το ενδιαφέρον των ζυμωμένων ποτών προέκυψε από τα οφέλη για την υγεία του ανθρώπου που προσφέρονται από ευεργετικούς μικροοργανισμούς που υπάρχουν σε αυτά τα ποτά και τις ενώσεις που παράγουν κατά τη ζύμωση, όπως τα οργανικά οξέα. Πολλά από αυτά τα ποτά, ειδικά εκείνα που βασίζονται σε γαλακτοκομικά προϊόντα, είναι άφθονα με βακτήρια γαλακτικού οξέος, τα οποία παραδοσιακά θεωρούνται προβιοτικά. Επιπλέον, αυτά τα ποτά με βάση τα γαλακτοκομικά προϊόντα συχνά δεν περιέχουν λακτόζη μετά την παραγωγή λόγω της κατανάλωσης λακτόζης από τους μικροοργανισμούς όταν περίπου το 70% των ενηλίκων στον κόσμο πάσχουν από δυσανεξία στη λακτόζη και συχνά στρέφονται σε ποτά χωρίς γαλακτόζη και μη γαλακτοκομικά ποτά για να καλύψουν τις ανάγκες τους σε ασβέστιο και άλλες διατροφικές ανάγκες.

Η μετατόπιση των καταναλωτών, λοιπόν, προς τρόφιμα που είναι ευεργετικά και έχουν τη δυνατότητα πρόληψης της υγείας έχει διευρύνει τις ευκαιρίες για τη βιομηχανία ποτών που έχουν υποστεί ζύμωση ευρύτερα. Επιπλέον, η ικανότητά του συγκεκριμένου μικροοργανισμού να ζυμώνει τη λακτόζη παρέχει μια μοναδική πηγή υποστρώματος και έτσι προκύπτει η ευκαιρία για αξιοποίηση των ροών γαλακτοκομικών αποβλήτων για την επέκταση της γαλακτοκομικής βιομηχανίας στη ζυμωμένη λειτουργική αγορά ποτών (Lawton et al, 2021).

3.7 Παραγωγή αρωματικών ενώσεων

Το είδος *Brettanomyces* μπορεί να επηρεάσει έντονα το άρωμα των προϊόντων ζύμωσης. Οι μοναδικές αρωματικές ιδιότητες και η αρωματική ικανότητα των ειδών αναγνωρίζονται όλο και περισσότερο στη βιομηχανία τροφίμων και ποτών, καθώς και από τον καταναλωτή παγκοσμίως. Πολλοί διαφορετικοί όροι, όπως αυτός του γαρίφαλου, του καπνιστού, του πλαστικού, του φαρμάκου, αυτής του υγρού δέρματος, του μπισκότου-κράκερ, του στόματος, των τροπικών φρούτων ή του μήλου και των εσπεριδοειδών, της πικάντικης, της κρεμώδους ή της μεταλλικής γεύσης και της φαινολικής επίγευσης χρησιμοποιούνται για να περιγράψουν το προϊόν αρώματος των ζυμών *Brettanomyces* (Heresztyn, 1986, Licker et al., 1999). Όλα αυτά

συνοψίζονται πιο εύκολα ως « γεύση Brett » ή « χαρακτήρας Brett ». Εκτός από την έντονη επιρροή των αισθητηριακών χαρακτηριστικών διαφόρων τροφίμων, πρόσφατα υποτέθηκε ότι ορισμένες από αυτές τις ενώσεις (συγκεκριμένα οι αιθυλο-φαινόλες) παίζουν καθοριστικό ρόλο στη διασπορά μέσω εντόμων (Dweck et al., 2015).

Η σημαντική γενετική και φαινοτυπική διακύμανση του *B. Bruxellensis* μεταφράζεται, επίσης, σε ξεχωριστό αντίκτυπο στην ανάπτυξη της γεύσης στις ζυμώσεις μπύρας. Η παραγωγή των τυπικών πτητικών ενώσεων Brett επηρεάζεται, ακόμη, από διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες (περιεκτικότητα σε αιθανόλη, pH, συγκέντρωση σακχάρου και οξυγόνου κ.α) και τη διαθεσιμότητα και τη σύνθεση των απαραίτητων προδρόμων (υδροξυκιναμικά οξέα) (Kheir et al, 2013). Περαιτέρω, υπάρχουν αυξανόμενες ενδείξεις ότι επίσης το στέλεχος ζύμης παίζει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή αρώματος, με ένα στέλεχος πιο αποτελεσματικό από ένα άλλο (Crauwels et al, 2015). Αυτό συνεπάγεται επίσης ότι, κάθε φορά που προστίθεται μια καλλιέργεια εκκίνησης, μια καλά μελετημένη επιλογή του απομονωθέντος προϊόντος (Steensels et al, 2015) θα πρέπει να βασίζεται σε επιστημονικές επιλογές. Επιπλέον, η επιλογή στελεχών θα πρέπει επίσης να λαμβάνει υπόψη πιθανά προβλήματα υγείας, καθώς αναφέρεται ότι ορισμένα στελέχη *Brettanomyces* μπορούν να παράγουν βιογενείς αμίνες, οι οποίες είναι επικίνδυνες βιολογικές ενώσεις που μπορούν να έχουν ανεπιθύμητες φυσιολογικές επιπτώσεις όταν απορροφώνται σε υψηλές συγκεντρώσεις.

◦ Κρεμώδης επίγευση

Η κρεμώδης επίγευση αντιμετωπίζεται τακτικά σε κρασιά μολυσμένα με βακτήρια γαλακτικού οξέος (LAB) ή *Brettanomyces*. Το άρωμα που σχετίζεται με τον *Brettanomyces* είναι το αποτέλεσμα πυριδινών που συντίθενται από λυσίνη και αιθανόλη. Υπάρχουν τρεις γνωστές ενώσεις που εμπλέκονται σε αυτό το πλεονέκτημα, οι: 2-αιθυλοτετραϋδροπυριδίνη (ETHP), 2-ακετυλοτετραϋδροπυριδίνη (ATHP) και 2-ακετυλοπυρρολίνη (APY) (Snowdon et al., 2006). Δύο από αυτές τις υποκατεστημένες τετραϋδροπυριδίνες, EHP και ATPH, παράγονται από τον *Brettanomyces*, αν και οι απόλυτες συγκεντρώσεις ποικίλλουν μεταξύ διαφορετικών ειδών και στελεχών (Romano et al., 2008 και Oelofse et al, 2009). Τα αρώματα που συνδέονται με την κρεμώδη επίγευση είναι μερικές φορές παρόμοια με τα αρώματα μπισκότων ή κράκερ, αλλά υπό συνθήκες χαμηλού pH μπορούν να θεωρηθούν ως μεταλλικά ή πικρά (Oelofse, 2008). Συνήθως γίνονται αντιληπτά μόνο μετά από κατάποση (ή αποχρωματισμός) και η επίγευση μπορεί να διαρκέσει για περισσότερα από 10 λεπτά (Snowdon et al., 2006).

Παρά την τεράστια επίδραση στην ποιότητα των ποτών, οι μεταβολικές οδοί που οδηγούν στην παραγωγή ΕΤΗΡ και ΑΤΗΡ σε *Brettanomyces* δεν είναι ακόμη γνωστές, αλλά έχουν περιγραφεί διαδρομές που οδηγούν σε αυτά τα Ν-ετεροκυκλικά στο είδος LAB (Costello and Henschke, 2002). Η σύνθεση ΑΤΗΡ και ΑΡΥ ξεκινά από την αιθανόλη, ένα ζυμώσιμο σάκχαρο (είτε φρουκτόζη είτε γλυκόζη) και ένα αμινοξύ (L-λυσίνη και L-ορνιθίνη για ΑΤΗΡ και ΑΡΥ, αντίστοιχα) με οξυγόνο που διεγείρει την παραγωγή τους (Heresztyń, 1986). Το ΕΤΗΡ από την άλλη πλευρά είναι πιθανό να είναι το προϊόν της μείωσης του ΑΤΗΡ (Romano et al., 2008).

◦ Σύνθεση οξικού οξέος και πτητικών εστέρων

Παρουσία οξυγόνου, τα στελέχη *Brettanomyces* είναι ικανά να παράγουν οξικό οξύ. Ανάλογα με το επιθυμητό οργανοληπτικό αποτέλεσμα και το βαθμό της παραγωγής οξικού, αυτό μπορεί να είναι ένα επιθυμητό ή ανεπιθύμητο χαρακτηριστικό.

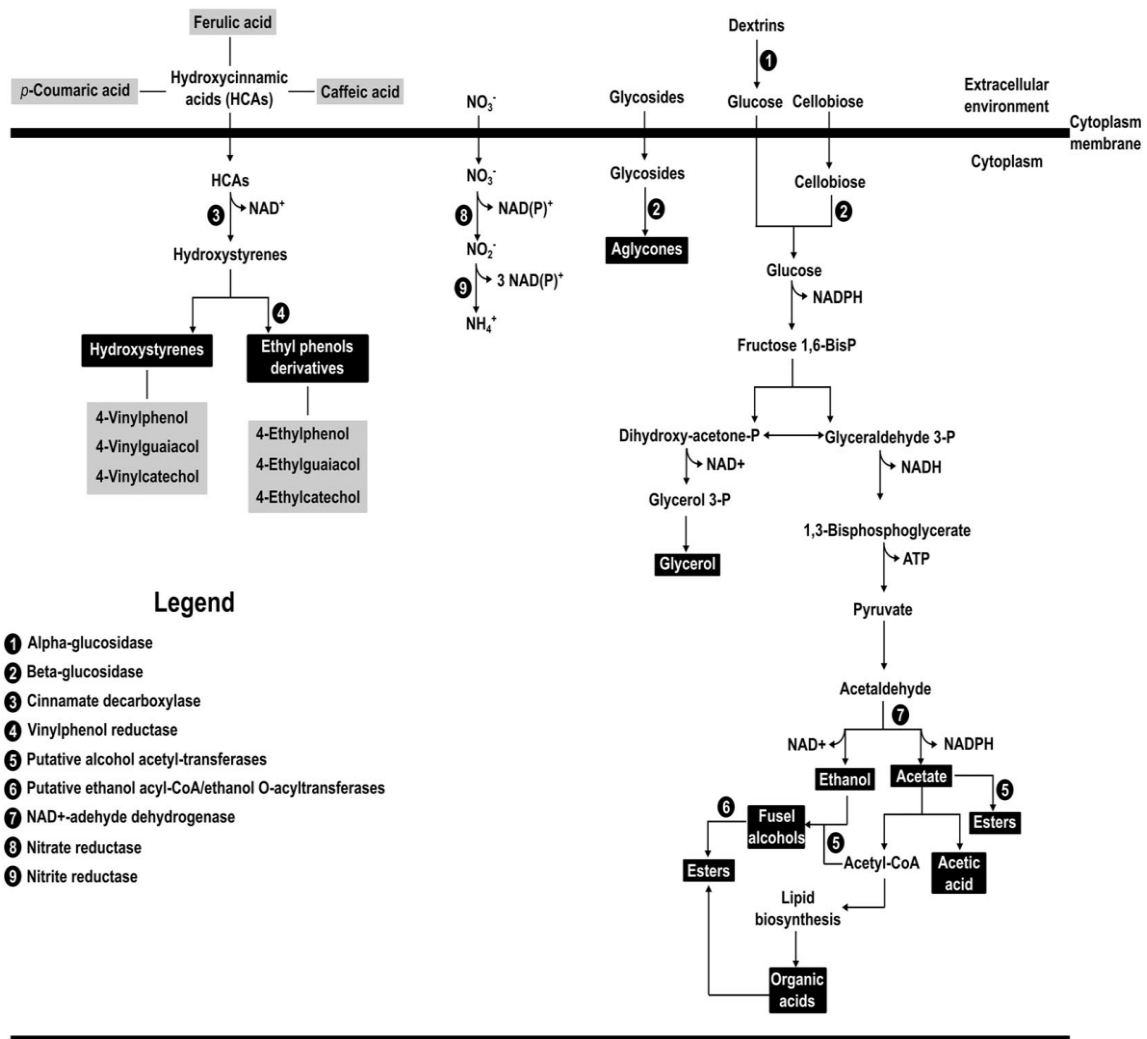
Στις μπύρες lambic, οι συγκεντρώσεις οξικού οξέος κυμαίνονται συνήθως από 0,4 έως 1,2 g / L ενώ σε κρασί από 0,2 έως 0,6 g / L. Γενικά θεωρούνται μειονεκτικά όταν οι συγκεντρώσεις φτάνουν τα >1,3 g / λίτρο. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το *Brettanomyces* μπορεί να παράγει οξικό οξύ σε αερόβιες συνθήκες, αλλά αυτό το χαρακτηριστικό είναι εξαρτώμενο από το στέλεχος και το είδος (Castro-Martinez et al., 2005, Rozpedowska et al., 2011). Συνεπώς, το ευρύ φάσμα συγκεντρώσεων οξικού οξέος μπορεί δυνητικά να εξηγηθεί από την παρουσία διαφορετικών βακτηρίων οξικού οξέος και / ή διαφορετικών στελεχών *Brettanomyces*. Δεδομένου ότι έχει αποδειχθεί ότι τα στελέχη *B. bruxellensis* χρησιμοποιούν τόσο γλυκόζη όσο και αιθανόλη για την παραγωγή οξικού οξέος σε αερόβιες συνθήκες, έχουν θεωρηθεί ως ενδιαφέροντες υποψήφιοι για παραγωγή βιομηχανικού οξικού οξέος (Freer, 2002, Freer et al., 2003). Το παραγόμενο οξικό οξύ μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί στη σύνθεση οξικών εστέρων όπως οξικού αιθυλεστέρα (Gamero et al., 2014).

Δεδομένου ότι είναι υπεύθυνοι για τον φρουτώδη ή λουλουδένιο χαρακτήρα των ποτών που έχουν υποστεί ζύμωση, οι πτητικοί εστέρες αποτελούν μια σημαντική ομάδα αρωματικών ενώσεων (Verstrepen et al., 2003a). Είναι, λοιπόν, μία από τις κύριες αρωματικές ενώσεις στις μπύρες με κορυφαία σημείο ζύμωσης (ale) και ζύμωση με κατώτατο σημείο ζύμωσης (lager) και είναι σημαντικές σε αυθόρμητα ζυμωμένες lambic μπύρες (Pires et al, 2014). Κατά την παραγωγή μπύρας, διάφοροι εστέρες παράγονται με τρόπο που εξαρτάται από το στέλεχος ζύμης και η παρουσία τους επηρεάζει τις μπύρες είτε θετικά (άρωμα φρουτώδους) είτε αρνητικά (άρωμα διαλύτη, υπερβολικά φρουτώδες). Οι αρχικές συνθήκες ζύμωσης μπύρας, όπως η θερμοκρασία, η σύνθεση του μούστου και η οξυγόνωση, επηρεάζουν άμεσα τη συνολική συγκέντρωση εστέρων.

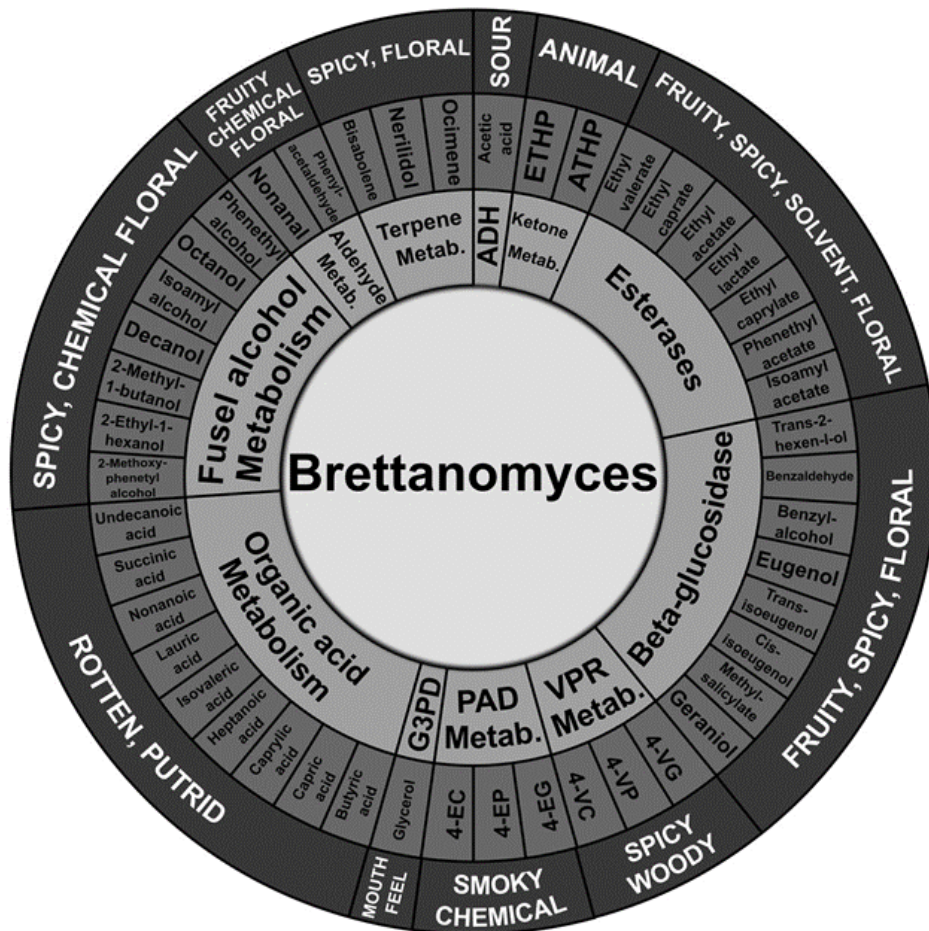
Στην μπίρα υπάρχουν δύο ομάδες πτητικών εστέρων: οι οξικοί εστέρες και οι αιθυλεστέρες λιπαρών οξέων μέσης αλυσίδας (MCFA). Το *S. cerevisiae* έχει τέσσερα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για το σχηματισμό οξικού και MCFA εστέρα. Στο *S. cerevisiae*, η παραγωγή οξικού εστέρα εξαρτάται από δύο ένζυμα: αλκοόλη ακετυλο-τρανσφεράση I και II (AATases I και II). Η παραγωγή εστέρα MCFA απαιτεί δραστικότητα αιθανόλης ακυλ-CoA / αιθανόλης Ο-ακυλτρανσφεράσης (AEATase) (Zhang et al, 2013). Ενώ οι βιοχημικές πληροφορίες σχετικά με τη βιοσύνθεση των εστέρων στο *Brettanomyces* δεν είναι διαθέσιμες, τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι το *B. bruxellensis* είναι ικανό να παράγει μεγάλες ποσότητες οξικών και MCFA εστέρων. Αυτοί οι εστέρες περιλαμβάνουν οξικό αιθυλεστέρα, γαλακτικό αιθυλεστέρα, οξικό ισοαμυλεστέρα και οξικό φαινυλαιθυλεστέρα, οι οποίοι απαντώνται κυρίως σε μπίρες lambic και αμερικανικές μπίρες ψύξης. Επιπλέον, το *Brettanomyces* συσσωρεύει λιπαρά οξέα συμπεριλαμβανομένου του οκτανοϊκού (C8) σε δωδεκανοϊκού οξέος (C12) και τα μετατρέπει στους αντίστοιχους εστέρες τους, υποδηλώνοντας αυξημένη δραστικότητα β-οξειδωσης. Τα επίπεδα εστέρα που υπάρχουν στη μπίρα επηρεάζονται από την (πιθανή) παρουσία βακτηρίων οξικού και γαλακτικού οξέος, των οποίων τα υποπροϊόντα ζύμωσης είναι υποστρώματα για σύνθεση εστέρα (Bokulich et al, 2012). Αν και ο σχηματισμός οξικών εστέρων ποσοτικοποιήθηκε πειραματικά χρησιμοποιώντας εμπορικές μπίρες συμπληρωμένες με μαλτο-ολιγοσακχαρίτες για ζύμωση από οκτώ στελέχη *B. bruxellensis*, λίγα είναι γνωστά για τη σύνθεση εστέρα *Brettanomyces* σε καθαρή καλλιέργεια ζύμωσης (Crauwels et al, 2017)

Το κλάσμα εστέρα σε μπίρες lambic (όπου το *Brettanomyces* παίζει πρωταγωνιστικό ρόλο) χαρακτηρίζεται τυπικά από πολύ χαμηλή ποσότητα οξικού ισοαμυλίου, υψηλής συγκέντρωσης καπρυλικού αιθυλεστέρα και γαλακτικού αιθυλεστέρα και σημαντικών ποσοτήτων καπικού αιθυλεστέρα σε σύγκριση με την μπίρα που παράγεται με παραδοσιακές ζύμες μπίρας *S. cerevisiae* και *S. pastorianus* (Verachtert, 1992). Περαιτέρω ανάλυση επιβεβαίωσε ότι οι εστεράσες υπάρχουν στο *Brettanomyces* spp. είναι υπεύθυνοι για το σχηματισμό αιθυλεστέρων, όπως οξικού αιθυλεστέρα και γαλακτικού αιθυλεστέρα, μαζί με την υδρόλυση οξικών εστέρων, όπως οξικού ισοαμυλίου και οξικού φαινυλεστέρα (Spraeren et al., 1978- Spraeren and Verachtert, 1982). Η ανισορροπία μεταξύ συγκέντρωσης οξικού και αιθυλεστέρα προκαλείται από την αποδόμηση των οξικών εστέρων από την εστεράση *Brettanomyces*, η οποία είναι πολύ πιο αποτελεσματική σε σύγκριση με την υδρόλυση των μη οξικών εστέρων (Steensels et al, 2015).

Ενώ η μέση συγκέντρωση οξικού αιθυλεστέρα κυμαίνεται μεταξύ 8 και 48 ppm για τις παραδοσιακές μπύρες, είναι μεταξύ 33,4 και 67,6 ppm για το είδος gueze όταν είναι φιλτραρισμένο και μεταξύ 60,9 και 167 ppm για το είδος gueze όταν δεν είναι φιλτραρισμένο (Strating and Venema , 1961). Η συγκέντρωση γαλακτικού αιθυλεστέρα σε μπύρες lambic έχει προσδιοριστεί ότι είναι πάνω από 400 ppm, η οποία είναι ιδιαίτερα αυξημένη σε σχέση με το κατώφλι γεύσης των 50 ppm και το όριο οσμής 14 ppm (Constant and Collier, 1997). Ο καπρυλικός αιθυλεστέρας και ο καπρικός αιθυλεστέρας, οι οποίοι συνήθως απουσιάζουν σε λίγες ή παρουσιάζονται μόνο σε μικρές συγκεντρώσεις σε μπύρες, θεωρούνται τυπικές ενώσεις αρώματος και αρώματος μπύρας των ειδών lambic και gueze , δίνοντας σε αυτές τις μπύρες τη γεύση κρασιού και φρουτώδους. Η συγκέντρωση του καπρυλικού αιθυλεστέρα μπορεί να φτάσει τα 5,7 ppm σε ορισμένες μπύρες από gueze .”



Σχήμα 3.2 : Σχηματική επισκόπηση των κύριων μεταβολικών οδών στα είδη *Brettanomyces* κατά τη ζύμωση μπίρας, εστιάζοντας στα βασικά ένζυμα που συνδέονται με τη βιοσύνθεση ενεργού συνδυασμού γεύσης και τη ρύθμιση της ισορροπίας οξειδοαναγωγής (NAD⁺ / NADH) που σχετίζεται με το φαινόμενο Custers. Οι αρωματικές δραστικές ενώσεις υποδεικνύονται στο σχήμα με γκρι και μαύρα κουτιά. Τα κύρια ένζυμα που είναι υπεύθυνα για τη δημιουργία δραστικών συστατικών γεύσης υποδεικνύονται από μαύρους κύκλους και από τον ένθετο θρύλο legend του σχήματος (Menoncin και Bonato, 2019)



- Enzyme/metabolic activity
- Metabolites
- Organoleptic properties

Σχήμα 3.3. Τροχός αρώματος / γεύσης που περιέχει τα κύρια μεταβολικά μονοπάτια, ένζυμα και μεταβολίτες που παράγονται από διαφορετικά είδη *Brettanomyces* κατά τη ζύμωση μπύρας. Το άρωμα / τα αρώματα, τα ένζυμα / οι μεταβολικοί οδοί και οι μεταβολίτες υποδεικνύονται στον τροχό με διαφορετικές γκριζές σκιές, που ορίζονται κάτω από τον τροχό. Συντομογραφίες: ADH, NAD⁺ - αλδεϋδη αφυδρογονάση; ETHP: 2-αιθυλοτετραϋδροπυριδίνη, ATHP: 2-ακετυλοτετραϋδροπυριδίνη, VPR: αναγωγή βινυλοφαινόλης, 4-VG: 4-βινυλογουαιακόλη; 4VP: 4-βινυλοφαινόλη, 4-VC: 4-βινυλοκατεχόλη, PAD: αποκαρβοξυλάση φαινυλακρυλικού οξέος, 4-EG: 4-αιθυλογουαιακόλη, 4-EP: 4-αιθυλοφαινόλη, 4-EC: 4-αιθυλοκατεχόλη, G3PD: 3-φωσφορική γλυκερόλη αφυδρογονάσης, μεταβ., μεταβολισμός (Joseph et al, 2013)

- Πτητικές Φαινόλες

Οι πτητικές φαινόλες περιλαμβάνουν μια ομάδα αρωματικών μορίων που βρίσκονται συχνά σε αλκοολούχα ποτά που έχουν υποστεί ζύμωση, συμπεριλαμβανομένης της μπύρας (Vanbeneden et al, 2008). Άρα θεωρούνται τα βασικά μόρια που είναι υπεύθυνα για μερικά από τα πιο αναγνωρισμένα αρωματικά χαρακτηριστικά που σχετίζονται με τους τύπους *Brettanomyces*.

Σύνθεση πτητικών αρωματικών φαινολικών ενώσεων και έχουν ως αποτέλεσμα τις τυπικές «γεύσεις Brett». Στην πραγματικότητα, οι πτητικές φαινολικές γεύσεις οι κύριοι δείκτες της δραστηριότητας *Brettanomyces* στο κρασί. Η παρουσία τους προκύπτει από το μεταβολισμό των υδροξυκιναμικών οξέων που προέρχονται από κριθάρι και λυκίσκο κατά τη ζύμωση από βακτήρια και ζύμες. Οι πτητικές φαινόλες όπως και οι εστέρες, συμβάλλουν στο άρωμα (πικάντικο, γαρίφαλο και καπνιστό) και εκτός γεύσεων (φαινολικές, φαρμακευτικές, σταθερές και αρωματικές ουσίες). Οι αρωματικές φαινόλες αποτελούν σημαντικό μέρος των οργανοληπτικών ιδιοτήτων διαφορετικών μορφών μπύρας, όπως η αμερικανική δροσερή μπύρα, η κόκκινη μπύρα της Φλάνδρας, η lambic, και το Oud Bruin (όλα περιέχουν *Brettanomyces*) (Holt et al, 2018).

Τα παράγωγα βινυλίου, τα οποία είναι οι πρόδρομοι των ενώσεων αιθυλίου, έχουν παρόμοια γεύση με τα παράγωγα αιθυλίου αλλά έχουν χαμηλότερα όρια γεύσης. Αυτά τα φαινολικά πτητικά παράγονται από μη πτητικά οργανικά οξέα όπως υδροξυκιναμικά οξέα τα οποία, για παράδειγμα, υπάρχουν φυσικά σε γλεύκος σταφυλιών, κρασί ή βύνη κριθάρι. Επομένως, η παραγωγή τους εξαρτάται από το μέσο ζύμωσης, καθώς η πρόδρομη σύνθεση και η συγκέντρωση μπορεί να ποικίλλουν σημαντικά. Για παράδειγμα, η μόλυνση από *Brettanomyces* εμφανίζεται πολύ πιο συχνά στα ερυθρά κρασιά όπου η εξαγωγή προδρόμων πτητικών φαινολών είναι πιο έντονη από ό, τι για τα λευκά κρασιά (Licker et al, 1999). Ωστόσο, ο αντίκτυπος αυτών των ενώσεων στη συνολική ποιότητα του κρασιού είναι υποκειμενικός, με κάποιες (σπάνιες) αναφορές που περιγράφουν την παρουσία χαμηλών συγκεντρώσεων φαινολικών ενώσεων ως ευχάριστη, καθώς «προσθέτει έναν διακριτικό χαρακτήρα ηλικίας στα νεαρά ερυθρά κρασιά», ενώ οι περισσότεροι δοκιμαστές το θεωρούσαν λιγότερο επιθυμητό λόγω της "χαμηλής γευστικής πολυπλοκότητας" που χαρακτηρίζει τη χαμηλή συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων (Fugelsang and Edwards, 2007, Malfeito-Ferreira, 2011).

Η μεταβολική οδός που οδηγεί στη σύνθεση φαινολικών παραγώγων διερευνήθηκε συστηματικά το 1986 από τον Heresztyn (1986). Τέσσερις ενώσεις έχουν συνήθως αποδοθεί στη φαινολική γεύση, συμπεριλαμβανομένων των 4-

βινυλογουαιακόλης (4-VG), 4-βινυλοφαινόλης (4-VP), 4-αιθυλογουαιακόλης (4-EG) και 4-αιθυλοφαινόλης (4-EP) (Oelofse et al, 2009). Ωστόσο, ανακαλύφθηκε πρόσφατα ότι η 4-βινυλοκατεχόλη (4-VC) και η 4-αιθυλοκατεχόλη (4-EC) μπορεί επίσης να έχουν ρόλο στο άρωμα των ζυμωμένων ποτών, ειδικά στο κρασί και στον μηλίτη (Burton, 2012). Τα είδη *Brettanomyces* έχουν την ικανότητα να παράγουν αυτές τις ισχυρές αρωματικές ενώσεις χρησιμοποιώντας κινναμωτική αποκαρβοξυλάση και αναγωγή βινυλοφαινόλης (VPR). Η σύνθεση των πτητικών φαινολών εμφανίζεται σε δύο ενζυματικά διαδοχικά στάδια (Godoy et al, 2009):

α) αποκαρβοξυλίωση των ρ-κουμαρικών και φουρουλικών οξέων στα αντίστοιχα υδροξυτερένια τους (4-βινυλοφαινόλη [4-VP] και 4-βινυλογουαιακόλη [4-VG]) από την κινναμική αποκαρβοξυλάση και

(β) αναγωγή αυτών των μορίων σε 4-αιθυλοφαινόλη (4-EP) και 4-αιθυλογουαιακόλη(4-EG) με αναγωγή βινυλοφαινόλης (VPR) .

Επιπλέον, η 4-αιθυλοκατεχόλη (4-EC) σχηματίζεται από καφεϊκό οξύ σε χαμηλές ποσότητες (Edlin et al, 1998).

Αξίζει να σημειωθεί ότι ορισμένα στελέχη *S. cerevisiae* σχηματίζουν επίσης υδροξυστερίνες από υδροξυκινναμικά οξέα αλλά δεν είναι σε θέση να μετασχηματίσουν περαιτέρω αυτές τις ενώσεις σε φαινόλες.

Είναι ενδιαφέρον ότι φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της προέλευσης του στελέχους και της παραγωγής πτητικής φαινόλης, καθώς μόνο στελέχη κρασιού παρήγαγαν ανιχνεύσιμες ποσότητες 4-EG και 4-EP όταν εμβολιάστηκαν σε κόκκινο κρασί (Crauwels et al., 2015), υποδηλώνοντας διαφορές στη φυσιολογική συμπεριφορά μεταξύ στελεχών από διαφορετική οικολογική προέλευση. Η παραγωγή αιθυλοφαινολών, ωστόσο, εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το στέλεχος και το περιβάλλον (Lentz and Haris, 2015). Όπως φαίνεται από τον Kosel και τους συνεργάτες του, (Kosel et al, 2014) σε ζύμωση καθαρής καλλιέργειας, τα υδροξυκινναμικά οξέα μετατρέπονται γρήγορα και πλήρως σε βινυλοφαινόλες. Ωστόσο, μια μείωση 30% στη μετατροπή σε αιθυλοφαινόλες επιτεύχθηκε σε μικτές καλλιέργειες με *Brettanomyces* και *S. cerevisiae*. Έτσι, οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το *Brettanomyces* έχει μεταβολική προτίμηση για τα υδροξυκινναμικά οξέα αντί της άμεσης πρόσληψης βινυλοφαινολών που συντίθενται από τον *S. cerevisiae*. Αυτή η υπόθεση επιβεβαιώθηκε δείχνοντας ότι το γονίδιο VPR εκφράστηκε σε χαμηλότερα επίπεδα σε μικτές καλλιέργειες ζύμωσης, όπου ήταν διαθέσιμες μικρότερες ποσότητες 4-βινυλοφαινόλης και 4-βινυλογουαιακόλης (Kosel et al, 2014). Σε μια πρόσφατη μελέτη βρέθηκαν

μεταβολές 0,28-1,13 mg / L 4-αιθυλοφαινόλης και 0,52-5,8 mg / L 4-αιθυλγουαϊακόλης σε lambic μπύρες (Witrick et al, 2017).

Παραδόξως, μέχρι σήμερα λίγα είναι γνωστά για τα γονίδια που κωδικοποιούν τα ένζυμα που εμπλέκονται την παραγωγή αυτών των φαινολικών μεταβολιτών. Αν και τα γονίδια στο *Brettanomyces* που απαιτούνται για τη φαινολική βιοσύνθεση δεν έχουν ταυτοποιηθεί πλήρως, πρόσφατα περιγράφηκε ένα γονίδιο που κωδικοποιεί ένα φαινολικό οξύ αποκαρβοξυλάση στο *B. bruxellensis* (γονίδιο DbPAD), του οποίου η λειτουργία επιβεβαιώθηκε με ετερόλογη έκφραση στο *S. cerevisiae*. Τα ένζυμα, DbPAD και DbPAD2, με δραστικότητα αποκαρβοξυλάσης φαινυλακρυλικού οξέος φέρονται ως υπεύθυνα για την παραγωγή 4-βινυλοφαινόλης από π-κουμαρικό οξύ. Επιπλέον, (de Souza Liberal et al., 2012) έχει αναφερθεί η ύπαρξη δύο γονιδίων στο *B. bruxellensis* που κωδικοποιούν παράλογους του ένζυμο φαινυλοπυρουβική δεκαρβοξυλάση (DbARO10). Τα γονίδια του DbARO10 έδειξαν ότι και τα δύο ανταποκρίνονται στην παρουσία του ρ-κουμαρικού οξέος, που δείχνει ότι μπορεί να υπάρχει εναλλακτικές ή πρόσθετες αποκαρβοξυλάσες στο *B. bruxellensis*. Όσον αφορά το ένζυμο της αναγωγής της βινυλικής φαινόλης, μόλις πρόσφατα το πιθανό ένζυμο καθарίστηκε και υποβλήθηκε σε αλληλουχία. Επιπλέον, βρέθηκε να έχει τόσο ρεντουκτάση βινυλικής φαινόλης όσο και δισμουτάση υπεροξειδίου δραστηριότητες και αναγνωρίστηκε κατηγορηματικά ως υπεροξειδίου δισμουτάσης στο γονιδίωμα *B. bruxellensis* AWR1 1499 (Granato et al., 2014). Είναι ενδιαφέρον, ενώ το 4-EG και το 4-EP συμβάλλουν έντονα στις εκτός γεύσης στο κρασί, οι ίδιες ενώσεις θεωρούνται επιθυμητές στο lambic και διάφορες όξινες μπύρες μπύρας.

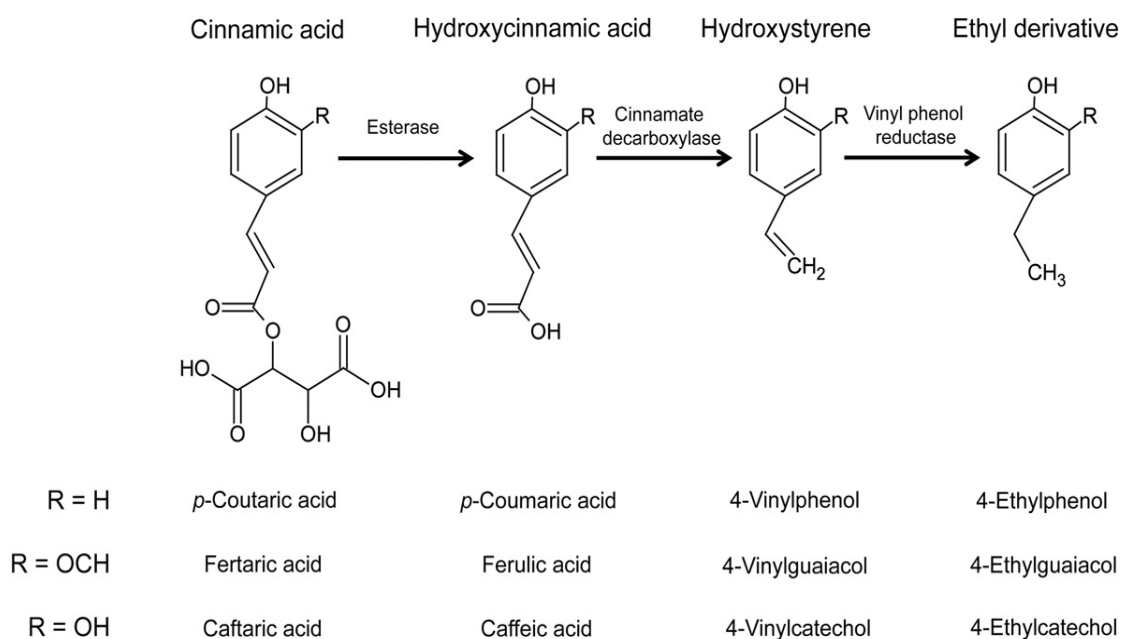
Προκειμένου να κατανοήσουμε καλύτερα τη βιοσύνθεση των φαινολικών ενώσεων στο *Brettanomyces*, είναι ακόμη απαραίτητο να εντοπιστούν τα ένζυμα που μετασχηματίζουν την υδροξυστερίνη στα παράγωγα αιθυλίου τους. Η σύνθεση υδροξυστερίνης προκύπτει τόσο από την αποκαρβοξυλάση του φαινυλικού ακρυλικού οξέος (PAD1) όσο και από την αποκαρβοξυλάση φουρουλικού οξέος (FDC1), η οποία είναι μια κινναμική αποκαρβοξυλάση. Ο φαινότυπος των στελεχών *S. cerevisiae* που περιέχουν ένζυμα υπεύθυνα για τη σύνθεση υδροξυστερίνης είναι το POF⁺ (φαινολική επίγευση). Ο φυσιολογικός ρόλος αυτών των ενζύμων δεν είναι πλήρως κατανοητός. Ωστόσο, το γονίδιο αποκαρβοξυλάσης πιθανότατα συμβάλλει στις διαδικασίες αποτοξίνωσης, καθώς η υπερέκφραση του PAD1 στο *S. cerevisiae* είχε ως αποτέλεσμα βελτιωμένο ρυθμό ανάπτυξης και παραγωγικότητα αιθανόλης παρουσία φουρουλικού οξέος, κινναμικού οξέος και σε ένα αραιό όξινο υδρόλυμα ερυθρελάτης (Larsson et al., 2001). Επιπλέον, δεδομένου ότι το VPR χρησιμοποιεί το NADH ως συμπράγοντα όταν

μειώνει τα υδροξυστυρένια στα παράγωγα αιθυλίου τους, θα μπορούσε να υποστηριχθεί ότι αυτό το ένζυμο μπορεί να διαδραματίσει ρόλο στη διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας του κυττάρου. Έχει παρατηρηθεί ότι οι συνθήκες περιορισμένου οξυγόνου ενισχύουν τη δραστηριότητα VPR (Curtin et al., 2013), αυξάνοντας έτσι τη διαθεσιμότητα NAD⁺.

Είναι ενδιαφέρον ότι, ενώ το 4-EP και το 4-EG συμβάλλουν σε μεγάλο βαθμό σε μια ανεπιθύμητη αλλοίωση των κρασιών, οι ίδιες ενώσεις θεωρούνται ουσιαστικοί συντελεστές των επιδόσεων των lambic, American Coolship Ale και διαφόρων βελγικών όξινων μπύρας. Η επίδραση του *Brettanomyces* στα κρασιά και τις μπύρες μπορεί να εξηγηθεί από τη διαφορά στη σχετική συγκέντρωση αυτών των πτητικών φαινολών. Στην μπύρα, η συγκέντρωση 4-EG (γαρύφαλλο ή πικάντικο άρωμα) είναι υψηλότερο από αυτό του 4-EP (φαρμακευτικό άρωμα) στο κρασί, αυτό είναι το αντίθετο (Oelofse et al., 2009). Η αλλοίωση του κρασιού από το *Brettanomyces* είναι γενικά χαρακτηρίζεται από αναλογία 4-EG και 4-EP μικρότερη από μία. Αντίθετα, στην μπύρα ο λόγος είναι γενικά είκοσι φορές μεγαλύτερος από έναν (Vanbeneden et al., 2006). Ωστόσο, η αναλογία 4-EG και 4-EP κυμαίνεται επίσης σημαντικά μεταξύ κρασιών, που κυμαίνονται από 1: 3 έως 1:40 . Οι διαφορές στο κρασί, καθώς και μεταξύ του κρασιού και της μπύρας δεν έχουν ακόμη γίνει πλήρως κατανοητές, αλλά είναι πιθανό να υποθέσουμε ότι προκαλούνται από το συνδυασμένο αποτέλεσμα διαφορετικών αναλογιών μεταξύ κουμαρικού και φουρουλικού οξέα και διαφορετικά στελέχη με κάποια στελέχη να είναι πιο αποτελεσματικά στην παραγωγή μιας ένωσης έναντι της άλλης (Crauwels et al., 2015). Λόγω των καταστροφικών επιπτώσεων του στο κρασί, αρκετοί ερευνητές διερεύνησαν τους παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή του 4-EP. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι *B. Bruxellensis* παράγουν ενώσεις 4-EP υπό συνθήκες με λίγη υπολειμματική ζάχαρη κατά τη μεταγενέστερη διαδικασία ωρίμανσης, υποδεικνύοντας ότι αυτή η διαδικασία δεν υποβάλλεται σε καταβολίτη από την γλυκόζη (Dias et al., 2003, Malfeito-Ferreira, 2011). Επιπλέον, το pH, η θερμοκρασία και η παρουσία οξυγόνου και θείου φαίνεται επίσης να επηρεάζουν την παραγωγή 4-EP (Dias et al., 2003, Zuehlke and Edwards, 2013).

Εκτός από την έντονη επιρροή του προφίλ αρώματος διαφόρων προϊόντων διατροφής, παραγωγή αιθυλο-φαινολών θα μπορούσε επίσης να θέσει μια έξυπνη στρατηγική του *Brettanomyces* για να ταξιδέψει σε νέο περιβάλλοντα δεδομένου ότι αποδείχθηκε πρόσφατα ότι οι αιθυλο-φαινόλες που παράγονται από την *Brettanomyces* είναι ελκυστικές για τα έντομα (Dweck et al., 2015). Το "ξίδι μύγας" (ή "φρούτα μύγας") *Drosophila melanogaster* ανιχνεύει την παρουσία υδροξυκινναμικών οξέων (HCAs, τα

οποία είναι ισχυρά διατροφικά αντιοξειδωτικά) μέσω οσφρητικών ενδείξεων. Αυτά τα φίλτρα δεν μπορούν να μυρίσουν αυτά τα οξέα απευθείας, αλλά είναι εξοπλισμένα με αποκλειστικούς οσφρητικούς αισθητήριους νευρώνες που ανιχνεύουν αιθυλοφαινόλες που παράγονται από ζύμες και προέρχονται αποκλειστικά από HCA. Επομένως, η παραγωγή αιθυλοφαινολών από το *Brettanomyces* μπορεί να αποτελέσει σημαντική στρατηγική ζώης, καθώς βοηθά στην προσέλκυση λεπτών που μπορούν να χρησιμεύσουν ως φορείς που προάγουν τη διασπορά των κυττάρων ζύμης μιας και μπορούν να παίξουν κρίσιμο ρόλο στη διασπορά της μαγιάς μέσω φορέων εντόμων, ενός μηχανισμού που έχει επίσης περιγραφεί για το *S. cerevisiae* (Crauwels et al., 2015).



Σχήμα 3.4 : Σχηματισμός πτητικών φαινολών με *Brettanomyces*. Ενώ η δραστηριότητα PAD συναντάται επίσης συχνά σε στελέχη *Saccharomyces*, η δραστηριότητα αναγωγάσης είναι ειδική για *Brettanomyces*.

PAD = αποκαρβοξυλάση φαινυλακρυλικού οξέος.

VPR = αναγωγάση βινυλοφαινόλης.

ο Πτητικά λιπαρά οξέα

Έχει αποδειχθεί ότι ο *Brettanomyces* παράγει μεγάλες ποσότητες πτητικών λιπαρών οξέων σε αναερόβιες συνθήκες ζύμωσης όπως το ισοβαλερικό οξύ. Πολλά από αυτά τα οξέα μπορεί να έχουν δυσάρεστη οσμή και / ή γεύση, η οποία μπορεί να είναι αισθητή στο χαλασμένο κρασί, ή σε νεαρές μπίρες *Brettanomyces* πριν από την εστεροποίηση αυτών των οξέων (Gamero et al., 2014). Στην πραγματικότητα, μαζί με τις αρωματικές ουσίες και τις φαινολικές ενώσεις που αναφέρονται παραπάνω, το ισοβαλερικό οξύ είναι

ο κύριος συντελεστής του ανεπιθύμητου χαρακτήρα *Brettanomyces* στο κρασί (Licker et al., 1999). Επιπλέον, υπάρχει η άποψη ότι επηρεάζει τη συνολική αντίληψη ή την ένταση των πτητικών φαινολικών ενώσεων σε προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση (Oelofse et al., 2009). Το ισοβαλερικό οξύ του είδους *lambic* δίνει στην μπίρα τις ιδιαίτερες γεύσεις και οσμές της. Η συγκέντρωση του ισοβαλερικού οξέος στις μπίρες *lambic* κυμαίνεται συνήθως μεταξύ 2 και 3 ppm, αν και σε κάποιες εμπορικές μπίρες *lambic* δεν μπορούσε να ανιχνευθεί ισοβαλερικό οξύ. Οι ακριβείς μεταβολικές οδοί που εμπλέκονται στην παραγωγή πτητικών λιπαρών οξέων και οι συνθήκες που επηρεάζουν την παραγωγή τους σε *Brettanomyces* δεν έχουν ακόμη καθοριστεί, αλλά αποδείχθηκε ότι η αποικοδόμηση των αμινοξέων L-λευκίνη, L-ισολευκίνη και L-βαλίνη συμμετέχει στο σχηματισμό αντίστοιχα ισοβαλερικού οξέος, 2-μεθυλβουτυρικού και ισοβουτυρικού οξέος (Harwood and Canaleparola, 1981, Oelofse, 2008). Το ισοβαλερικό οξύ παράγεται γενικά με διαμεταμόλυνση λευκίνης σε α-κετοϊσοκαπρωϊκό οξύ, μετέπειτα αποκαρβοξυλίωση σε ισοαμυλαδεΐδη και τελικά οξείδωση σε ισοβαλερικό οξύ (Harwood and Canaleparola, 1981, Styger et al., 2013). Τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για αυτές τις διεργασίες δεν έχουν ακόμη εντοπιστεί στον *Brettanomyces*, αλλά τα γονίδια αλκοόλης και της αλδεΐδης αφυδρογονάσης, τα οποία κωδικοποιούν οξειδοοξειδοδοκτάσες, αποδείχθηκε ότι αντιγράφηκαν στο γονιδίωμα *B. Bruxellensis* και αναφέρθηκαν ως δυνητικοί καθοριστικοί παράγοντες της παραγωγής πτητικών λιπαρών οξέων του *B. bruxellensis* (Curtin et al., 2012b, Piskur et al., 2012, Steensels et al., 2015)

◦ Σάκχαρο-συνδεδεμένες

Σε επιπλέον προς τις τυπικές *Brettanomyces* γεύσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω, ο *B. bruxellensis* μπορεί να εισάγει πρόσθετες γεύσεις στα τα προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση. Εκτός από την παρουσία της γεύσης-δραστικών πτητικών ενώσεων σε ελεύθερη μορφή, φρούτα, άνθη και άλλα μέρη των φυτών που συχνά χρησιμοποιούνται σε τρόφιμα και ποτών ζυμώσεις περιέχουν πτητικά που είναι «κλειδωμένο» σε γλυκοσιδικά συνδεδεμένα σάκχαρα, με αποτέλεσμα να είναι διαλυτές σε νερό και άοσμες ενώσεις.

Ο *Brettanomyces spp.* καλλιεργείται συνήθως από μπίρα ή κρασί που έχει ωριμάσει σε δρύινα βαρέλια (Vanderhaegen et al., 2003). Είναι ενδιαφέρον ότι ορισμένα είδη *Brettanomyces* έχουν την ικανότητα να υδρολύουν την κυττατοβιόζη (ένα σύνθετο σάκχαρο που υπάρχει στο ξύλο) και να το ζυμώσουν περαιτέρω σε αιθανόλη (Moon et al., 2001), το οποίο θα μπορούσε να βοηθήσει να εξηγήσει πώς μπορεί να επιβιώσει το *Brettanomyces* χρόνια σε ξύλινα βαρέλια. Αυτό απαιτεί β-γλυκοσιδάση, η οποία απαντάται συχνά σε διάφορα στελέχη *Brettanomyces* (Daenen et al., 2008a, Gonde et

al., 1984, Moon et al., 2001). Μια βιομηχανικά σημαντική παρενέργεια αυτού του ενζύμου είναι η ικανότητά του να απελευθερώνει «κλειδωμένα» φυσικά ρεύματα από διάφορα υποστρώματα. Εκτός από την παρουσία επίγευσης λόγω ενεργών πτητικών ενώσεων σε ελεύθερη μορφή, τα φρούτα, τα λουλούδια και άλλα μέρη των φυτών που χρησιμοποιούνται συχνά για ζύμωση τροφίμων και ποτών περιέχουν επίσης πτητικά που δεσμεύονται γλυκοσιδικά, με αποτέλεσμα υδατοδιαλυτές, μη πτητικές και άοσμες ενώσεις (Daenen, 2008 b).

Η ικανότητα του *Brettanomyces* να υδρολύει αυτές τις μη πτητικές χημικώς δεσμευμένες ενώσεις αρώματος είναι ενδιαφέρουσα στις βιομηχανικές πρακτικές επειδή μόλις απελευθερωθούν, αυτές οι φυσικές ενώσεις μπορούν να συμβάλουν θετικά στο άρωμα (Daenen et al., 2009). Η δραστηριότητα β-γλυκοσιδάσης διερευνήθηκε στο *B. intermedia* (τώρα *B. bruxellensis*) (Blondin et al., 1984 and McMahon et al., 1999), *B. anomalus* (τώρα *B. anomala*) (Fia et al., 2005) και *B. custersii* (Daenen et al., 2008a). Η δραστηριότητα βρέθηκε να είναι κυτταρική, ενδοκυτταρική και να απελευθερώνεται αργά στο μέσο. Οι Daenen και οι συνεργάτες του ανακάλυψαν περαιτέρω ότι ο *B. custersii* μπόρεσε να υδρολύσει γλυκοσυνδετικά αρωματικά συστατικά από λυκίσκο κατά τη φάση ωρίμανσης της μπίρας (Daenen et al., 2008b). Παρομοίως, έδειξαν ότι η δραστηριότητα γλυκοσιδάσης *Brettanomyces* συμβάλλει πιθανώς στην τυπική ανάπτυξη των παραδοσιακών διαδικασιών παραγωγής Kriek (μπύρες κερασιών), επειδή απελευθερώνει δραστικές ενώσεις που υπάρχουν στα κεράσια (Daenen, 2008b). Επίσης, στα κρασιά, αποδείχθηκε ότι ο *B. bruxellensis* και ο *B. anomala* εμφανίζουν δραστηριότητα β-γλυκοσιδάσης και καθιστούν δυνατή την υδρόλυση των γλυκοζιτών μονοτερπενίου που υπάρχουν στον χυμό σταφυλιών (Fia et al., 2005 και Villena et al., 2007).

Αυτό καθιστά το *Brettanomyces* πολύ κατάλληλο για την παραγωγή νέων αλκοολούχων ποτών που είναι εμπλουτισμένα με φυσικές γεύσεις και αρώματα από λυκίσκο, φρούτα και άλλα μέρη φυτών που συνήθως δεν μπορούν να παράγουν ζύμες *Saccharomyces* (Vanderhaegen et al., 2003).

Επιπλέον, ο πρόσφατος καθαρισμός και ο χαρακτηρισμός του ενζύμου β-γλυκοσιδάσης στον *B. anomalus* αποκάλυψε ότι μπορεί να δράσει σε υψηλότερο pH (5,75) και χαμηλότερη θερμοκρασία (37 ° C) από τις διαθέσιμες εμπορικές β-γλυκοσιδάσες, παρέχοντας νέες ευκαιρίες αυτού του ενζύμου για βιοσυσκευασία ορισμένων ποτών. Σε σύγκριση με τα επί του παρόντος διαθέσιμα ένζυμα, το ένζυμο *B. anomalus* έδειξε αυξημένη απελευθέρωση συγκεκριμένων αγλυκών, συμπεριλαμβανομένης της ευγενόλης και της γερανιόλης σε μπίρα κερασιού και οξειδίο

λιναλοόλης, βενζυλική αλκοόλη και σαλικυλικό μεθύλιο στο γάλα φρούτων του δάσους. Είναι ενδιαφέρον ότι πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι ορισμένες τα στελέχη *B. bruxellensis* περιέχουν δύο ξεχωριστά γονίδια β-γλυκοσιδάσης, ενώ άλλα στελέχη περιέχουν μόνο ένα από τα δύο γονίδια. Ενώ αυτή η γονιδιωματική διαγραφή θα μπορούσε να συνδεθεί με την αδυναμία χρήσης ορισμένων β-συνδεδεμένων σακχάρων από ορισμένα στελέχη του *B. bruxellensis*, απαιτείται περαιτέρω έρευνα για να διερευνηθεί ο ακριβής ρόλος αυτών των β-γλυκοσιδάσης στην αρωματική ικανότητα του *B. bruxellensis* στελέχη (Crauwels et al., 2014 και Crauwels et al., 2015).

- Γλυκερόλη

Η γλυκερόλη είναι μια μη πτητική ένωση που δεν έχει συγκεκριμένο άρωμα. Ωστόσο, η ιξώδης φύση και η γλυκιά του γεύση συμβάλλει στην ποιότητα των προϊόντων ζύμωσης παρέχοντας γλυκύτητα, σώμα και αίσθηση (Langstaff and Lewis, 1993, Nurgel and Pickering, 2005, Pretorius, 2000). Στις περισσότερες διαδικασίες ζύμωσης *Saccharomyces*, είναι ποσοτικά το πιο εισαγόμενο προϊόν μετά από αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα. Ο *B. bruxellensis*, ωστόσο, δεν παράγει μεγάλες ποσότητες γλυκερόλης, η οποία πιθανότατα οφείλεται στην απουσία δραστηριότητας γλυκερόλης 3-φωσφορικής φωσφατάσης (Wijsman et al., 1984). Η έλλειψη παραγωγής, μάλιστα, γλυκερόλης μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στο φαινόμενο Custers. Πρόσφατες μελέτες, ωστόσο, παρακολούθησαν την παραγωγή γλυκερόλης υπό αναερόβιες συνθήκες από ορισμένα στελέχη *B. bruxellensis*, αν και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (Uscanga et al., 2003, Blomqvist et al., 2010, Rozpedowska et al., 2011).

- Δραστηριότητα α-και β-γλυκοζάσης και αγλυκονών

Έχουν ταυτοποιηθεί πολυάριθμα φυτικά αισθητήρια μόρια και πολλές από αυτές τις ενώσεις είναι γλυκοσυλιωμένες (π.χ. φλαβονόλες, ανθοκυανίνες, μονοτερπένια και νορισοπρενοειδικές ενώσεις) και χωρίς άρωμα. Από την άλλη πλευρά, η αποικοδόμηση γλυκοσυλιωμένων μορίων σε αγλυκόνες συνδέεται άμεσα με φρουτώδη ή / και αρώματα λουλουδιών και γεύσεις μπύρας (Sarry and Gunata, 2004).

Ορισμένα στελέχη *Saccharomyces* μεταβολίζουν γλυκοζίτες σε αγλυκόνες χρησιμοποιώντας εξω-β-γλυκανάση (π.χ. Exg1p). Ωστόσο, ο μεταβολισμός των γλυκοσίδων εμφανίζεται προφανώς με υψηλότερο ρυθμό στα είδη *Brettanomyces*. Οι Daenen με τους συναδέλφους της ταυτοποίησε μια κυτταρική β-γλυκοσιδάση που σχετίζεται με μια ευρύτερη δραστηριότητα σε ένα απομονωμένο με Lambic στέλεχος *Brettanomyces custersii* LD72 (Daenen et al, 2008a). Το ένζυμο β-γλυκοσιδάσης του *B. custersii* LD72 απελευθερώνει διαφορετικούς αγλυκόνες, όπως trans-2-εξεν-1-όλη, βενζαλδεϋδη, βενζυλική αλκοόλη, ευγενόλη, trans- και cis-ισοϊγενόλη, σαλικυλικό

μεθύλιο και γερανόλη από τη μετατροπή γλυκοζίτες που υπάρχουν στα βύσσινα. Αυτή η μελέτη παρείχε επίσης προκαταρκτικά στοιχεία ότι η υδρόλυση της αμυγδαλίνης, με αποτέλεσμα την παραγωγή βενζαλδεΐδης, βενζυλικής αλκοόλης και οξικού βενζυλεστέρα, συμβαίνει σε απόκριση της δραστηριότητας της υδρολάσης γλυκοσίδης σε ορισμένα είδη *Brettanomyces* (Daenen et al, 2008b).

Όσον αφορά τα νέα χαρακτηριστικά της μπύρας, ο βιολογικός μετασχηματισμός των γλυκοσίδων από λυκίσκο και φρούτα σε δραστικούς αγλυκόνες μπορεί να προσφερθεί με τη χρήση στελεχών *Brettanomyces* (Gamero A. et al, 2014). Είναι ενδιαφέρον, η δραστηριότητα της εξωκυτταρικής β-γλυκοσιδάσης στο *B. bruxellensis* σχετίζεται, επίσης, με την παραγωγή ρεσβερατρόλης, μια πιθανή αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή και αντιγηραντική ένωση (Kuo et al, 2018). Επιπλέον, η παρουσία β-γλυκοσιδάσης επιτρέπει στα είδη *Brettanomyces* να χρησιμοποιούν κυτταροβιόζη - από το ξύλο σε δρύινα βαρέλια - ως πηγή άνθρακα. Η τελευταία φάση της ζύμωσης της μπύρας lambic (13-24 μήνες μετά την έναρξη της ζύμωσης) κυριαρχείται κυρίως από το *B. bruxellensis*, υποστηριζόμενο από κυτταροκύτταρα που απελευθερώνονται από ξύλινα βαρέλια (Vanderhaegen et al, 2003). Η ικανότητα χρήσης της κυτταροβιόζης προκαλεί τα είδη *Brettanomyces* να σχηματίσουν βιοφίλμ στο βαρέλι, επιτρέποντας στα ζυθοποιεία να χρησιμοποιούν αυτό το βιοφίλμ *Brettanomyces* για να προσδώσουν τα χαρακτηριστικά «Brett» στην μπύρα (White and Zainasheff, 2010). Αξίζει να σημειωθεί ότι το χαρακτηριστικό που σχετίζεται με τις ιδιότητες υπερβολικής εξασθένισης του μούστου στον οποίο χρησιμοποιούνται τα είδη *Brettanomyces* προέρχεται από τη δραστηριότητα της α-γλυκοσιδάσης, οδηγώντας στη διαμόρφωση μπύρας χαμηλών θερμίδων .

3.8 Παράγοντες που επηρεάζουν τις ζυμώσεις

Για να είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί οποιαδήποτε ζύμη για την παραγωγή προϊόντος, κύριος στόχος είναι να έχει διασφαλιστεί η μικροβιολογική της ασφάλεια ώστε να μην υπάρχει αμφιβολία για την κατανάλωση του τελικού παραγόμενου προϊόντος.

Είναι ενδιαφέρον ότι λίγη έρευνα έχει επικεντρωθεί στην ασφάλεια *Brettanomyces* για εφαρμογή στις ζυμώσεις τροφίμων. Επειδή οι ζύμες βρίσκονται συνήθως σε παραδοσιακές ζυμώσεις ποτών, όπως οι βελγικές gueuze και οι lambic μπύρες , οι οποίες παράγονται και καταναλώνονται για αιώνες, το *Brettanomyces* θεωρείται συχνά ασφαλές. Ωστόσο, υπάρχουν δύο παράγοντες που απαιτούν κάποια προσοχή, συγκεκριμένα η δυνατότητά τους να παράγουν ορισμένες βιογενείς αμίνες και η αντοχή τους στο αντιμικροβιακό κυκλοεξαμίδιο (Steensels et al,2015).

- Παραγωγή βιογενών αμινών

Οι βιογενείς αμίνες (BAs) είναι δυνητικά επικίνδυνες βιολογικές ενώσεις που μπορούν να έχουν ανεπιθύμητες φυσιολογικές επιπτώσεις όταν απορροφώνται σε υψηλές συγκεντρώσεις. Μπορούν να προκαλέσουν ορμονικές διαταραχές, έκκριση γαστρικού οξέος, αυξημένο καρδιακό παλμό, ημικρανία, ταχυκαρδία και υψηλότερη αρτηριακή πίεση (Shalaby, 1996). Σύμφωνα με τη χημική τους δομή, τα BA μπορούν να ταξινομηθούν ως αλειφατικά (πλουτρεσκίνη,καδαβερίνη,σπερμίνη και σπερμιδίνη), αρωματικά (τυραμίνη και φαινυλαιθυλαμίνη) ή ετεροκυκλικά (ισταμίνη και τρυπταμίνη) (Spano et al., 2010). Ο πιο τοξικός εκπρόσωπος τους είναι η ισταμίνη.

Τα BA μπορούν να εισέλθουν σε ζυμωμένα τρόφιμα με δύο τρόπους, είτε απευθείας από πρώτες ύλες είτε από την παραγωγή κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ζύμωσης. Στη διαδικασία ζύμωσης, παράγονται με αποκαρβοξυλίωση αμινοξέων. Αυτή η αντίδραση συμβαίνει σε πολλά μικροβιακά είδη, συμπεριλαμβανομένων ορισμένων στελεχών *Brettanomyces*. Κατά συνέπεια, αυτά μπορούν να παράγουν σημαντικές συγκεντρώσεις BAs, ειδικά όταν αναπτύσσονται σε σύνθετα μέσα με εμπλουτισμένη συγκέντρωση αμινοξέων. Η βιολογική λειτουργία αυτής της αντίδρασης δεν είναι πλήρως κατανοητή, αλλά θεωρείται ότι αυτή η δραστηριότητα αποκαρβοξυλάσης ευνοεί την ανάπτυξη και την επιβίωση σε όξινα μέσα, καθώς προκαλεί αύξηση του pH (Spano et al., 2010).

Στο κρασί, έχουν αναγνωριστεί περισσότερα από 20 διαφορετικά BA και η συνολική τους συγκέντρωση έχει αναφερθεί ότι κυμαίνεται από μερικά mg / L έως περίπου 50 mg / L (Landete et al., 2005, Lonvaud-Funel, 2001, Spano et al. , 2010). Η βιβλιογραφία που δημοσιεύεται σχετικά με την παραγωγή BA στο κρασί από το *B. bruxellensis* δεν είναι πάντα ξεκάθαρη. Σε μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τον Vignatini και τους συνεργάτες του , πλουτρεσκίνη, καδαβερίνη και σπερμιδίνη βρέθηκαν σε κρασιά εμβολιασμένα με *B. bruxellensis*, αλλά θεωρήθηκαν ακίνδυνα για την ανθρώπινη υγεία λόγω των χαμηλών συγκεντρώσεων και της απουσίας των πιο φυσιολογικά ενεργών μορίων (Vignatini et al., 2008). Ωστόσο, ο Caruso και η ομάδα του βρήκαν πως ένα στέλεχος *B. bruxellensis* κατάφερε να σχηματίσει έως και 15 mg L⁻¹ ολικών αμινών, κυρίως 2-φαινυλαιθυλαμίνης (Caruso et al., 2002). Η παραγωγή βιογενών αμινών θεωρείται σημαντικός παράγοντας για την ασφάλεια των μικροοργανισμών στις διαδικασίες ζύμωσης τροφίμων: μια πρόσφατα δημοσιευμένη επιστημονική γνώμη της επιτροπής για τους βιολογικούς κινδύνους της Ευρωπαϊκής Αρχής για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA) συζητά τον έλεγχο των BA για - μόνωση σε ζυμωμένα τρόφιμα (EFSA, 2011). Ωστόσο, η μακροχρόνια παραδοσιακή χρήση των

τροφίμων που παράγονται από ζυμώσεις *Brettanomyces* και η έντονη μεταβλητότητα των ενδοστροφών υποδηλώνουν ότι η επιλογή συγκεκριμένων στελεχών *Brettanomyces* μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο μόλυνσης από ΒΑ σε ζυμώσεις που εμβολιάζονται με *Brettanomyces* (Steensels et al,2015).

- Αντοχή στο κυκλοεξαμίδιο

Το *Brettanomyces* είναι γενικά εξαιρετικά ανθεκτικό στο κυκλοεξαμίδιο (μερικές φορές αναφέρεται ως ακτιδιόνη) όπου είναι ένας κοινός αντιμυκητιασικός παράγοντας που αναστέλλει τη βιοσύνθεση της πρωτεΐνης σε πολλούς ευκαρυωτικούς οργανισμούς (Leach et al., 1947 και Morneau et al., 2011). Κατά συνέπεια, το αντιβιοτικό χρησιμοποιείται συχνά ως ένας από τους κύριους εκλεκτικούς παράγοντες για την απομόνωση στελεχών *Brettanomyces*. Αν και η ανθεκτικότητα στα αντιμυκητιασικά δεν μεταδίδεται μεταξύ ζυμομυκήτων, αποφασίστηκε πρόσφατα από την EFSA ότι ζύμες ανθεκτικές σε αντιμυκητιασικά που χρησιμοποιούνται για θεραπείες στον άνθρωπο πρέπει να αποφεύγονται σε διαδικασίες ζύμωσης (EFSA, 2009). Το κυκλοεξαμίδιο, ωστόσο, δεν εφαρμόζεται επί του παρόντος ως θεραπευτικό αντιμυκητιασικό και ως εκ τούτου δεν πρέπει να αποτελεί πρόβλημα όταν πραγματοποιείται έλεγχος των τεκμηρίων ασφάλειας (QPS) για *Brettanomyces* (Steensels et al,2015).

3.9 Αναστολείς ζυμώσεων

Υπάρχουν ορισμένοι χημικοί παράγοντες οι οποίοι μπορούν να μειώσουν την απόδοση της αλκοολικής ζύμωσης ή ακόμα και να την αναστείλουν. Όπως συμβαίνει σε κάθε μεταβολική πορεία έτσι και στην αλκοολική ζύμωση έχουμε διάφορα σημεία ρύθμισης, καθώς και αρκετούς ανασταλτικούς παράγοντες. Για το λόγο αυτό θα πρέπει να ελέγχονται (Webb,1963). Οι πιο σημαντικοί από τους αναστολείς είναι :

- Σάκχαρα : Η αυξημένη συγκέντρωση σακχάρων μπορεί να επηρεάσει την πορεία της αλκοολικής ζύμωσης, καθώς επηρεάζει το μεταβολισμό των ζυμών. Αναλυτικότερα, προκαλεί επιμήκυνση της περιόδου αναμονής, μειωμένη ταχύτητα ζύμωσης και μείωση της ποσότητας των ζυμωμένων σακχάρων.
- Αιθανόλη : Το ίδιο το προϊόν δρα σαν αναστολέας σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις. Αλκοολικοί βαθμοί μεγαλύτεροι των 5 αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό ορισμένων ζυμών, ενώ σε βαθμούς μεγαλύτερους των 12 τα περισσότερα κύτταρα θανατώνονται. Ειδικότερα, αυξημένη συγκέντρωση αιθανόλης οδηγεί σε αύξηση της φάσης αναμονής των κυττάρων της ζύμης και σε επιβράδυνση της αύξησης των κυττάρων. Σε ακόμη μεγαλύτερες συγκεντρώσεις η αιθανόλη δύναται να οδηγήσει σε τερματισμό της αλκοολικής ζύμωσης και θανάτωση των κυττάρων ζύμης

- Φορμαλδεΐδη : Η HCHO που χρησιμοποιείται με την μορφή φορμόλης ως αντισηπτικό ενάντια στα βακτήρια, υπό ορισμένες συνθήκες αναστέλλει την αλκοολική ζύμωση.
- Θειώδες οξύ : Το H₂SO₃ χρησιμοποιείται συνήθως για τη θείωση στις οينوδεξαμενές και πρέπει να είναι ελεύθερο αρσενικού, γιατί σε αντίθετη περίπτωση αποτελεί αναστολέα της ζύμωσης.
- Μέταλλα: Ορισμένα μέταλλα όπως το Cd, ο Cu, ο Pb, και ο Hg σε ορισμένες συγκεντρώσεις δρουν σαν αναστολείς (Ghose and Tyagi, 1979) .

3.10 Αλλοιώσεις που προκαλούνται από τον *Brettanomyces*

Ο *Brettanomyces* εξαπλώνεται όταν έρχεται σε επαφή το ποτό με μολυσμένες περιοχές αλλά η μόλυνση από αυτόν δεν προέρχεται από μία αιτία αλλά από ένα σύνολο φαινομένων (Tubia et al, 2018).

Από τα σχετικά μεταβολικά προϊόντα που παράγονται από τον *Brettanomyces* κατά τη διάρκεια της ζύμωσης αλκοολούχων ποτών, οι πτητικές φαινόλες είναι αυτές που επηρεάζουν κυρίως την ποιότητα του κρασιού και του μηλίτη. Η παραγωγή αυτών των ενώσεων πραγματοποιείται με τη δραστικότητα δύο ενζύμων τα οποία αποκαρβοξυλιώνουν τα υδροξυκιναμικά οξέα σε υδροξυτυρίνη και στη συνέχεια ανάγονται σε παράγωγα αιθυλίου. Ο *Brettanomyces* είναι σε θέση να χρησιμοποιήσει π-κουμαρίνη και φουρουλικό οξύ (που βρίσκονται στο μούστο), μετατρέποντάς τα σε 4-αιθυλφαινόλη και 4-αιθυλγουακόλη, αντίστοιχα (Steensels et al., 2015, Suárez et al., 2007). Μερικοί τύποι ζύμης μπορούν να παράγουν αυτό το αποτέλεσμα: *Dekkera bruxellensis*, *Dekkera anomala*, *Pichia guilliermondii*, *Candida versatilis*, *Candida halophila* and *Candida manniotfaciens* (Blackburn, 2006). Αλλά ο *Brettanomyces* είναι ο μόνος μικροοργανισμός που μπορεί να τα παράγει ειδικώς σε συνθήκες παραγωγής κρασιού και μηλίτη (π.χ. χαμηλό pH, υψηλή αιθανόλη και χαμηλή οξυγόνωση). Αναφέρεται ότι το 80% του *Brettanomyces* μπορεί να παράγει αυτές τις φαινόλες και μόνο το 50% σε υψηλά επίπεδα (Conterno et al., 2006). Επιπλέον, υπάρχουν μερικές μελέτες που δείχνουν διαφορετική παραγωγή φαινόλης ανάλογα με το στέλεχος *Brettanomyces bruxellensis* (Di Toro et al., 2015).

Μερικές δημοσιεύσεις έχουν διερευνήσει την παρουσία *Brettanomyces* στα σταφύλια σε περιοχές συγκομιδής, αλλά η συχνότητα ανίχνευσης είναι πολύ χαμηλή (που περιλαμβάνει 0–3% του συνολικού πληθυσμού ζύμης που υπάρχει στα σταφύλια) (Renouf et al., 2007). Παραδείγματα περιοχών που συνήθως παρέχουν κατάλληλες κόγχες για την ανάπτυξη του *Brettanomyces*, στην οينوποίηση, περιλαμβάνουν γραμμές μούστου, βρώμικο εξοπλισμό θραύσης, ξύλινα σκεύη ή οποιαδήποτε δεξαμενή ή γραμμή

μεταφοράς που καθαρίζεται αποτελεσματικά (Oelofse et al., 2008). Τα πρώτα βήματα στη διαδικασία οινοποίησης δημιουργούν ευκαιρίες για την εξάπλωση της ζύμης αλλοίωσης. Πρώτον, η χρήση πρακτικών διαβροχής και πηκτολυτικών ή άλλων ενζύμων που περιέχουν δραστικότητα κινναμοϋλικής εστεράσης, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένα επίπεδα υδροξυκινναμικού οξέος, πρόδρομο του φαινολικής επίγευσης που δημιουργείται με τη σύνθεση *Brettanomyces* (Freer, 2002). Κρίσιμα σημεία για πιθανή επιμόλυνση από *Brettanomyces* κατά την οινοποίηση είναι η διάρκεια της αλκοολικής και της μηλογαλακτικής ζύμωσης, των στατικών ή υποτονικών ζυμώσεων, η τιμή του pH (άνω του 3,6), η θερμοκρασία (δεν θα πρέπει να είναι υψηλή). Σημαντικές είναι, επίσης, οι τεχνικές μικροξυγόνωσης, οι ανεπαρκείς επεξεργασίες θειώδους κατά τη διάρκεια ωρίμανσης, στο οποίο ευρύτερα πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή (Tubia et al, 2018).

Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας οινοποίησης, ο *Brettanomyces* ανταγωνίζεται το νωπό μούστο και άλλα είδη ζυμών που αναπτύσσονται γρήγορα. Το *S. cerevisiae* είναι υπεύθυνο για την αλκοολική ζύμωση και ως εκ τούτου, το *Brettanomyces* έχει ελάχιστες πιθανότητες επικράτησης. Καθώς η διαδικασία ζύμωσης τελειώνει, οι συνθήκες αλλάζουν και ευνοείται ο *Brettanomyces* έναντι άλλων μικροοργανισμών (Tubia et al, 2018). Τα υψηλά επίπεδα αιθανόλης και τα χαμηλά επίπεδα σακχάρου, pH και οξυγόνωσης προκαλούν την αυτόλυση άλλων κυττάρων, όπως το *S. cerevisiae*. Ωστόσο, ο *Brettanomyces* έχει εξαιρετική αντοχή στις αλκοολικές συνθήκες σε ένα ελάχιστο θρεπτικό περιβάλλον και στα χαρακτηριστικά αργής ανάπτυξης (Renouf et al., 2006). Επίσης, όταν το κρασί αποθηκεύεται για ωρίμανση σε ξύλινα βαρέλια, η πορώδης μικροδομή των δρύινων βαρελιών επιτρέπει την είσοδο του οξυγόνου που προάγει την ανάπτυξη του *Brettanomyces* (du Toit et al., 2006). Η ποικιλία των πηγών άνθρακα που μπορεί να μεταβολίσει ο *Brettanomyces*, του δίνει το πλεονέκτημα να αναπτύσσεται ευκολότερα από άλλες ζύμες κατά τη διάρκεια των τελικών σταδίων της ζύμωσης (Tubia et al, 2018).

Ο σχηματισμός βιοφίλμ αυξάνει την αντοχή των *Brettanomyces* σε χημικές και φυσικές θεραπείες. Ωστόσο, σε σύγκριση με άλλες αλλοιώσεις και μικροοργανισμούς που σχηματίζουν βιομάζες, υπάρχουν λίγες δημοσιευμένες μελέτες σχετικά με τα βιοφίλμ *Brettanomyces*. Μερικοί συγγραφείς έχουν δείξει την ικανότητα του *Brettanomyces* για να σχηματίζει βιολογικά προϊόντα σε κρασί και συνθετικά μέσα με διαφορετικές συγκεντρώσεις ζάχαρης (Joseph et al., 2007 , Tristezza et al. 2010).

Επιπλέον, μελέτες γενετικής ποικιλομορφίας αποκάλυψαν σημαντική γονοτυπική ικανότητα εντός του είδους *B. bruxellensis* (Crauwels et al., 2014 and Vignitini et al., 2012) Μερικές από αυτές τις μελέτες αναφέρουν μια συσχέτιση μεταξύ

των γονότυπων ομάδων του *B. bruxellensis* και της πηγής απομόνωσης τους (π.χ. μπίρα ή κρασί) (Crauwels et al., 2014, Conterno et al., 2006, Vigentini et al., 2012), υποδηλώνοντας εξειδικευμένη προσαρμογή. Πρόσφατα, αυτή η συσχέτιση προτάθηκε επίσης για τους φαινοτύπους του *B. bruxellensis*, αν και μελετήθηκε μόνο ένα περιορισμένο σύνολο επτά προϊόντων απομόνωσης (2 στελέχη κρασιού, 4 στελέχη μπίρας και 1 από αναψυκτικά). Η ικανότητα μεταβολισμού συγκεκριμένων α- και β-γλυκοζιτών καθώς και α- και β-υποκατεστημένων μονοσακχαριτών βρέθηκε να είναι πολύ μεταβλητή μεταξύ των στελεχών *B. Bruxellensis*, αλλά συνεπής για στελέχη από την ίδια προέλευση. Ενώ στελέχη που απομονώθηκαν από κρασί κατάφεραν να χρησιμοποιήσουν D-γαλακτόζη, αυτό φαίνεται λιγότερο στην περίπτωση των προϊόντων απομόνωσης μπίρας. Συνεπώς, στελέχη που δεν μπορούσαν να αναπτυχθούν σε γαλακτόζη βρέθηκε να στερούνται τουλάχιστον ενός από τα γονίδια που εμπλέκονται στην οδό Leloir του μεταβολισμού της γαλακτόζης (Crauwels et al., 2015).

Περαιτέρω, σε αντίθεση με τα στελέχη του κρασιού, τα στελέχη παρασκευής βρέθηκαν να μην είναι ικανά να υδρολύουν β-γλυκοσίδιο, δισακχαρίτες, κυτταροβιόζη και γεντιοβιόζη, υποδηλώνοντας ότι αυτά τα στελέχη στερούνται του ενζύμου ή των ενζύμων που είναι υπεύθυνα για τη θραύση συγκεκριμένων β-δεσμευμένων σακχάρων. Πράγματι, η αλληλουχία ολόκληρου του γονιδιωματός αποκάλυψε ότι ενώ τα μελετημένα στελέχη κρασιού περιέχουν δύο (διακριτά) γονίδια β-γλυκοσιδάσης, τα στελέχη μπίρας που ερευνήθηκαν στερούνται ενός από αυτά τα γονίδια, τα οποία μπορεί να εξηγήσουν αυτές τις φαινοτυπικές διαφορές (Crauwels et al., 2015). Ωστόσο, το 43,3% των 147 δοκιμασμένων στελεχών *Brettanomyces* από ζυμώσεις lambic (ταυτοποιήθηκαν ως *B. custersii* και *B. intermedius* εκείνη την εποχή, βρέθηκαν δύο είδη που έχουν πλέον ανακαταταχθεί ως *B. bruxellensis*), έχει δραστηριότητα **κυτταροβιόζης**, υποδηλώνοντας ότι τα στελέχη παρασκευής του *B. bruxellensis* φιλοξενούν επίσης φαινοτύπους θετικούς σε κυτταροβιόζη. Απαιτείται περαιτέρω έρευνα που χρησιμοποιεί περισσότερα προϊόντα απομόνωσης από διαφορετικές οικολογικές θέσεις για να διερευνηθεί σε ποιο βαθμό αυτά τα ευρήματα αντιπροσωπεύουν μια γενική τάση για τα στελέχη μπίρας και κρασιού *B. Bruxellensis*.

Είναι ενδιαφέρον ότι τα γονίδια που εμπλέκονται στην οδό Leloir καθώς και το προαναφερθέν γονίδιο β-γλυκοσιδάσης που απουσιάζει στα στελέχη μπίρας συγκεντρώνονται σε μια περιοχή ~ 36 kb που περιλαμβάνει 13 γονίδια, τα περισσότερα από τα οποία εμπλέκονται στον μεταβολισμό του άνθρακα. Αυτή η περιοχή βρέθηκε εντελώς απουσία στο στέλεχος μπίρας ST05 / 12.22 (Crauwels et al., 2014). Επιπλέον, μια πιο εμπειρισταωμένη μελέτη με χρήση PCR αποκάλυψε ότι αυτό το γονιδιακό

σύμπλεγμα χάθηκε σταδιακά με την πάροδο του χρόνου σε στελέχη μπύρας: μερικά στερούνται μόνο λίγα γονίδια, άλλα δεν διαθέτουν και τα 13 γονίδια, αλλά όλα τα στελέχη μπύρας δεν έχουν το γονίδιο β-γλυκοσιδάσης. Αντιθέτως, αυτό το σύμπλεγμα γονιδίων υπήρχε εξ ολοκλήρου στα στελέχη του κρασιού. Επιπλέον, αυτή η περιοχή είναι επίσης επιρρεπής σε αντιγραφή αριθμών και απώλεια ετεροζυγοτικότητας . Με βάση αυτά τα ευρήματα μπορεί να υποθεθεί ότι αυτό το γονιδιακό σύμπλεγμα φέρει κόστος καταλληλότητας για το *B. bruxellensis* σε ορισμένα συστήματα ζύμωσης όπως η παρασκευή μπύρας, παρέχοντας έτσι μια επιλεκτική πίεση για την απώλεια της.

Είναι επίσης ενδιαφέρον να σημειωθεί πιθανότατα ότι η ικανότητα αυτή της ζύμης μπορεί να συνδέεται με την οικολογική θέση της. Πιο συγκεκριμένα, η τριπλοειδία φαίνεται να κυριαρχεί στον Αυστραλιανό πληθυσμό *B. bruxellensis*, καθώς παρατηρείται στο 92% όλων των απομονωμένων προϊόντων από κρασιά της Αυστραλίας (Curtin et al., 2007). Αντίθετα, η πλειονότητα των στελεχών μπύρας *B. bruxellensis* που έχουν ερευνηθεί μέχρι σήμερα βρέθηκε διπλοειδής . Τα τριπλοειδή στελέχη περιέχουν ένα πυρήνα διπλοειδές γονιδίωμα (συγκρίσιμο με τα διπλοειδή στελέχη) και ένα τρίτο απλοειδές συμπλήρωμα διάλυσης, το οποίο μπορεί να έχουν αποκτήσει μέσω ενδοειδικής υβριδοποίησης. Αυτή η ενδιαφέρουσα δομή γονιδιώματος δεν είναι σπάνια σε ζυμομύκητες και μοιάζει με τα ενδοειδικά υβρίδια που αναγνωρίζονται στο *Saccharomyces sensu rigo clade*, όπως η ζύμη lager *Saccharomyces pastorianus* και το *S. cerevisiae* / υβρίδια *S. kudriavzevii* που απομονώθηκαν από ζύμωση κρασιού και μπύρας (Gonzalez et al., 2008). Στην περίπτωση των υβριδίων *Saccharomyces*, θεωρήθηκε ότι το πρόσθετο σύνολο χρωμοσωμάτων παρέχει ένα επιλεκτικό πλεονέκτημα σε ένα βιομηχανικό περιβάλλον, αλλά απομένει να καθοριστεί εάν ένα παρόμοιο σενάριο εφαρμόζεται στο *B. bruxellensis*. Υποστηρίχθηκε ότι η ικανότητα των περισσότερων στελεχών του κρασιού να αντέχει σε υψηλά επίπεδα θειώδους άλατος, ο κύριος παράγοντας κατά της αλλοίωσης στις ζυμώσεις κρασιού, μπορεί να εξηγηθεί (τουλάχιστον εν μέρει) από την κατάσταση της τριπλοειδίας . Ωστόσο, παρόλο που αυτές οι προκαταρκτικές έρευνες υπαινίσσονται ορισμένες τάσεις μεταξύ της γενετικής δομής καθώς και της φαινοτυπικής συμπεριφοράς των πληθυσμών του *B. bruxellensis* και της προέλευσής τους, απαιτούνται πιο περίπλοκες μελέτες που χρησιμοποιούν μεγάλες συλλογές διαφορετικών στελεχών για να εξαχθούν ισχυρά συμπεράσματα ως προς αυτό. Μια τέτοια μελέτη μπορεί επίσης να αποκαλύψει ακούσιες ανθρώπινες επιδράσεις στην εξέλιξη του *B. bruxellensis*, π.χ. όσον αφορά χαρακτηριστικά όπως η ανοχή στο θειώδες (Crauwels et al., 2015).

3.10.1 Μέθοδοι ελέγχου

Λόγω της οικονομικής σημασίας του *Brettanomyces* ως ζύμης αλλοίωσης, έχει δοθεί στο παρελθόν μεγάλη προσοχή στην ανάπτυξη αξιόπιστων μεθόδων ανίχνευσης. "

Πίνακας 3.2 : Προαιρετικές μέθοδοι για τον έλεγχο του *Brettanomyces* στα κρασιά (Tubia et al,2018)

Μεταχείριση	Αποτέλεσμα	Μειονέκτημα	Αναφορά
Πρωτεϊνική διευκρίνιση			
Ζελατίνη	Μειώνει τους πληθυσμούς των <i>Brettanomyces</i> και <i>Dekkera</i> με παρεμπόδιση	Απώλεια χρώματος και αρώματος	Murat and Dumeau (2003), Ruiz-Hernández (2003)
Ασπράδι αυγού			
Καζεΐνη καλίου			
Καζεΐνες			
Διήθηση			
Μεμβράνες (0,45 Ιm)	Μειώνει τους πληθυσμούς <i>Brettanomyces</i> και <i>Dekkera</i> με φυσικό διαχωρισμό	Απώλεια χρώματος και αρώματος	Caldero'n et al. (2004)
Υπερδιήθηση			
Φυσικοχημικές μεταβλητές			
Χαμηλή θερμοκρασία ζύμωσης	Καθορίζει φυσικοχημικές συνθήκες που μειώνουν τη βιωσιμότητα των <i>Brettanomyces</i> και <i>Dekkera</i>	Αυτές οι μεταβλητές μπορεί να είναι δύσκολο να τροποποιηθούν στα κρασιά και να μην είναι	Gerbeaux et al. (2000)
χαμηλό pH			
Μείωση της περιεκτικότητας οξυγόνου			

Αποφυγή μικροξυγονωσης		συμβατές με τη ζύμωση	
Υψηλά επίπεδα αλκοόλ			
Μείωση της πρόδρομης συγκέντρωσης			
Χαμηλή θερμοκρασία διαβροχής	Αποτρέπει τη διάλυση των υδροξυκινναμικών οξέων (πρόδρομοι πτητικών φαινολών)	Απώλεια χρώματος και αρώματος	Gerbeaux et al. (2002)
Αποφυγή πεκτολυτικών ενζύμων και τα ενζύμων με δραστηριότητα στένωσης κινναμούλιου			
Πρόσθετα			
SO2	Αναστέλλει την ανάπτυξη των	Ορισμένα από αυτά τα	Delfini et al. (2002),
DMDC		προϊόντα δεν	Go´mez-Rivas et al.
Χιτοζάνη	<i>Brettanomyces</i>	έχουν εγκριθεί	(2004)
Σορβικό οξύ	και <i>Dekkera</i> και	για χρήση στον	
Βενζοϊκό οξύ	προλαμβάνει	αμπελοοινικό	
Φουμαρικό οξύ	καταστάσεις που	τομέα ή είναι	
Ασκορβικό οξύ	ευνοούν το	ακόμη	
Ερυθροβικό οξύ	σχηματισμό αιθυλοφαινόλων	πειραματικά	
Επεξεργασία υψηλής πίεσης			
400–500 MPa	Καταστρέφει τους μικροοργανισμούς στο κρασί χωρίς να επηρεάζει σοβαρά τις	Υψηλό κόστος εξοπλισμού	Puig et al. (2003)

	αισθητηριακές ιδιότητές του		
Βιολογικές τεχνικές			
Βακτηριοκίνες	Αναστέλλει την ανάπτυξη του <i>Brettanomyces</i> και <i>Dekkera</i>	Η χρήση αυτών των τεχνικών με το κρασί είναι συνήθως πειραματική	Toit and Pretorius (2000)
Βακτηριολογικά ένζυμα			
Ζυμοκίνες			
Γενετική μηχανική			
Διαγονιδιακές ζύμες	Γενετικά τροποποιημένες ζύμες που αναστέλλουν την ανάπτυξη των <i>Brettanomyces</i> και <i>Dekkera</i>	Δεν επιτρέπεται προς το παρόν στην οινοποίηση	Toit and Pretorius (2000)

Πλεονεκτικά, τα ίδια εργαλεία ανίχνευσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παρακολούθηση ή τον χαρακτηρισμό ευεργετικών στελεχών παρασκευής. Για παράδειγμα, ημι-εκλεκτικά μέσα με αιθανόλη ως πηγή άνθρακα και φαινολικό πρόδρομοι όπως υδροξυκινναμικά οξέα έχουν χρησιμοποιηθεί για να ευνοήσουν την ανάπτυξη του *Brettanomyces* έναντι άλλων ζυμών (Rodrigues et al., 2001).

Ι. Προληπτικές

Η παρουσία των *Brettanomyces* θεωρείται ταυτόχρονα ένα σημαντικό πρόβλημα για τις βιομηχανίες αλκοολούχων ποτών. Τόσες πολλές βιομηχανίες έχουν επικεντρώσει τις προσπάθειές τους στη βελτίωση των πρωτοκόλλων υγιεινής τους και στη χρήση αντιμικροβιακών τεχνολογιών. Συχνά, οι οινοποιοί πρέπει να εξισορροπούν την εφαρμογή των αντιμικροβιακών μεθόδων έναντι της διατήρησης της ποιότητας και του στυλ των ποτών τους. Τα τυποποιημένα πρωτόκολλα υγιεινής αποτελούνται από πλύσιμο και απολύμανση δεξαμενών, γραμμών, αντλιών και εξοπλισμού μεταξύ κάθε χρήσης (Loureiro και Malfeito-Ferreira, 2003). Οι χημικοί παράγοντες, κυρίως αυτοί με χλώριο, δεν είναι κατάλληλοι για κατεργασία ξύλου λόγω της απελευθέρωσης ουσιών. Αντίθετα, κατάλληλες είναι πιο τυποποιημένες διαδικασίες υγιεινής οι οποίες

περιλαμβάνουν ζεστό νερό ή μεθόδους με ατμό (Zuehlke et al., 2013). Ωστόσο, αυτό δεν είναι συνήθως επαρκές και χρησιμοποιούνται άλλες συμπληρωματικές μέθοδοι.

Οι οινοπαραγωγοί πρέπει με τη μέθοδο ελέγχου να εξισορροπήσουν την εφαρμογή τεχνολογιών ελέγχου με τις επιπτώσεις στο στυλ και την ποιότητα του κρασιού. Ένας κοινός τρόπος αντιμετώπισης είναι η χρήση της προσθήκης SO₂ ως προληπτικής μεθόδου κατά τη διαδικασία ελέγχου ποιότητας του κρασιού (Ough et al, 2005). Ωστόσο, σε ορισμένες χώρες, η χρήση του SO₂ ελέγχεται ή απαγορεύεται λόγω αρνητικών επιπτώσεων στην υγεία (Vally and Misso, 2012).

Οι μέθοδοι βιοελέγχου έχουν επίσης γίνει ένας πολύ ενδιαφέρον τρόπος για τους παραγωγούς να μειώσουν την επιζήμια επίδραση των ζυμομυκήτων. Ο αριθμός των κυττάρων *Brettanomyces* ελέγχεται από την αλληλεπίδρασή του με άλλες ζύμες και βακτήρια. Ορισμένες μελέτες έδειξαν ότι οι ζυμομύκητες μη-*Saccharomyces* (π.χ., *Kluyveromyces wickerhamii*, *Pichia anomala* and *Pichia membranifaciens*) παράγουν τοξίνες οι οποίες δύνανται να επιφέρουν θάνατο και αντιμικροβιακές πρωτεϊνούχες ενώσεις που αναστέλλουν ευαίσθητες ζύμες (Mehlomakulu et al., 2015). Επίσης, η χρήση καλλιεργειών εκκίνησης για την προώθηση των αλκοολικών και μηλογαλακτικών ζυμώσεων έχει δείξει ότι θα μπορούσε να αποφευχθεί η ανάπτυξη *B. bruxellensis* και ο πτητικός σχηματισμός φαινόλης (Berbegal et al., 2018).

II. Πρότυπες

Εκτός από την εξερεύνηση νέων προληπτικών μεθόδων, οι βιομηχανίες ενδιαφέρονται επίσης για τον εντοπισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό των επιπέδων μαγιάς αλλοίωσης. Σήμερα, οι παραδοσιακές μέθοδοι ανίχνευσης ζύμης είναι οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες τεχνικές λόγω της απλότητας τους αλλά και του σχετικά χαμηλού κόστους τους. Αυτές οι μέθοδοι μπορούν να είναι άμεσες ή έμμεσες, όπου η παρουσία αυτών των ζυμών είτε ανιχνεύεται με ακρίβεια είτε βασίζεται στην αναγνώριση ορισμένων μικροβιακών μεταβολικών προϊόντων, αντίστοιχα. Δυστυχώς, και οι δύο τύποι μεθόδων παρουσιάζουν πολλά μειονεκτήματα, όπως απαιτούμενες εξειδικευμένες δοκιμές, μεγάλες περιόδους επώασης (δύο εβδομάδες ή περισσότερες) και ανακριβή αποτελέσματα. Ως εκ τούτου, οι βιομηχανίες κρασιού και μηλίτη ενδιαφέρονται για πιο ευαίσθητες, γρήγορες και οικονομικές τεχνικές ανίχνευσης (Tubia et al,2018).

Οι μέθοδοι άμεσης ανάλυσης στοχεύουν στον εντοπισμό μικροοργανισμών που υπάρχουν στα ποτά με βάση την άμεση παρατήρηση των κυττάρων ζύμης, την ανάλυση διαφορετικών παραμέτρων όπως μορφολογία, κινητική ανάπτυξης, μονάδες σχηματισμού αποικιών και βιοδεικτών . Γενικά, αυτές οι τεχνικές είναι πολύ ευαίσθητες και ικανές να ανιχνεύουν μικρές συγκεντρώσεις μικροοργανισμών, αλλά θα μπορούσαν

να είναι χρονοβόρες, απαιτώντας έως και δύο εβδομάδες για αποτελέσματα (Millet and Lonvaud-Funel, 2000). Έτσι, αυτές οι δοκιμές δεν είναι συμβατές με τις βιομηχανικές ανάγκες του κρασιού και του μηλίτη.

Οι πιο σχετικές άμεσες μέθοδοι για τον *Brettanomyces* είναι οι μέθοδοι επιμετάλλωσης, η μικροσκοπία, η μοριακή ανίχνευση και η κυτταρομετρία ροής (Cocolin et al., 2004, Ibeas et al., 1996, Renouf and Lonvaud-Funel, 2007).

Οι έμμεσες τεχνικές αναλύουν τα μεταβολισμένα μόρια και τις αλλαγές στα χημικά χαρακτηριστικά που υπάρχουν στο κρασί ή στον μηλίτη. Συνήθως, αυτές οι τεχνικές συνδυάζονται με άμεσες μεθόδους για την καλύτερη ανάλυση του δείγματος εξασφαλίζοντας αποτελέσματα. Όταν τα μεταβολικά προϊόντα των ζυμομυκήτων καταστρέφουν την ποιότητα του κρασιού, είναι πολύ αργά για οποιαδήποτε δράση πρόληψης (Suárez et al., 2007). Ως αποτέλεσμα, χρησιμοποιούνται έμμεσες μέθοδοι για την ανάλυση της ποιότητας του προϊόντος και όχι για την παρουσία μολυσματικών ουσιών (Tubia et al,2018).

- Άμεσες μέθοδοι

1. Μέθοδοι επιμετάλλωσης

Αυτές οι μέθοδοι χρησιμοποιούν πλάκες επιλεκτικής-διαφορικής καλλιέργειας, ακολουθούμενες από κάποια συμπληρωματική βιοχημική και φυσιολογική ανάλυση. Αυτές οι τεχνικές θα μπορούσαν να περιλαμβάνουν και μελέτη μορφολογίας με μικροσκόπιο (Wedral et al., 2010). Συνήθως, είναι επίσης δυνατή η ανάλυση της διαφορετικής μορφολογίας των αποικιών στην πλάκα άγαρ. Ωστόσο, είναι δύσκολο να τα διακρίνουμε και να τα αναγνωρίσουμε σύμφωνα με μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά, και συχνά, δίνει ψευδώς θετικά. Επιπλέον, εφαρμόζεται μόνο για τον ποσοτικό προσδιορισμό βιώσιμων κυττάρων, καθώς τα βιώσιμα αλλά μη καλλιεργήσιμα κύτταρα (VBNC) δεν θα αναπτυχθούν, παρόλο που υπάρχουν στο μέσο.

Τα πιο συνηθισμένα μέσα καλλιέργειας που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση *Brettanomyces* αποτελούνται από διαφορετικά χημικά και αντιδραστήρια . Περιέχει συνήθως σάκχαρα (π.χ. γλυκόζη, φρουκτόζη και σακχαρόζη), πρωτεΐνες που έχουν υποστεί πέψη ως πηγή αζώτου (π.χ. πεπτόνη και τρυπτόνη) και σύνθετα συμπληρώματα (π.χ. εκχύλισμα ζύμης και εκχύλισμα βύνης). Για την ελαχιστοποίηση της μόλυνσης, χρησιμοποιούνται διαφορετικά αντιβιοτικά όπως το κυκλοεξαμίδιο και η χλωραμφενικόλη (Morneau et al., 2011). Η αιθανόλη χρησιμοποιείται επίσης ως εκλεκτικός παράγοντας λόγω των βακτηριοκτόνων ιδιοτήτων της (Couto et al., 2005).

2. Μικροσκοπία

Η άμεση οπτικοποίηση των μικροοργανισμών μέσω μικροσκοπίας είναι μια συνήθως χρησιμοποιούμενη τεχνική. Οι *Brettanomyces* πράγματι δεν είναι εύκολο να εντοπιστούν χρησιμοποιώντας κλασικές τεχνικές μικροβιολογίας. Η μορφολογία και το μέγεθος των κυττάρων αυτής της μαγιάς μπορεί να ποικίλλει πάρα πολύ από το ένα στέλεχος στο άλλο. Επιπλέον, η μαγιά εμφανίζει μεταβλητή μορφολογία κυττάρων ανάλογα με την ηλικία, το μέσο καλλιέργειας και το περιβαλλοντικό στρες. Κλασικά, τα φυτικά κύτταρα έχουν σχήμα σκαφών αλλά επιμήκη, σφαιρικά, ελλειψοειδή και κυλινδρικά κύτταρα έχουν επίσης αναφερθεί. Η ανάπτυξη των ψευδοϋποφθαλμικών δομών είναι επίσης συχνή (π.χ., μακρά, διακλαδισμένα φλεγμονώδη κύτταρα) (Louw et al., 2014). Ωστόσο, δεδομένου ότι έχει αναφερθεί ανάπτυξη ψευδοφύφων σε άλλες ζύμες, όπως το *S. cerevisiae*, η ανάπτυξη των ψευδοϋπολογικών δομών από μόνη της είναι ανεπαρκής για τον εντοπισμό της ανάπτυξης *Brettanomyces* (Gancedo, 2001).

Νέες τεχνικές μικροσκοπίας που βασίζονται σε *in situ* υβριδισμό με χρήση πεπτιδικών νουκλεϊκών οξέων ανιχνευτών έχουν αναπτυχθεί για να παρέχουν ταχύτερη και ακριβέστερη ταυτοποίηση των *Brettanomyces* χρησιμοποιώντας μικροσκοπία φθορισμού.

3. Μοριακή ανίχνευση

Αυτοί οι τύποι μεθόδων βασίζονται στην ενίσχυση συγκεκριμένων θραυσμάτων ριβοσωμικού DNA και RNA με την αντίδραση αλυσιδωτής πολυμεράσης (PCR) για την αναγνώριση μικροοργανισμών. Οι μοριακές τεχνικές είναι γρήγορες, ευαίσθητες και ειδικές για την ανίχνευση μικροοργανισμών (Oelofse et al., 2009).

Όσον αφορά τη διάκριση μεταξύ βιώσιμων και μη βιώσιμων κυττάρων, για τη βελτίωση του περιορισμού της τεχνικής PCR, προτάθηκε η αντίστροφη μεταγραφάση PCR (RT-PCR). Αυτή η τεχνική χρησιμοποιεί ένα ένζυμο ικανό να συνθέσει μονόκλωνο DNA από RNA στην κατεύθυνση 5-3. Το RT-PCR είναι επίσης μια ευαίσθητη μέθοδος χωρίς να αυξάνεται ο χρονοβόρος σεβασμός της παραδοσιακής PCR. Για αυτόν τον λόγο, είναι μια μέθοδος μοριακής ανίχνευσης που χρησιμοποιείται συνήθως (Phister and Mills, 2003, Shimotsu et al., 2015).

Οι τεχνικές ένθετης ενίσχυσης (Nested-PCR) είναι μια άλλη μέθοδος μοριακής ανίχνευσης που χρησιμοποιείται για το *Brettanomyces*. Αυτή η τεχνική χρησιμοποιεί δύο εξωτερικούς και δύο εσωτερικούς εκκινήτες, παρέχοντας μια μοναδική μέθοδο άμεσης ανίχνευσης του *Brettanomyces* σε ποτά χωρίς απομόνωση στελέχους (Tubia et al., 2018).

Πρόσφατα, μια ποσοτική PCR με απευθείας δειγματοληψία (Cells-qPCR) έχει προσαρμοστεί για να ανιχνεύει και να ποσοτικοποιεί τις συνολικές ζύμες (π.χ. *B.*

bruxellensis, *S. cerevisiae* και *Zygosaccharomyces bailii*) σε γλεύκος σταφυλιών και κρασί. Αυτοί οι συγγραφείς πρότειναν διακοπή κυτταρικού τοιχώματος με μηχανικές και ενζυματικές μεθόδους, επιτυγχάνοντας καλή απόδοση. Τα κύτταρα-qPCR με μηχανικά λύματα παρέχουν μια γρήγορη, άμεση και ευαίσθητη τεχνική για τον προσδιορισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό της μαγιάς *Brettanomyces bruxellensis*, με συγκέντρωση ενός κυττάρου ανά αντίδραση (Tubia et al,2018).

4. Κυτταρομετρία ροής

Η κυτταρομετρία ροής (FCM) είναι μια ισχυρή τεχνική που επιτρέπει την ανίχνευση και απαρίθμηση μικροβιακών πληθυσμών στη διαδικασία παρασκευής τροφίμων και ποτών. Αυτή η αναλυτική μέθοδος χρησιμοποιεί μόνο φυσιολογικές χρωστικές, καθώς είναι πολύ χρήσιμη για την παρακολούθηση μιας διαδικασίας, αλλά η απουσία ειδικότητας υπονομεύει τη χρησιμότητά τους στις βιομηχανίες ποτών. Το μικροσκοπικό ρεύμα υγρού παίρνει τις ζύμες αλλοίωσης να περνούν το φως λέιζερ ένα κύτταρο κάθε φορά. Το φως που διασκορπίζεται από τις ζύμες ανιχνεύεται καθώς διέρχονται από τη δέσμη λέιζερ. Η κυτταρομετρία ροής μπορεί να ανιχνεύσει τον φθορισμό που εκπέμπεται από ζυμομύκητες με θετική χρώση χρησιμοποιώντας διαφορετικούς ανιχνευτές.

Πρόσφατα, αναπτύχθηκε μια δοκιμή ανοσοκυτταρομετρίας («Bretta-Test», Amarok Biotechnologies) για την ανίχνευση του *Brettanomyces bruxellensis*. Αυτή η μέθοδος βασίζεται στη χρήση πολυκλωνικών αντισωμάτων αντι-*Brettanomyces* συζευγμένων με φθοροχρώμιο για διάκριση και ποσοτικοποίηση αυτής της ζύμης αλλοίωσης. Μπορεί να το αναγνωρίσει σε ένα συνθετικό μέσο μεταξύ άλλων ειδών ζύμης με σημαντική αποτελεσματικότητα. Αυτή η μέθοδος μπορεί να διαφοροποιήσει το *Brettanomyces* από άλλα είδη και να αξιολογήσει τη βιωσιμότητά του.

Πρόσφατα, εφαρμόστηκαν τεχνικές μοριακής ανίχνευσης συνδυάζοντας με άλλες τεχνικές. Για παράδειγμα, αναπτύχθηκε μια μέθοδος που συνδυάζει τεχνικές κυτταρομετρίας ροής (FCM) και in situ υβριδισμού φθορισμού (FISH), ως πραγματική εναλλακτική λύση για το RT-PCR (Serpaggi et al. 2012). Επιπλέον, έχει εφαρμοστεί επίσης κυτταρομετρία εικόνας κυτταρομέτρου με χρώση φθορισμού AO / PI για ακριβή και αποτελεσματική συγκέντρωση κυττάρων *B. bruxellensis*, βιωσιμότητα και εκκόλαψη.

- Έμμεσες μέθοδοι

1. Αέρια χρωματογραφία - φασματομετρία μάζας

Η κύρια χρησιμοποιούμενη τεχνική για την ταυτοποίηση των μεταβολιτών είναι η αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (GC-MS). Η ανίχνευση

βασίζεται συνήθως στον ποσοτικό προσδιορισμό της φαινόλης, της 4-αιθυλοφαινόλης και της 4-αιθυλογουαϊακόλης, που είναι δύο από τα πιο σχετικά μεταβολικά προϊόντα του *Brettanomyces*. Παρά το γεγονός ότι είναι μια ακριβής μέθοδος για την ανίχνευση των ποσοτήτων του επιπέδου φαινόλης στα δείγματα, είναι δύσκολο να γνωρίζουμε τη συγκέντρωση των ζυμομυκήτων που παράγουν αυτά τα προϊόντα. Παραδοσιακά, χρησιμοποιήθηκαν μέθοδοι εκχύλισης υγρού-υγρού της τεχνικής GC-MS. Ωστόσο, σήμερα, έχουν αναπτυχθεί πιο επιλεκτικές και απλές μέθοδοι εκχύλισης για την ανίχνευση *Brettanomyces*: εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE, στερεάς φάσης μικροεκχύλιση (SPME) ή αναρροφητική ράβδος ανάδευσης (SBSA) (Tubia et al, 2018).

Ένα από τα κύρια μειονεκτήματα είναι ότι έχει υψηλό όριο ανίχνευσης *Brettanomyces* και δεν μπορεί να ποσοτικοποιήσει τον πληθυσμό. Μόλις εντοπιστούν τα μεταβολικά προϊόντα, τα ποτά μολύνονται από τη μαγιά αλλοίωσης. Επομένως, δεν είναι μια χρήσιμη τεχνική για γρήγορη και έγκαιρη ανίχνευση μόλυνσης από *Brettanomyces* επειδή τα τρέχοντα όρια ανίχνευσης των φαινολών είναι υψηλά, 28 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ και 44 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ για 4-αιθυλοφαινόλη και 4-αιθυλογουαϊακόλη, αντίστοιχα. Επιπλέον, αυτή η τεχνική είναι ακριβή και απαιτεί πολύ εκπαιδευμένο προσωπικό, αυξάνοντας το κόστος παραγωγής του κεφαλαίου.

III. Πειραματικές τεχνολογίες ανίχνευσης

1. Βιοαισθητήρες

Οι βιοαισθητήρες είναι ένα πολλά υποσχόμενο εργαλείο για τον ποιοτικό έλεγχο και την έγκαιρη ανίχνευση παθογόνων σε διάφορες περιοχές όπως η κλινική διάγνωση, η ανάλυση τροφίμων, η βιοεπεξεργασία και η παρακολούθηση του περιβάλλοντος. Ένα από τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά τους είναι η ικανότητά τους να ενσωματώνονται επιτόπου σε πολλά διαφορετικά περιβάλλοντα με υψηλή ιδιαιτερότητα και ευαισθησία. Από όλους τους βιοαισθητήρες, σε αυτόν τον τομέα, οι βιοαισθητήρες που βασίζονται στην ηλεκτροχημική χρήση είναι οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενοι. Κυρίως, βασίζονται στις τρέχουσες ή πιθανές αλλαγές που οφείλονται στις αλληλεπιδράσεις που συμβαίνουν στην ανιχνευτική επιφάνεια του βιοαισθητήρα. Αυτοί οι βιοαισθητήρες ταξινομούνται σύμφωνα με την παρατηρούμενη παράμετρο για την ανίχνευση: σύνθετη αντίσταση (αμπερομετρικό), ρεύμα (αμμομετρικό) ή δυναμικό (ποτενσιομετρικό). Σήμερα, μόνο ανιχνευτές σύνθετης αντίστασης και αμπερομετρικής βάσης έχουν χρησιμοποιηθεί για ανίχνευση ζύμης σε βιομηχανικές ρυθμίσεις. Πρόσφατα, δημοσιεύθηκαν βιοαισθητήρες χωρίς ετικέτες και βασισμένοι σε αντισώματα για ορισμένες ζύμες όπως *Brettanomyces bruxellensis*, *Pichia guilliermondii* και *Debaryomyces Hansenii* (Tubia et al., 2018). Η μεταβολική δραστηριότητα και η ζύμη αλλοίωσης, η προσκόλληση και η ανάπτυξη στην

επιφάνεια του βιοαισθητήρα αλλάζουν τη μετρούμενη αντίσταση. Επιπρόσθετα, έχει αναπτυχθεί ένας μίας χρήσης αμπερομετρικός ανοσοαισθητήρας για την ανίχνευση του *Brettanomyces bruxellensis*.

Κατά την τελευταία δεκαετία, η ηλεκτρονική έχει διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στη διαφορετική βιομηχανική εφαρμογή. Η ανάπτυξη και η εφαρμογή ηλεκτρονικών συσκευών μύτης και γλώσσας είναι μερικά από τα πιο εξέχοντα παραδείγματα συστοιχιών αισθητήρων και συστημάτων αναγνώρισης προτύπων που μετρούν και συγκρίνουν γεύσεις, οσμές και όψεις. Τα τελευταία χρόνια, αυτού του είδους οι συσκευές έχουν χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο της ποιότητας και της γήρανσης του κρασιού. Μπορούν να προβλέψουν τη συγκέντρωση διαφορετικών ενώσεων που ενδιαφέρουν το κρασί, όπως φαινόλες, σάκχαρα και pH.

Οι ηλεκτρονικές γλώσσες θα μπορούσαν να θεωρηθούν ως αναλυτικό όργανο που αναπαράγει τεχνητά το ανθρώπινο γευστικό σύστημα, αναπαράγοντας την αίσθηση των πέντε γεύσεων (γλυκό, αλμυρό, ξινό, πικρό και umami). Παρομοίως, οι ηλεκτρονικές μύτες μπορούν να αναγνωρίσουν απλές ή πολύπλοκες οσμές, που χαρακτηρίζουν διαφορετικά μείγματα αερίων. Αυτές οι συσκευές μπορούν να λάβουν μια ποιοτική και ποσοτική μέτρηση διαφορετικών ειδών του δείγματος. Οι ευρύτερα χρησιμοποιούμενες συστοιχίες αισθητήρων (ηλεκτρονικοί αισθητήρες) είναι ηλεκτροχημικοί (π.χ. ποτενσιομετρικοί, ιμιδιμετρικοί, αμπερομετρικοί), οπτικοί και ενζυματικοί αισθητήρες (Tubía et al., 2018).

2. Μικρο-υγρές συσκευές

Πρόσφατα, ορισμένες πλατφόρμες ανίχνευσης έχουν προσαρμοστεί για μικρο-υγρές συσκευές. Παρά το ότι είναι ένα πολλά υποσχόμενο εργαλείο για την ανίχνευση ζυμομυκήτων σε υγρά δείγματα, δεν έχει χρησιμοποιηθεί για το *B. bruxellensis*. Αυτός ο τύπος πλατφορμών έχει υλοποιηθεί κυρίως για βακτήρια (π.χ. , *Escherichia coli*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus subtilis*).

Ωστόσο, οι μικρο-υγρές συσκευές απαιτούν άλλα εργαλεία ανίχνευσης για τον εντοπισμό ή τον ποσοτικό προσδιορισμό του αριθμού των μικροοργανισμών στο δείγμα. Μερικοί ερευνητές χρησιμοποίησαν τεχνικές φασματοσκοπίας σύνθετης αντίστασης σε μικρές υγρές συσκευές για την ανίχνευση διαφορετικών μικροοργανισμών. Αυτά τα εργαλεία είναι όλο και πιο δημοφιλή λόγω του μικρού αντιδραστηρίου και των απαιτήσεων δειγμάτων και της ευελιξίας. Ήδη, αυτό το είδος αποτελεσματικών συσκευών έχει χρησιμοποιηθεί σε διαφορετικά πεδία (π.χ. ιατρική, ακαδημαϊκή και βιομηχανική) για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό βακτηριδίων (Tubía et al,2018)

4. Συμπεράσματα

Μετά από την παρούσα μελέτη του *Brettanomyces spp.* μπορεί να διατυπωθεί με βεβαιότητα ότι κάποιες από τις μη συμβατικές ζύμες, οι οποίες μπορεί και να θεωρούνται ακόμη ανεπιθύμητοι οργανισμοί αλλοίωσης, μπορούν να έχουν ωφέλιμο ρόλο στη διενέργεια μιας ζυμωτικής διαδικασίας. Ένας μικροοργανισμός ο οποίος μέχρι πρότινος θεωρούνταν μικροοργανισμός αλλοίωσης του κρασιού αποδεικνύει έμπρακτα πλέον ότι μπορεί όχι μόνο να χρησιμοποιηθεί ως κύριος μικροοργανισμός διενέργειας ζύμωσης αλλά και να προσδώσει σε αυτές χαρακτηριστικά τα οποία τον καθιστούν επιθυμητό.

Οι συνθήκες ανάπτυξης του, όπου επιτρέπουν την ανάπτυξη του σε περιβάλλοντα φτωχά σε θρεπτικά συστατικά, χρησιμοποιώντας και ζυμώνοντας ένα ευρύ φάσμα πηγών άνθρακα, έχοντας τη δυνατότητα αποικοδόμησης σύνθετων σακχάρων, μπορώντας να χρησιμοποιήσει νιτρικό ως μοναδική πηγή αζώτου και έχοντας αντοχή έναντι του θειώδους (το οποίο χρησιμοποιείται ως απολυμαντικό στη βιομηχανία) τον καθιστούν ως έναν εξαιρετικά ανθεκτικό μικροοργανισμό. Έναν μικροοργανισμό ο οποίος μπορεί να αναπτυχθεί σε περιβάλλοντα που οι υπόλοιποι δεν θα επιβίωναν. Η γρήγορη αφομοίωση της γλυκόζης και η παραγωγή αιθανόλης, την οποία ο *Brettanomyces* μπορεί να επιτύχει με υδρόλυση της κυτταροβιόζης μέσω της δραστηριότητας της β-γλυκοσιδάσης αλλά και η εξαιρετική ανθεκτικότητα του σε υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης, ένα χαρακτηριστικό που απαιτείται για την επιβίωση σε ένα περιβάλλον ζύμωσης, του δίνουν το πλεονέκτημα της επιβίωσης σε αντίξοες συνθήκες. Επιπρόσθετα, η δυνατότητα του να παράγει, να συσσωρεύει και να καταναλώνει οξικό οξύ σε αερόβιες συνθήκες, το οποίο καθιστά πιο όξινο το μέσο, αναστέλλοντας την ανάπτυξη πιθανών μικροβιακών ανταγωνιστών ενώ ο ίδιος ο *Brettanomyces* έχει αναπτύξει αντοχή στο στο προκύπτον χαμηλό pH είναι μερικά ακόμα χαρακτηριστικά που τον καθιστούν έναν εξαιρετικά ενδιαφέροντα μικροοργανισμό.

Για όλους τους ανωτέρω λόγους η μελέτη του μικροοργανισμού αυτού ήταν καταλυτική για την ανάπτυξη ζυμώμενων προϊόντων τα οποία θα μπορούσαν να έχουν ιδιαίτερα γνωρίσματα. Ο γνωστός « χαρακτήρας Brett » ο οποίος προκύπτει λόγω της κρεμώδους επίγευσης, της σύνθεσης οξικού οξέος και πτητικών εστέρων ή πτητικών λιπαρών οξέων αλλά και γλυκερόλης είναι εκείνος που πλέον αναγνωρίζεται σε πολλά προϊόντα ζυμώμενα από τον μικροοργανισμό αυτό. Προϊόντα τα οποία αν τους αφαιρεθεί το ιδιαίτερο γνώρισμα του αρωματικού τους χαρακτήρα δεν θα είναι αποδεκτά από το καταναλωτικό κοινό όπως οι lambic μπύρες. Εκτός από την έντονη επιρροή των αισθητηριακών χαρακτηριστικών διαφόρων τροφίμων, πρόσφατα μελετήθηκε και η

χρήση καλλιέργειας *Brettanomyces spp.* για την παραγωγή βιοαιθανόλης αλλά και την παραγωγή λειτουργικών τροφίμων από την αξιοποίηση παραπροϊόντων. Και οι δύο αυτές έρευνες προσέδωσαν αποτελέσματα τα οποία παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον και αποζητούν μεγαλύτερη και πιο ενδελεχή έρευνα για την πλήρη αξιοποίηση των δυνατοτήτων του μικροοργανισμού, ο οποίος με τα ιδιαίτερα γνωρίσματα του και την εξαιρετική αντοχή του μπορεί να διαδραματίσει αξιοσημείωτο ρόλο στο μέλλον της βιομηχανίας.

Βιβλιογραφία

- Agnolucci, M., Rea, F., Sbrana, C., Cristani, C., Fracassetti, D., Tirelli, A., Nuti, M., 2010. Sulphur dioxide affects culturability and volatile phenol production by *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis*. *Int. J. Food Microbiol.* 143, 76–80.
- Aguilar Uscanga, M.G., Délia, M.L., Strehaiano, P., Paper, O., 2003. *Brettanomyces bruxellensis*: effect of oxygen on growth and acetic acid production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61, 157–162.
- Antunovics, Z., Nguyen, H.V., Gaillardin, C., Sipiczki, M., 2005. Gradual genome stabilisation by progressive reduction of the *Saccharomyces uvarum* genome in an interspecific hybrid with *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 5, 1141–1150.
- Barata, A., Caldeira, J., Botelho, R., Pagliara, D., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., 2008. Survival patterns of *Dekkera bruxellensis* in wines and inhibitory effect of sulphur dioxide. *Int. J. Food Microbiol.* 121, 201–207.
- Barnett, J. A., and Lichtenthaler, F. W., 2001, A history of research on yeasts 3: Emil Fischer, Eduard Buchner and their contemporaries, 1880–1900, *Yeast* 18, 363–388.
- Barnett, J.A., 1998, A history of research on yeasts 1: Work by chemists and biologists 1789–1850, *Yeast* 14, 1439–1451.
- Barnett, J.A., Entian, K.D., 2005. A history of research on yeasts — 9: regulation of sugar metabolism. *Yeast* 22, 835–894.
- Barnett, J.A., Payne, R.W., Yarrow, D., 1983. *Yeasts: Characteristics and Identification*. 1st edition. Cambridge University Press, Cambridge.
- Beckner, M., Ivey, M.L., Phister, T.G., 2011. Microbial contamination of fuel ethanol fermentations. *Lett. Appl. Microbiol.* 53, 387–394.
- Bell, T.A., Etchells, J.L., Borg, A.F., 1959. Influence of sorbic acid on the growth of certain species of bacteria, yeasts, and filamentous fungi. *J. Bacteriol.* 77, 573–580.
- Berbegal, C., Spano, G., Fragasso, M., Grieco, F., Russo, P., Capozzi, V., 2018. Starter cultures as biocontrol strategy to prevent *Brettanomyces bruxellensis* proliferation in wine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*
- Blackburn, C., 2006. *Food Spoilage Microorganisms*, 1st Edition. CRC Press, 390-397
- Blomqvist, J., 2011. *Dekkera bruxellensis* — A Competitive Yeast for Ethanol Production From Conventional and Non-conventional Substrates. *Natural Resources and Agricultural Sciences* — Department of Microbiology, Swedish university of agricultural sciences, Uppsala.

- Blomqvist, J., Eberhard, T., Schnurer, J., Passoth, V., 2010. Fermentation characteristics of *Dekkera bruxellensis* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 1487–1497.
- Blondin, B., Ratomahenina, R., Arnaud, A., Galzy, P., 1983. Purification and properties of the beta-glucosidase of a yeast capable of fermenting cellobiose to ethanol — *Dekkera intermedia vanderwalt*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 17, 1–6.
- Bokulich, N. A., Bamforth, C. W., and Mills, D. A., 2012, Brewhouse-resident microbiota are responsible for multi-stage fermentation of American coolship ale, *PLOS ONE* 7, e35507.
- Bokulich, N.A., and Bamforth, C. W., 2013, The microbiology of malting and brewing, *Microbiol. Microbiology and Molecular Biology Reviews* 77, 157-172.
- Borneman, A. R., Zeppel, R., Chambers, P. J., and Curtin, C. D., 2014, Insights into the *Dekkera bruxellensis* genomic landscape: comparative genomics reveals variations in ploidy and nutrient utilisation potential amongst wine isolates, *PLOS Genet.* 10, e1004161.
- Boulton, C., and Quain, D., 2001, *Brewing Yeast & Fermentation*. Oxford: Blackwell, 6–11.
- Brandam, C., Castro-Martinez, C., Delia, M.L., Ramon-Portugal, F., Strehaiano, P., 2008. Effect of temperature on *Brettanomyces bruxellensis*: metabolic and kinetic aspects. *Can. J. Microbiol.* 54, 11–18.
- Brown, C.A., Murray, A.W., Verstrepen, K.J., 2010. Rapid expansion and functional divergence of subtelomeric gene families in yeasts. *Curr. Biol.* 20, 895–903.
- Buron, N., Coton, M., Legendre, P., Ledauphin, J., Kientz-Bouchart, V., Guichard, H., Barillier, D., Coton, E., 2012. Implications of *Lactobacillus collinoides* and *Brettanomyces/Dekkera anomala* in phenolic off-flavour defects of ciders. *Int. J. Food Microbiol.* 153, 159–165.
- Butler G., Rasmussen M., Lin M., Santos M., Sakthikumar S., Munro C., Rheinbay E., Grabherr M., Forche A., Reedy J., Agrafioti I., Arnaud M., Bates S., Brown A., Brunke S., Costanzo M., Fitzpatrick D., de Groot P., Harris D., Hoyer L., Hube B., Klis F., Kodira C., Lennard N., Logue M., Martin R., Neiman A., Nikolaou E., Quail M., Quinn J., Schmitzberger F., Sherlock G., Shah P., Silverstein K., Skrzypek M., Soll D., Staggs R., Stansfield I., Stumpf M., Sudbery P., Srikantha T., Zeng Q., Berman J., Berriman M., Heitman J., Gow N., Lorenz M., Birren B., Kellis M. and Cuomo C., 2009, Evolution of pathogenicity and sexual reproduction In eight *Candida* genomes, *Nature* 459, no. 7247, 657-662.

- Carrascosai, J. M., Viguera, M. D., de Castro, N. I., and Scheffers, W. A. ,1981, Metabolism of acetaldehyde and Custers effect in the yeast *Brettanomyces abstinentis*, *Antonie Van Leeuwenhoek* 47, 209–215.
- Caruso, M., Fiore, C., Contursi, M., Salzano, G., Paparella, A., Romano, A., 2002. Formation of biogenic amines as criteria for the selection of wine yeasts. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 18, 159–163.
- Castro-Martinez, C., Escudero-Abarca, B.I., Gomez Rodriguez, J., Hayward-Jones, P.M., Aguilar-Uscanga, M.G., 2005. Effect of physical factors on acetic acid production in *Brettanomyces* strains. *J. Food Process Eng.* 28, 133–143.
- Cecchini, F., Iacumin, L., Fontanot, M., Comuzzo, P., Comi, G., Manzano, M., 2013. Dot blot and PCR for *Brettanomyces bruxellensis* detection in red wine. *Food Control* 34, 40–46.
- Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J.N., Pons, M., 1992. The origin of ethylphenols in wines. *J. Sci. Food Agric.* 60, 165–178.
- Christiaens, J.F., Van Mulders, S.E., Duitama, J., Brown, C.A., Ghequire, M.G., DeMeester, L., Michiels, J., Wenseleers, T., Voordeckers, K., Verstrepen, K.J., 2012. Functional divergence of gene duplicates through ectopic recombination. *EMBO Rep.* 13, 1145–1151.
- Ciani, M., Comitini, F., 2011. Non-*Saccharomyces* wine yeasts have a promising role in biotechnological approaches to winemaking. *Ann. Microbiol.* 61, 25–32.
- Claussen N. H., 1904, On a method for the application of Hansen pure yeast system in the manufacturing of well-conditioned English stock beers, *Journal of the Institute of Brewing* 10, 308–331.
- Cocolin, L., Rantsiou, K., Iacumin, L., Zironi, R., Comi, G., 2004. Molecular detection and identification of *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* and *Brettanomyces/Dekkera anomalous* in spoiled wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1347–1355.
- Colomer, M. S., Funch, B., and Forster, J. (2018) The raise of *Brettanomyces* yeast species for beer production, *Current Opinion in Biotechnology* 56, 30–35.
- Constant M. and Collier J., 1997, Headspace gas chromatography profiles of fruit-flavored malt beverages using solid-phase microextraction. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 55, no. 3, 112-118.
- Conterno, L., Aprea, E., Franceschi, P., Viola, R., Vrhovsek, U., 2013., Overview of *Dekkera bruxellensis* behaviour in an ethanol-rich environment using untargeted and targeted metabolomic approaches., *Food Res. Int.* 51, 670–678.

- Conterno, L., Joseph, C.M.L., Arvik, T.J., Henick-kling, T., Bisson, L.F., 2006. Genetic and Physiological Characterization of *Brettanomyces Bruxellensis* Strains Isolated from Wines., *Am. J. Enol. Vitic* 57,139–147.
- Cordero-Bueso, G., Esteve-Zarzoso, B., Mariano Cabellos, J., Gil-Diaz, M., Arroyo, T., 2013. Biotechnological potential of non-Saccharomyces yeasts isolated during spontaneous fermentations of Malvar (*Vitis vinifera* cv. L.). *Eur. Food Res. Technol.* 236, 193–207.
- Costello, P.J., Henschke, P.A., 2002. Mousy off-flavor of wine: precursors and biosynthesis of the causative N-heterocycles 2-ethyltetrahydropyridine, 2-acetyltetrahydropyridine, and 2-acetyl-1-pyrroline by *Lactobacillus hilgardii* DSM 20176. *J. Agric. Food Chem.* 50, 7079–7087.
- Coton E., Coton, M., Levert D., Casaregola S. and Sohier, D., 2006, Yeast ecology in French cider and black olive natural fermentations, *International Journal of Food Microbiology*, 108 , no. 1,130-135.
- Couto, J.A., Barbosa, A., Hogg, T., 2005. A simple cultural method for the presumptive detection of the yeasts *Brettanomyces* / *Dekkera* in wines. *Lett. Appl. Microbiol.* 41,505–510
- Crauwels S. , Opstaele F.V. , Jaskula-Goiris J. ,Steensels J., Verreth C., Bosmans L. , Paulussen C., Herrera-Malaver B. , Jonge R., Clippeleer J., Marchal K., Samblanx G.,Willems K.A. , J. Verstrepen K. J. , Aerts G. and Lievens B., 2017, Fermentation assays reveal differences in sugar and (off-) flavor metabolism across different *Brettanomyces bruxellensis* strains , *FEMS Yeast Research*, Vol. 17 , 1-10
- Crauwels S. , Steensels J. , Aerts G. , Willems K. A. ,Verstrepen K. J. and Lievens B.,2015, *Brettanomyces Bruxellensis*, Essential Contributor in Spontaneous Beer Fermentations Providing Novel Opportunities for the Brewing Industry , *Brewing Science Vol 68*, pp. 110-121
- Crauwels, S., Zhu, B., Steensels, J., Busschaert, P., De Samblanx, G., Marchal, K., Willems, K.A., Verstrepen, K.J., Lievens, B., 2014, Assessing genetic diversity in *Brettanomyces* yeasts using DNA fingerprinting and whole genome sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 4398–4413.
- , C. D., Pretorius, I.S., 2014, Genomic insights into the evolution of industrial yeast species *Brettanomyces bruxellensis*, *FEMS Yeast Res.* 14, 997–1005.
- Curtin, C., Kennedy, E., Henschke, P.A., 2012a. Genotype-dependent sulphite tolerance of Australian *Dekkera* (*Brettanomyces*) *bruxellensis* wine isolates. *Lett. Appl. Microbiol.* 55, 56–61.

- Curtin, C.D., Bellon, J.R., Henschke, P.A., Godden, P.W., and De Barros Lopes, M.A., 2007, Genetic diversity of *Dekkera bruxellensis* yeasts isolated from Australian wineries, *FEMS Yeast Res.* 7, 471–481.
- Curtin, C.D., Borneman, A.R., Chambers, P.J., Pretorius, I.S., 2012b. De-novo assembly and analysis of the heterozygous triploid genome of the wine spoilage yeast *Dekkera bruxellensis* AWRI1499. *PLOS ONE* 7, e33840.
- Curtin, C.D., Langhans, G., Henschke, P.A., Grbin, P.R., 2013. Impact of Australian *Dekkera bruxellensis* strains grown under oxygen-limited conditions on model wine composition and aroma. *Food Microbiol.* 36, 241–247.
- Curtin D.C and Pretorius I.S, 2014, Genomic insights into the evolution of industrial yeast species *Brettanomyces bruxellensis*, *FEMS Yeast Research*, 997-1005.
- Custers, M.T.J., 1940. *Onderzoekingen over het gistgeslacht Brettanomyces*. Delft University, Delft.
- Daenen, L., Saison, D., De Schutter, D.P., De Cooman, L., Verstrepen, K.J., Delvaux, F., Derdelinckx, G., Verachtert, H., 2009, Bioflavouring of beer through fermentation, refermentation and plant parts addition. In: Preedy, V.R. (Ed.), *Beer in Health and Disease Prevention*. Elsevier, Amsterdam, 33–49.
- Daenen, L., Saison, D., Sterckx, F. R., Verachtert, H., and Derdelinckx, G (2008, a) Screening and evaluation of the glucoside hydrolase activity in *Saccharomyces* and *Brettanomyces* brewing yeasts, *Journal of Applied Microbiology* 104, 478–488
- Daenen, L., Sterckx, F., Delvaux, F. R., Verachtert, H., and Derdelinckx, G. (2008, b) Evaluation of the glycoside hydrolase activity of a *Brettanomyces* strain on glycosides from sour cherry (*Prunus cerasus* L.) used in the production of special fruit beers, *FEMS Yeast Res.* 8, 1103–1114.
- De Barros Pita, W., Leite F. C., de Souza Liberal, A. T., Simões, D. A., and de Morais, M. A. Jr., 2011, The ability to use nitrate confers advantage to *Dekkera bruxellensis* over *S. cerevisiae* and can explain its adaptation to industrial fermentation processes, *Antonie Van Leeuwenhoek* 100, 99–107.
- De Barros Pita, W., Silva, D.C., Simoes, D.A., Passoth, V., de Morais Jr., M.A., 2013. Physiology and gene expression profiles of *Dekkera bruxellensis* in response to carbon and nitrogen availability. *Antonie Van Leeuwenhoek* 104, 855–868.
- De Deken, R. H., 1966, The Crabtree effect: A regulatory system in yeast, *J. Gen. Microbiol.* 44, 149–156.
- De Souza Liberal A., Carazzolle M., Pereira G., Simoes D. and de Morais M., 2012, The yeast *Dekkera bruxellensis* genome contains two orthologs of the ARO10

gene encoding for phenylpyruvate decarboxylase, *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 28, no. 7, 2473-2478.

- Di Toro, M.R., Capozzi, V., Beneduce, L., Alexandre, H., Tristezza, M., Durante, M., Tufariello, M., Grieco, F., Spano, G., 2015, Intraspecific biodiversity and “spoilage potential” of *Brettanomyces bruxellensis* in Apulian wines. *LWT Food Sci. Technol.* 60,102–108.
- Dias, L., Pereira-da-Silva, S., Tavares, M., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., 2003. Factors affecting the production of 4-ethylphenol by the yeast *Dekkera bruxellensis* in enological conditions. *Food Microbiol.* 20, 377–384.
- Du Toit ,W., Lisjak, K., Marais, J., 2006. The effect of micro-oxygenation on the phenolic composition, quality and aerobic wine-spoilage microorganisms of different South African red wines. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 27, 57–67.
- Du Toit, W.J., Pretorius, I.S., Lonvaud-Funel, A., 2005. The effect of sulphur dioxide and oxygen on the viability and culturability of a strain of *Acetobacter pasteurianus* and a strain of *Brettanomyces bruxellensis* isolated from wine. *J. Appl. Microbiol.* 98, 862–871.
- Duckitt, E., 2012. Investigating the Impact of Sulphur Dioxide on *Brettanomyces bruxellensis* at a Molecular and Cellular Level. Institute for wine biotechnology, Stellenbosch University, Stellenbosch.
- Dweck, H.K., Ebrahim, S.A., Farhan, A., Hansson, B.S., Stensmyr, M.C., 2015. Olfactory proxy detection of dietary antioxidants in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 25, 455–466.
- Edlin, D. A. N., Narbad, A., Gasson, M. J., Llody, J. R., 1998, Purification and Colomer characterization of hydroxycinnamate decarboxylase from *Brettanomyces anomalus*, *Enzyme and Microbial Technology* 22, 232–239.
- Egli M. and Heninck-Kling T., 2001, Identification of *Brettanomyces/Dekkera* based on polymorphism in the rRNA internal transcribed spacer region, *American Journal of Enology and Viticulture* 52 , no. 3, 241-247.
- Fia, G., Giovani, G., Rosi, I., 2005. Study of beta-glucosidase production by wine-related yeasts during alcoholic fermentation. A new rapid fluorimetric method to determine enzymatic activity. *J. Appl. Microbiol.* 99, 509–517.
- Freer, S.N., 2002. Acetic acid production by *Dekkera / Brettanomyces* yeasts., *World J. Microbiol. Biotechnol.* 18, 271–275.
- Freer, S.N., Dien, B., Matsuda, S., 2003, Production of acetic acid by *Dekkera/Brettanomyces* yeasts under conditions of constant pH. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 19, 101–105.

- Fugelsang, K.C., Edwards, C.G., 2007. Wine Microbiology: Practical Applications and Procedures. Springer, 87, 164-166, 20-209
- Galafassi, S., Capusoni, C., Muktaduzzaman, M., and Compagno, C., 2013, Utilization of nitrate abolishes the 'Custers effect' in *Dekkera bruxellensis* and determines a different pattern of fermentation products, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 40, 297–303.
- Galafassi, S., Merico, A., Pizza, F., Helborg, L., Molinari, F., Piškur, J., and Compagno, C., 2010, *Dekkera/Brettanomyces* yeasts for ethanol production from renewable sources under oxygen-limited and low-pH conditions, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38, 1079–1088.
- Gamero A., Ferreira V., Pretorius I.S., Querol A., 2014, Wine, beer and cider: unravelling the aroma profile, in: *Molecular Mechanisms in Yeast Carbon Metabolism* (Piškur J., and Compagno C. Eds.). 1st ed., 261–297, Springer, Berlin.
- Gancedo, J.M., 2001. Control of pseudohyphae formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 107–123.
- Gaunt, D. M., Degn, H., and Lloyd D., 1988, The influence of oxygen and organic hydrogen acceptors on glycolytic carbon dioxide production in *Brettanomyces anomalus*, *Yeast* 4, 249–255.
- Gerbeaux, V., Vincent, B., Bertrand, A., 2002. Influence of maceration, temperature and enzymes on the content of volatile phenols in pinot noir wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 53, 131–137.
- Ghose T. K. and Tyagi R. D., 1979, Rapid Ethanol Fermentation of Cellulose Hydrolysate, *Biotechnology & Bioengineering*, Vol 21, issue 8, pg 1401-1420
- Godoy L., Garrido D., Martinez C., Saavedra J., Combina M. and Ganga M., 2009, Study of the coumarate decarboxylase and vinylphenol reductase activities of *Dekkerabruxellensis* (anamorph *Brettanomyces bruxellensis*) isolates, *Letters in Applied Microbiology* 48, no. 4, 452-457.
- Godoy, L., García, V, Peña, R., Martínez, C., and Ganga, M. A., 2014, Identification of the *Dekkera bruxellensis* phenolic acid decarboxylase (PAD) gene responsible for wine spoilage, *Food Control* 45, 81–86.
- Gonde, P., Blondin, B., Leclerc, M., Ratomahenina, R., Arnaud, A., Galzy, P., 1984. Fermentation of cellodextrins by different yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 265–269.

- Gonzalez S., Barrio E. and Gonde Querol A., 2008, Molecular characterization of new natural hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii* in brewing, *Applied and Environmental Microbiology*, 74, no. 8, 2314-2320.
- Granato T., Romano D., Vigentini I., Foschino R., Monti D., Mamone G., Ferranti P., Nitride C., Iametti S., Bonomi F. and Molinari F., 2014, New insights on the features of the vinyl phenol reductase from the wine-spoilage yeast *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*, *Annals of Microbiology* 65, no. 1, 321-329.
- Harwood, C.S., Canaleparola, E., 1981. Branched-chain amino-acid fermentation by a marine spirochete — strategy for starvation survival. *J. Bacteriol.* 148, 109–116.
- Hellborg, L., and Piskur, J., 2009, Complex nature of the genome in a wine spoilage yeast, *Dekkera bruxellensis*, *Eukaryot. Cell* 8, 1739–1749.
- Heresztyn T., 1986, Metabolism of volatile phenolic compounds from hydroxycinnamic acids by *Brettanomyces* yeast, *Archives of Microbiology* 146, 96-98.
- Heresztyn, T., 1986. Formation of substituted tetrahydropyridines by species of *Brettanomyces* and *Lactobacillus* isolated from mousy wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 80, 171–176.
- Hittinger, C.T., Gonçalves, P., Sampaio, J.P., Dover, J., Johnston, M., Rokas, A., 2010. Remarkably ancient balanced polymorphisms in a multi-locus gene network. *Nature* 464, 54–58.
- Holt, S., Mukherjee, V., Lievens, B., Verstrepen, K. J., and Thevelein, J.M., 2018, Bioflavoring by non-conventional yeasts in sequential beer fermentations, *Food Microbiology* 72, 55–66.
- Ibeas, J.I., Lozano, I., Perdignes, F., Jimenez, J., 1996. Detection of *Dekkera-Brettanomyces* strains in sherry by a nested PCR method. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 998–1003.
- Johnson E., 2012, Biotechnology of non-*Saccharomyces* yeasts the ascomycetes, *Applied Microbiology and Biotechnology* 97, no. 2, 503-517.
- Johnson, E.A., 2013. Biotechnology of non-*Saccharomyces* yeasts — the ascomycetes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 503–517.
- Joseph C., Gorton L., Ebeler S. and Bisson L., 2013, Production of volatile compounds by wine strains of *Brettanomyces bruxellensis* grown in the presence of different precursor substrates, *Am. J. Enol. Vitic.* 64, no. 2, 231-240.
- Joseph, C.M.L., Kumar, G., Su, E., Bisson, L.F., 2007. Adhesion and biofilm production by wine isolates of *Brettanomyces bruxellensis*. *Am. J. Enol. Vitic.* 58, 373–378.

- Kayode, A.P.P., Vieira-Dalode, G., Linnemann, A.R., Kotchoni, S.O., Hounhouigan, A.J.D., van Boekel, M., Nout, M.J.R., 2011. Diversity of yeasts involved in the fermentation of tchoukoutou, an opaque sorghum beer from Benin. *Afr. J. Microbiol. Res.* 5, 2737–2742.
- Kheir J., Salameh D., Strehaiano P., Brandam C. and Lteif R., 2013, Impact of volatile phenols and their precursors on wine quality and control measures of *Brettanomyces/Dekkera* yeasts, *European Food Research and Technology* 237, no. 5, 655-671.
- Kosel, J., Čadež, N., and Raspor, P., 2014, Factors affecting volatile phenol production during fermentations with pure and mixed cultures of *Dekkera bruxellensis* and *Saccharomyces cerevisiae*, *Food Technology and Biotechnology* 52, 35–45.
- Kumara H. and Verachtert H., 1991, Identification of lambic super attenuating microorganisms by the use of selective antibiotics, *Journal of the Institute of Brewing* 97, no. 3, 181-185.
- Kumara, H.M., De Cort, S., Verachtert, H., 1993. Localization and characterization of alpha-glucosidase activity in *Brettanomyces lambicus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2352–2358.
- Kuo, H-P., Wang, R., Huang, C-Y., Lai, J-T., Lo, Y-C., and Huang, S-T., 2018, Characterization of an extracellular β -glucosidase from *Dekkera bruxellensis* for resveratrol production, *Journal of Food and Drug Analysis* 26, 163–171.
- Kurtzman, C. P., Robnett, C. J., 2013, Relationships among genera of the *Saccharomycotina* (Ascomycota) from multigene phylogenetic analysis of type species, *FEMS Yeast Res.* 13, 23–33.
- Landete, J.M., Ferrer, S., Polo, L., Pardo, I., 2005. Biogenic amines in wines from three Spanish regions. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1119–1124.
- Langstaff, S.A., Lewis, M.J., 1993. The mouthfeel of beer — a review. *J. Inst. Brew.* 99, 31–37.
- Larsson, S., Nilvebrant, N.O., Jonsson, L.J., 2001. Effect of overexpression of *Saccharomyces cerevisiae* Pad1p on the resistance to phenylacrylic acids and lignocellulose hydrolysates under aerobic and oxygen-limited conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57, 167–174.
- Laureys D. and de Vuyst, 2014, Microbial species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of water kefir fermentation, *Applied and Environmental Microbiology* 80, no. 8, 2564-2572.

- Lawton MR, de Riancho DL, Alcaine SD, 2021, Lactose utilization by *Brettanomyces claussenii* expands potential for valorization of dairy by-products to functional beverages through fermentation, Food Science vol. 42.
- Leach, Byron E., Ford, Jared H., Whiffen, A.J., 1947. Actidione, An Antibiotic from *Streptomyces griseus*. J. Am. Chem. Soc. 69 (2), 474-474.
- Leite, F.C.B., Basso, T.O., Pita, W.D., Gombert, A.K., Simoes, D.A., de Morais, M.A., 2013. Quantitative aerobic physiology of the yeast *Dekkera bruxellensis*, a major contaminant in bioethanol production plants. FEMS Yeast Res. 13, 34–43.
- Lentz, M., and Harris, C., 2015, Analysis of growth inhibition and metabolism of hydroxycinnamic acids by brewing and spoilage strains of *Brettanomyces* yeast, Foods, 4, 581–593.
- Libkind, D., Hittinger, C.T., Valerio, E., Goncalves, C., Dover, J., Johnston, M., Goncalves, P., Sampaio, J.P., 2011. Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 108, 14539–14544.
- Licker, J.L., Acree, T.E., Henick-Kling, T., 1999, What is “Brett” (*Brettanomyces*) flavor. American Chemical Soc Symposium, 213th National Meeting, San Francisco, CA, 96–115.
- Lonvaud-Funel, A., 2001. Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Lett. 199, 9–13.
- Loureiro V., Malfeito-Ferreira, M., 2003. Spoilage yeasts in the wine industry. Int. J. Food Microbiol. 86, 23–50.
- Louw, A., Diener, I., Landers, M.R., Puentedura, E.J., 2014. Preoperative pain neuroscience education for lumbar radiculopathy. Spine (Phila Pa 1976) 39, 1449–1457.
- Malfeito-Ferreira, M., 2011. Yeasts and wine off-flavours: a technological perspective. Ann. Microbiol. 61, 95–102.
- Martens H., Dawoud E. and Verachtert H., 1991, Wort enterobacteria and other microbial populations involved during the first month of lambic fermentation, Journal of the Institute of Brewing 97 , no. 6, 435-439.
- Martens, H., Iserentant, D., Verachtert, H., 1997. Microbiological aspects of mixed yeast– bacterial fermentation in the production of a special Belgian acidic ale. J. Inst. Brew. 103, 85–91.
- Martorell P., Barata A., Malfeito-Ferreira M., Fernandez-Espinar M., Loureiro V. and Querol A, 2006, Molecular typing of the yeast species *Dekkera bruxellensis* and

Pichia guilliermondii recovered from wine related sources, International Journal of Food Microbiology, 106, no. 1, 79-84.

- McMahon, H., Zoecklein, B.W., Fugelsang, K.C., Jasinski, Y., 1999. Quantification of glycosidase activities in selected yeasts and lactic acid bacteria. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 23, 198–203.
- Mehlomakulu, N.N., Setati, M.E., Divol, B., 2015. Non-saccharomyces killer toxins: possible biocontrol agents against brettanomyces in wine? S. Afr. J. Enol. Vitic. 36, 1–11.
- Menoncin M. , Bonatto D. ,2019, Molecular and biochemical aspects of Brettanomyces in brewing, Wiley Online Library, 402 – 411
- Michel, M., Meier-Dörnberg, T., Jacob, F., Methner, F.-J., Wagner R.S. and Hutzler, M., 2016, Review: Pure non-Saccharomyces starter cultures for beer fermentation with a focus on secondary metabolites and practical applications, Journal of the Institute of Brewing 122, 569–587. [\](#)
- Michel, M., [Kopecká J.](#), [Meier-Dörnberg T.](#), [Zarnkow M.](#), [Jacob F.](#), [Hutzler M.](#), 2016. Screening for new brewing yeasts in the non-Saccharomyces sector with *Torulaspora delbrueckii* as model, Yeast 33, 129–144.
- Millet, V., Lonvaud-Funel, A., 2000, The viable but non-culturable state of wine microorganisms during storage. Lett. Appl. Microbiol. 30, 136–141.
- Molina F. I., Shen, P., and Jong, S.C. (1993) Validation of the species concept in the genus *Dekkera* by restriction analysis of genes coding for rRNA, International Journal of Biological Macromolecules 43, 32–35.
- Moon, H., Kim, J., Oh, K., JKim, S., Hong, S., 2001. Kinetic modelling of simultaneous saccharification and fermentation for ethanol production using steam-exploded wood with glucose- and cellobiose-fermenting yeast. *Brettanomyces custersii*. J. Microbiol. Biotechnol. 11, 598–606.
- Morneau, A.D., Zuehlke, J.M., Edwards, C.G., 2011, Comparison of media formulations used to selectively cultivate *Dekkera/Brettanomyces*. Lett. Appl. Microbiol. 53, 460–465.
- Nurgel, C., Pickering, G., 2005. Contribution of glycerol, ethanol and sugar to the perception of viscosity and density elicited by model white wines. J. Texture Stud. 36, 303–323.
- Oelofse A., Lonvaud-Funel A. and du Toit M., 2009, Molecular identification of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from red wines and volatile phenol production, Food Microbiology 26, no. 4, 377-385.

- Oelofse, A., Pretorius, I.S., du Toit, M., 2008. Significance of *Brettanomyces* and *Dekkera* during winemaking: a synoptic review, *South African Journal of Enology and Viticulture* 29, 128–144.
- Ough, C.S & Were, Lilian, 2005, Sulfur dioxide and sulfites, *Antimicrobials in Food*, 3rd edition, 143-167
- Passoth, V., Blomqvist, J., Schnurer, J., 2008. Fermentation cultures and methods employing the same, World Patent Application WO 2008072184 A1.
- Passoth, V., Blomqvist, J., Schnurer, J., 2007. *Dekkera bruxellensis* and *Lactobacillus vini* form a stable ethanol-producing consortium in a commercial alcohol production process. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 4354–4356.
- Peynaud E. and Domercq S., 1956, *Brettanomyces* isolated from grapes and wine, *Archive for Mikrobiology* 24 , no. 3, 266-280.
- Phister T. and Mills D.,2003, Real-Time PCR assay for detection and enumeration of *Dekkera bruxellensis* in wine, *Applied and Environmental Microbiology*, 69, no. 12, 7430-7434.
- Pires, E. J., Teixeira, J. A., Brányik, T and Vicente A., 2014, Yeast: the soul of beer's aroma – A review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98,1937–1949.
- Piskur, J., Ling Z, Marcet-Houben M., Ishchuk, O. P., Aerts, A. LaButti, K, Copeland, A., Lindquist, E., Barry, K., Compagno, C., Bisson, L., Grigorev, I. V., Gabaldón, T., and Phister, T.,2012, The genome of wine yeast *Dekkera bruxellensis* provides a tool to explore its food-related properties, *International Journal of Food Microbiology* 157, 202–209.
- Piskur, J., Rozpedowska, E., Polakova, S., Merico, A., Compagno, C., 2006. How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? *Trends Genet.* 22, 183–186.
- Pretorius I., 2000, Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking, *Yeast* 16, no. 8, 675-729.
- Procházka, E., Poláková, S., Piškur, J., Sulo, P., 2010.Mitochondrial genome from the facultative anaerobe and petite-positive yeast *Dekkera bruxellensis* contains the NADH dehydrogenase subunit genes. *FEMS Yeast Res.* 10, 545–557.
- Quintas, C., Leyva, J.S., Sotoca, R., Loureiro-Dias, M.C., Peinado, J.M., 2005. A model of the specific growth rate inhibition by weak acids in yeasts based on energy requirements. *Int. J. Food Microbiol.* 125–130.
- Reis, A.L.S., de Souza, R.d.F.R., Torres, R.R.N.B., Leite, F.C.B., Paiva, P.M.G., Vidal, E.E., de Morais Jr., M.A., 2014, Oxygen-limited cellobiose fermentation and the

characterization of the cellobiase of an industrial *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* strain, SpringerPlus 3:38.

- Renouf V. and Lonvaud-Funel A., 2007, Development of an enrichment medium to detect *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*, a spoilage wine yeast, on the surface of grape berries, Microbiological Research 162 , no. 2, 154-167.
- Renouf, V., Falcou, M., Miot-Sertier, C., Perello, M.C., De Revel, G., Lonvaud-Funel, A., 2006. Interactions between *Brettanomyces bruxellensis* and other yeast species during the initial stages of winemaking. J. Appl. Microbiol. 100, 1208–1219
- Rodrigues, N., Gonçalves, G., Pereira-Da-Silva, S., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., 2001. Development and use of a new medium to detect yeasts of the genera *Dekkera/Brettanomyces*. J. Appl. Microbiol. 90, 588–599.
- Romano, A., Perello, M.C., de Revel, G., Lonvaud-Funel, A., 2008. Growth and volatile compound production by *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* in red wine. J. Appl. Microbiol. 104, 1577–1585.
- Roos, J., and Vuyst, L., 2018, Microbial acidification, alcoholization, an aroma production during spontaneous lambic beer production, Journal of the Science of Food and Agriculture vol.99, Issue1, 25-38
- Rozpedowska, E., Hellborg, L., Ishchuk, O.P., Orhan, F., Galafassi, S., Merico, A., Woolfit, M., Compagno, C., Piskur, J., 2011, Parallel evolution of the make–accumulate–consume strategy in *Saccharomyces* and *Dekkera* yeasts, Nature Communications 2, 302.
- Salma, M., Rousseaux, S., Sequeira-Le Grand, A., Divol, B., Alexandre, H., 2013. Characterization of the viable but nonculturable (VBNC) state in *Saccharomyces cerevisiae*. PLOS One 8, e77600.
- Sarry, J-E., and Günata, Z., 2004, Plant and microbial glycoside hydrolases: Volatile release from glycosidic aroma precursors, Food Chemistry 87, 509–521.
- Sawadogo-Lingani, H., Lei, V., Diawara, B., Nielsen, D.S., Moller, P.L., Traore, A.S., Jakobsen, M., 2007. The biodiversity of predominant lactic acid bacteria in dolo and pito wort for the production of sorghum beer. J. Appl. Microbiol. 103, 765–777.
- Scheffers, W., 1966. Stimulation of fermentation in yeasts by acetoin and oxygen. Nature 210, 533–534.
- Scheffers, W.A., 1961. On the inhibition of alcoholic fermentation of *Brettanomyces* yeasts under anaerobic conditions. Experientia 17, 40–42.

- Serpaggi, V., Remize, F., Recorbet, G., Gaudot-Dumas, E., Sequeira-Le Grand, A., Alexandre, H., 2012. Characterization of the “viable but nonculturable” (VBNC) state in the wine spoilage yeast *Brettanomyces*. *Food Microbiol.* 30, 438–447.
- Shalaby, A.R., 1996. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Res. Int.* 29, 675–690.
- Shimotsu, S., Asano, S., Lijima, K., Suzuki, K., Yamagishi, H., and Aizawa, M. (2015) Investigation of beer-spoilage ability of *Dekkera/ Brettanomyces* yeasts and development of multiplex PCR method for beer-spoilage yeasts, *Journal of the Institute of Brewing* 121, 177–180.
- Snowdon, E.M., Bowyer, M.C., Grbin, P.R., Bowyer, P.K., 2006. Mousy off-flavor: a review. *J. Agric. Food Chem.* 54, 6465–6474.
- Spaepen, M., and Verachtert, H., 1982, Esterase activity in the genus *Brettanomyces*, *Journal of the Institute of Brewing* 88, 11–17.
- Spaepen, M., Van Oevelen, D., Verachtert, H., 1978, Fatty acids and esters produced during the spontaneous fermentation of lambic and gueuze. *J. Inst. Brew.* 84, 278–282.
- Spano, G., Russo, P., Lonvaud-Funel, A., Lucas, P., Alexandre, H., Grandvalet, C., Coton, E., Coton, M., Barnavon, L., Bach, B., Rattray, F., Bunte, A., Magni, C., Ladero, V., Alvarez, M., Fernandez, M., Lopez, P., de Palencia, P.F., Corbi, A., Trip, H., Lolkema, J.S., 2010. Biogenic amines in fermented foods. *Eur. J. Clin. Nutr.* 64 (Suppl. 3), 95–S100.
- Steensels, J., Daenen, L., Malcorps, P., Derdelinckx, G., Verachtert, H., Verstrepen, K.J., 2015, *Brettanomyces* yeasts - from spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 206, 24–38.
- 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 Microbiol. Rev.* 38, 947–995.
- Steensels, J., Verstrepen, K.J., 2014. Taming wild yeast: potential of conventional and nonconventional yeasts in industrial fermentations. *Annu. Rev. Microbiol.* 68, 61–80.
- Steensels, J., Meersman, E., Snoek, T., Saels, V., Verstrepen, K.J., 2014, Large-scale selection and breeding to generate industrial yeasts with superior aroma production. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 6965–6975.
- Strating J. and Venema A., 1961, Gas-chromatographic study of an aroma concentrate from beer. *Journal of the Institute for Brewing*, 37, 525-528.

- Sturm, M., Arroyo-López, F., Garrido-Fernández, A., Querol, A., Mercado, L., Ramirez, M., Combina, M., 2014. Probabilistic model for the spoilage wine yeast *Dekkera bruxellensis* as a function of pH, ethanol and free SO₂ using time as a dummy variable. *Int. J. Food Microbiol.* 170, 83–90.
- Styger, G., Jacobson, D., Prior, B.A., Bauer, F.F., 2013. Genetic analysis of the metabolic pathways responsible for aroma metabolite production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 4429–4442.
- Suárez, R., Suárez-Lepe, J.a., Morata, a., Calderón, F., 2007. The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: a review. *Food Chem.* 102, 10–21.
- Teoh A., Heard G. and Cox J. , 2004, Yeast ecology of kombucha fermentation, *International Journal of Food Microbiology*, 95 (2004), no. 2, 119-126.
- Tiukova, I. A., Jiang, H., Dainat, J., Hoepfner, M. P., Lantz, H., Piskur, J., 2019, Assembly and analysis of the genome sequence of the yeast *Brettanomyces naardenensis* CBS 7540. *Microorganisms* 7, 489
- Tiukova, I. A., Petterson, M.E., Tellgren-Roth, C., Bunikis, I., Eberhard, T., Pettersson, O. V., and Passoth, V., 2013, Transcriptome of the alternative ethanol production strain *Dekkera bruxellensis* CBS 11270 in sugar limited, low oxygen Cultivation, *PLOS ONE* 8, e58455.
- Tonsmeire, M. , 2014, 100% *Brettanomyces* fermentations, in *American Sour Beer: Innovative Techniques for Mixed Fermentations*. 1st ed., 181–195. *Brewers Association*, Boulder, CO.
- Tristezza, M., Lourenço, A., Barata, A., Brito, L., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., 2010. Susceptibility of wine spoilage yeasts and bacteria in the planktonic state and in biofilms to disinfectants. *Ann. Microbiol.* 60, 549–556..
- Tubia I. , Karthik Prasad , Pérez-Lorenzo E. , Cristina Abadín , Zumárraga M. , Oyanguren I. , Barbero F. , Paredes J. , Arana S. ,2018 , Beverage spoilage yeast detection methods and control technologies: A review of *Brettanomyces*, *International Journal of Food Microbiology* 283, 65-76
- Valdes J., Tapia P., Cepeda V., Varela J., Godoy L., Cubillos F. A., Silva E., Martinez C. & Ganga M. A., 2014, *FEMS Microbiol. Lett* 361 , 104–106
- Vally, H., Misso, N.L.A., 2012, Adverse reactions to the sulphite additives. *Gastroenterol Hepatol. Bed Bench* 5, 16–23.
- Van der Walt, J. P., 1984, *Dekkera* in *The Yeasts, a Taxonomic Study* (N. J. W. Kreger-van Rij Ed.), 3rd ed., 146–150

- Van Oevelen, D., Spaepen, M., Timmermans, P., Verachtert, H., 1977. Microbiological aspects of spontaneous wort fermentation in the production of lambic and gueuze. *J. Inst. Brew.* 83, 356–360.
- Vanbeneden, N., Delvaux, F., Delvaux, F.R., 2006. Determination of hydroxycinnamic acids and volatile phenols in wort and beer by isocratic high-performance liquid chromatography using electrochemical detection. *J. Chromatogr.* 1136, 237–242.
- Vanbeneden, N., Gils, F., Delvaux, F., and Delvaux, F. R., 2008, Formation of 4-vinyl and 4-ethyl derivatives from hydroxycinnamic acids: Occurrence of volatile phenolic flavour compounds in beer and distribution of Pad1-activity among brewing yeasts, *Food Chemistry* 107, 221–230.
- Vanderhaegen B. , Neven H. , Coghe S. , Verstrepen · K. J. , Derdelinckx G. , Verachtert H. , 2003 , Bioflavoring and beer refermentation, *Applied Microbiology and Biotechnology* 62, 140-150
- Verachtert H. and Iserentant D., 1995, Properties of Belgian acid beers and their microflora. Part I. The production of gueuze and related refreshing acid beers *Cerevisia* 20 , 37-41.
- Verachtert, H., (1992). Lambic and gueuze brewing: Mixed cultures in action, COMETT Course on Microb. Cont., Helsinki, 243–262.
- Verachtert, H., and Dawoud, E. (1984) Microbiology of lambic-type beers, *J. Appl. Bacteriol.* 57, R11–R12.
- Verstrepen, K.J., Derdelinckx, G., Dufour, J.P., Winderickx, J., Thevelein, J.M., Pretorius, I.S., Delvaux, F.R., 2003a. Flavor-active esters: adding fruitiness to beer. *J. Biosci. Bioeng.* 96, 110–118.
- Verstrepen, K.J., Derdelinckx, G., Verachtert, H., Delvaux, F.R., 2003b. Yeast flocculation: what brewers should know. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61, 197–205.
- Verstrepen, K.J., Klis, F.M., 2006. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Mol. Microbiol.* 60, 5–15.
- Vigentini I., De Lorenzis G., Picozzi C., Imazio S., Merico A., Galafassi S., Piskur J. and Foschino R., 2012, Intraspecific variations of *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* genome studied by capillary electrophoresis separation of the intron splice site profiles, *International Journal of Food Microbiology*, 157, no. 1, 6-15.
- Vigentini, I., Lucy Joseph, C.M., Picozzi, C., Foschino, R., Bisson, L.F., 2013. Assessment of the *Brettanomyces bruxellensis* metabolome during sulphur dioxide exposure. *FEMS Yeast Res.* 13, 597–608.

- Vigentini, I., Romano, A., Compagno, C., Merico, A., Molinari, F., Tirelli, A., Foschino, R., Volonterio, G., 2008. Physiological and oenological traits of different Dekkeran/ *Brettanomyces bruxellensis* strains under wine-model conditions. *FEMS Yeast Res.* 8, 1087–1096.
- Villena, M.A., Iranzo, J.F.Ú., Pérez, A.I.B., 2007. β -Glucosidase activity in wine yeasts: application in enology. *Enzyme Microb. Technol.* 40, 420–425.
- Webb, 1963, *Enzyme and Metabolic Inhibitors*, Academic Press Vol I, pg 420-480
- Wedral, D., Shewfelt, R., Frank, J., 2010. The challenge of *Brettanomyces* in wine. *LWT Food Sci. Technol.* 43, 1474–1479.
- White, C. and Zainasheff, J., 2010, *Brettanomyces*, in *Yeast: The Practical Guide to Beer Fermentation*. 1st ed., Brewers Association, Boulder, 61–64.
- Wijsman, M.R., van Dijken, J.O., van Kleeff, B.H.A., Scheffers, W.A., 1984. Inhibition of fermentation and growth in batch cultures of the yeast *Brettanomyces intermedius* upon a shift from aerobic to anaerobic condition (Custers effect). *Antonie Van Leeuwenhoek* 50, 183–190.
- Wikén, T., Scheffers, W., Verhaar, A., 1961. On the existence of a negative Pasteur effect in yeasts classified in the genus *Brettanomyces* Kufferath et van Laer. *Antonie Van Leeuwenhoek* 27, 401–433.
- Witrick, K. T., Duncan, S. E., Hurley, K. E., O’Keefe, S. F., 2017, Acid and volatiles of commercially-available lambic beers, *Beverages* 3, 51
- Woolfit M., Rozpedowska El., Piškur J. and Wolfe K.H, 2007, Genome Survey Sequencing of the Wine Spoilage Yeast *Dekkera* (*Brettanomyces*) *bruxellensis*, *American Society for Microbiology.*, 721–733
- Zhang, C-Y., Liu Y-L, Qi, Y-N, Zhang, J-W, Dai, L-H, Lin, X, Xiao, D-G, 2013, Increased esters and decreased higher alcohols production by engineered brewer’s yeast strains, *European Food Research and Technology* 236, 1009–1014.
- Zuehlke, J.M., Edwards, C.G., 2013, Impact of sulfur dioxide and temperature on culturability and viability of *Brettanomyces bruxellensis* in wine. *J. Food Prot.* 76, 2024–2030.
- Zuehlke, J.M., Petrova, B., Edwards, C.G., 2013. Advances in the control of wine spoilage by *Zygosaccharomyces* and *Dekkera/Brettanomyces*. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 4, 57–78.