

# ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ



**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ**

**ΘΕΜΑ:**

**Αλλοίωση τροφίμων από Ζύμες**

Φοιτητής: Αναστάσιος Δεληστάθης ( 16020 )

Επιβλέπων Καθηγητής: Βασίλειος Σπηλιώτης

**Αθήνα**

**Σεπτέμβριος, 2022**

## **Εγκρίθηκε από τριμελή εξεταστική επιτροπή**

Αθήνα, 2022

### **ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ**

1. Επιβλέπων Καθηγητής

Βασίλης Σπηλιώτης

Καθηγητής, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Πανεπιστήμιο  
Δυτικής Αττικής

2. Μέλος επιτροπής

Ανθμία Μπατρίνου

Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων,  
Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

3. Μέλος επιτροπής

Σπυρίδων Κοντελής

Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων,  
Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

## ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο κάτωθι υπογεγραμμένος ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ ΔΕΛΗΣΤΑΘΗΣ του ΛΑΜΠΡΟΥ ΔΕΛΗΣΤΑΘΗ, με αριθμό μητρώου 16020 φοιτητής του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

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

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

Ο Δηλών

Αναστάσιος Δεληστάθης



## **ΑΦΙΕΡΩΣΗ**

Στην Ελεάννα, το άλλο μου μισό, για τη στήριξή της στην εκπόνηση της εργασίας και που θα συνεχίσει να με στηρίζει στην ζωή μου

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Ευχαριστώ τους καθηγητές μου και επιβλέποντες της πτυχιακής μου εργασίας κ. Ανθημία Μπατρινού και κ. Βασίλειο Σπηλιώτη για την καθοδήγηση που μου προσέφεραν για την εκπόνησή της.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσης βιβλιογραφικής εργασίας είναι μια επισκόπηση αναφορικά με το θέμα της αλλοίωσης των τροφίμων από ζυμομύκητες, εστιάζοντας αρχικά σε πιο γενικευμένα χαρακτηριστικά τους. Ακολούθως, γίνεται εκτενής αναφορά στις συνθήκες ανάπτυξης των ζυμών στα τρόφιμα, δίνοντας έμφαση στις εξής παραμέτρους: την ενεργότητα ύδατος, την θερμοκρασία ανάπτυξης, την τιμή του pH και την παρουσία οξυγόνου. Γίνεται ακόμα αναφορά σε συγκεκριμένους ζυμομύκητες οι οποίοι είναι βασικοί παράγοντες αλλοίωσης των τροφίμων. Σ' ένα μέρος της εργασίας παραθέτονται οι μέθοδοι ανίχνευσης και προσδιορισμού των ζυμών αλλοίωσης εμβαθύνοντας σε πιο σύγχρονες και ταχείες μεθόδους. Επιπρόσθετα, αναλύονται τα μέτρα που έχουν θεσπιστεί για τον περιορισμό των ζυμών αλλοίωσης, καθώς και άλλων μέτρων που αναμένεται να εφαρμοστούν με επιτυχία στην βιομηχανία των τροφίμων.

**Λέξεις Κλειδιά:** ζύμες αλλοίωσης, τρόφιμα, *Zygosaccharomyces*, βιομηχανία τροφίμων, ανάπτυξη ζυμών, ωσμόφιλοι, ξηρόφιλοι

## **ABSTRACT**

The aim of this bibliographic study is a review on food spoilage yeasts, initially focusing on their generalized characteristics. Subsequently, an extensive reference is made to the growth conditions of yeasts in food, emphasizing the following parameters: water activity, growth temperature, pH value and the presence of oxygen. There is, also, a report to specific yeasts which are one of the main factors in food spoilage. In one part of this study, the methods of detecting and determining spoilage yeasts are listed, going deeper into modern and fast methods. In addition, the measures established to limit spoilage are analyzed, as well as other measures that expected to be successfully implemented in the food industry.

**Key Words:** spoilage yeasts, food, Zygosaccharomyces, food industry, yeast growth, osmophile, xerophile

## **ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ**

1.ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ.....	13
2.ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΖΥΜΩΝ.....	17
3.ΖΥΜΕΣ ΚΑΙ ΤΡΟΦΙΜΑ.....	22
3.1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟ ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΖΥΜΕΣ ΚΑΙ ΤΡΟΦΙΜΑ.....	22
3.2. ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΩΝ ΖΥΜΩΝ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ.....	23
3.2.1 ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΥΔΑΤΟΣ.....	23
3.2.2. ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ.....	30
3.2.3. ΤΙΜΕΣ pH.....	33
3.2.4. ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΟΞΥΓΟΝΟΥ.....	36
3.3. ΒΑΣΙΚΕΣ ΖΥΜΕΣ ΑΛΛΟΙΩΣΗΣ ΣΤΗΝ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ.....	37
3.3.1 ΖΥΜΕΣ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ <i>Zygosaccharomyces</i> .....	38
3.3.2. ΖΥΜΗ <i>Debaryomyces hansenii</i> .....	43
3.3.3. ΖΥΜΗ <i>Pichia membranifaciens</i> .....	44
3.3.4. ΖΥΜΕΣ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ <i>Torulopsis</i> .....	45
3.3.5. ΖΥΜΕΣ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ <i>Brettanomyces</i> ΚΑΙ <i>Dekkera</i> .....	46
4. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΖΥΜΩΝ ΑΛΛΟΙΩΣΗΣ ΣΤΗΝ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ ΤΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ.....	48
4.1 ΠΑΡΑΔΟΣΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΖΥΜΩΝ ΑΛΛΟΙΩΣΗΣ.....	48
4.2. ΤΑΧΕΙΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΖΥΜΩΝ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ.....	49
4.2.1. ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ.....	49
4.2.2. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΑΠΑΡΙΘΜΗΣΗ ΜΕ 3M <sup>TM</sup> Petrifilm <sup>TM</sup> .....	52
4.2.3. ΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΕΣ ΟΠΤΙΚΕΣ ΣΥΣΚΕΥΕΣ.....	52
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΠΡΟΛΗΠΤΙΚΑ ΜΕΤΡΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΖΥΜΩΝ ΑΛΛΟΙΩΣΗΣ ΣΤΗΝ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ.....	58
5.1 ΠΡΟΛΗΠΤΙΚΕΣ ΕΝΕΡΓΕΙΕΣ ΣΤΑ ΦΡΟΥΤΑ ΚΑΙ ΤΑ ΛΑΧΑΝΙΚΑ.....	58
5.2. ΠΡΟΛΗΠΤΙΚΕΣ ΕΝΕΡΓΕΙΕΣ ΣΤΟ ΚΡΑΣΙ.....	59
5.3. ΣΥΝΤΗΡΗΤΙΚΑ ΩΣ ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΛΗΨΗΣ.....	60
5.4 ΤΑ ΑΙΘΕΡΙΑ ΕΛΑΙΑ ΩΣ ΜΕΣΟ ΠΡΟΛΗΨΗΣ.....	61
5.5 ΟΙ ΤΟΞΙΝΕΣ-ΔΟΛΟΦΟΝΟΙ ΤΩΝ ΖΥΜΩΝ ΩΣ ΜΕΣΟ ΠΡΟΛΗΨΗΣ.....	62
6.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	63
7.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	66



## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

**Γράφημα 2.1:** Ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης θερμοανεκτικών και στελεχών ζύμης αγρίου τύπου σε εύρος θερμοκρασίας μεταξύ 15°C και 50°C (Caspeta and Nielsen, 2015)

**Γράφημα 3.2.2.1:** Απαιτούμενες θερμοκρασίες για την ανάπτυξη μικροοργανισμών (Keenleyside, 2019)

**Γράφημα 3.2.3.1:** Καμπύλες ανάπτυξης ζυμών συναρτήσει του χρόνου (σε ώρες) για τιμές pH 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0 (Miah, 2014)

**Γράφημα 3.3.1.4.1:** Η αντίσταση στο συντηρητικό βενζοϊκό οξύ και η ανεκτικότητα στην γλυκόζη ορισμένων ειδών ζυμομυκήτων (Stratford&Capell, 2003)

## **ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ**

**Εικόνα 2.1.: Αγενής Πολλαπλασιασμός ζυμομυκήτων όπως φαίνεται από το μικροσκόπιο. Στο σχήμα (1) απεικονίζεται ο πολλαπλασιασμός με εκβλάστηση και στο σχήμα (2) ο πολλαπλασιασμός με κυτταρική διαίρεση (Sonali Phale, 2018)**

**Εικόνα 2.2: Ηλεκτρονικά μικρογραφήματα της διαδικασίας σύζευξης στον ζυμομύκητα *Hansenula winger* (Madigan et al, 2014)**

**Εικόνα 4.2.1.1: Μέθοδος Κυτταρομετρία-Ροής (Semrock)**

**Εικόνα 4.2.1.2 (α) Ανιχνευτής Μπροστινής Διασποράς (FSC), προσδιορισμός του μεγέθους των σωματιδίων. (β) Διάγραμμα απεικόνισης μεγέθους και πολυπλοκότητας σωματιδίου. (StarCellBio)**

**Εικόνα 4.2.4.1.: Ανίχνευση των ζυμομυκήτων με το σύστημα Bax (Hygiena)**

**Εικόνα 4.2.4.2: Ανίχνευση ζυμομυκήτων με την μέθοδο PallGeneDisc (PALL)**

**Εικόνα 4.2.4.3: Πλακέτα MicroPlate™ (BIOLOG)**

**Εικόνα 4.2.4.4: Πλακέτα MicroPlate ύστερα από πραγματοποίηση των απαραίτητων αντιδράσεων (BIOLOG)**

**Εικόνα 4.2.4.5: Θετικά και αρνητικά αποτελέσματα ενός KitAPI 20C (Microbiologie-clinique)**

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

**Πίνακας 3.2.1.1: Είδη μυκήτων (και ζυμών) που μπορούν να αναπτυχθούν σε  $a_w \leq 0,75$  (Beuchat&Hocking, 1990)**

**Πίνακας 3.2.1.2: «Περιοχές»  $a_w$  που αναπτύσσονται μικροοργανισμοί αλλοίωσης (LabcellLTD)**

**Πίνακας 3.2.1.3: Ελάχιστη  $a_w$  συγκεκριμένων διαλυμάτων οπού μπορούν να αναπτυχθούν ζύμες αλλοίωσης (Deak, 2007)**

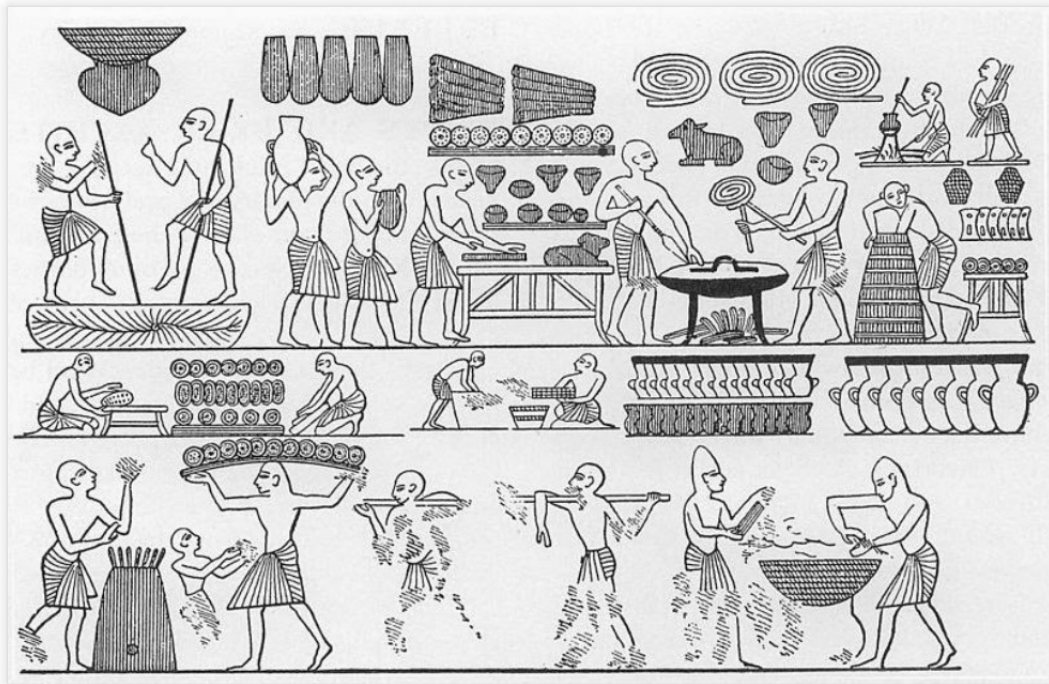
**Πίνακας 3.3.1: Ζύμες μόλυνσης και αλλοίωσης που απομονώθηκαν από τρόφιμα και ποτά (Crawford, 2014)**

## 1.ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Οι ζυμομύκητες ή αλλιώς ζύμες είναι μια κατηγορία μικροοργανισμών ο οποίος εμπλέκεται ενεργά στην καθημερινότητα του ανθρώπου. Πολλά από τα βασικά τρόφιμα που καταναλώνουμε, αν όχι σε καθημερινή βάση τουλάχιστον πολύ συχνά, έχουν βασίσει την παραγωγή τους στη δράση των ζυμών. Αυτά τα προϊόντα τροφίμων προέρχονται από τον κλάδο της Οινοποιίας, της Ζυθοποιίας, της Αρτοποιίας καθώς και αυτών των Γαλακτοκομικών προϊόντων. Επιπρόσθετα, οι ζύμες αξιοποιούνται και στην παραγωγή καθαρής αιθυλικής αλκοόλης βιολογικής προελεύσεως με εφαρμογές στην βιομηχανία την φαρμακευτική ή και την ποτοποιία, όπως επίσης και στην παραγωγή πιο εξεζητημένων προϊόντων. Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων προϊόντων είναι η γλυκερίνη, κάποιες βιταμίνες και ένζυμα, αλλά και λιπαρές ουσίες ή πολυσακχαρίτες (Μπαλατσούρας, 2006).

Η χρήση των ζυμών στην καθημερινότητα των ανθρώπων δεν εμφανίζεται όμως τα τελευταία χρόνια. Σε κάποιες πηγές σημειώνεται πως η αρτοποιία και η ζυθοποιία αναπτύχθηκαν στην Αρχαία Αίγυπτο πάνω από 4000 χρόνια πριν(Lesafre), ενώ στο βιβλίο του, «*Μικροβιολογία Τροφίμων*», ο Μπαλατσούρας Γ. αναφέρει πως ζυμούμενα τυριά παράγονταν στο Ιράκ πριν από περίπου 8000 χρόνια. Όσον αφορά την παρασκευή του πρώτου ζυμωμένου ψωμιού, εικάζεται πως ένα μείγμα αλεύρου και νερού αφέθηκε για περισσότερο από τον προκαθορισμένο χρόνο μια μέρα με υψηλή θερμοκρασία. Κατά αυτόν τον τρόπο οι ζυμομύκητες, οι οποίοι βρίσκονταν στο αλεύρι, προκάλεσαν τηνζύμωση του μείγματος πριν το ψήσιμό του (Lesafre).

Αν αναλογιστούμε πως από ένα τυχαίο συμβάν, «χτίστηκαν» σταδιακά μέσα σε χιλιαετίες ολόκληρες επιχειρήσεις και παγκόσμιες βιομηχανίες, και αυτά τα παραδείγματα μόνο στον κλάδο της Αρτοποιίας, τότε δεν είναι υπερβολή να αποκαλέσουμε τους ζυμομύκητες ως τους παλαιότερους βιομηχανικούς μικροοργανισμούς και να τους κατατάξουμε στην κατηγορία των πολυτιμότερων εξ αυτών.



Εικόνα 1.1: Απεικόνιση του αρτοποιείου επί του Ραμσή ΙΙΙ (Rios, 2014)

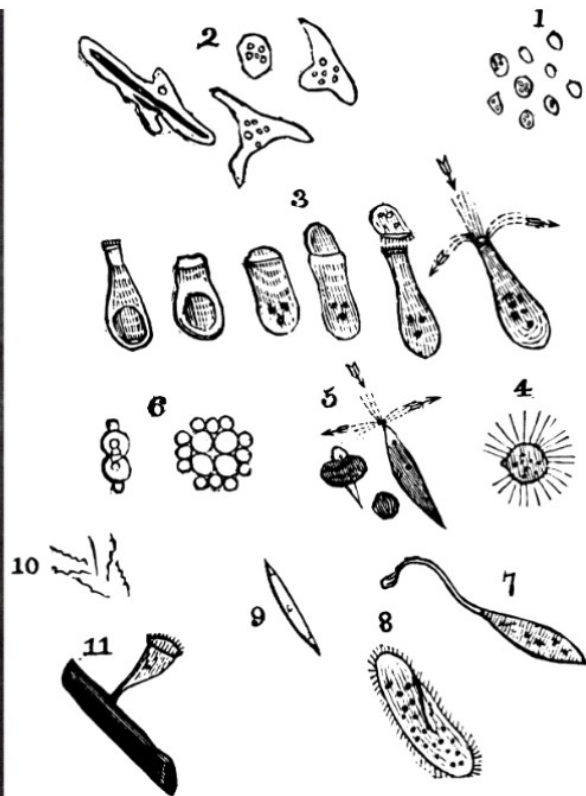
Οι ιδιότητες, ωστόσο, των ζυμομυκήτων δεν περιορίζονται μόνο σε αυτές που διευκολύνουν τον άνθρωπο και διευρύνουν την επιχειρηματικότητα. Οι ζύμες πολλές φορές έχουν αποτελέσει εμπόδιο κατά μήκος της αγροτροφικής αλυσίδας από το «Αγρόκτημα στο τραπέζι», κυρίως σε τρόφιμα με χαμηλό pH και με υψηλή περιεκτικότητα σε συντηρητικά (Deak&Beuchat, 1996). Επιπλέον, παρότι είναι μεσόφιλοι οργανισμοί και αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες 20-45°C (optimum 25-28°C) μπορούν να αναπτυχθούν και σε θερμοκρασίες από 0-15°C, άρα και σε περιβάλλον ψυγείου (Μπαλατσούρας, 2006).

Έχει παρατηρηθεί μάλιστα, πως τα τελευταία χρόνια έχουν αυξηθεί τα περιστατικά εμφάνισης ζυμών λόγω των προτύπων ποιότητας που έχουν θεσπιστεί για τα τρόφιμα, βάσει των οποίων απαιτείται η μετρίαση της ποσότητας και της χρήσης των συντηρητικών καθώς και η εφαρμογή ηπιότερων διαδικασιών συντήρησης (Fleet, 1992).

Ιστορικά, επομένως, ο άνθρωπος ουσιαστικά χρησιμοποιούσε την ζύμωση ως ιδιότητα και πράξη αγνοώντας όμως πλήρως την ύπαρξη των ζυμών.

Η ανακάλυψη των ζυμομυκήτων επιτεύχθηκε από τον Antonie van Leeuwenhoek, το 17<sup>ο</sup> αιώνα, τα οποία μάλιστα ήταν και τα πρώτα μικρόβια που παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο. Ο Leeuwenhoek ήταν ένας επιχειρηματίας-έμπορος ξηρών καρπών ο οποίος γνώριζε και την τέχνη του γυαλιού. Χάρη σε αυτή του την δεξιότητα μπορούσε να λειάνει το γυαλί με τέτοιο τρόπο ώστε να κατασκευάσει εν τέλει μικροσκόπια με φακούς που μεγεθύνονται είδωλα 250 με 700 φορές. (Olusegun, 2020).

Έτσι, στις 17 Σεπτεμβρίου του 1683, τα κύτταρα της ζύμης, πιθανώς του *Saccharomyces*, παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο του Leeuwenhoek και τα οποία ο ίδιος εσφαλμένα τα ονόμασε “animalcules”, δηλαδή ζώαρια (Olusegun, 2020).



Εικόνα 2: Ο Antonie van Leeuwenhoek και ένα σχέδιο των ζωαρίων (Olusegun, 2020)

Ύστερα από αυτή του την ανακάλυψη, κατέβαλε προσπάθειες να προωθήσει τα ευρήματά του στη Βασιλική Εταιρία του Λονδίνου, δηλαδή στην Ακαδημία Επιστημών της Βρετανίας, χωρίς ωστόσο να λάβει την δέουσα προσοχή. Την κατάληξη αυτή την δικαιολογεί το γεγονός ότι το επίκεντρο της προσοχής εκείνη την περίοδο ήταν τα μαθηματικά και ο ορθολογισμός. Ως εκ τούτου εξελίξεις στον τομέα της Ζυμολογίας άρχισαν να ξανακάνουν την εμφάνισή τους σχεδόν δύο αιώνες μετά.

Πιο συγκεκριμένα, η αρχή των νέων ανακαλύψεων οφείλονταν στους CagniarddelaTour στη Γαλλία, το 1835 (Payen) και οι Schwann και Kützing στη Γερμανία, το 1837 (Barnett, 2003), οι οποίοι ασχολήθηκαν επισταμένα με την αναπαραγωγή και τον τρόπο λειτουργίας των ζυμών. Κατ' αυτόν τον τρόπο σχηματίστηκαν τρία δόγματα: το δόγμα της αυτόματης γενέσεως των έμβιων όντων, η βιταλιστική θεωρία (vitalistic) και η μηχανιστική θεωρία (mechanistic). Λύση στην «διαμάχη» μεταξύ αυτών των τριών (3) δογμάτων ήρθε να δώσει ο χημικός και μικροβιολόγος Louis Pasteur, το έτος 1864, υποστηρίζοντας την βιταλιστική θεωρία και τονίζοντας παράλληλα πως:

*«Ζύμωση είναι το αποτέλεσμα της ανάπτυξης κυττάρων ζύμης, τα οποία τρέφονται από υπολείμματα νεκρών κυττάρων».* (Manchester, 2007)

Συμπερασματικά, ο ρόλος των ζυμομυκήτων στην ζύμωση είναι ενεργητικός.

Σε επόμενο στάδιο, οι επιστήμονες CagniarddelaTour και οι Schwann και Kützing έκαναν μια προσπάθεια να προσδιορίσουν την μορφολογία των ζυμών και ως εκ τούτου τον τρόπο πολλαπλασιασμού των ζυμών. Συγκεκριμένα προσδιορίστηκε ο αγενής πολλαπλασιασμός μέσω του μηχανισμού της εκβλάστησης (budding).

Ένας ακόμα σημαντικός σταθμός στον κλάδο της Ζυμολογίας είναι και η ταξινόμηση των ζυμών σε γένη και σε είδη. Ο πρώτος επιστήμονας που επιχείρησε να κατατάξει ζύμες ήταν ο Δανός Emil Hansen, το έτος 1896. Στην συνέχεια, εστιάστηκε η προσοχή στην φυσιολογία, τον σεξουαλισμό και τις φυλογενετικές σχέσεις των ζυμών.

Σταδιακά, επομένως, εμπλουτίζοντας τις γνώσεις τους οι επιστήμονες και μέσω νέων ανακαλύψεων επιτεύχθηκε η ύπαρξη ενός συστήματος ταξινόμησης των ζυμών, το οποίο δημοσιεύθηκε το 1952 και είναι γνωστό ως «Κλείδα ταξινόμησης των J.Lodder και Kreger-vanRij». Αυτή η κλείδα ταξινόμησης χρησιμοποιείται από τα

περισσότερα ερευνητικά κέντρα, καθώς και η πιο πρόσφατη κλείδα ταξινόμησης, του έτους 1984, από τον Kreger-vanRij. Οι ταξινομήσεις αυτές και οι περαιτέρω αναλύσεις τους υπάρχουν επομένως στα βιβλία αυτών των εκδόσεων με το ίδιο τίτλο «*The yeasts - A Taxonomic Study*» (Kreger-vanRij, 1984).

## **2. ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΖΥΜΩΝ**

Η παρούσα πτυχιακή μελέτη έχει ως επίκεντρο έναν συγκεκριμένο κλάδο επιστήμης, την Ζυμολογία. Βάσει των πληροφοριών που αντλούμε από τον κλάδο αυτό, οι ζύμες ανήκουν στην κατηγορία των ευκαρυωτικών οργανισμών και πιο συγκεκριμένα είναι μέρος μιας ομάδας μικροοργανισμών, τους μύκητες (Perricone et al, 2017). Γενικότερα, οι μύκητες (fungi) χωρίζονται σε τρεις (3) κατηγορίες, οι οποίες ονομαστικά είναι οι μυκηλιακοί μύκητες ή αλλιώς μούχλες (molds), τα μανιτάρια (mushrooms) και οι ζύμες ή αλλιώς ζυμομύκητες (yeasts) (Γκιαούρης Ε.). Μάλιστα, οι ζυμομύκητες χαρακτηρίζονται ως ‘μονοκύτταρικοί οργανισμοί’, οι οποίοι εξελίχθηκαν από τους πολυκύτταρους μύκητες (Madigan et al, 2014). Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, οι ζύμες έχουν ως εκπροσώπους τους Ασκομύκητες, τους Δευτερομύκητες και τους Βασιδιομύκητες. Η πλειονότητά τους ωστόσο κατατάσσεται στους Ασκομύκητες (Μπαλατσούρας, 2006).

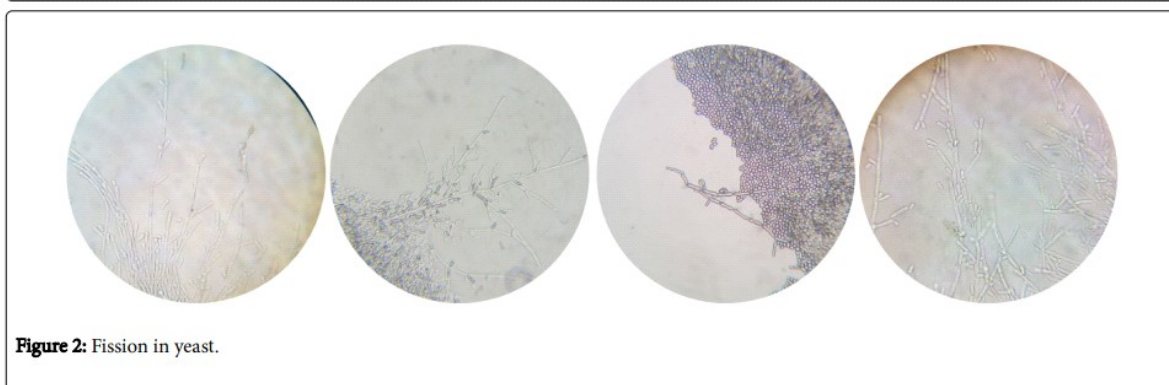
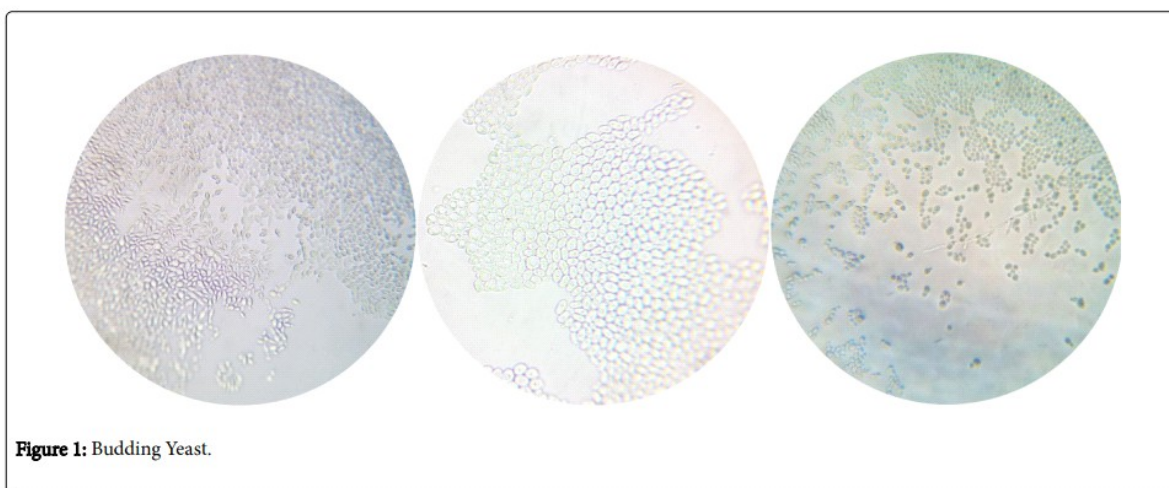
Τα κύτταρα των ζυμών έχουν ως επί των πλείστων σχήμα σφαιρικό, ωσειδές ή κυλινδρικό (Madigan et al, 2014), ενώ οι διαστάσεις τους μπορεί να είναι και δεκαπλάσιες φορές μεγαλύτερη από αυτή των βακτηρίων. Κάποιες από τις ιδιότητες που χαρακτηρίζουν τους συγκεκριμένους μικροοργανισμούς είναι ότι μπορούν να αναπτυχθούν εύκολα, ακόμα και σε συνθήκες Εργαστηρίου με την χρήση των κατάλληλων υποστρωμάτων, και ότι πολλαπλασιάζονται με γρήγορους ρυθμούς, από 40 έως 60-90 λεπτά, αναλόγως αν οι συνθήκες είναι ευνοϊκές ή όχι (Μπαλατσούρας, 2006).

Αναλύοντας περισσότερο τον τρόπο πολλαπλασιασμού των ζυμομυκήτων, μπορούμε να διακρίνουμε δύο (2) τρόπους με τους οποίους αυτοί αναπαράγονται. Αρχικά, έχουμε τον αγενή τρόπο πολλαπλασιασμού (στα αγγλικά ο όρος είναι ‘asexual’). Ο αγενής πολλαπλασιασμός μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με την διαδικασία της εκβλάστησης (budding), κατά την οποία:



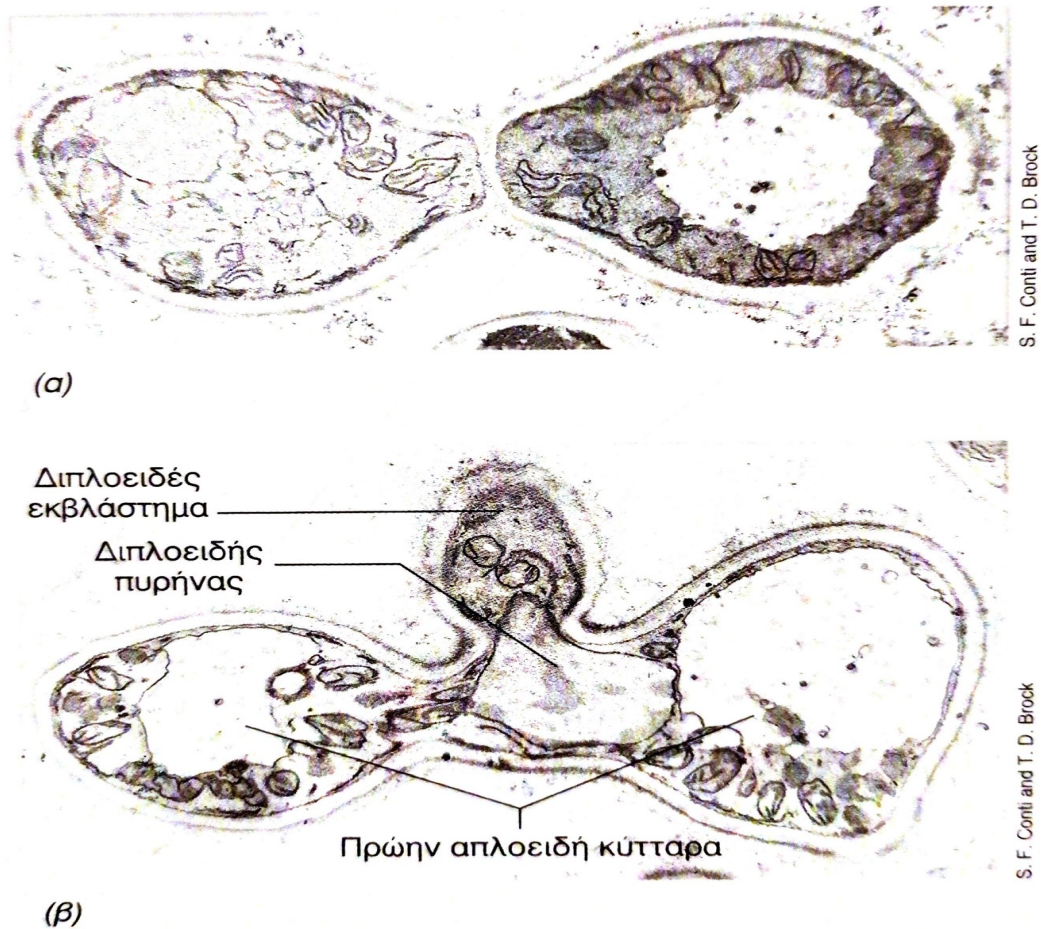
*«σχηματίζεται ένα νέο κύτταρο υπό την μορφή μιας μικρής προεξοχής ενός ώριμου κυττάρου το «μάτι» βαθμιαία μεγαλώνει και τελικά χωρίζεται»,*

είτε με την διαδικασία της κυτταρικής διαίρεσης (fission) η οποία, επειδή οι ζυμομύκητες είναι μονοκύτταροι οργανισμοί, πραγματοποιείται με διχοτόμηση. Επομένως, από ένα κύτταρο προκύπτουν δύο νέα πανομοιότυπα μεταξύ τους. Έχει παρατηρηθεί ωστόσο πως τα κύτταρα των ζυμών μπορούν να πολλαπλασιαστούν και με συνδυασμό των δύο παραπάνω διαδικασιών (bud-fission). Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζονται οι δύο τρόποι αγενούς πολλαπλασιασμού όπως φαίνεται στο μικροσκόπιο.



*Εικόνα 2.1: Αγενής Πολλαπλασιασμός ζυμομυκήτων όπως φαίνεται από το μικροσκόπιο. Στο σχήμα (1) απεικονίζεται ο πολλαπλασιασμός με εκβλάστηση και στο σχήμα (2) ο πολλαπλασιασμός με κυτταρική διαίρεση (Sonali Phale, 2018).*

Ο δεύτερος τρόπος πολλαπλασιασμού είναι ο εγγενής (ή αλλιώς αναπαραγωγή φυλετικά) και ο οποίος πραγματοποιείται με την διαδικασία αυτής σύζευξης. Στα διάφορα στάδια αυτής διαδικασίας αυτής δύο κύτταρα συγχωνεύονται δημιουργώντας έτσι ένα νέο κύτταρο, τον ζυγωτή. Από τον ζυγωτή αυτόν, στη συνέχεια παράγονται τα νέα κύτταρα των ζυμομυκήτων.



Εικόνα 2.2: Ηλεκτρονικά μικρογραφήματα της διαδικασίας σύζευξης στον ζυμομύκητα *Hansenula winger* (Madigan et al, 2014).

Όπως αναφερθήκαμε σε προηγούμενη παράγραφο, ένα από τα χαρακτηριστικά των ζυμών είναι ότι αναπτύσσονται γενικότερα εύκολα, ακόμα και όταν τα κύτταρα τους βρίσκονται κάτω από αντίξοες συνθήκες. Πρώτα από όλα όμως πρέπει να αναφερθεί το περιβάλλον στο οποίο αναπτύσσονται οι συγκεκριμένοι

μικροοργανισμοί. Οι ζυμομύκητες, λόγω έλλειψης της χλωροφύλλης κατατάσσονται στην κατηγορία των ετερότροφων οργανισμών, και εκτός των άλλων είναι διαδεδομένες λόγω της αξιοποίησης διαφόρων πηγών άνθρακος της μορφής  $(\text{CH}_2\text{O})_n$  για την διατροφή τους. Πιο αναλυτικά, οι μικροοργανισμοί αυτοί ζυμώνουν τα σάκχαρα προς αιθανόλης (οινόπνευμα) και διοξείδιο του άνθρακα, όπως φαίνεται και στην ακόλουθη αντίδραση (Μπαλατσούρας, 2006):



Αλκοολική Ζύμωση

Αυτή η αντίδραση παρουσιάζει τον ζυμωτικό μεταβολισμό. Είναι εφικτό όμως παρόλα αυτά, ζυμομύκητες όπως αυτοί του γένους *Saccharomyces* να πραγματοποιήσουν οξειδωτικό μεταβολισμό των σακχάρων, παράγοντας με αυτόν τον τρόπο διοξείδιο του άνθρακα και νερό ως προϊόντα αντίδρασης.



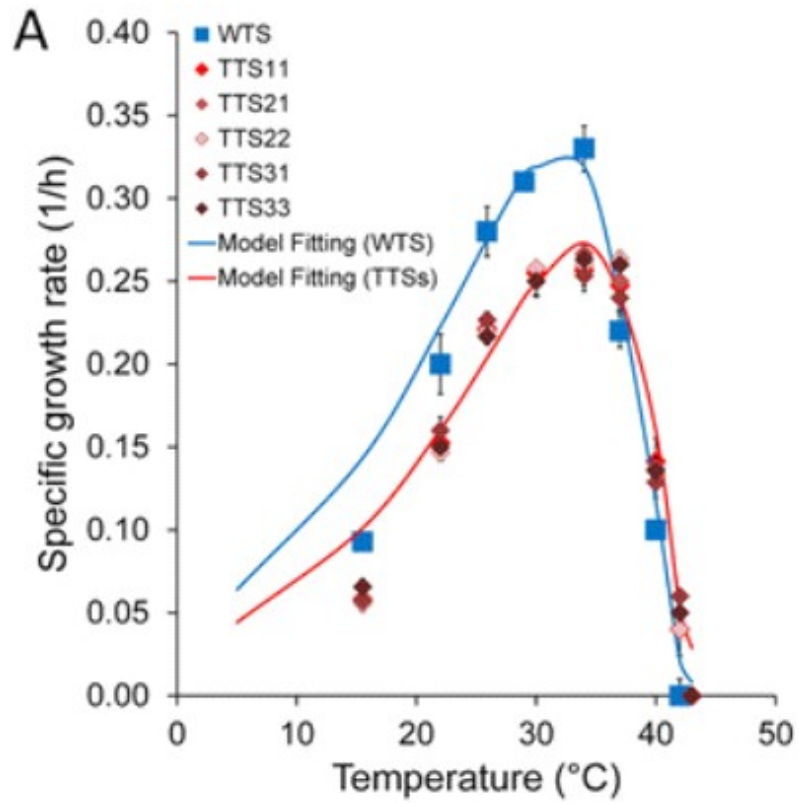
Οξειδωτική Ζύμωση

Συνεπώς, οι δύο αντιδράσεις που παρουσιάστηκαν παραπάνω συνθέτουν και τον ορισμό της ζύμωσης, σύμφωνα με τον οποίο:

«Η ζύμωση είναι μια φυσική μεταβολική διαδικασία στην οποία οι μικροοργανισμοί μετατρέπουν τους υδατάνθρακες, είτε σε αλκοόλ είτε σε οξύ (Tarver, 2016).

Όσον αναφορά τις συνθήκες περιβάλλοντος που ευνοούν την ανάπτυξη των μονοκύτταρων μυκήτων, αυτοί χαρακτηρίζονται ως μεσόφιλοι οργανισμοί με ιδανικό (optimum) εύρος θερμοκρασιών ανάπτυξης από τους 20°C έως τους 40°C, ανάλογα το γένος και το είδος των ζυμομυκήτων. Αξίζει επιπλέον να σημειωθεί πως υπάρχουν ζύμες οι οποίες έχουν καταφέρει να αναπτυχθούν στην μέγιστη θερμοκρασία των 40-42°C, ωστόσο καμία ζύμη δεν έχει optimum θερμοκρασίες ανάπτυξης άνω των 40°C.

Παρακάτω παρουσιάζεται ένα διάγραμμα με την επίδραση της θερμοκρασίας σε θερμοανθεκτικές ζύμες, καθώς και σε αγρίου τύπου.



Γράφημα 2.1: Ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης θερμοανθεκτικών και στελεχών ζύμης αγρίου τύπου σε εύρος θερμοκρασίας μεταξύ 15°C και 50°C (Caspeta and Nielsen, 2015)

### 3.ΖΥΜΕΣ ΚΑΙ ΤΡΟΦΙΜΑ

#### 3.1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟ ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΖΥΜΕΣ ΚΑΙ ΤΡΟΦΙΜΑ

Μελετώντας τις πληροφορίες που αντλούμε από την βιβλιογραφία, κατανοούμε πως πολλά από τα τρόφιμα που καταναλώνονται τόσο από ανθρώπους όσο και από ζώα, εμπεριέχουν στα επιμέρους συστατικά τους ζυμομύκητες (Perricone, etal., 2016). Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η χρήση των ζυμών ως καλλιέργειες εκκίνησης σε διάφορα είδη τυριών, όπως είναι τα επιλεγμένα στελέχη του *Geotrichum candidum* σε τυριά ωρίμανσης με μούχλα στην επιφάνεια (Cogan, etal., 2014), καθώς και είδη που ζυμώνουν την λακτόζη για την παραγωγή των μπλέ τυριών όπως είναι και τα *K. marxianus*, *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces cerevisiae* και *Debaryomyces hansenii*. Επιπλέον, χρησιμοποιούνται στην αρτοποιία, και πιο συγκεκριμένα στο ψωμί, ως την γνωστή «μαγιά», αλλά και σε προϊόντα αλκοολικής ζύμωσης λόγω χάρη το κρασί και την μύρα, με τον *Saccharomyces cerevisiae* ως τον πιο διαδεδομένο(Adams, 2018, Ogletree, 2020, Perricone, etal, 2016).

Όπως παρουσιάστηκε πολύ στοχευμένα σ'ένα άρθρο του IFT( Institute of food Technologists), από την αναπληρώτρια καθηγήτρια του Πανεπιστημίου του Αϊντάχο, Gulhan Unlu,

«Στην μικροβιολογία των τροφίμων, έχουμε το Καλό, το Κακό και το Άσχημο ακριβώς όπως η ταινία (*The Good, The Bad and the Ugly*)»

Σύμφωνα με την θεωρία αυτή, οι «Άσχημοι» μικροοργανισμοί βλάπτουν την ποιότητα των τροφίμων αλλοιώνοντας τα ενώ οι «Κακοί» επηρεάζουν και την ασφάλεια των τροφίμων προκαλώντας τροφιμογενές ασθένειες. Στην κατηγορία των «Καλών» ανήκουν τα βακτήρια, οι ζυμομύκητες και οι μύκητες, που είναι απαραίτητα για την παραγωγή ορισμένων προϊόντων τροφίμων (Tarver, 2016).

Οι ιδιότητες των ζυμομυκήτων ωστόσο δεν περιορίζονται μόνο σε εκείνες που μπορούν να εξυπηρετήσουν τις ανάγκες του ανθρώπου και να προσφέρουν ευχαρίστηση με τα ποικίλα προϊόντα που παράγονται. Χάρη στην ικανότητά τους να χρησιμοποιούν τα τρόφιμα ως ενδιαιτήματα, δηλαδή να τα θεωρούν ως φυσικό περιβάλλον όπου μπορούν να αναπτυχθούν οι ζυμομύκητες σε συνδυασμό με την δυνατότητά τους να επιβιώνουν και να αναπτύσσονται σε μη ευνοϊκές για αυτούς συνθήκες (Perricone, etal., 2016), προκαλούνται σημαντικές επιπτώσεις στην

βιομηχανία των τροφίμων καθώς αναπτύσσονται σε τρόφιμα που δεν θα έπρεπε να υπάρχουν. Ουσιαστικά, προκαλείται αλλοίωση των τροφίμων επηρεάζοντας αρνητικά την γεύση και την οσμή τους, δηλαδή την ποιότητα. Είναι σημαντικό να τονιστεί, επίσης, πως η ανάπτυξη των ζυμών δεν είναι ζήτημα ασφάλειας, αλλά καθαρά θέμα ποιότητας (Crawford, 2014) και θέμα αισθητικής τις περισσότερες φορές τουλάχιστον.

### **3.2. ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΩΝ ΖΥΜΩΝ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ**

Σε προηγούμενο κεφάλαιο (Βλ. Κεφάλαιο: 2.ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΖΥΜΩΝ), έγινε αναφορά σε κάποια βασικά στοιχεία που χαρακτηρίζουν τους ζυμομύκητες όπως την προέλευση τους, την μορφολογία τους ή τον τρόπο πολλαπλασιασμού τους. Σε αυτό το κεφάλαιο θα εμβαθύνουμε περισσότερο στις συνθήκες ανάπτυξης ζυμών στα τρόφιμα και συγκεκριμένα για τις καταστάσεις όπου μπορούν να επιφέρουν την αλλοίωση τους, και που προβληματίζουν την βιομηχανία των τροφίμων.

#### **3.2.1 ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΥΔΑΤΟΣ**

Αρχικά, οι ζύμες έχουν ως κοινό χαρακτηριστικό ότι μπορούν και επιβιώνουν σε τρόφιμα με χαμηλή ενεργότητα ύδατος, δηλαδή ανήκουν στην κατηγορία των ξηρόφιλων μικροοργανισμών. Ένας ορισμός που μπορεί να δοθεί σύμφωνα με τον A. Irwin (2020) είναι ο εξής:

«Ως ξηρόφιλοι, έχουν προσδιοριστεί οι μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται σε χαμηλά επίπεδα ενεργότητας ύδατος( $a_w$ ), [...] ήτοι κάτω από 0,85»

Υπάρχουν αρκετά σημαντικά γένη ξηρόφιλων ζυμών ανάμεσα στα οποία είναι και τα *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Pichia*, *Zygosaccharomyces* και *Torulopsis*. Ωστόσο, όμως δεν έχουν αναφερθεί κάποια περιστατικά όπου ζύμες να έχουν αναπτυχθεί σε  $a_w$  κάτω από την τιμή 0,80 περίπου. Εξαιρέση αποτέλεσε το στέλεχος *Zygosaccharomyces rouxii*, όπου βρέθηκε σε σιρόπι φρουκτόζης και σε συμπύκνωμα αχλαδιού με ενεργότητα ύδατος 0,62, (Lund, etal., 2020) καθώς και τα *Saccharomyces bisporus* σε ξερά φρούτα, ξηρούς καρπούς κ.α. (LabcellLTD)

Πίνακας 3.2.1.1: Είδη μυκήτων (και ζυμών) που μπορούν να αναπτυχθούν σε  $a_w \leq 0,75$  (Beuchat&Hocking, 1990)

Fungus	Minimum $a_w$ for growth	Temp. (°C)	Reference
<i>Aspergillus candidus</i>	0.75	25	(21)
<i>A. conicus</i>	0.70	22	(35)
<i>A. restrictus</i>	0.75	25	(44)
<i>Basipetospora halophila</i>	0.70	25	(49)
<i>Chrysosporium fastidium</i>	0.69	25	(38)
<i>C. xerophilum</i>	0.71	25	(38)
<i>Eurotium amstelodami</i>	0.70	25	( 6)
<i>E. carnoyi</i>	0.74	25	(38)
<i>E. chevalieri</i>	0.71	33	( 7)
<i>E. echinulatum</i>	0.62	25	(44)
<i>E. herbariorum</i>	0.74	25	(38)
<i>E. repens</i>	0.71	21	( 7)
<i>E. rubrum</i>	0.70	25	(44)
<i>Polyphaecium pisce</i>	0.70	25	(50)
<i>Wallemi sebi</i>	0.75	22	(35)
<i>Xeromyces bisporus</i>	0.61	25	(38)
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	0.62	30	(47)

Τρόφιμα, γενικότερα με  $a_w$  0,87-0,80 όπου αναπτύσσονται ξηρόφιλες ζύμες είναι οι συμπυκνωμένοι χυμοί φρούτων, το συμπυκνωμένο ζαχαρούχο γάλα, διάφορα σιρόπια, μαρμελάδες, ζελέ, καθώς και οι μαλακές ζωτροφές (LabcellLTD). Στον παρακάτω πίνακα απεικονίζονται διάφορες κατηγορίες τροφίμων για συγκεκριμένα ευρή ενεργότητας ύδατος και οι μικροοργανισμοί που μπορούν να αναπτυχθούν στα συγκεκριμένα αυτά επίπεδα  $a_w$ .

Πίνακας 3.2.1.2: «Περιοχές»  $a_w$  που αναπτύσσονται μικροοργανισμοί αλλοίωσης (LabcellLTD).

Water Activity and Growth of Microorganisms in Food*			
	Range of $a_w$	Microorganisms Generally Inhibited by Lowest $a_w$ in This Range	Foods Generally within This Range
	1.00–0.95	<i>Pseudomonas</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Proteus</i> , <i>Shigella</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , some yeasts	Highly perishable (fresh) foods and canned fruits, vegetables, meat, fish, milk, and beverages
	0.95–0.91	<i>Salmonella</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>C. botulinum</i> , <i>Serratia</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i> , some molds, yeasts ( <i>Rhodotorula</i> , <i>Pichia</i> )	Some cheeses (Cheddar, Swiss, Muenster, Provolone), cured meat (ham), bread, tortillas
	0.91–0.87	Many yeasts ( <i>Candida</i> , <i>Torulopsis</i> , <i>Hansenula</i> ), <i>Micrococcus</i>	Fermented sausage (salami), sponge cakes, dry cheeses, margarine
	0.87–0.80	Most molds (mycotoxigenic penicillia), <i>Staphylococcus aureus</i> , most <i>Saccharomyces (baillii)</i> spp., <i>Debaryomyces</i>	Most fruit juice concentrates, sweetened condensed milk, syrups, jams, jellies, soft pet food
	0.80–0.75	Most halophilic bacteria, mycotoxigenic aspergilli	Marmalade, marzipan, glacé fruits, beef jerky
	0.75–0.65	Xerophilic molds ( <i>Aspergillus chevalieri</i> , <i>A. candidus</i> , <i>Wallemia sebi</i> ), <i>Saccharomyces bisporus</i>	Molasses, raw cane sugar, some dried fruits, nuts, snack bars, snack cakes
	0.65–0.60	Osmophilic yeasts ( <i>Saccharomyces rouxii</i> ), few molds ( <i>Aspergillus echinulatus</i> , <i>Monascus bisporus</i> )	Dried fruits containing 15-20% moisture; some toffees and caramels; honey, candies
	0.60–0.50	No microbial proliferation	Dry pasta, spices, rice, confections, wheat
	0.50–0.40	No microbial proliferation	Whole egg powder, chewing gum, flour, beans
	0.40–0.30	No microbial proliferation	Cookies, crackers, bread crusts, breakfast cereals, dry pet food, peanut butter
	0.30–0.20	No microbial proliferation	Whole milk powder, dried vegetables, freeze dried, corn starch, potato chips, corn chips

Συγκεντρωτικά για τις ζύμες, όπου είναι και ο μικροοργανισμός που μας απασχολεί, από τα στοιχεία που απομονώνουμε από τον πίνακα προκύπτει ότι αρκετές ζύμες του γένους *Saccharomyces* και *Debaryomyces* έχουν την δυνατότητα να αναπτυχθούν σε επίπεδα  $a_w$  0,87-0,80. Οι περισσότερες ζύμες αναπτύσσονται σ'ένα εύρος  $a_w$  μεταξύ 0,91-0,87 σε τρόφιμα όπως είναι το σαλάμι, το κέικ, τα ξηρά τυριά (παρμεζάνα) και η μαργαρίνη. Σε υψηλότερα επίπεδα  $a_w$  (0,95-0,91) γένη ζυμών όπως τα *Rhodotorula* και *Pichia* μπορούν να αναπτυχθούν σε τυριά λόγω χάρη το cheddar, τα ελβετικά τυριά και το Provolone, καθώς και σε αλλαντικά, ψωμί και τортίγες. Τέλος, λίγες ζύμες μπορούν να πολλαπλασιαστούν και να προκαλέσουν



αλλοίωση στα τρόφιμα με τα ανώτερα επίπεδα  $a_w$  (1,00-0,95) όπου είναι τα φρέσκα τρόφιμα και το κονσερβοποιημένα φρούτα, τα λαχανικά, το κρέας, τα ψάρια, το γάλα και τα ροφήματα.

Στις χαμηλές τιμές ενεργότητας ύδατος από την άλλη μεριά, όπως αναφέρθηκαν σε προηγούμενη παράγραφο, μπορούν να επιβιώσουν μόνο οι *Saccharomyces bisporus* και *Zygosaccharomyces rouxii* σε  $a_w$  0,75-0,65 και 0,65-0,60 αντίστοιχα.

Τα γένη των ξηρόφιλων ζυμομυκήτων ανάλογα με το περιβάλλον που μπορούν να αναπτυχθούν χαρακτηρίζονται είτε ως οσμόφιλα είτε ως αλόφιλα.

Ο ορισμός που βρίσκουμε στην βιβλιογραφία για τους οσμόφιλους μικροοργανισμούς είναι ο εξής (Murray-BrownLabs):

*«Μικροοργανισμοί που μπορούν να αναπτυχθούν σε υψηλές συγκεντρώσεις οργανικών διαλυμάτων και ιδιαίτερα σε διαλύματα σακχάρων, καλούνται οσμόφιλοι»*

Ένας ακόμα ορισμός που περιγράφει την χαρακτηριστική ιδιότητα των οσμόφιλων μικροοργανισμών είναι και ο παρακάτω (Lakna, 2019):

*«Οσμόφιλοι είναι οι μικροοργανισμοί που ζουν σε περιβάλλον με υψηλή οσμωτική πίεση.»*

Από τους παραπάνω ορισμούς προκύπτει πως οι οσμόφιλοι ζυμομυκήτες μπορούν να επιβιώνουν και να αναπτύσσονται σε περιβάλλοντα όπου επικρατεί χαμηλή ενεργότητα ύδατος, και κυρίως διαλύματα σακχάρων. Είναι σημαντικό σε αυτό το σημείο να υπογραμμιστεί πως οι όροι «οσμόφιλοι» και «ξηρόφιλοι» οργανισμοί δεν είναι ισοδύναμα σύμφωνα με τους L. Beuchat και A. Hocking (1990). Βάση του επιστημονικού τους άρθρου για την παρουσία των ξηρόφιλων μυκήτων στα τρόφιμα, καταλήγουμε στο συμπέρασμα πως ο όρος «οσμόφιλος» αναφέρεται σε ζυμομυκήτες όπου προτιμούν να αναπτύσσονται σε περιβάλλοντα με χαμηλή ενεργότητα ύδατος, ενώ ο όρος «ξηρόφιλοι» αφορά εκείνους που απλά μπορούν να πολλαπλασιαστούν σε ένα περιβάλλοντα με χαμηλές τιμές  $a_w$ .

Παρατηρείται, ωστόσο, σε κάποια κείμενα να συγχέονται αυτές οι δύο έννοιες, ενώ έχουν διαφορετικό νόημα. Ο λόγος για τον οποίο γίνεται αυτό, αφορά τον χαρακτηρισμό που θέλουμε να προσδώσουμε σε μια κατάσταση είτε πρόκειται για

ανοχή σε χαμηλές τιμές  $a_w$  (ξηρόφιλος) είτε για ανάγκη εύρεσης ενός περιβάλλοντος με χαμηλές τιμές  $a_w$  (οσμόφιλος).

Από την κατηγορία των ζυμομυκήτων, εκείνος που είναι πιο ευρέως διαδεδομένος στην βιομηχανία των τροφίμων για τα οικονομικά προβλήματα που προκαλεί είναι το γένος *Zygosaccharomyces* (Murray-Brown Labs). Τα τρόφιμα στα οποία προκαλεί αλλοίωση, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, είναι εκείνο με υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα και πιο συγκεκριμένα μαρμελάδες, μελάσσα, σιρόπια από καλαμπόκι, αρωματισμένα σιρόπια και γαρνιτούρες, μέλι, συμπυκνωμένοι χυμοί φρούτων, σοκολάτες με διάφορες γεμίσεις κ.τ.λ.

Άλλα στελέχη οσμόφιλων ζυμομυκήτων που έχουν επίσης απομονωθεί από τρόφιμα υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα είναι, σύμφωνα με τον Γ. Μπαλατσούρα, το *Saccharomyces bisporus*, και πιο σπάνια τα *Eremascus albus*, *Hansenula anomala*, *Hansenula subpelliculosa* και *Hanseniaspora osmophila*.

Ένα επιπλέον αξιοσημείωτο σχόλιο που απομονώνουμε από το βιβλίο του Γ. Μπαλατσούρα, επικεντρώνεται στο αποτέλεσμα της αλλοίωσης ενός τροφίμου από οσμόφιλες ζύμες, δηλαδή την οσμή του αλλοιωμένου τροφίμου. Αναφέρει χαρακτηριστικά πως η οσμή που προκύπτει δεν είναι αποκρουστική αλλά οφείλεται σε εστέρες, αλδεΐδες και άλλα πηπτικά προϊόντα ενδιάμεσου μεταβολισμού των ζυμών, και η οποία ωστόσο δεν συνιστά μια τυπική οσμή ενός υγιούς τροφίμου (Μπαλατσούρας, 2006).

Η τρίτη κατηγορία ζυμομυκήτων που διακρίνουμε με βάση την ενεργότητα ύδατος που απαιτείται στο περιβάλλον ανάπτυξής τους, είναι οι αλόφιλοι. Ένας σύντομος ορισμός που περιγράφει στοχευόμενα την ιδιότητα των μικροοργανισμών αυτών είναι ο εξής (Lakna, 2019):

«Αλόφιλοι είναι μικροοργανισμοί που ζουν σε περιβάλλοντα με υψηλή αλατότητα»

Ουσιαστικά, οι αλόφιλοι μικροοργανισμοί, όχι μόνο μπορούν απλά να πολλαπλασιαστούν σε περιβάλλον με υψηλή αλατότητα, αλλά προτιμούν να αναπτύσσονται κάτω από αυτές τις συνθήκες.

Μάλιστα, ανάλογα και με τον βαθμό προτίμησης στην περιεκτικότητα σε αλάτι μπορούν να διαχωριστούν σε τρεις (3) ομάδες, όπου στην πρώτη κατατάσσονται οι

ελαφρώς αλόφιλοι που προτιμούν 1,7-4,8% αλατότητα, στην δεύτερη οι μέτριοι αλόφιλοι που επιδιώκουν τιμές 4,7-20% σε αλατότητα και την τρίτη ομάδα όπου ανήκουν οι ακραία αλόφιλοι με προτίμηση 20-30% σε αλατότητα (Lakna, 2019).

Σύμφωνα με τους Silra-Graca et al. (2003), αρκετά είδη ζυμομυκήτων μπορούν να αναπτυχθούν σε τρόφιμα με υψηλή περιεκτικότητα σε αλάτι, δηλαδή σε συγκεντρώσεις NaCl 15-25%. Ανάμεσα σε αυτά τα είδη είναι τα *Candida versatilis*, *Candida halonitratophila* και *Candida lactis condensis*. Ως πιο αλόφιλοι, όμως, ζυμομυκήτες χαρακτηρίζονται το στέλεχος *Zygosaccharomyces* και το γένος *Debaryomyces*, και κυριότερα το στέλεχος *Debaryomyces hansenii*.

Πέραν αυτών όμως των ζυμομυκήτων, υπάρχουν και εκείνα τα γένη όπου αναπτύσσονται σε τρόφιμα με χαμηλότερη περιεκτικότητα σε αλάτι όπως είναι τα προϊόντα γαλακτικής ζύμωσης. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι οι ελιές με περιεκτικότητα σε αλάτι 6,5-8%, τα αγγούρια με 10-16%, καθώς και το ζυμωμένο λάχανο με αλάτι 4,5-5% (Μπαλατσούρας, 2006).

Όσον αφορά το γένος *Debaryomyces*, παρουσιάζει ενδιαφέρον το γεγονός ότι έχει απομονωθεί από το θαλασσινό νερό (Chao, et al., 2009). Αυτό σημαίνει ότι σε επόμενο στάδιο είναι πολύ πιθανό να μεταφερθεί στις πρώτες ύλες αλατιού που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή τροφίμων προς συντήρηση, όπως είναι το παστό κρέας αλλά και το μπέικον και κρέατα που συντηρούνται σε άλμη.

Παρακάτω παραθέεται ένας πίνακας όπου παρουσιάζονται ενδεικτικά ζυμομυκήτες και οι αντίστοιχες χαμηλότερες τιμές ενεργότητας ύδατος που μπορούν να αναπτυχθούν, σε διαλύματα γλυκόζης, φρουκτόζης, σουκρόζης και αλατιού.

*Πίνακας 3.2.1.3: Ελάχιστη  $a_w$  συγκεκριμένων διαλυμάτων όπου μπορούν να αναπτυχθούν ζύμες αλλοίωσης (Deak, 2007).*

Yeast Species	Glucose	Fructose	Sucrose	NaCl
<i>Candida lactiscondensi</i>	0.79	0.78	0.79	0.92
<i>Candida versatilis</i>	0.79	0.80	0.79	0.84
<i>Debaryomyces hansenii</i>	0.84	0.86	0.81	0.84
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	0.90	0.93	0.90	0.95
<i>Pichia membranifaciens</i>	0.90	0.92	0.90	0.94
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	0.90	0.92	0.90	0.90
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.89	0.91	0.91	0.92
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	0.86	0.89	0.87	0.90
<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	0.85	0.85	0.79	0.95
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	0.79	0.67	0.79	0.86

Όπως προαναφέρθηκε σε προηγούμενες παραγράφους, ο *Zygosaccharomyces rouxii* φαίνεται να είναι η πιο ωσμόφιλη ζύμη, ενώ τα *Debaryomyces hansenii* και *Candida versatilis* είναι οι πιο αλόφιλες ζύμες. Στο αντίθετο άκρο, παρατηρούμε πως τα στελέχη *Pichia membranifaciens* και *Hanseniaspora uvarum* παρουσιάζουν την λιγότερη αντοχή στην ωσμωτική πίεση σε όλα τα διαλύματα σακχάρων και περισσότερο στο διάλυμα φρουκτόζης, ενώ το τελευταίο (στέλεχος) μαζί με το *Zygosaccharomyces bisporus* φαίνεται να είναι τα λιγότερα ανθεκτικά σε διαλύματα άλατος.

Ολοκληρώνοντας την ενότητα που παρουσιάζει την ανάπτυξη των ζυμών αναφορικά με την ενεργότητα ύδατος είναι σημαντικό να τονιστεί πως σε ορισμένα κείμενα κάποιες ζύμες αναφέρονται ως ξηρόφιλες, ωσμοάντοχες ή αλοάντοχες. Σύμφωνα όμως με τους Anand και Brain (1968) και Tokouka (1993), οι ζύμες αυτές μπορούν απλά να αναπτυχθούν σε χαμηλές τιμές  $a_w$  και δεν απαιτούν το συγκεκριμένο περιβάλλον προκειμένου να πολλαπλασιαστούν. Επομένως, βάσει των λεγομένων τους οι χαρακτηρισμοί που θα έπρεπε να χρησιμοποιούνται για τους ζυμομύκητες είναι «ξηροάντοχοι», «ωσμοάντοχοι» και «αλοάντοχοι» (Deak, 2007).

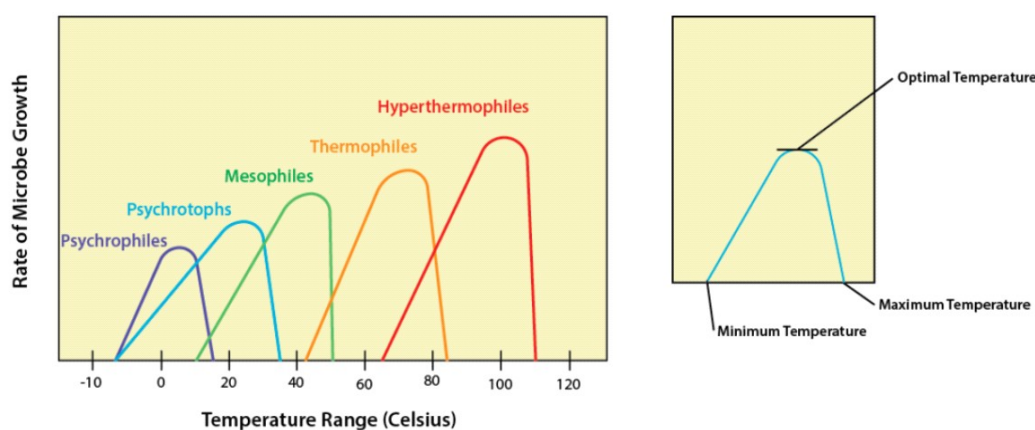
Επιπλέον, ο Γ. Μπαλατσούρας στο βιβλίο του «Μικροβιολογία Τροφίμων» χρησιμοποιεί τον χαρακτηρισμό «ωσμόφιλες» για όλες τις ζύμες, ενώ για τις άλλες δύο (2) κατηγορίες τους χαρακτηρισμούς «ξηροάντοχες» και «αλατοάντοχες».

Παρατηρούμε, επομένως ότι είναι πιθανό να υπάρχει μια σύγχυση κατά την χρήση αυτών των όρων στα διάφορα επιστημονικά άρθρα που μελετούμε. Για την εκπόνηση της παρούσας πτυχιακής μελέτης θα συνεχίσουμε να αναφερόμαστε στους

όρους ξηρόφιλη, ωσμόφιλη και αλόφιλη για όλες τις ζύμες χωρίς ωστόσο να τασσόμαστε υπέρ της χρήσης των συγκεκριμένων αυτών όρων έναντι των άλλων.

### 3.2.2. ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

Σπουδαίο ρόλο στην ανάπτυξη των ζυμομυκήτων σ' ένα τρόφιμο έχει και ο παράγοντας της θερμοκρασίας. Γνωρίζουμε ήδη πως ανάλογα με τις optimum θερμοκρασίες ανάπτυξης που χαρακτηρίζουν κάθε μικροοργανισμό, αυτοί χωρίζονται σε πέντε (5) κατηγορίες: τους ψυχρόφιλους, τους ψυχρότροφους, τους μεσόφιλους, τους θερμόφιλους και τους υπερθερμόφιλους (CourseHero).



Γράφημα 3.2.2.1: Απαιτούμενες θερμοκρασίες για την ανάπτυξη μικροοργανισμών (Keenleyside, 2019).

Όπως προκύπτει από το διάγραμμα, οι optimum θερμοκρασίες για κάθε μία από τις 5 κατηγορίες είναι οι εξής: για τους ψυχρόφιλους μικροοργανισμούς κυμαίνονται σε τιμές γύρω από τους 10°C, για τους ψυχρότροφους βρίσκονται σ' ένα διάστημα μεταξύ 25 και 30°C και για τους μεσόφιλους μεταξύ περίπου στους 30-45°C. Για τους πιο ανθεκτικούς στις υψηλές θερμοκρασίες μικροοργανισμούς, οι optimum θερμοκρασίες ανάπτυξης είναι περίπου στους 60-75°C για τους θερμόφιλους και 95-105°C για τους υπερθερμόφιλους.

Σε αυτό το σημείο συμπληρώνουμε την παρατήρηση ότι οι προαναφερθείσες θερμοκρασίες δεν είναι απόλυτες και ότι το εύρος των optimum θερμοκρασιών

ανάπτυξης μπορεί να διαφέρει ή και να είναι μεγαλύτερο κατά μερικές τιμές. Επιπρόσθετα, οι θερμοκρασίες που σημειώσαμε βασίζονται σε αυτές που παρατηρήσαμε στο παραπάνω διάγραμμα.

Οι ζύμες ανήκουν κατά κύριο λόγο στην κατηγορία των μεσόφιλων μικροοργανισμών με βέλτιστο εύρος θερμοκρασιών ανάπτυξης 20-30°C (Deak, 2007), ενώ βάση μιας άλλης βιβλιογραφίας οι optimum θερμοκρασίες για αυτόν του είδους των μικροοργανισμών είναι 30-35°C (Oden). Οι ιδανικές θερμοκρασίες ανάπτυξης είναι επίσης πολύ πιθανό να διαφέρουν από είδος σε είδος ζυμών, κάτι το οποίο είναι λογικό αφού όπως θα δούμε σε επόμενο κεφάλαιο τα γένη παρουσιάζουν κάποιες διαφορές μεταξύ τους ως προς την ανθεκτικότητα σε διαφορετικούς παράγοντες όπως είναι η θερμοκρασία, το pH και το  $a_w$ .

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται ενδεικτικά κάποιες ζύμες με την αντίστοιχη μέγιστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους. Ουσιαστικά επιβεβαιώνονται οι παρατηρήσεις μας σχετικά με τις μεταβλητές θερμοκρασίες ανάπτυξης για διαφορετικές ζύμες. Για παράδειγμα η ζύμη *Leucosporidium scotti* χαρακτηρίζεται από την μέγιστη θερμοκρασία ανάπτυξης 22-24°C, ενώ στο άλλο άκρο η *Kluyveromyces marxianus* έχει ως μέγιστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 44-47°C.

*Πίνακας 3.2.2.1: Μέγιστες τιμές ανάπτυξης θερμοκρασιών ορισμένων ειδών ζυμομυκήτων (Deak, 2007). (58)*

Species	$T_{max}$ (°C)
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	44–47
<i>Candida glabrata</i>	43–46
<i>Candida albicans</i>	42–46
<i>Issatchenkia orientalis</i>	42–45
<i>Pichia guilliermondii</i>	38–43
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	31–39
<i>Pichia anomala</i>	35–37
<i>Yarrowia lipolytica</i>	33–37
<i>Debaryomyces hansenii</i>	32–37
<i>Candida zeylanoides</i>	32–34
<i>Candida vini</i>	27–31
<i>Leucosporidium scottii</i>	22–24

Σε θερμοκρασίες χαμηλότερες απ' αυτών των ιδανικών τιμών, εμφανίζουν κατά κανόνα δραματική μείωση στον ρυθμό ανάπτυξης ενώ σε θερμοκρασίες κάτω των 10°C πρακτικά αναστέλλεται ο πολλαπλασιασμός των ζυμομυκήτων (Oden). Οι εξαιρέσεις σε αυτόν τον κανόνα αποτελούν ζύμες με ψυχρότροφο χαρακτήρα και οι οποίες είναι ικανές να αναπτυχθούν σε θερμοκρασίες γύρω από τους 0°C ή και σε κάποιες περιπτώσεις κάτω από τους 0°C. Οι ζύμες αυτές με την ψυχρότροφη συμπεριφορά είναι στην πλειοψηφία τους τα στελέχη *Yarrowia lipolytica*, *Debaryomyces hansenii* και *Pichia membranifaciens* (Dean, 2007). Επιπλέον, είχε βρεθεί πως και στελέχη του γένους *Rhodotorula* έχουν την ευχέρεια να αναπτυχθούν σε θερμοκρασίες αντίστοιχες με αυτές των οικιακών ψυγείων (Μπαλατσούρας, 2006).

Από την άλλη μεριά, σε θερμοκρασίες ανώτερες από αυτών των ιδανικών τιμών, πάλι ο ρυθμός ανάπτυξης των ζυμομυκήτων επιβραδύνεται αισθητά και σε θερμοκρασίες άνω των 40°C αναστέλλεται ο πολλαπλασιασμός τους. Σε θερμοκρασίες μάλιστα, άνω των 50°C τα κύτταρα των ζυμών δεν μπορούν να επιβιώσουν και πεθαίνουν (Oden). Και στην περίπτωση αυτή των υψηλότερων θερμοκρασιών υπάρχει μια πολύ περιορισμένη ομάδα ζυμών που μπορούν να πολλαπλασιαστούν σε θερμοκρασίες άνω το 40°C. Σε αυτή την ομάδα που εξαιρείται από τον κανόνα ανήκουν τα στελέχη *Hansenula polymorpha*, *Geotrichum capitatum*, *Saccharomyces cerevisiae* και τα είδη των *Candida* και *Debaryomyces*. Η ζύμη πάντως με την μεγαλύτερη ανοχή στην θερμοκρασία είναι η *Kluyveromyces* και έχει

αναφερθεί συγκεκριμένα για ένα στέλεχος της το *Kluyveromyces marxianus*, πως απομονώθηκε από ζυμωμένη μελάσσα και κατάφερε να αναπτυχθεί μέχρι τους 48°C (Hughes, et al., 1984), ενώ κάποια άλλα στελέχη επιβίωσαν και επίσης αναπτύχθηκαν στην θερμοκρασία των 52°C (Banat&Marchant, 1995).

Μια ακόμα αξιοσημείωτη παρατήρηση είναι ότι η ελάχιστη θερμοκρασία ανάπτυξης των ζυμομυκήτων επηρεάζεται από το διάλυμα στο οποίο βρίσκονται. Πιο αναλυτικά, όσο μειώνεται η ενεργότητα ύδατος στο περιβάλλον όπου αναπτύσσεται η ζύμη τόσο αυξάνεται και η ελάχιστη θερμοκρασία ανάπτυξης της. Επιπλέον, όσο αυξάνονται οι συγκεντρώσεις ζάχαρης ή αλατιού στα διαλύματα τόσο αυξάνεται και η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης των ζυμών (Deak, 2007).

### 3.2.3. ΤΙΜΕΣ pH

Μέχρι τώρα έχουμε αναλύσει πώς επηρεάζεται η ανάπτυξη των ζυμομυκήτων στο περιβάλλον ενός τροφίμου συναρτήσει των παραγόντων ως ενεργότητας ύδατος ( $a_w$ ), σε συνδυασμό με την παρουσία σακχάρων ή αλατος, και της θερμοκρασίας. Ακόμη ένας σημαντικός παράγοντας που καθορίζει την πορεία ανάπτυξης των ζυμών σε ένα τρόφιμο είναι η τιμή του pH του.

Αρχικά, οι ζύμες παρουσιάζουν μια προτίμηση να αναπτύσσονται σε ελαφρώς όξινο περιβάλλον, ενώ ταυτόχρονα φαίνεται να είναι ιδιαίτερα ανεκτικές σε ένα μεγάλο σχετικά εύρος τιμών pH. Δηλαδή μπορούν να αναπτυχθούν εύκολα σε pH μεταξύ 3,0 και 8,0 (Deak, 2007), ωστόσο οι optimum τιμές pH βάσει ορισμένων βιβλιογραφιών είναι μεταξύ των τιμών 4,0-4,5 (Bullerman, 2003), 4,5-5,5 (Deak, 2007), 5,5-6,0 (Bullerman, 2003). Αυτό που θα μπορούσαμε να συμπεράνουμε με σιγουριά από τις παραπάνω τιμές είναι πως τελικά το optimum pH των ζυμομυκήτων κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 4,5 και 6,0. Επιπρόσθετα, πέραν αυτού του εύρους τιμών, δηλαδή σε pH μικρότερο του 3,7 και μεταξύ 7 και 8 (Μπαλατσούρας, 2006), η ανάπτυξη των ζυμών φαίνεται να είναι πιο περιορισμένη. Γενικότερα, όμως, εμφανίζουν καλύτερη ανάπτυξη σε ένα όξινο περιβάλλον παρά σε ένα αλκαλικό (Deak, 2007).

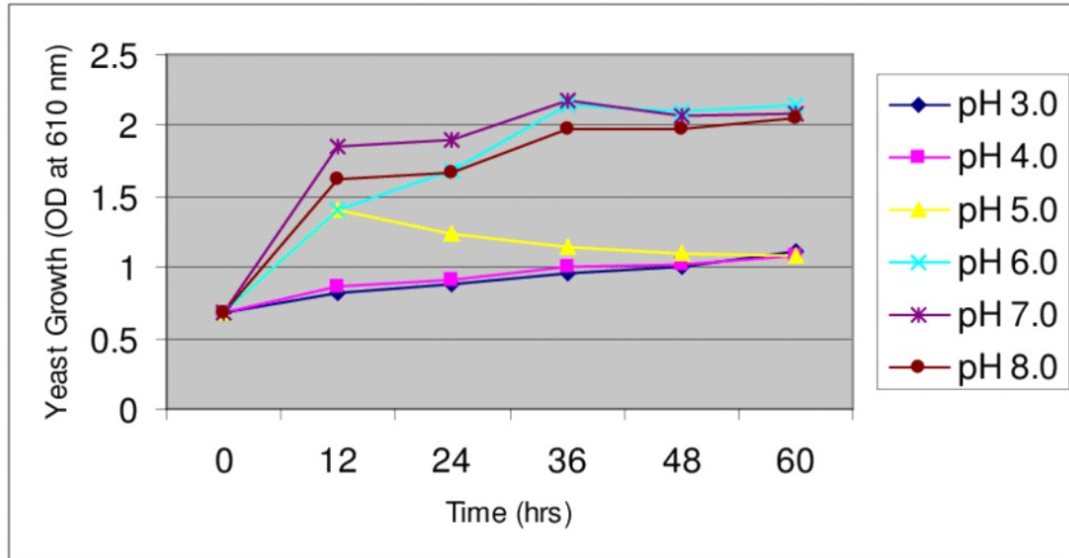
Είναι απαραίτητο να τονιστεί πως σε pH μικρότερο από 2,8, ενώ η ανάπτυξη των ζυμών αδρανοποιείται, η μεταβολική τους δραστηριότητα παραμένει ενεργή, απλά



πραγματοποιείται σε αργό ρυθμό (Bayrock, 2019). Παρόλα αυτά υπάρχουν ορισμένα οξεόφιλα στελέχη που έχουν καταφέρει να παρουσιάσουν σημάδια ανάπτυξης σε ακραίες τιμές pH, ήτοι 1,3 με 1,7, σύμφωνα με τον Pitt (1974). Τα στελέχη αυτά είναι συγκεκριμένα τα *Issatchenkia orientalis*, *Pichia membranifaciens*, *Dekkera intermedia* και *Kazachstania exiguus*. Το γεγονός όμως ότι τα στελέχη αυτά παρουσιάζουν τέτοια ανοχή στην οξύτητα αποδίδεται στην ύπαρξη συγκεκριμένων οξέων στα διαλύματα. Με βάση την βιβλιογραφία η παρουσία ανόργανων οξέων στα διαλύματα δρα λιγότερο ανασταλτικά στην ανάπτυξη των ζυμομυκήτων σε σχέση με τα οργανικά οξέα, ενώ από τα τελευταία το οξικό οξύ θεωρείται ο πιο ανασταλτικός παράγοντας από όλα τα οξέα (Moon, 1983 και Debevere, 1987).

Όσον αφορά τα αλκαλικά περιβάλλοντα, όπως προαναφέραμε, η ανάπτυξη ζυμών είναι κατά κανόνα περιορισμένη. Για παράδειγμα τα γένη ζυμών *Brettanomyces*, *Saccharomyces* και *Schizosaccharomyces* δεν μπορούν να αναπτυχθούν σε pH μεγαλύτερο από 8,0. Και εδώ όμως υπάρχουν ορισμένα στελέχη όπου χαρακτηρίζονται ως ιδιαίτερα ανθεκτικά στις αλκαλικές περιοχές pH. Επομένως, σύμφωνα με τον Aono (1990) υπάρχουν Βασιδιομύκητες όπως οι *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula minuta* και *Cryptococcus laurentii*, όπου η ανεκτικότητα τους σε αλκαλικά περιβάλλοντα μπορεί να επιτρέψει την ανάπτυξη τους σε τιμές pH μεγαλύτερες του 10,0.

Το παρακάτω διάγραμμα απεικονίζει διάφορες καμπύλες ανάπτυξης των ζυμομυκήτων, παρουσία διαλυμένου οξυγόνου (oxygen dissolved-OD), συναρτήσεως του χρόνου για κάποιες ορισμένες τιμές pH. Παρατηρούμε ότι σε τιμές pH 5,0, 6,0, 7,0 και 8,0 ο πληθυσμός των ζυμομυκήτων παρουσιάζει αισθητή ανάπτυξη ενώ για τις τιμές 3,0 και 4,0 η ανάπτυξη είναι λίγο πιο περιορισμένη.



Γράφημα 3.2.3.1: Καμπύλες ανάπτυξης ζυμών συναρτήσει του χρόνου (σε ώρες) για τιμές pH 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0 (Miah, 2014).

Οι κατηγορίες τροφίμων, επομένως, που προκαλούν αλλοίωση οι ζύμες είναι τα φρούτα καθώς και οι χυμοί φρούτων, διάφορα προϊόντα τομάτας, ζυμωμένες ελιές και τουρσιά, κρέατα σε άλμη, λουκάνικα, σαλάμια κτλ. Γενικότερα, δεν προκαλούν αλλοίωση σε τρόφιμα που δεν υφίστανται γαλακτική ζύμωση, όπως είναι το φρέσκο κρέας, τα ψάρια και τα όσπρια (Μπαλατσούρας, 2006).

Αξιοσημείωτες είναι επίσης και οι μεταβολές που προκύπτουν στις τιμές pH που προτιμούν οι ζύμες για την ανάπτυξη τους, όταν επεμβαίνουν οι παράγοντες της θερμοκρασίας, της ενεργότητας ύδατος και την περιεκτικότητας σε αλάτι. Πιο αναλυτικά, ύστερα από εφαρμογές πειραμάτων, όταν η θερμοκρασία του περιβάλλοντος μειώθηκε στους 8°C παρατηρήθηκε αύξηση του ελάχιστου pH ανάπτυξης από τις 2,5 μονάδες στις 3,0-3,5 (Betts, et al., 1999). Όσον αφορά, την ενεργότητα ύδατος, προέκυψε ότι με την  $a_w$  αυξήθηκε η επίδραση του pH στον περιορισμό της ανάπτυξης των ζυμών (Deak, 2007). Τέλος, με την αύξηση της συγκέντρωσης άλατος στο διάλυμα, το εύρος των τιμών pH για την βέλτιστη ανάπτυξη των ζυμών μειώνεται. Για παράδειγμα το εύρος pH 3,5-5,5 περιορίζεται στις τιμές 3,5-4,5 (Betts, et al., 1999).

### 3.2.4. ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΟΞΥΓΟΝΟΥ

Ένας τελευταίος παράγοντας που θα αναφέρουμε σ' αυτήν πτυχιακή μελέτη και που σχετίζεται με την ανάπτυξη των ζυμών, είναι η παρουσία του οξυγόνου. Ο συγκεκριμένες όμως παράγοντας, όπως θα δούμε στην συνέχεια, δεν επηρεάζει τόσο την ανάπτυξη των ζυμών αυτή καθ' αυτή αλλά τα προϊόντα του μεταβολισμού τους.

Για να γίνουμε πιο κατανοητοί, θα αναφέρουμε αρχικά πως οι ζύμες κατατάσσονται σε τρεις (3) κατηγορίες (Μπλατσούρας, 2006) ανάλογα με τις απαιτήσεις τους σε οξυγόνο:

- τις αυστηρές αερόβιες, δηλαδή τις οξειδωτικές ζύμες
- τις κατά βάση οξειδωτικές
- τις κατά βάση ζυμωτικές

Όταν χρησιμοποιούμε τον όρο ζυμωτική ζύμη εννοούμε πως κάτω από συνθήκες με περιορισμένο ή και καθόλου οξυγόνο, πραγματοποιείται αλκοολική ζύμωση των σακχάρων (κυρίως γλυκόζη) από τους ζυμομύκητες, με κύρια προϊόντα αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα ( $\text{CO}_2$ ). Από την άλλη, όταν αναφέρουμε ότι οι ζύμες είναι οξειδωτικές εννοούμε πως παρουσία οξυγόνου οι ζύμες δεν ζυμώνουν τα σάκχαρα παρά τα διασπούν οξειδωτικά σε  $\text{CO}_2$  και νερό ( $\text{H}_2\text{O}$ ). Οι χημικές αντιδράσεις των παρακάτω διεργασιών είναι διατυπωμένες στο κεφάλαιο «ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΖΥΜΩΝ» στην σελίδα 18.

Επομένως, ο παραπάνω διαχωρισμός βασίστηκε στα εξής στοιχεία: ότι υπάρχουν ζύμες που μπορούν να αναπτυχθούν μόνο κάτω από αυστηρώς αερόβιες συνθήκες και συνεπώς μπορούν να πραγματοποιηθούν αποκλειστικά οξειδωτικό μεταβολισμό. Επιπλέον, υπάρχουν οι κατά βάση οξειδωτικές ζύμες οι οποίες πραγματοποιούν οξειδωτικό μεταβολισμό, αλλά σε συνθήκες με περιορισμένο οξυγόνο ζυμώνουν τα σάκχαρα προς αιθανόλη και  $\text{CO}_2$ . Τέλος, υπάρχουν και οι κατά βάση ζυμωτικές ζύμες οι οποίες αναπτύσσονται κυρίως σε συνθήκες με περιορισμένο οξυγόνο εκτελώντας αλκοολική ζύμωση, ενώ υπό καθαρά αερόβιες συνθήκες μεταβολίζουν τα σάκχαρα οξειδωτικά.

Συμπεραίνουμε, λοιπόν, από τα παραπάνω και σε συνδυασμό με την πληροφορία ότι οι ζυμομύκητες πραγματοποιούν στην πλειοψηφία τους οξειδωτικό

μεταβολισμό(Μπαλατσούρας, 2006), ότι οι ζύμες είναι μικροοργανισμοί αερόβιοι. Επιπρόσθετα, οι ζύμες και ανάμεσα τους τα γένη *Cryptococcus* και *Rhodotorula*, είναι αυστηρά μη ζυμωτικές αναερόβιες, ενώ καμία δεν είναι αυστηρώς αναερόβια (Deak, 2007).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η συμπεριφορά της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae* η οποία μπορεί να αναπτυχθεί κάτω από αναερόβιες συνθήκες (EuropeanCommission), ενώ σε περιβάλλον με περιορισμένο οξυγόνο είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι μπορεί και αναπτύσσεται με ταχύ ρυθμό (Visser, etal., 1990).

### **3.3. ΒΑΣΙΚΕΣ ΖΥΜΕΣ ΑΛΛΟΙΩΣΗΣ ΣΤΗΝ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

Τα είδη ζυμών που προκαλούν αλλοιώσεις στα τρόφιμα και δυσχεραίνουν το έργο των επιστημόνων τροφίμων είναι πολλά και διαφορετικά, αναλόγως τις συνθήκες που επικρατούν όπως οι συνθήκες αποθήκευσης, το pH του τροφίμου, η επεξεργασία που υφίσταται αλλά και η σύσταση του ίδιου του τροφίμου γενικότερα. Στην παρακάτω εικόνα φαίνονται κάποιοι αρκετά σημαντικοί ζυμομύκητες που προκαλούν αλλοιώσεις και μολύνσεις στην βιομηχανία των τροφίμων.

*Πίνακας 3.3.1: Ζύμες μόλυνσης και αλλοίωσης που απομονώθηκαν από τρόφιμα και ποτά (Crawford, 2014).*

Most frequent contaminants <sup>a</sup> (Deak and Beuchat, 1996)	Spoilage species (Pitt and Hocking, 1985)	Additional spoilage species (Tudor and Board, 1993)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Brettanomyces intermedius</i> <sup>b</sup>	<i>Candida dattila</i>
<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Candida holmii</i>	<i>Candida globosa</i>
<i>Pichia anomala</i>	<i>Candida krusei</i>	<i>Candida humicola</i>
<i>Pichia membranifaciens</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Candida lactis-condensi</i>
<i>Rhodotorula glutinis</i>	<i>Kloeckera apiculata</i>	<i>Candida lipolytica</i>
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Pichia membranifaciens</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>Torulasporea delbrueckii</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Candida sake</i>
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	<i>Candida versatilis</i>
<i>Issatchenkia orientalis</i>	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	<i>Candida zeylanoides</i>
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	<i>Cryptococcus</i> spp.
<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	<i>Hansenula anomala</i>
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>		<i>Hansenula subpelliculosa</i>
<i>Candida guilliermondii</i>		<i>Kluyveromyces marxianus</i>
<i>Candida albidus</i>		<i>Pichia burtonii</i>
<i>Candida tropicalis</i>		<i>Pichia fermentans</i>
<i>Saccharomyces exiguus</i>		<i>Sporobolomyces roseus</i>
<i>Pichia fermentans</i>		<i>Torulasporea delbrueckii</i>
<i>Trichosporon pullulans</i>		<i>Trichosporon cutaneum</i>
<i>Hanseniaspora uvarum</i>		<i>Trycosporum pullulans</i>
<i>Candida zeylanoides</i>		

<sup>a</sup> Species presented by decreasing level of occurrence.

<sup>b</sup> Anamorph of *D. bruxellensis*.

Στο παρόν κεφάλαιο θα αναφέρουμε και θα αναλύσουμε ορισμένα μόνο είδη ζυμομυκήτων τα οποία όμως είναι πολύ σημαντικά και συναντώνται περισσότερο σε επιστημονικά άρθρα που αφορούν αλλοιώσεις τροφίμων από ζύμες.

### 3.3.1 ΖΥΜΕΣ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ *Zygosaccharomyces*

Οι ζύμες του γένους *Zygosaccharomyces* θεωρούνται από τις πιο διαδεδομένες ζύμες αλλοίωσης στην βιομηχανία των τροφίμων, λόγω της μεγάλης αντοχής που παρουσιάζουν σε δυσχερείς για μικροοργανισμούς περιβαλλοντικές συνθήκες, επιφέροντας με αυτόν τον τρόπο μεγάλες οικονομικές απώλειες ακόμα και μείωση του εφοδιασμού τροφίμων παγκοσμίως (Correia, et al., 2014).

Στο σύνολό τους, τα στελέχη τους γένους *Zygosaccharomyces* έχουν χαρακτηριστεί ως εξαιρετικά ωσμόφιλα, αφού μπορούν και αναπτύσσονται σε τρόφιμα με περιεκτικότητα σε γλυκόζη έως και 70%, ενώ μερικά άλλα στελέχη έχουν παρουσιάσει δείγματα ανάπτυξης σε περιεκτικότητα γλυκόζης μεγαλύτερη από 90% w/v. Συμπεραίνουμε, επομένως ότι είναι και αρκετά ξηρόφιλοι μικροοργανισμοί.

Επιπλέον, επιβιώνουν και αναπτύσσονται σε περιβάλλοντα με χαμηλό pH, υψηλή περιεκτικότητα άλατος, καθώς και με παρουσία οξέων και αιθανόλης (Correia, et al., 2014).

Τα τρόφιμα που παρουσιάζουν πιο συχνά αλλοίωση από τις συγκεκριμένες ζύμες είναι κατά κύριο λόγο επεξεργασμένα τρόφιμα. Μερικά ενδεικτικά παραδείγματα ευάλωτων επεξεργασμένων τροφίμων είναι οι χυμοί φρούτων και τα ζαχαρωμένα φρούτα, σάλτσες σαλάτας και σάλτσες ντομάτας, κέτσαπ, σιπόπια ζάχαρης, μαρμελάδες και κονσέρβες, καθώς και κρασιά και ανθρακούχα αναψυκτικά (Escott, et al., 2018).

Τα είδη *Zygosaccharomyces* που αποτελούν την σοβαρότερη απειλή για την κατηγορία των επεξεργασμένων τροφίμων είναι το *Zygosaccharomyces rouxii*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Zygosaccharomyces bisporus* και *Zygosaccharomyces lentus*. Στην συνέχεια θα αναλύσουμε τα χαρακτηριστικά του κάθε είδους με την σειρά όπως τα αναφέρουμε.

### **3.3.1.1 *Zygosaccharomyces rouxii***

Το *Zygosaccharomyces rouxii* είναι ένας ιδιαίτερα ωσμόφιλος ζυμομύκητας, αφού αναπτύσσεται σε πολύ υψηλά επίπεδα σακχάρων (έως και πάνω από 90% w/v), ενώ φαίνεται να παρουσιάζει μια ιδιαίτερη προτίμηση στην κατανάλωση φρουκτόζης έναντι της γλυκόζης. Για αυτό χαρακτηρίζεται και ως φρουκτοφιλική ζύμη (Escott, et al., 2018). Μάλιστα, μπορεί και αναπτύσσεται άριστα σε τιμή  $a_w$  μέχρι 0,62 σε περιβάλλον με φρουκτόζης (Stratford&Capell, 2003). Είναι, συνεπώς, και ένας εξαιρετικά ξηρόφιλος μικροοργανισμός.

Τρόφιμα τα οποία είναι ευάλωτα στον *Zygosaccharomycesrouxii* είναι οι συμπυκνωμένοι χυμοί, κυρίως κεράσι και πορτοκάλι, αλλά και τονωτικά ροφήματα. Έχει αναφερθεί η ύπαρξη του συγκεκριμένου ζυμομύκητα ύστερα από συντήρηση 16 μηνών συμπυκνωμένου χυμού στην θερμοκρασίας των -18°C (Escott, et al., 2018).

Άλλη μια ιδιότητα του *Zygosaccharomyces rouxii* είναι η αυξημένη ζυμωτική του δύναμη. Δηλαδή παρουσία υψηλής συγκέντρωσης σακχάρων, ύστερα από την αλλοίωση του τροφίμου παράγεται περίσσεια αερίων, με αποτέλεσμα την διόγκωση της συσκευασίας. Πολλές φορές η περίσσεια αυτή αερίου οδηγεί στην καταστροφή της συσκευασίας, δηλαδή στο σπάσιμο φιαλών γυαλιού (Escott, et al., 2018).

Όσον αφορά κάποιες άλλες παραμέτρους, εμφανίζει εξαιρετική ανεκτικότητα σε χαμηλές τιμές pH. Πιο συγκεκριμένα, έχει σημειωθεί να αναπτύσσεται σε τιμή pH 2,2 με την χαμηλότερη να φτάνει σε pH 1,8 (Martorell, et al., 2007, Gordon&Wolfe, 2008). Αυτός είναι και ο λόγος που είναι η κύρια αιτία αλλοίωσης του συμπυκνωμένου χυμού σταφυλιού που είναι ιδιαίτερα όξινος.

Μεγάλη ανεκτικότητα παρουσιάζει και σε υψηλές συγκεντρώσεις άλατος, ήτοι 20% w/v (Hosono, 1992), ωστόσο όμως δεν είναι τόσο ανθεκτικό στα διάφορα συντηρητικά που χρησιμοποιούνται στα τρόφιμα και στις συνθήκες παστερίωσης είναι αρκετά ευάλωτα (Stratford&Capell, 2003).

Δύο ακόμα περιστατικά στα οποία επίσης απομονώθηκε το *Zygosaccharomycesrouxii* είναι αλλοίωση κρασιού με ταυτόχρονη παραγωγή CO<sub>2</sub>(Morata&Loira, 2017)καθώς και σε ζύδι βαλσάμικο (Solieri, 2021).

### **3.3.1.2 *Zygosaccharomyces bailii***

Ο *Zygosaccharomyces bailii* είναι ένας μικροοργανισμός που χαρακτηρίζεται ως μια από τις πιο επιθετικές ζύμες αλλοίωσης (Nurzhan, et al., 2017). Όντας ανεκτική στις υψηλές συγκεντρώσεις ζάχαρης και ως ο πιο ανθεκτικός στα συντηρητικά οργανισμός (Stratford&Capell, 2003), μπορεί και αναπτύσσεται σε ποικίλα έτοιμα προϊόντα όπως είναι η μαγιονέζα, οι σάλτσες και οι σάλτσες σαλάτας, η ketchup, η μουστάρδα, τα τουρσιά, τα ανθρακούχα ποτά και μερικά κρασιά (Correia, et al., 2014).

Ο *Zygosaccharomyces bailii* παρουσιάζει αξιοσημείωτη αντίσταση στην παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων συντηρητικών όπως είναι το οξικό οξύ, ενώ σε συνθήκες όπως είναι το pH του τροφίμου είναι περίπου 4,0 αναπτύσσεται παρά την ύπαρξη σορβικού και βενζοϊκού οξέος σε ποσότητα έως και 1000 ppm. Η ποσότητα ωστόσο αυτών των συντηρητικών, δεν υπάρχει περίπτωση να εφαρμοστεί στο τρόφιμο, αφού βάσει του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1333/2008 που αφορά τα πρόσθετα τροφίμων δεν πρέπει να περιέχονται σε ποσότητα μεγαλύτερη από 300mg/Kg.

Προϊόντα που αλλοιώνει η συγκεκριμένη ζύμη και τα οποία συντηρούνται με οξικό οξύ, είναι τα τουρσιά κρεμμυδιού, πατζαριού, κόκκινου λάχανου και αγγουριού. Ως αποτέλεσμα της αλλοίωσης των προαναφερθέντων τροφίμων

παράγεται αέριο και αναδύεται μια οσμή θειώδους, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις σχηματίστηκαν κρεμώδη καφέ ιζήματα (Tudor&Board, 1993).

Επιπλέον, λόγω της ανθεκτικότητας στο σορβικό οξύ προκαλεί αλλοιώσεις σε κρασιά στα οποία δεν εφαρμόζεται αποστείρωση για την σταθεροποίηση τους. Συμπληρωματικά, είναι ιδιαίτερα ανεκτικά και στο διοξείδιο του θείου που χρησιμοποιείται στα κρασιά (Kunkee&Bisson, 1993).

Από τα παραπάνω, πέρα και από τα δεδομένα που συγκεντρώνουμε από την βιβλιογραφία, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι ο *Zygosaccharomyces bailii* χαρακτηρίζεται και από μεγάλη ανοχή στην οξύτητα, αφού αναπτύσσεται σε παρουσία οξέος 1% (Kunkee&Bisson, 1993).

Όσον αφορά τα τρόφιμα με υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα, οι Martorell, Stratford et al (2007) αναφέρουν πως ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός για να αναπτυχθεί θέλει ενεργότητα ύδατος τουλάχιστον 0,85 και πως είναι αδύνατον να αναπτυχθεί σε σιρόπια ζάχαρης και ζαχαρωμένων φρούτων. Αντίθετα, οι M. Stratford και C.J. Capell, σε σχετικό τους κείμενο για την αλλοίωση τροφίμων από ζυμομύκητες, σημειώνουν πως αναπτύσσεται πολύ καλά σε συγκεντρώσεις ζάχαρης ακόμα και σε ποσοστό 50-60%. Το μόνο σίγουρο όμως είναι ότι για να επιτευχθεί μόλυνση του τροφίμου ή μιας ά ύλης επαρκεί μια χαμηλή μολυσματική δόση, λόγω χάρη ένα κύτταρο ανά συσκευασμένο τρόφιμο (Stratford&Capell, 2003).

### **3.3.1.3. *Zygosaccharomyces bisporus***

Το *Zygosaccharomyces bisporus*, σε αντίθεση με τους άλλους δύο προαναφερθέντες ζυμομύκητες, δεν χαρακτηρίζεται τόσο για την αντοχή του σε τρόφιμα με υψηλή περιεκτικότητα σε αλάτι καθώς είναι μέτρια αλόφιλο (Sharma&Sharma, 2017). Μάλιστα σύμφωνα με τους Dakal et al (2014), η συγκεκριμένη ζύμη αναπτύσσεται με δυσκολία σε συγκεντρώσεις άλατος που ξεπερνούν τα 2,0 M.

Είναι όμως παρόλα αυτά, ιδιαίτερα ωσμόφιλο και σε συνδυασμό με την ανθεκτικότητα του στις χαμηλές θερμοκρασίες, στις χαμηλές τιμές pH και ενεργότητας ύδατος, καθώς και στα συντηρητικά μπορεί και αναπτύσσεται σε διάφορες κατηγορίες προϊόντων. Πιο αναλυτικά, έχει απομονωθεί από προϊόντα όπως



είναι το ζαχαροκάλαμο το ακατέργαστο, μέλι και μαρμελάδες μέχρι πίκλες, χυμούς και ζελέ( Deak and Beuchat, 1993, Stratford, 2006, James and Stratford).

Συμπληρωματικά, όσον αφορά την αντοχή του *Zygosaccharomyces bisporus* στα συντηρητικά αυτά φαίνεται μεν να αναπτύσσεται και να πολλαπλασιάζεται παρουσία βενζοϊκών και σορβικών οξέων, αλλά μεγαλύτερη ανθεκτικότητα έχει όταν στο τρόφιμο περιέχεται οξικό οξύ (Fleet, 2011, Ralph E. et al. 1993).

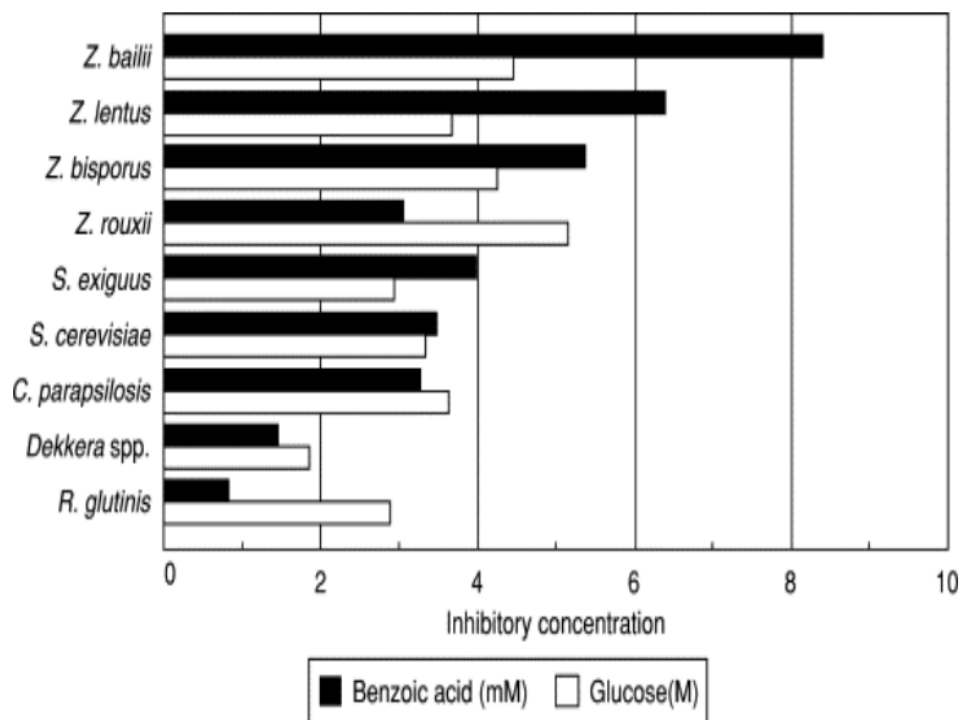
#### **3.3.1.4. *Zygosaccharomyces lentus***

Μια ακόμη ζύμη του γένους *Zygosaccharomyces* που απασχολεί την επιστημονική κοινότητα, είναι το *Zygosaccharomyces lentus*. Η συγκεκριμένη ζύμη παρουσιάζει το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό ότι αναπτύσσεται ιδιαίτερα αργά και ιδιαίτερα εύκολα σε θερμοκρασία ψυγείου, ήτοι στους 4°C (Steels, et al., 1999). Επομένως, αλλοιώνει τρόφιμα όπως για παράδειγμα χυμούς φρούτων και αναψυκτικά που συντηρούνται στο ψυγείο (Stratford & Capell, 2003). Τα συγκεκριμένα τρόφιμα, επίσης, ανήκουν στην κατηγορία των προϊόντων που έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα, το οποίο αποδεικνύει και ότι ο *Zygosaccharomyces lentus* είναι ωσμόφιλος μικροοργανισμός (Steels, et al., 1999).

Επιπλέον, η ζύμη αυτή έχει απομονωθεί και από κατεψυγμένα προϊόντα (Correia, et al., 2014), άρα συμπεραίνουμε ότι πρόκειται για ένα ψυχρότροφο οργανισμό, αφού ταυτόχρονα οι ρυθμοί ανάπτυξής του είναι πολύ χαμηλή σε θερμοκρασία άνω των 25°C (Stratford & Capell, 2003).

Τέλος, είναι και αυτή η ζύμη ιδιαίτερα ανθεκτική σε συντηρητικά τροφίμων, όπως είναι το βενζοϊκό και το σορβικό οξύ, αλλά και σε χαμηλές τιμές pH π.χ. 4,0 (Steels, et al., 1999).

Στην συνέχεια, παρουσιάζεται ένα ραβδόγραμμα που απεικονίζεται, εκτός των άλλων, η ανθεκτικότητα των τεσσάρων (4) ειδών *Zygosaccharomyces* που προαναφέραμε ως προς την γλυκόζη (λευκή ράβδος) και το συντηρητικό βενζοϊκό οξύ (μαύρη ράβδος) (Stratford & Capell, 2003).



Γράφημα 3.3.1.4.1: Η αντίσταση στο συντηρητικό βενζοϊκό οξύ και η ανεκτικότητα στην γλυκόζη ορισμένων ειδών ζυμομυκήτων (Stratford&Capell, 2003).

Συνεπώς, το *Zygosaccharomyces rouxii* παρουσιάζει την μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στην γλυκόζη, σε αντίθεση με το *Zygosaccharomyces lentus* που είναι το λιγότερο ανθεκτικό, ενώ το *Zygosaccharomyces bailii* και *Zygosaccharomyces bisporus* είναι σε ενδιάμεση κατάσταση. Από την άλλη, όσον αφορά την ανθεκτικότητα σε βενζοϊκό οξύ, το *Zygosaccharomyces rouxii* εμφανίζει την μικρότερη αντίσταση, ενώ το *Zygosaccharomyces bailii* φαίνεται να είναι το πιο ανθεκτικό με μεγάλη διαφορά. Το *Zygosaccharomyces lentus* και *Zygosaccharomyces bisporus* έχουν μεγάλη αντοχή στο συγκεκριμένο συντηρητικό, ωστόσο δεν ξεπαιρούν το *Zygosaccharomyces rouxii*.

### 3.3.2. ZYMHD***Debaryomyces hansenii***

Η ζύμη *Debaryomyces hansenii* είναι ένας μικροοργανισμός ο οποίος προσελκύει έντονα το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας. Ο πρώτος λόγος είναι ότι εμφανίζει εξαιρετικά μεγάλη αντοχή σε περιβάλλοντα με υψηλή

περιεκτικότητα σε αλάτι. Οι Raphailong και Fleet (1999) αναφέρουν στο βιβλίο «Εγκυκλοπαίδεια της Μικροβιολογίας Τροφίμων» πως ο συγκεκριμένος ζυμομύκητας αναπτύσσεται με ευκολία σε περιβάλλον με περιεκτικότητα σε NaCl 15% w/v, ενώ κάτω από πιο ευνοϊκές συνθήκες, όσον αφορά άλλες παραμέτρους, αναπτύσσεται κανονικά και σε συγκέντρωση 20-24% NaCl (w/v). Μάλιστα, η αντοχή του κατά κανόνα είναι πιο μεγάλη όταν η τιμή του pH είναι περίπου 5,0 ενώ αντίθετα σε τιμές 3,0 και 7,0 είναι μικρότερη.

Πέραν αυτού, είναι και αρκετά ωσμóφιλη ζύμη με ανθεκτικότητα ακόμα και σε 60% w/v σακχαρόζης, ενώ είναι και ιδιαίτερα ξηρόφιλη. Σε συνδυασμό επίσης με την ευκολία ανάπτυξης της σ' ένα εύρος pH μεγαλύτερο από το 3,0-10,0 (Breuer&Harms, 2006), απομονώνεται συχνά από το θαλασσινό νερό καθώς και από διάφορες κατηγορίες τροφίμων όπως τρόφιμα σε άλμη (π.χ. πίκλες), μπύρα, κρασί, τυριά, κρέας, φρούτα και χυμούς φρούτων κ.α. (Barnett, etal., 2000, Davenport, 1980, Norkrans, 1966, Tilbury, 1980).Αξίζει μάλιστα να σημειωθεί ότι είναι η ζύμη που απομονώνεται πιο συχνά από τα τυριά (Banjara, 2014).

Ένας ακόμη ενδιαφέρον παράγοντας που καθορίζει την ανάπτυξη του *Debaryomyces hansenii*, είναι η θερμοκρασία. Παρόλο που αναπτύσσεται κανονικά σε θερμοκρασίες 20-25°C, είναι ευαίσθητο στις θερμικές επεξεργασίες, ενώ αντίθετα φαίνεται να αναπτύσσεται με ταχείς ρυθμούς σε θερμοκρασίες ψυγείου, ήτοι 1-5°C. Έχει σημειωθεί, επίσης, απομόνωση του συγκεκριμένου ζυμομύκητα από τρόφιμο, στην θερμοκρασία των -12,5°C (Banjara, 2014).

Επιπρόσθετα, ο *Debaryomyces hansenii* έχει ως χαρακτηριστικό ότι αναπτύσσεται αποκλειστικά σχεδόν αεροβίως, παράγοντας έτσι CO<sub>2</sub> και νερό. Πιο αναλυτικά, ύστερα από πειράματα φαίνεται η ζύμωση της γαλακτόζης, της γλυκόζης, της σουκρόζης, της μαλτόζης κ.α. να είναι αρκετά αδύναμη, ενώ της λακτόζης δεν υφίσταται.

Τέλος, ένα ακόμα θέμα που κεντρίζει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας είναι η παθογένεια της ζύμης αυτής. Γενικότερα, οι επιστήμονες δεν κατατάσσουν τον μικροοργανισμό αυτόν στην κατηγορία των παθογόνων (Jacques and Casaregola, 2008). Έχει απομονωθεί, ωστόσο ουκ ολίγες φορές από κλινικές περιπτώσεις (Nishikawa, etal., 1996) και μάλιστα συνοδευόμενο από αναφορά για μολύνσεις στα οστά (Wong, etal., 1982), όπως είναι λόγου χάρη η οστεϊτίδα

(Mattson, etal., 1999). Αυτό έρχεται και σε αντίθεση και με την γενικότερη θεωρία, ότι οι ζύμες που αλλοιώνουν τα τρόφιμα προκαλούν προβλήματα ποιότητας και όχι ασφάλειας. Συνεπώς, κρίνεται αναγκαία να δοθεί περισσότερο προσοχή και να διεξαχθούν μελέτες πάνω σε αυτό το θέμα της παθογένειας του ζυμομύκητα αυτού.

### **3.3.3. ZYMH *Pichia membranifaciens***

Η ζύμη *Pichia membranifaciens* είναι από τους μικροοργανισμούς που δεν έχει δοθεί η απαραίτητη προσοχή από την επιστημονική κοινότητα και δεν έχουν διεξαχθεί οι απαιτούμενες μελέτες, παρ' όλο που πρόκειται για ένα κοινό είδος αλλοίωσης τροφίμων. Από τις πληροφορίες ωστόσο που έχουμε συγκεντρώσει από την βιβλιογραφία συμπεραίνουμε ότι είναι ένας ζυμομύκητας ο οποίος προκαλεί προβλήματα στην βιομηχανία του οίνου κατά κύριο λόγο.

Πιο συγκεκριμένα, παράγει οργανικά οξέα (MycCosm) και φαινόλες, οι οποίες φαινόλες όταν βρίσκονται σε μεγάλη ποσότητα έχουν ως αποτέλεσμα την δημιουργία δυσάρεστων οσμών (Saez, etal., 2011). Πέραν, όμως, των παραπάνω ενώσεων, στους επιτραπέζιους οίνους παράγει επιπλέον ακεταλδεΐδη, οξικό αιθυλεστέρα και οξικό ισοαμύλιο (Rankine, 1966).

Γενικότερα, η *Pichia membranifaciens* παρουσιάζει σημαντική ανοχή στην αιθανόλη, αφού φαίνεται να επιβιώνει σε περιβάλλον με συγκέντρωση αιθανόλης έως και 11% (Lachance, 1995). Επιπλέον, μπορούν και επιβιώνουν των θερμικών επεξεργασιών στην βιομηχανία των τροφίμων, λόγω των ασκοσπορίων που σχηματίζουν ορισμένες φορές και κατά αυτό τον τρόπο προκαλούν οικονομικές απώλειες (Veiga&Madeira-Lopes, 2000).

### **3.3.4. ZYMEΣ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ *Torulopsis***

Οι ζύμες του γένους *Torulopsis* απασχολούν ιδιαίτερα τον κλάδο της βιομηχανίας τροφίμων που σχετίζεται με την επεξεργασία φρούτων, τους χυμούς φρούτων καθώς και τα αναψυκτικά. Ο λόγος που συμβαίνει αυτό είναι ότι οι ζυμομύκητες αυτοί χαρακτηρίζονται ως αρκετά ωσμόφιλοι. Μάλιστα, οι ζύμες *Torulopsis glabrata*, *Torulopsis versatilis* και *Torulopsis haemuloni* απομονώθηκαν από περιβάλλοντα με 60% γλυκόζη (Hommel, 2014). Το *Torulopsis glabrata*

συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί ως η αιτία μυκητιάσεων σε ανοσοκατεσταλμένους και εξασθενημένους οργανισμούς (Hommel, 2014), ενώ ευθύνεται και για την παραγωγή αιθανόλης σε βρεφικές τροφές και ποτά τύπου κόλα.

Επιπρόσθετα, υπάρχουν και ξηρόφιλες ζύμες του γένους *Torulopsis*. Ένας από τους βιότοπους τους είναι και τα έντομα. Μέσω των μελισσών και άλλων νεκταρόφιλων εντόμων, μεταφέρονται στα ανθικά νέκταρ και ως εκ τούτου μολύνονται οι εγκαταστάσεις επεξεργασίας σιροπιών ζάχαρης, μελιού κτλ. Κάτι που αξίζει να σημειωθεί είναι πως η μικροχλωρίδα των ζυμών του καρπού και του μετέπειτα προϊόντος του καρπού είναι πάντα παρόμοια. Επομένως, η ποσότητα των ζυμών που θα βρεθεί στο προϊόν αντιπροσωπεύει και την υγιεινή του εργοστασίου και αποδεικνύει αν τα προληπτικά μέτρα ασφάλειας των τροφίμων είναι εν τέλει λειτουργικά (Hommel, 2014).

Πέρα των παραπάνω, ορισμένα είδη του γένους *Torulopsis* απομονώνονται τόσο από τον χώρο της ζυθοποιίας όσο και από τις ίδιες τις παραγόμενες μύρες, προκαλώντας θολώσεις. Πιο αναλυτικά, το *Torulopsis spandorensis* έχει απομονωθεί αρκετές φορές από δείγματα της Γερμανικής μύρας Pilsner. Επιπλέον, και το *Torulopsis colliculosa* προκαλεί θολώματα στην μύρα όπως και το *Torulopsis incospicua*, που είναι λοιμώδης μικροοργανισμός, χαρακτηριστικό σπάνιο για ζύμες, και το οποίο μάλιστα κυριαρχεί στο Ηνωμένο Βασίλειο. Τέλος, το 49% περίπου των ζυμομυκήτων που απομονώθηκαν από ένα ζυθοποιείο στο Βέλγιο, άνηκε στο γένος *Torulopsis* (Hommel, 2014).

Ένα τελευταίο, επίσης, ιδιαίτερο χαρακτηριστικό που θα αναφέρουμε για το συγκεκριμένο είδος ζυμών είναι ότι όταν βρίσκεται σε περιβάλλον όπου επικρατούν αερόβιες συνθήκες, έχει την ικανότητα να μειώνει την συγκέντρωση οξέος αφομοιώνοντάς την και ως εκ τούτου να αυξηθεί το pH, δίνοντας έτσι το περιθώριο σε άλλα βακτήρια να αναπτυχθούν και να αλλοιώσουν το τρόφιμο (Hommel, 2014).

### **3.3.5. ΖΥΜΕΣ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ *Brettanomyces* ΚΑΙ *Dekkera***

Σε αντίθεση με τον τρόπο που αναφέραμε τα πρηγούμενα είδη και γένη ζυμών, εδώ θα αναφέρουμε τον *Brettanomyces* και τον *Dekkera* μαζί. Ο λόγος που γίνεται αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι αυτές οι δύο ζύμες συνδέονται μεταξύ τους, καθώς η

ζύμη *Dekkera* θεωρείται η ασκοσποριογόμος σεξουαλική μορφή του *Brettanomyces* (Jimenez, et al., 1999), σύμφωνα με πολλούς ερευνητές. Γενικότερα, οι δύο αυτές ζύμες προκαλούν αλλοιώσεις σε χυμούς φρούτων και αναψυκτικά λόγω της ανθεκτικότητάς τους σε χαμηλές τιμές pH και ικανότητας τους να ζυμώνουν την μεγάλη ποσότητα σακχάρων που περιέχουν. Τις περισσότερες, ωστόσο, οικονομικές καταστροφές τις έχει προκαλέσει στη βιομηχανία του οίνου.

Γενικότερα, τα *Brettanomyces* και *Dekkera* έχουν ανιχνευτεί σε οίνους και οινοποιεία από όλο τον κόσμο ανεξαιρέτως, ακόμα και από τις μεγαλύτερες οινοπαραγωγικές χώρες (Oelofse et al, 2008, Wedral et al, 2010). Το κύριο περιβάλλον στο οποίο αναπτύσσονται είναι εμφανωμένοι οίνοι, λευκά κρασιά καθώς και το ξηρό κρασί «Fino», αλλά ιδιαίτερα σε κρασιά που ωριμάζουν σε βαρέλια. Θα συμπληρώσουμε σε αυτό το σημείο πως οι ζύμες του γένους *Brettanomyces* αναφέρονται πιο συχνά σε περιστατικά αλλοίωσης από ότι το γένος *Dekkera*, επειδή η ανίχνευση των спорίων των τελευταίων ανιχνεύονται πιο δύσκολα.

Ένα βασικό χαρακτηριστικό αυτόν των ζυμομυκήτων είναι ότι παράγουν δυσάρεστες οσμές και γεύσεις κατά την αλλοίωση τόσο των κρασιών όσο και των ζύθων. Οι ενώσεις που παράγουν και προκαλούν τα παραπάνω καλούνται, «brett flavors» και αποτελούνται από τις εξής τρεις (3) (Hellborg&Piskur, 2009):

- η 4-αιθυλφαινόλη (οσμή στάβλου αλόγων, αντισηπτικού)
- η 4-αιθυλγκουαϊκόλη (οσμή μπέικον, μπαχαρικού, γαρύφαλλου, καπνιστού)
- το ισοβαλερικό οξύ (οσμή ιδρωμένης σέλας, τυριού)

Μια ακόμη χαρακτηριστική οσμή που προκαλούν είναι γνωστή ως mousiness ή mousy off flavor και περιγράφεται σαν γεύση και οσμή ως ούρα ποντικού. Η συγκεκριμένη μάλιστα γεύση παράγεται από τους *Dekkeraanomala*, *Dekkerabruxellensis*, *Brettanomycesnoardensis* και *Brettanomycescusterianus* και αποτελείται από τις ενώσεις 2-αιθυλτετραϋδροπυριδίνη (ETHP), 2-ακετυλοτετραϋδροπυριδίνη (ATHP) και 2-ακετυλοπολίνη (APY)(Grbin και Henschke, 2000).

Το *Brettanomyces* όπως αναφέραμε και πριν μπορεί να προκαλέσει σοβαρά προβλήματα στα κρασιά που ωριμάζουν σε βαρέλια και να μολύνει γενικά ολόκληρο

το κελάρι σε σημείο που να είναι τις περισσότερες φορές αδύνατο να αντιμετωπιστεί (Kunkee&Bisson, 1993). Μπορεί εισχωρήσει στο κελάρι είτε μέσω της παραλαβής των σταφυλιών, είτε μέσω των νέων προς παραλαβή βαρελιών με τους εξής δύο (2) τρόπους:

Αρχικά, μέσω των θραυσμάτων κυτταρίνης που εξάγονται από το νέο ξύλο και είναι πολύ καλή πηγή C ως τροφή για τον *Brettanomyces* και δεύτερον μέσω των φαινολικών θραυσμάτων από το νέο ξύλο και που μετατρέπονται σε δυσάρεστες οσμές και γεύσεις από τον *Brettanomyces* (Kunkee&Bisson, 1993).

Επιπλέον, όσο αφορά τα είδη *Brettanomycesbruxellensis* και *Dekkerabruxellensis*, το πρώτο επικρατεί σε ερυθρούς οίνους που ωριμάζουν σε βαρέλια με χαμηλή περιεκτικότητα SO<sub>2</sub> και οξέων, ενώ παράλληλα η μολυσματική δόση που είναι ικανή να αλλοιώσει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του κρασιού είναι μικρή. Το δεύτερο είναι ανεκτικό σε χαμηλές τιμές pH και ιδιαίτερα σε υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης, αφού μπορούν να αλλοιώσει οίνους με περιεκτικότητα σε αιθανόλη έως και 15% v/v (Wyk&Silva, 2019).

#### **4. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΖΥΜΩΝ ΑΛΛΟΙΩΣΗΣ ΣΤΗΝ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ ΤΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

Η αλλοίωση τροφίμων από ζυμομύκητες είναι ένα φαινόμενο το οποίο έχει δυσμενείς οικονομικές συνέπειες ανεξάρτητα σε ποιο στάδιο της παραγωγικής διαδικασίας ή της αγροτροφικής αλυσίδας ("From Farm to Fork") βρίσκεται. Σε περίπτωση όπου βρεθούν οι μικροοργανισμοί αυτοί στο τρόφιμο από τον καταναλωτή, αυτό συνεπάγεται σίγουρα την δυσαρέσκειά του και την απώλεια της εμπιστοσύνης του απέναντι στο συγκεκριμένο τρόφιμο ή την εταιρεία που το παράγει ή το διανέμει. Όπως, έχουμε ήδη τονίσει, η κατανάλωση ζυμών αλλοίωσης δεν προκαλεί τροφικές δηλητηριάσεις κατά κύριο λόγο, παρά αλλοιώνει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τροφίμου. Επιπλέον, ύστερα από ανίχνευση ζυμομυκητων, η αρμόδια εταιρία θα κληθεί να ανακλήσει την συγκεκριμένη παρτίδα του προϊόντος, κάτι το οποίο έχει μεγάλη οικονομική ζημία. Για αυτό, λοιπόν, είναι

υψίστης σημασίας η έγκαιρη ανίχνευση των ζυμών στα τρόφιμα και η διαχείριση αυτών με τις κατάλληλες διορθωτικές ενέργειες.

#### **4.1 ΠΑΡΑΔΟΣΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΖΥΜΩΝ ΑΛΛΟΙΩΣΗΣ**

Ευρέως διαδεδομένες μέθοδοι ανίχνευσης, οι οποίες καλούνται και ως «*παραδοσιακές*», στον χώρο της βιομηχανίας των τροφίμων, είναι αυτές που περιλαμβάνουν την επίστρωση σε τρυβλία και την χρήση μικροσκοπίου, καθώς και την εφαρμογή αέριας χρωματογραφίας και φασματοσκοπία μάζας (Tubia, etal., 2018).

Όσον αφορά την επίστρωση σε τρυβλία, αυτή πραγματοποιείται σε εκλεκτικό μέσο άγαρ-άγαρ, το οποίο στην συνέχεια επωάζεται στους 25°C για 5-7 μέρες. Στο επόμενο στάδιο εξετάζεται η παρουσία ή απουσία ζυμών. Σε επόμενο επίπεδο είναι εφικτή η απομόνωση και ο προσδιορισμός του γένους του ζυμομύκητα που βρίσκεται στο τρόφιμο, με την πραγματοποίηση υποκαλλιέργειας σε μη-εκλεκτικό άγαρ και έπειτα με παρακολούθηση στο μικροσκόπιο. Παρ' όλο όμως που είναι εφικτή η αναγνώριση του γένους των ζυμών δεν μπορούμε με το μικροσκόπιο να προσδιορίσουμε το είδος αυτό οποίο κατατάσσονται (RapidTechnology).

Η παραπάνω μέθοδος επιφανειακής επίστρωσης διαφέρει ανάλογα με την κατηγορία του τροφίμου για το οποίο θέλουμε να την εφαρμόσουμε. Υπάρχει, επομένως, το ISO 21527:2008 το οποίο χωρίζεται ουσιαστικά σε δύο (2) μέρη. Το πρώτο μέρος, το 21527-1:2008, είναι αυτό με το οποίο απαριθμούνται ζωντανοί ζυμομύκητες που απομονώθηκαν από προϊόντα με ενεργότητα ύδατος μεγαλύτερη από 0,95, λόγω χάρη τα φρούτα, τα λαχανικά, το κρέας και τα γαλακτοκομικά προϊόντα (ISO). Το δεύτερο μέρος είναι το 21527-2:2008 και βάσει αυτού καταμετρούνται οι ζύμες που απομονώνονται από τρόφιμα με ενεργότητα ύδατος μικρότερη από 0,95, αλλά όχι κάτω από την τιμή 0,60, όπως για παράδειγμα τα αποξηραμένα προϊόντα, τα μπαχαρικά, οι ξηροί καρποί, οι μαρμελάδες κ.α.

Ακόμη, μια μέθοδος που ενδείκνυται για την απαρίθμηση χυμών σε τρόφιμα είναι το ISO 6611:2004 και ειδικεύεται στο γάλα και στα γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως για παράδειγμα το βούτυρο, το τυρί, καζεινες και ορός γάλακτος, κρέμες γάλακτος και επιδόρπια.(ISO)

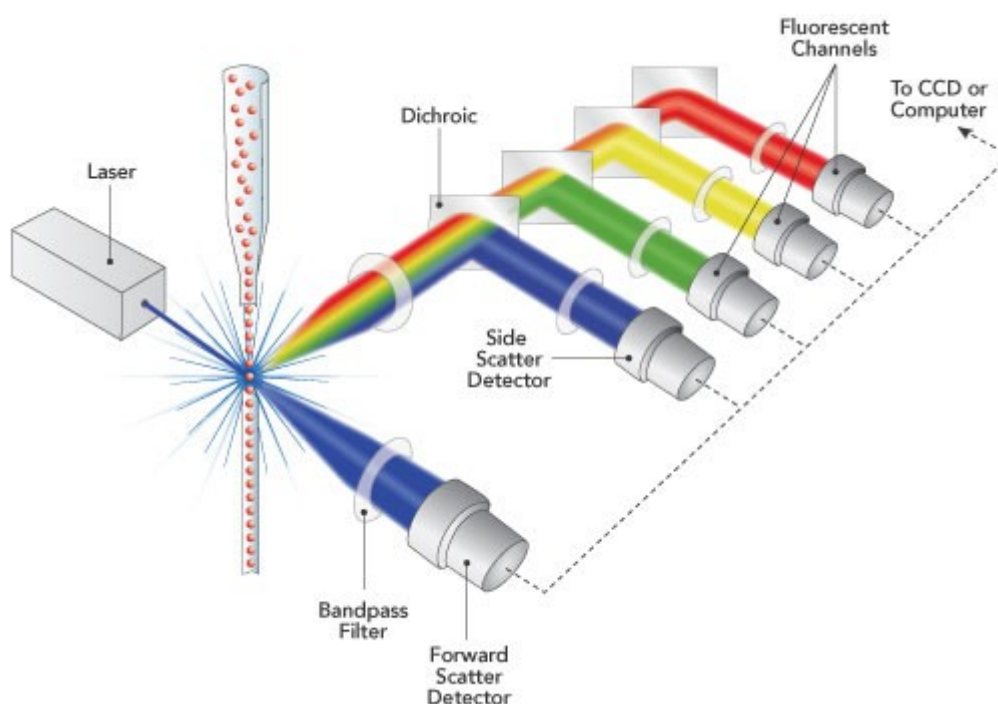


## 4.2. ΤΑΧΕΙΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΖΥΜΩΝ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ

Οι μέθοδοι που προαναφέρθηκαν δεν εξυπηρετούν απόλυτα τον επιθυμητό στόχο, καθώς είναι αρκετά χρονοβόρες και κοστοβόρες, και παράλληλα τα αποτελέσματα αυτών δεν είναι πάντα ακριβή. Είναι επόμενο, λοιπόν, η επιστημονική κοινότητα να προσανατολιστεί σε πιο ταχείες και αυτοματοποιημένες μεθόδους, ούτως ώστε να ελαχιστοποιήσουν το κόστος και το χρόνο των διαδικασιών, αλλά και να διεξάγουν αποτελέσματα και δεδομένα με μεγαλύτερη ακρίβεια.

### 4.2.1. ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

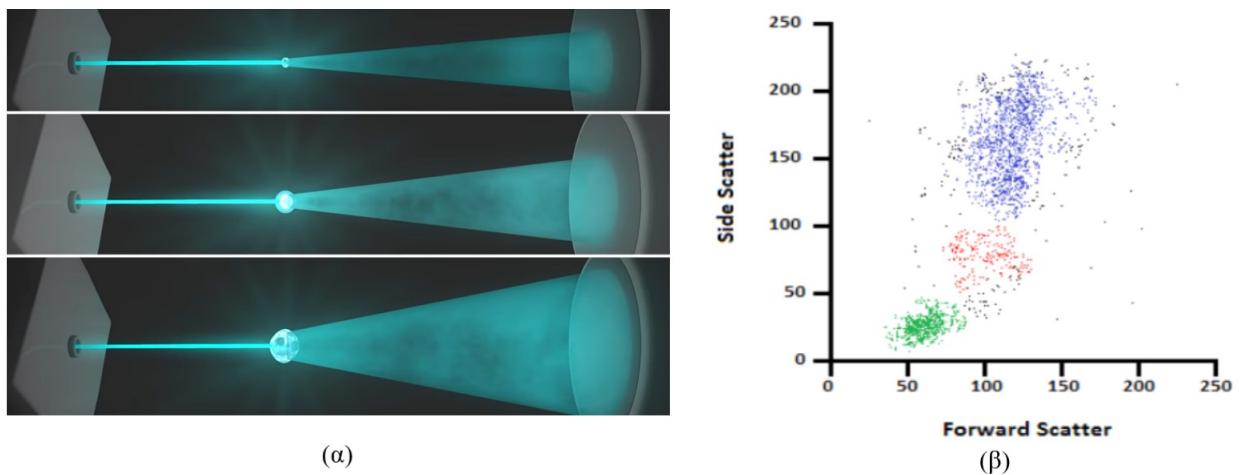
Σημαντική μέθοδος, λοιπόν, και με αντικειμενικά αποτελέσματα είναι η Κυτταρομετρία Ροής (Flow-Cytometry). Είναι ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο το οποίο μπορεί και αναλύει ταχύτητα, σωματίδια ή κύτταρα δίνοντας μας πληροφορίες για αυτά. Πιο αναλυτικά τα σωματίδια αυτά ή κύτταρα, ρέουν μέσα σε μια στήλη που περιέχει ρυθμιστικά διαλύματα και το οποίο έχει ως βάση το αλάτι, όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 4.2.1.1: Μέθοδος Κυτταρομετρία-Ροής (Semrock)

Όπως αυτά ρέουν στην στήλη περνάνε μπροστά από μια πηγή λέιζερ η οποία προκαλεί ορατή διασπορά φωτός. Απέναντι ακριβώς από την πηγή λέιζερ υπάρχει ένας ανιχνευτής που ανιχνεύει το φως που εκπέμπεται προς τα αυτόν και ονομάζεται Ανιχνευτής Μπροστινής Διασποράς (Forward Scatter Detector-FSC). Ο FSC είναι χρήσιμος γιατί μας παρουσιάζει το μέγεθος του σωματιδίου ή του κυττάρου, αφού «στείλει» τα δεδομένα στον ηλεκτρονικό υπολογιστή με την οποίο είναι συνδεδεμένος.

Κάθετα στην δεσμίδα λέιζερ, βρίσκονται οι Ανιχνευτές Πλευρικής Διασποράς (Side Scatter Detector-SSC) των οποίων τα αποτελέσματα που μεταφέρονται στον Η/Υ, αφορούν το σχήμα των σωματιδίων ή κυττάρων, καθώς και την εσωτερική πολυπλοκότητά τους (McKinnon, 2018). Από τα δεδομένα που στέλνονται στον Η/Υ προκύπτουν δύο διαγράμματα τα οποία αν συνδυαστούν παίρνουν την παρακάτω μορφή.



Εικόνα 4.2.1.2 (α) Ανιχνευτής Μπροστινής Διασποράς (FSC), προσδιορισμός του μεγέθους των σωματιδίων. (β) Γράφημα απεικόνισης μεγέθους και πολυπλοκότητας σωματιδίου. (StarCellBio)

Κατά αυτό τον τρόπο μπορούμε να προσδιορίσουμε μεμονωμένα τα είδη κυττάρων όταν αυτά βρίσκονται μέσα σε έναν ετερογενή πληθυσμό. Ως εκ τούτου άμα θέλουμε να ανιχνεύσουμε ζύμες αλλοίωσης σε ένα τρόφιμο μπορούμε να λάβουμε ακριβή και αντικειμενικά αποτελέσματα, καθώς το συμπέρασμα θα είναι η παρουσία ή η απουσία αυτών των δειγμάτων.

Επιπροσθέτως, άμα θέλουμε να έχουμε στη διάθεσή μας περισσότερες πληροφορίες για την μορφολογία και την πολυπλοκότητα των κυττάρων, χρησιμοποιούμε τον φθορισμό.

Το φθορίζον φως που εκπέμπεται περνάει από φίλτρα εκπομπών τα οποία επιτρέπουν την ανίχνευση πολλαπλών διαφορετικών φθοροφόρων φωτεινών σημάτων σ' ένα μόνο κύτταρο. Τα περισσότερα Κυτταρόμετρα Ροής ανιχνεύουν 2-4 χρώματα την ίδια στιγμή. Υπάρχουν όμως Κυτταρόμετρα Ροής που ανιχνεύουν μέχρι και 18 χρώματα ταυτόχρονα (StarcellBio).

#### **4.2.2. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΑΠΑΡΙΘΜΗΣΗ ΜΕ 3M™ Petrifilm™**

Σε μια προσπάθεια να ελαχιστοποιηθεί ο χρόνος επώασης των ζυμομυκήτων στα τρυβλία Petri, ούτως ώστε να απαριθμηστούν στη συνέχεια, παρήχθησαν οι πλάκες 3M™ Petrifilm. Η τεχνολογία αυτών των πλακών βασίζεται στο γεγονός ότι είναι έτοιμες για χρήση, αφού αποτελούνται από αποξηραμένα μέσα καλλιέργειας τα οποία περικλείονται σε πλαστικές ή υφασμάτινες μεμβράνες. Επιπρόσθετα, διαθέτουν και εναλλασσόμενο πλέγμα το οποίο εξυπηρετεί στην απαρίθμηση των ζυμών. Το τελικό συμπέρασμα είναι ότι η εφαρμογή των πλακών αυτών στην βιομηχανία των τροφίμων μπορεί να μειώσει το χρόνο επώασης από 5 μέρες σε 48-72 ώρες (RapidMicrobiology).

Επομένως, έχει κατασκευαστεί το 3M™ Petrifilm™ Rapid Yeast and Mold Plate το οποίο εμφανίζει αποτελέσματα σε 48 ώρες και μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο σε τρόφιμα με υψηλή ενεργότητα ύδατος όσο και σε τρόφιμα με πιο χαμηλές τιμές ενεργότητας ύδατος.

Πέραν αυτού, όμως υπάρχει στην αγορά και το 3M™ Petrifilm™ Aqua Yeast and Mold Count Plate, το οποίο είναι ιδανικό για ανίχνευση ζυμομυκήτων σε

εμφυαλωμένα νερά και χρησιμοποιείται ευρέως από το συγκεκριμένο κλάδο της βιομηχανίας τροφίμων (DKSH).

#### **4.2.3. ΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΕΣ ΟΠΤΙΚΕΣ ΣΥΣΚΕΥΕΣ**

Σε ένα ακόμη πιο προχωρημένο επίπεδο, έχουν κατασκευαστεί οπτικές συσκευές οι οποίες απαλλάσσουν τον ερευνητή από τη συνεχή παρακολούθηση του δείγματος μέχρι να εμφανιστούν τα επιθυμητά αποτελέσματα. Η συγκεκριμένη τεχνολογία εφαρμόζεται ως εξής: μία μικρή ποσότητα δείγματος εμβολιάζεται σε έτοιμα προς χρήση φιαλίδια δοκιμής, τα οποία, στην συνέχεια τοποθετούνται στο όργανο ανάλυσης. Το όργανο αυτό είναι κατάλληλο σχεδιασμένο με σκοπό να μετρούν την μικροβιακή ανάπτυξη παρακολουθώντας διάφορες βιοχημικές αντιδράσεις, όπως είναι για παράδειγμα η μεταβολή του pH. Ως εκ τούτου προκαλούνται αλλαγές στο χρώμα του υγρού μέσω ή παρατηρείται φθορισμός (SAFEFOODSOLUTIONS).

Ευρέως διαδεδομένα αυτού του είδους συστήματα είναι το Soleris<sup>®</sup> από την Neogen και το Biolumix. Μάλιστα το σύστημα Biolumix προσφέρει την δυνατότητα ανίχνευσης CO<sub>2</sub> που προκαλείται από την ανάπτυξη των ζυμών και προκαλείται αλλαγή χρώματος του υγρού μέσου εντός 48 ωρών (RapidMicrobiology).

#### **4.2.4. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ**

Πέρα από τις προηγούμενες μεθόδους, αξιόπιστα αποτελέσματα σε σύντομο χρόνο μας δίνουν και οι μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης. Οι συγκεκριμένες αυτές μέθοδοι βασίζονται στην αλλοίωση του DNA των υπό μελέτη μικροοργανισμών που πιθανόν να βρίσκονται στα τρόφιμα. Πιο συγκεκριμένα, από το τρόφιμο παίρνουμε το επιθυμητό δείγμα και με τις απαραίτητες διαδικασίες προκαλούμε την λύση του κυτταρικού τοιχώματος των μικροοργανισμών, απελευθερώνοντας με αυτό τον τρόπο το DNA. Στην συνέχεια χρησιμοποιώντας την επεξεργασία της θέρμανσης η διπλή έλικα του DNA ανοίγει και οι δύο αλυσίδες από τις οποίες αποτελείται, απομακρύνεται η μία από την άλλη. Σε επόμενο στάδιο, μέσα στους σωλήνες PCR (Polymerase Chain Reaction) όπου βρίσκονται τα αντιδραστήρια PCR: DNA πολυμεράση, νουκλεοτίδια και πριμόσωμα. Αφού συνδεθεί το πριμόσωμα στις μονοκλώνες αλυσίδες DNA, τότε η DNA πολυμεράση αρχίζει την αντιγραφή

(Hygiene). Τέλος, χάρη σε κατάλληλα μηχανήματα-ανιχνευτές προσδιορίζονται οι μικροοργανισμοί που έχουν αναπτυχθεί στο τρόφιμο.

Ένα από τα πολύ τα διαδεδομένα συστήματα που βασίζεται σε μοριακή μέθοδο είναι το σύστημα Bax. Στο συγκεκριμένο σύστημα ανάμεσα στα αντιδραστήρια PCR συμπεριλαμβάνεται και μία ειδική βαφή στόχος, η οποία προσκολλάται στις αλυσίδες που έχουν αντιγραφεί και προκαλεί φθορισμό. Έπειτα, προκαλείται πάλι θέρμανση ούτως ώστε να αποχωριστούν ξανά τα ζεύγη αλυσίδων και να σταματήσει ο φθορισμός. Το σύστημα Bax μπορεί και αντιλαμβάνεται αυτή την αλλαγή και εν τέλει παρουσιάζει στην οθόνη τα κατάλληλα δεδομένα, τα οποία είναι η παρουσία ή η απουσία συγκεκριμένων μικροοργανισμών (Hygiene). Μπορεί μάλιστα να δώσει αποτελέσματα μέσα σε 48 ώρες ανιχνεύοντας πολύ χαμηλά επίπεδα ζυμών (ThermoFisher).

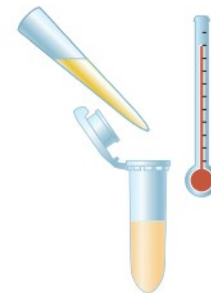
## EASY-TO-USE PROCESS



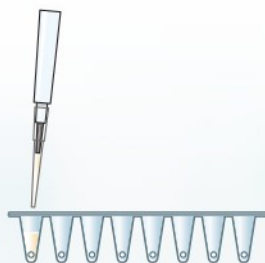
- 1 ENRICH**  
Collect your sample and mix it with enrichment media.



- 2 INCUBATE**  
Allow the sample to heat for designated time.



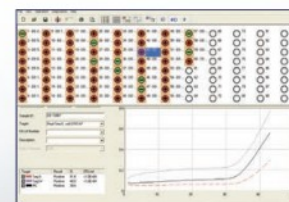
- 3 LYSE**  
Add sample to lysis reagent and heat cluster tubes to rupture the cell wall and release DNA into the solution.



- 4 HYDRATE**  
Transfer lysate to the tablet in each PCR tube.



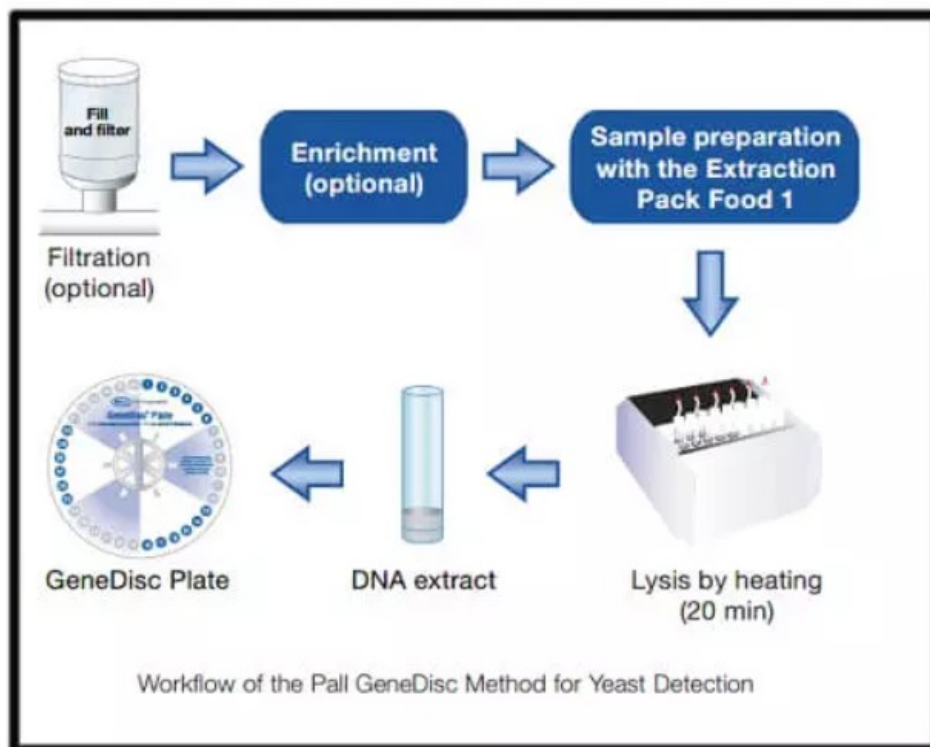
- 5 LOAD**  
Place the PCR tubes into the BAX® System instrument for automated analysis.



- 6 REVIEW**  
Results are displayed as clear yes or no icons in about one hour for most assays.

Εικόνα 4.2.4.1.: Ανίχνευση των ζυμομυκήτων με το σύστημα Bax(Hygiena)

Σε μία παρόμοια διαδικασία βασίζεται και το σύστημα GeneDisc από την εταιρεία Pall, όπου είναι σχεδιασμένο για τις βιομηχανίες οίνου και ποτών. Το GeneDisc παρέχει σημαντικό πλεονέκτημα πώς λαμβάνονται αποτελέσματα εντός 2 ωρών ενώ προσφέρει και την δυνατότητα ταυτοποίησης των ζυμομυκήτων, καθώς και τον προσδιορισμό της κυρίας αλλοίωσης όσον αφορά τις ζύμες.



Εικόνα 4.2.4.2.: Ανίχνευση ζυμομυκήτων με την μέθοδο Pall GeneDisc (PALL).


Εκτός από τις μεθόδους ανίχνευσης ζυμομυκήτων που προκαλούν αλλοίωση, έχει σημειωθεί πρόοδος και στις μεθόδους ταυτοποίησης των ζυμών αυτών, έτσι ώστε να παραλαμβάνονται αποτελέσματα με την μέγιστη δυνατή ακρίβεια σε σύντομο χρόνο.


Έχει εφευρεθεί επομένως το σύστημα Biolog η λειτουργία του οποίου βασίζεται στο YT Microplate. Κάποια βασικά πρώτα στάδια της μεθόδου αυτής είναι ο

πολλαπλασιασμός της ζύμης σε άγαρ και στην συνέχεια η δημιουργία εναιωρήματος με επίπεδο διαπερατότητας περίπου 47%, ύστερα από μέτρηση σε θολόμετρο. Στο επόμενο στάδιο τοποθετούμε από 100 μl σε κάθε «κελί» στην πλακέτα Microplate.

#### YT MicroPlate™

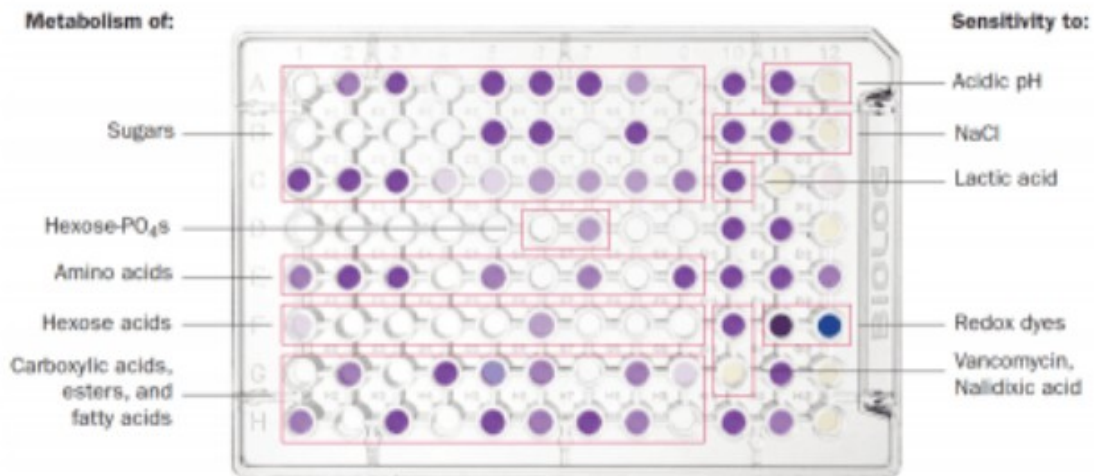
A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
Water	Acetic Acid	Formic Acid	Propionic Acid	Succinic Acid	Succinic Acid Mono-Methyl Ester	L-Aspartic Acid	L-Glutamic Acid	L-Proline	D-Gluconic Acid	Dextrin	Inulin
B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12
D-Cellobiose	Gentiobiose	Maltose	Maltotriose	D-Melezitose	D-Melibiose	Palatinose	D-Raffinose	Stachyose	Sucrose	D-Trehalose	Turanose
C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
N-Acetyl-D-Glucosamine	α-D-Glucose	D-Galactose	D-Psicose	L-Sorbose	Salicin	D-Mannitol	D-Sorbitol	D-Arabitol	Xylitol	Glycerol	Tween 80
D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
Water	Fumaric Acid	L-Malic Acid	Succinic Acid Mono-Methyl Ester	Bromosuccinic Acid	L-Glutamic Acid	γ-Aminobutyric Acid	α-Ketoglutaric Acid	2-Keto-D-Gluconic Acid	D-Gluconic Acid	Dextrin	Inulin
E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
D-Cellobiose	Gentiobiose	Maltose	Maltotriose	D-Melezitose	D-Melibiose	Palatinose	D-Raffinose	Stachyose	Sucrose	D-Trehalose	Turanose
F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
N-Acetyl-D-Glucosamine	D-Glucosamine	α-D-Glucose	D-Galactose	D-Psicose	L-Rhamnose	L-Sorbose	α-Methyl-D-Glucoside	β-Methyl-D-Glucoside	Amygdalin	Arbutin	Salicin
G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
Maltitol	D-Mannitol	D-Sorbitol	Adonitol	D-Arabitol	Xylitol	i-Erythritol	Glycerol	Tween 80	L-Arabinose	D-Arabinose	D-Ribose
H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12
D-Xylose	Succinic Acid Mono-Methyl Ester plus D-Xylose	N-Acetyl-L-Glutamic Acid plus D-Xylose	Quinic Acid plus D-Xylose	D-Gluconic Acid plus D-Xylose	Dextrin plus D-Xylose	α-D-Lactose plus D-Xylose	D-Melibiose plus D-Xylose	D-Galactose plus D-Xylose	m-Inositol plus D-Xylose	1,2-Propanediol plus D-Xylose	Acetoin plus D-Xylose

 Oxidation Tests

 Assimilation Tests

Εικόνα 4.2.4.3: Πλακέτα MicroPlate™ (BIOLOG)

Η σημαντική σημείωση σε αυτό εδώ το στάδιο είναι ότι κάθε κελί του Microplate περιέχει θρεπτικά και βιοχημικά συστατικά που βοηθούν στην ταυτοποίηση. Για παράδειγμα, το μωβ του Τετραζολίου λειτουργεί ως οξειδοαναγωγική βαφή για να υπόδειξη χρώματα μετρικά την οξείδωση των πηγών άνθρακα που βρίσκονται στα κελιά. Επομένως, το Microplate παίρνει εν τέλει την παρακάτω μορφή.



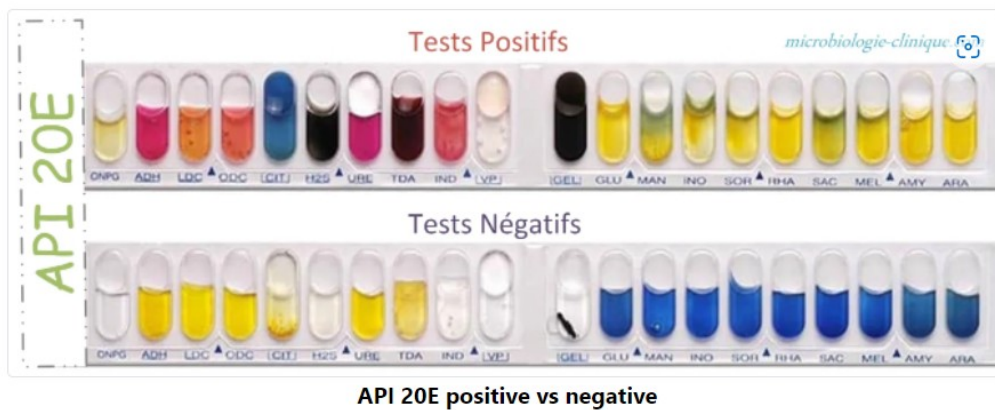
Εικόνα 4.2.4.4: Πλακέτα MicroPlate ύστερα από πραγματοποίηση των απαραίτητων αντιδράσεων (BIOLOG).

Η πλακέτα αυτή μας δίνει χρήσιμες πληροφορίες για τον υπό μελέτη μικροοργανισμό όπως για παράδειγμα τα σάκχαρα που μεταβολίζει, ή τα αμινοξέα ή τα λιπαρά οξέα, την ανθεκτικότητα του στις χαμηλές ή στις υψηλές τιμές pH και NaCl κ.α.

Τα αποτελέσματα αυτά όμως δεν προσδιορίζονται με το μάτι, παρά προκύπτουν από την ανάγνωση της πλακέτας από τη συσκευή MicroStation. Κατά αυτόν τον τρόπο λοιπόν μπορούμε να ταυτοποιήσουμε ημι-αυτόματα τις ζύμες που προκαλούν αλλοίωση στην βιομηχανία των τροφίμων, εντός 48 ωρών.

Μία ακόμη γρήγορη και εύχρηστη μέθοδος ταυτοποίησης ζυμών αλλοιώσεις είναι το kit API 20C όπου και αυτή βασίζεται στην ανάγνωση μεταβολικών «δακτυλικών αποτυπωμάτων» πηγών άνθρακα, η οποία όμως πραγματοποιείται με το μάτι και όχι με κάποια συσκευή.





Εικόνα 4.2.4.5: Θετικά και αρνητικά αποτελέσματα ενός KitAPI 20C (Microbiologie-clinique).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΠΡΟΛΗΠΤΙΚΑ ΜΕΤΡΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΖΥΜΩΝ ΑΛΛΟΙΩΣΗΣ ΣΤΗΝ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Όπως παρατηρήσαμε και σε προηγούμενα κεφάλαια, η βιβλιογραφία μας προσφέρει πολλές σύγχρονες μεθόδους αντιμετώπισης και περιορισμού των ζυμομυκήτων που προκαλούν αλλοιώσεις στα τρόφιμα. Σημαντικός, ωστόσο παράγοντας για να επιτευχθεί ο στόχος αυτός, είναι η εφαρμογή των κατάλληλων μέτρων πρόληψης. Υπάρχουν, επομένως, διαφορετικά μέτρα πρόληψης τα οποία εξαρτώνται και από την κατηγορία του τροφίμου που θέλουμε να προστατέψουμε.

### 5.1 ΠΡΟΛΗΠΤΙΚΕΣ ΕΝΕΡΓΕΙΕΣ ΣΤΑ ΦΡΟΥΤΑ ΚΑΙ ΤΑ ΛΑΧΑΝΙΚΑ

Μία μεγάλη κατηγορία τροφίμων που χρίζει πρότερης προσοχής είναι φρούτα και τα λαχανικά. Τα τρόφιμα αυτά λόγω της ελάχιστης επεξεργασίας που επιδέχονται είναι αρκετά ευάλωτα σε μικροβιακές μολύνσεις και ως εκ τούτου αλλοιώνονται εύκολα και γρήγορα. Χαρακτηρίζονται, συνεπώς, από μικρή διάρκεια ζωής. Επειδή είναι πλούσια σε σάκχαρα θεωρούνται ιδανικό υπόστρωμα για ανάπτυξη ζυμομυκήτων, οι οποίοι μετατρέπουν τα σάκχαρα σε αιθανόλη προσδίδοντας έτσι ανεπιθύμητη οσμή και γεύση. Χαρακτηριστικό παράδειγμα ζυμών αλλοίωσης είναι τα είδη του γένους *Debaryomyces* που είναι ιδιαίτερα ωσμόφιλα.

Ύστερα από προσπάθειες της επιστημονικής κοινότητας να παρατείνει την διάρκεια ζωής των φρούτων και των λαχανικών, καθιερώθηκε ως αποτελεσματική η επικάλυψη των τροφίμων με βρώσιμα μέσα. Τα κυριότερα μέσα επικάλυψης που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία των τροφίμων είναι το αλγινικό και η χιτοζάνη. Συνήθως, τα δύο αυτά υλικά χρησιμοποιούνται μαζί, καθώς το αλγινικό δεν έχει αντιμικροβιακή δράση όπως η χιτοζάνη, αλλά θεωρείται ως ένας κατάλληλος φορέας για πτητικά ή μη πτητικά συντηρητικά.

Μία ακόμη εξίσου σημαντική μέθοδος πρόληψης για τα συσκευασμένα φρούτα και λαχανικά είναι η απολύμανση τους πριν αυτά συσκευαστούν. Από δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν, παρατηρήθηκε πως δεν παρουσιάστηκε ανάπτυξη ζυμών σε φρέσκα καρότα ύστερα από επεξεργασία αυτών με διμεθυλο-δικαρβονικό (dmde), ενώ ο αριθμός των ζυμομυκήτων σε αγκινάρες μειώθηκε σε μεγάλο βαθμό, όταν αυτές εμβαπτίσθηκαν σε διάλειμμα οξαλικού οξέος και αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (Krisch, etal., 2016).

Επιπρόσθετα, ο συνδυασμός υδροθερμικής επεξεργασίας και επίστρωσης με χιτοζάνη, παράτεινε την διατηρησιμότητα της παπάγιας σε θερμοκρασία ψύξης, ενώ όταν εφαρμόστηκε ακτινοβολία UV-C και επεξεργασία του όζοντος, τότε παρατάθηκε ακόμα περισσότερο η διάρκεια ζωής του φρούτου αυτού (Krisch, etal., 2016).

Όσον αφορά τους χυμούς φρούτων αποδείχθηκε πως η ομογενοποίηση υψηλής πίεσης (100MPa) είναι πιο αποτελεσματική από την απλή παστερίωση. Από την άλλη, για τον πελτέ ντομάτας, η χρήση φυσικών συντηρητικών, όπως είναι το τζίντζερ και η σκόνη σκόρδου, αποδείχτηκε χρήσιμη μέθοδος για τον περιορισμό των ζυμομυκήτων και την παράταση της διάρκειας ζωής του προϊόντος (Kirsch, etal., 2016).

## **5.2. ΠΡΟΛΗΠΤΙΚΕΣ ΕΝΕΡΓΕΙΕΣ ΣΤΟ ΚΡΑΣΙ**

Το κρασί και γενικότερα τα ποτά είναι ένας κλάδος ο οποίος απασχολεί μάλλον την επιστημονική κοινότητα σε μεγάλο βαθμό, αφού αρκετές μελέτες και βιβλιογραφίες αναφέρονται τόσο στην ανίχνευση ζυμών όσο και στα προληπτικά μέτρα που εφαρμόζονται για την καταπολέμηση τους.

Η βασική, όμως, μέθοδος πρόληψης που χρησιμοποιεί η πλειοψηφία των οινοπαραγωγών είναι η προσθήκη διοξειδίου του θείου ή άλλων ενώσεων του θείου στο κρασί (Kirsch, et al., 2016). Επιπλέον, ορισμένοι παραγωγοί οίνου, εκτός από διοξείδιο του θείου, χρησιμοποιούν σορβικό ή βενζοϊκό οξύ για να μετριάσουν την αλλοίωση από ζυμομύκητες (StarCellBio).

Υπάρχουν, επίσης, και αρκετές μελέτες που αναλύουν φυσικές μέθοδος προστασίας του οίνου από μικροοργανισμούς. Μία τέτοια φυσική μέθοδος είναι η ακτινοβολία UV-C, η οποία όταν εφαρμόζεται στην απολύμανση νερού δρα πολύ αποτελεσματικά. Επειδή όμως η διείσδυση σε κρασιά είναι δύσκολη λόγω της υψηλής απορροφητικότητάς τους, η αδρανοποίηση των μικροβίων είναι περιορισμένη. Παράλληλα, η ποσότητα ακτινοβολίας που θα λάβουν οι οίνοι πρέπει να είναι περιορισμένη για να μην αλλοιωθούν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους. Στόχος επομένως είναι να κατασκευαστεί ο κατάλληλος εξοπλισμός όπου θα παράγει ακτινοβολία UV-C στα επιθυμητά επίπεδα και δεν θα καταστρέφει το προϊόν. Έχουν κατασκευαστεί, ωστόσο, τέτοια συστήματα, τα οποία όμως παραμένουν ακόμα σε πειραματικό στάδιο (Junqua, et al., 2020).

Συμπληρωματικά, και η καταστροφή των ζυμών αλλοίωσης μέσω ηλεκτρικού ρεύματος, είναι μία φυσική μέθοδος σε πειραματικό στάδιο. Οι οινοπαραγωγοί, όμως, παρουσιάζουν μεγαλύτερη προτίμηση απέναντι στο διοξείδιο του θείου και στον μεταβισουλφίτη, και αντιμετωπίζουν με δυσπιστία τις φυσικές αυτές μεθόδους και τα εναλλακτικά συντηρητικά.

### **5.3. ΣΥΝΤΗΡΗΤΙΚΑ ΩΣ ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΛΗΨΗΣ**

Σημαντικό ρόλο στην συντήρηση των τροφίμων έχουν τα οξέα και κυρίως οξέα όπως είναι το οξικό, το προπιονικό και το σορβικό οξύ. Τα οξέα αυτά, τα οποία χαρακτηρίζονται και ως «αδύναμα οξέα», είναι πολύ διαδεδομένα στις βιομηχανίες που έχουν ως αντικείμενο την επεξεργασία φρούτων και την παραγωγή προϊόντων τους. Πιο συγκεκριμένα, τα αδύναμα οξέα έχουν τη δυνατότητα να διαπερνούν τη μεμβράνη των κυττάρων και να διαχωρίζουν στο εσωτερικό το κύτταρο τα πρωτόνια από τα ανιόντα, προκαλώντας με αυτό τον τρόπο την δυσλειτουργία του κυττάρου και εν τέλει τον θάνατό του.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η συμπεριφορά της ζύμης *Zygosaccharomyces bailii* απέναντι στα αδύναμα οξέα. Τα κύτταρα της ζύμης αυτής παρουσιάζουν γενικότερα ανομοιογένεια όσον αφορά το εσωτερικό τους pH, καθώς άλλα χαρακτηρίζονται ως πιο ευαίσθητα αφού έχουν pH 6,2, ενώ άλλα είναι πιο ανθεκτικά με τιμή pH περίπου 5,6. Ως εκ τούτου εμποδίζεται η συσσώρευση οξέων και καταστρέφονται εν τέλει τα ευαίσθητα κύτταρα, αφήνοντας να επιβιώσουν μόνο τα ανθεκτικά (Kirsch, et al., 2016).

#### **5.4 ΤΑ ΑΙΘΕΡΙΑ ΕΛΑΙΑ ΩΣ ΜΕΣΟ ΠΡΟΛΗΨΗΣ**

Τα τελευταία χρόνια αρχίζει να γίνεται όλο και πιο το διαδεδομένη η χρήση των αιθέριων ελαίων στην βιομηχανία των τροφίμων καθώς η αντιμικροβιακή τους δράση είναι πολύ αποτελεσματική. Ένα ακόμη όμως πλεονέκτημα που τα χαρακτηρίζει είναι το γεγονός ότι δεν είναι επιβλαβή για την υγεία όπως τα κοινά συντηρητικά και επιπλέον λύνουν σε μεγάλο βαθμό το πρόβλημα της ανθεκτικότητας των μικροοργανισμών, έναντι των αντιβιοτικών. Τέλος, είναι πολύ φιλικά προς το περιβάλλον και περισσότερο κερδοφόρα (Σάκκας, 2007).

Η χρήση, ωστόσο, αιθέριων ελαίων ως μέσο πρόληψης για την ανάπτυξη ζυμών αλλοίωσης, δεν είναι τόσο διαδεδομένη όσο για άλλα είδη μικροβίων όπως είναι τα βακτήρια (Pandey, et al., 2017). Παρόλα αυτά έχουν διεξαχθεί μελέτες, των οποίων τα αποτελέσματα είναι ελπιδοφόρα. Αρχικά, οι φαινόλες παρουσίασαν μεγάλη αποτελεσματικότητα στην συντήρηση του κρασιού. Χαρακτηριστικά παραδείγματα φαινολών που χρησιμοποιήθηκαν για αυτή την μελέτη είναι η ρεσβερατρόλη και η λουτεολίνη. Επιπλέον, η θυμόλη και η καρβοκρόλη, κύρια συστατικά του θυμαριού και της ρίγανης, αποδείχθηκαν καλύτερα συντηρητικά, συγκριτικά με τον μεταβισουλφίτη (Kirsch, et al., 2016).

Συμπληρωματικά, μελετήθηκε και η δράση του d-λιμονενίου στην καταστροφή του *Saccharomyces cerevisiae*. Το αποτέλεσμα ήταν απλά η βλάβη του κυτταρικού τοιχώματος της ζύμης, ενώ μεμβράνη της δεν επηρεάστηκε καθόλου (Kirsch, et al., 2016). Η σημαντική σημείωση σε αυτό το σημείο που πρέπει να αναφέρουμε είναι ότι, η αντιμικροβιακή δράση των κυττάρων επικεντρώνεται στην παρεμπόδιση της πραγματοποίησης των φυσιολογικών και βιοχημικών διεργασιών των

μικροοργανισμών (Pandey, 2017). Επομένως, η βλάβη του κυτταρικού τοιχώματος δεν είναι αρκετή για τον επιθυμητό περιορισμό της ανάπτυξης του μικροοργανισμού.

Ένας αρκετά σημαντικός περιοριστικός παράγοντας, όσον αφορά την χρήση των αιθέριων ελαίων στα τρόφιμα είναι η υδρόφοβη και η πτητική φύση τους. Ως εκ τούτου, είναι ιδιαίτερα δύσκολη η εφαρμογή τους σε τρόφιμα με υψηλή περιεκτικότητα σε νερό, καθώς θα πρέπει να παρακολουθείται διαρκώς η συγκέντρωσή τους σε αυτά, ούτως ώστε να παραμένει σταθερή (Kirsch, 2016).

## **5.5 ΟΙ ΤΟΞΙΝΕΣ-ΔΟΛΟΦΟΝΟΙ ΤΩΝ ΖΥΜΩΝ ΩΣ ΜΕΣΟ ΠΡΟΛΗΨΗΣ**

Τέλος, μια ακόμη, νέα προσέγγιση για τον περιορισμό και την καταπολέμηση των ζυμών αλλοίωσης είναι η χρήση τοξινών-δολοφόνων (στα αγγλικά ο όρος είναι «*killer toxins*») που παράγονται από ζυμομύκητες. Τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά αυτόν των τοξινών δολοφόνων είναι ότι καταστρέφουν μόνο άλλες ζύμες, οι οποίες είναι ευπαθής, και δεν επηρεάζουν άλλους μικροοργανισμούς. Επιπλέον, τα στελέχη ζυμών που παράγουν αυτές τις τοξίνες δεν επηρεάζονται από αυτές (Marquina, et al., 2002).

Συνοπτικά, ο τρόπος θανάτωσης των ευπαθών ζυμών περιγράφεται ως εξής: οι τοξίνες δολοφόνοι που έχουν παραχθεί προσδένονται αρχικά στο κυτταρικό τοίχωμα της ευπαθούς ζύμης. Στη συνέχεια, οι τοξίνες αυτές που έχουν συσσωρευτεί στο κυτταρικό τοίχωμα, μετατοπίζονται προς την πλασματική μεμβράνη διαταράσσοντας σταδιακά την λειτουργία της και τις διεργασίες όπου εκτελούνται εκεί, όπως για παράδειγμα τη σύνθεση του DNA. Ως εκ τούτου, τα κύτταρα της ευπαθούς ζύμης θανατώνονται (Schmitt, 2006).

Παραδείγματα ζυμών που παράγουν τοξίνες δολοφόνας είναι η *Pichia kluyveri* και η *Pichia membranifaciens*. Η τοξίνη-δολοφόνος της *Pichia kluyveri* φάνηκε να δρα εξαιρετικά ενάντια των ζυμών *Dekkera bruxellensis* και *Saccharomyces cerevisiae*, ενώ η τοξίνη που παράχθηκε από την *Pichia membranifaciens*, σε συνεργασία με μεταβισουλφίτη καλίου, περιορίσ την ανάπτυξη του *Zygosaccharomyces rouxii* σε διάλυμα με υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης (Kirsch, 2016).

## 6.ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Μελετώντας την παρούσα βιβλιογραφική εργασία, μπορούμε να αντιληφθούμε το μέγεθος του προβλήματος που προκύπτει από τις αλλοιώσεις στα τρόφιμα λόγω της παρούσας ανεπιθύμητων ζυμομυκήτων. Το γεγονός αυτό δεν έχει σοβαρό αντίκτυπο μόνο στην οικονομία, αλλά προκαλεί και την δυσαρέσκεια των καταναλωτών εξαιτίας των δυσάρεστων οργανοληπτικών χαρακτηριστικών που δημιουργούνται. Επιπρόσθετα, σε πολύ σπάνιες περιπτώσεις ενδέχεται να επηρεαστεί η υγεία του καταναλωτή.

Είναι επομένως, απαραίτητο να δωθεί η πρέπουσα προσοχή στα στάδια της πρόληψης και της ανίχνευσης των ζυμών αλλοίωσης. Η πρόληψη και η ανίχνευση είναι δύο πολύ βασικά στάδια στην αγροτροφική αλυσίδα, καθώς ενισχύουν την εξάλειψη, όχι μόνο ζυμομυκήτων, αλλά και άλλων ανεπιθύμητων μικροοργανισμών σε ένα αξιόλογο ποσοστό. Οι αρμόδιοι ερευνητές αφιερώνουν χρόνο στο να εφεύρουν νέες πιο σύγχρονες μεθόδους, ούτως ώστε να είναι πιο αποτελεσματικές, λιγότερο χρονοβόρες και ακριβείς.

Η δημιουργία νέων μεθόδων βασίζεται κατά ένα μέρος στις γνώσεις που διαθέτουμε για το ποιοι είναι οι ζυμομύκητες που απειλούν την βιομηχανία των τροφίμων. Επιπλέον, στηρίζεται σε ορισμένα χαρακτηριστικά τους με επίκεντρο τις συνθήκες ανάπτυξής τους, όπου είναι το εύρος των τιμών pH και των θερμοκρασιών ανάπτυξης, η παρουσία ή η απουσία του οξυγόνου και η ενεργότητα ύδατος.

Στα αντίστοιχα κεφάλαια της πτυχιακής μελέτης, αναπτύξαμε κάποιες ευρέως διαδεδομένες μεθόδους ανίχνευσης και προσδιορισμού των ζυμών αλλοίωσης. Αρχικά, αναπτύχθηκαν οι πιο παραδοσιακές και εν συνεχεία οι σύγχρονες μέθοδοι, οι οποίες και χαρακτηρίζονταν από αισθητά μειωμένο χρόνο εκτέλεσης, λόγω χάρη η Κυτταρομετρία Ροής και οι Αυτοματοποιημένες Οπτικές Συσκευές.

Ακόμα, αναλύσαμε τα μέσα πρόληψης που είτε εφαρμόζονται ήδη στην βιομηχανία τροφίμων, είτε είναι ακόμα σε πειραματικό στάδιο και χρησιμοποιούνται με επιφύλαξη. Ύστερα από αναζητήσεις στο διαδίκτυο, παρατηρήσαμε πως η κατηγορία τροφίμου στον οποίο έχουν δημοσιευθεί οι περισσότερες έρευνες σχετικά με τις μεθόδους προσδιορισμού και ανίχνευσης, αλλά και πρόληψης, είναι ο οίνος.

Τον Ιούνιο του 2019 δημοσιεύθηκε μια έρευνα για μια μέθοδο η οποία βασίζεται στην τεχνική Φθορισμού InSituΥβριδισμού (FluorescenceInSituHybridization-FISH), που ειδικεύεται στην ανίχνευση της ζύμης *Dekkerabruxellensis*. Συγκεκριμένα, ολιγονουκλεοτίδια-ανιχνευτές με φθορίζουσα σήμανση, προσδένονται με υβριδισμό σε συγκεκριμένες αλληλουχίες του DNA ή του RNA του ζυμομύκητα αυτού (Branco, etal., 2019).

Το ενδιαφέρον με την τεχνική αυτή είναι ότι μπορεί να συνδιαστεί με την Μικροσκοπία Επιφθορισμού και την Κυτταρομετρία Ροής, που μελετήσαμε σε προηγούμενο κεφάλαιο, αντλώντας πληροφορίες για τα κύτταρα του μικροοργανισμού, τον αριθμό τους, αλλά και ιδιότητές τους (Branco, etal., 2019).

Παρόλο που η FISH είναι μέθοδος με προοπτικές, δεν έχει εφαρμοστεί πάρα πολύ στον κλάδο της οινοποίησης, λόγω του χρόνου που απαιτείται για να υλοποιηθεί, καθώς και εξαιτίας τεχνικών προβλημάτων που προκύπτουν από περιπτώσεις ψευδών θετικών ή ψευδών αρνητικών αποτελεσμάτων. Ωστόσο, η επιστημονική κοινότητα ερευνά τις λύσεις των εμποδίων αυτών με στόχο να τεθεί ως μια ακόμη αξιόπιστη σύγχρονη μέθοδος ταχείας ανίχνευσης και προσδιορισμού (Branco, etal., 2019).

Μια ακόμη τεχνική είναι ο βιοέλεγχος ως μερική εναλλακτική λύση του SO<sub>2</sub> στο κρασί. Ο βιοέλεγχος ουσιαστικά βασίζεται στην παρουσία ζυμομυκήτων, οι οποίοι είναι κίνδυνοι για το κρασί και που δρουν ανταγωνιστικά έναντι ζυμομυκήτων αλλοίωσης του οίνου, όπως είναι ο *Zygosaccharomycesrouxii* και ο *Brettanomycesbruxellensis*. Ζυμομύκητες βιοέλεγχου που έχουν χρησιμοποιηθεί για αυτόν τον σκοπό είναι ο *Wickerhamomycesanomalus* και ο *Metschnikowiarpulcherrima*. Η έρευνα αυτή που δημοσιεύθηκε το 2021 δεν είναι ακόμα ολοκληρωμένη, διότι υπάρχουν ακόμα ερωτήματα που πρέπει να απαντηθούν, λόγου χάρη «*Ποιες είναι οι περιβαλλοντικές συνθήκες που καθιστούν τον βιοέλεγχο αποτελεσματικό για εφαρμογή;*» (Kuchen, etal., 2021).

Εν κατακλείδι, γίνονται αξιόλογες προσπάθειες από την πλευρά της επιστημονικής κοινότητας προκειμένου να παράγονται και να διακινούνται ασφαλή και ποιοτικά τρόφιμα, διατηρώντας το μικροβιολογικό φορτίο σε χαμηλά επίπεδα. Εφαρμόζοντας σωστά την αρχή της «Τεχνολογία των Εμποδίων», όλο και περισσότερες νέες μέθοδοι θα προκύπτουν ούτως ώστε να προστατεύεται η οικονομία

της βιομηχανίας των τροφίμων και των καταναλωτών, ενώ οι τελευταίοι θα έχουν εμπιστοσύνη απέναντι στις επιχειρήσεις από τις οποίες προμηθεύονται τα τρόφιμα.



## 7.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Adams, P., 2018. *The science of winemaking yeasts*. SevenFifty Daily. Available from: [Winemaking Yeasts Play a Crucial Role in Your Wine's Flavor | SevenFifty Daily](#)

Aono, R., 1990. *Taxonomic distribution of alkali-tolerant yeasts*. System. Appl. Microbiol. 13:394–397.

Banat, I. M. and Marchant, R., 1995. *Characterization and potential industrial application of five novel, thermotolerant, fermentative yeast strains*. World J. Microbiol. Biotechnol. 11:304–306.

Banjara, N., 2014. *Debaryomyces hansenii: A foodborne yeast that produces anti-Candida killer toxin*. USA: University of Nebraska-Lincoln. Available from: [DEBARYOMYCES HANSENI: A FOODBORNE YEAST THAT PRODUCES ANTI-CANDIDA KILLER TOXIN \(unl.edu\)](#)

Barnett, J.A., 2003. *Beginnings of microbiology and biochemistry: the contribution of yeast research*. U.K.: University of East Anglia. Available from: [Beginnings\\_of\\_microbiology\\_and\\_biochemistry\\_yeast\\_research.pdf \(e-malt.com\)](#)

Barnett, JA, Payne, RW, Yarrow, D., 2000. *Yeasts: Characteristics and Identification*. 3rd edn. Barnett, JA, Payne, RW, Yarrow, D. (eds). Cambridge University Press: Cambridge.

Bayrock, D., 2019. *Consequences of a lower pH*. Ethanol Producer Magazine. Available from: [Consequences of a Lower pH | EthanolProducer.com](#)

Berche, B., Henkel, M., Kenna, R., 2009. *Critical Phenomena: 150 years since Cagniard de la Tour*. Journal of Physical Studies. Available from: [3001-4.pdf \(lnu.edu.ua\)](#)

Betts, G.D., Linton, P., Betteridge, R.J., 1999. Food Spoilage Yeasts: effects of pH, NaCl and temperature on growth. *Food Control*. 10: pp 27-33. Available from: [Food spoilage yeasts: effects of pH, NaCl and temperature on growth - ScienceDirect](#)

[Beuchat, L.R., Hocking, A.D., 1990. Some considerations when analyzing foods for the presence of xerophilic fungi. Journal of food protection. 53, pp. 984-989.](#)

Bintsis, T., 2021. Yeasts in different types of cheese. *AIMS Microbiology*. 7 (4), pp. 447-470. Available from: [Yeasts in different types of cheese \(aimspress.com\)](#)

[BIOLOG. Microbial Identification. BIOLOG. Available from: Microbial Identification – Biolog](#)

BIOLOG.YT MicroPlate™.BIOLOG. Available from: [YT MicroPlate™ \(biolog.com\)](http://www.biolog.com)

Branco P., Candeias, A., Caldeira, A.T., Gonzalez-Perez, M., 2019.*An important step forward for the future development of an easy and fast procedure for identifying the most dangerous wine spoilage yeast, Dekkera bruxellensis, in wine environment.*Microbial Biotechnology. 12:6. pp. 1237-1248. Available from: [An important step forward for the future development of an easy and fast procedure for identifying the most dangerous wine spoilage yeast, Dekkera bruxellensis, in wine environment - Branco - 2019 - Microbial Biotechnology - Wiley Online Library](#)

Breuer, U., Harms, H., 2006. Debaryomyces hansenii-an extremophilic yeast with biotechnological potential.*Yeast.*Wiley InterScience. 23: 415-437. Available from: [Debaryomyces hansenii - an extremophilic yeast with biotechnological potential \(unex.es\)](http://www.unex.es)

Bullerman, L.B., 2003. Growth Requirements.SPOILAGE-Fungi in Food-An Overview.*Encyclopedia of food sciences and nutrition.*2<sup>nd</sup> ed. pp. 5511-5522. Available from: [SPOILAGE | Fungi in Food – An Overview - ScienceDirect](#)

Cantor, MD, van den Tempel, T., Kronborg Hansen, T., et al., 2017.Blue cheese. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology Major.* London: Elsevier Academic Press, 929-954.

Caspeta, L., Nielsen, J., 2015. *Thermotolerant Yeast Strains Adapted by Laboratory Evolution Show Trade-Off at Ancestral Temperatures and Preadaptation to Other Stresses.*Research Gate. Available from:[Effect of temperature on yeast growth. \(A\) Specific growth rates of... | Download Scientific Diagram \(researchgate.net\)](#)

Chao, H., Yen, Y., Ku, M.SB., 2009. *Characterization of a salt-induced DhAHP, a gene coding for alkyl hydroperoxide reductase, from the extremely halophilic yeast Debaryomyces hansenii.*BMC Microbiology. Available from: [Characterization of a salt-induced DhAHP, a gene coding for alkyl hydroperoxide reductase, from the extremely halophilic yeast Debaryomyces hansenii | BMC Microbiology | Full Text \(biomedcentral.com\)](#)

Cogan, T.M., Goerges, S., Gelsomino, R., et al., 2014.Biodiversity of the surface microbial consortia from limburger, Reblochon, Livarot, Tilsit, and Gubbeen Cheeses. *Microbiol Spectrum* 2: CM–0010–2012.

Correia, S., Guerreiro, J.F., Loureiro-Dias, M.C., Leao, C., Corte-Real, M., 2014.Zygosaccharomyces.*Encyclopedia of Food Microbiology.*2<sup>nd</sup> ed. pp. 849-855.

Course Hero.*Temperature and Microbial Growth.*Course Hero. Available from: [Temperature and Microbial Growth | Microbiology | Course Hero](#)

- Crawford, E., 2014. *Spoilage Microorganisms: Yeasts*. Prague, Institute of Chemical Technology. Available from: [Spoilage Yeasts \(vscht.cz\)](http://vscht.cz)
- Dakal, T., Solieri, L., Giudici, P., 2014. *Adaptive Response and Tolerance to Sugar and Salt Stress in the Food Yeast Zygosaccharomyces Rouxii*. Int. J. Food Microbiol. 185, 140–157.
- Dakal, T.C., Solieri, L., Giudici, P., 2014. *Adaptive response and tolerance to sugar and salt stress in the food yeast Zygosaccharomyces rouxii*. Mol Microbiol 97: 541-59.
- Davenport RR. 1980. *Biology and activities of yeasts*. Skinner, FA, Passmore, SM, Davenport, RR (eds). Academic Press: London; 215–230.
- Deak, T., 2007. *Handbook of food spoilage yeasts*. USA: CRC Press.
- Deak, T., Beuchat, L. R., 1993. *Yeasts associated with fruit juice concentrates*. J Food Prot 56:777-82.
- Deak, T., Beuchat, L. R., 1996. *Handbook of spoilage yeasts*. USA, New York: CRC Press.
- Debevere, J. M., 1987. *The use of buffered acidulant systems to improve the microbiological stability of acid foods*. Food Microbiol. 4:105–114.
- DKSH.3M™ Petrifilm™ Plates. DKSH. Available from: [Quality indicator testing | 3M™ Petrifilm™ Plates \(dksh.com\)](http://dksh.com)
- Encyclopedia.com. *Cagniard De La Tour, Charles*. Encyclopedia.com. Available from: [Cagniard De La Tour, Charles | Encyclopedia.com](http://Encyclopedia.com)
- Escott, C., Del Fresno, J.M., Loira, I., et al., 2018. *Zygosaccharomyces rouxii: Control strategies and applications in food and winemaking*. Madrid: Chemistry and Food Technology Department. Available from: [Fermentation | Free Full-Text | Zygosaccharomyces rouxii: Control Strategies and Applications in Food and Winemaking | HTML \(mdpi.com\)](http://mdpi.com)
- European Commission. *Eliminating Oxygen Requirements in Yeasts*. Europe: European Commission. Available from: [Eliminating Oxygen Requirements in Yeasts | ELOXY Project | Fact Sheet | H2020 | CORDIS | European Commission \(europa.eu\)](http://europa.eu)
- Fleet, G., 1992. *Spoilage Yeasts*. Crit. Rev. Biotechnol.
- Fleet, GH, 2011. Yeast spoilage of foods and beverages. In: *The Yeasts, A taxonomic study*. pp. 53-63.
- Gordon, J.L., Wolfe, K.H., 2008. Recent Allopolyploid Origin of *Zygosaccharomyces Rouxii* Strain ATCC 42981. *Yeast*. 25, 449–456.

Guerzoni, M. E., Lanciotti, R., and Marchetti, R., 1993. *Survey of the physiological properties of the most frequent yeasts associated with commercial chilled foods*. *Int. J. Food Microbiol.* 17:329–341.

Hellborg, L., Piskur, J., 2009. *Dekkera/Brettanomyces*. Yeast Diversity in the brewing industry. *Beer in Health and Disease Prevention*. pp. 77-88.

Hommel, R.K., 2014. Food Spoilage. *Torulopsis*. *Encyclopedia of Food Microbiology*. 2<sup>nd</sup> ed. pp. 596-602.

Hommel, R.K., 2014. *Torulopsis*. ResearchGate. Available from: [Torulopsis \(researchgate.net\)](https://www.researchgate.net/publication/266111111)

Hosono, K., 1992. *Effect of Salt Stress on Lipid Composition and Membrane Fluidity of the Salttolerant Yeast Zygosaccharomyces Rouxii*. *J. Gen. Microbiol.* 138, 91–96.

Hughes, D. B., Tudroszen, N. J., and Moyle, C. J., 1984. *The effect of temperature on the kinetics of ethanol production by a thermotolerant strain of Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol. Lett.* 6:1–6.

Hygiena. *BAX<sup>®</sup> SYSTEM*. Hygiena. Available from: [MBFB-BAX-System-Q7-Brochure-EN.pdf \(hygiena.com\)](https://www.hygiena.com/Products/MBFB-BAX-System-Q7-Brochure-EN.pdf)

Hygiena. *How real-time and end-point PCR works in the BAX<sup>®</sup> System*. Available from:  [\(842\) How Real-Time and End-Point PCR Works in the BAX<sup>®</sup> System - YouTube](https://www.youtube.com/watch?v=842)

Irlinger, F., Layec, S., Helinck, S., et al., 2015. Cheese rind microbial communities: diversity, composition and origin. *FEMS Microbiol Let* 362: 1-11.

Irwin, J.A., 2020. Xerophiles: life with little or no water. Overview of extremophiles and their food and medical applications. *Physiological and Biotechnological Aspects of Extremophiles*. pp. 65-87.

ISO. *ISO 21527-1:2008. Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds-Part 1: Colony count technique in products with water activity greater than 0,95*. ISO. Available from: [ISO - ISO 21527-1:2008 - Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds — Part 1: Colony count technique in products with water activity greater than 0,95](https://www.iso.org/standard/55111.html)

ISO. *ISO 21527-2:2008. Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds-Part 2: Colony count technique in products with water activity less than or equal to 0,95*. ISO. Available from: [ISO - ISO 21527-2:2008 - Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds — Part 2: Colony count technique in products with water activity less than or equal to 0,95](https://www.iso.org/standard/55112.html)

ISO. ISO 6611:2004. *Milk and milk products-Enumeration of colony-forming units of yeasts and/or moulds-Colony-count technique at 25°C*. Available from: [ISO - ISO 6611:2004 - Milk and milk products — Enumeration of colony-forming units of yeasts and/or moulds — Colony-count technique at 25 degrees C](#)

Jacques, N., Casaregola, S., 2008. *Safety assessment of dairy microorganisms: the hemiascomycetous yeasts*. Int J Food Microbiol. 126, pp. 321-326.

James, SA, Stratford, M., 2011. *Zygosaccharomyces Barker (1901)*. In: Kurtzman, CP, Fell, JW, Boekhout, T. (Eds.). *Yeasts in Food Beneficial and Detrimental Aspects*. Hamburg: Behr's Verlag, Hamburg, pp. 937-47.

Jimenez, J., Fidalgo, M., Alguacil, M., 1999. Implications in Fermented Beverages and Foods. *Brettanomyces*. *Encyclopedia of Food Microbiology*. pp. 302-308.

Junqua, R., Vinsonneau, E., Ghidossi, R., 2020. *Microbial, stabilization of grape musts and wines using coiled UV-C reactor*. VINE & WINE. Available from: [2944-Article -25042-3-10-20200306.pdf](#)

Keenleyside, W., 2019. Temperature and Microbial Growth. *Microbiology: Canadian Edition*. Canada: Pressbooks. Available from: [9.6 Temperature and Microbial Growth – Microbiology: Canadian Edition \(pressbooks.pub\)](#)

Kreger-van Rij, N.J.W., 1984. *The Yeasts: A Taxonomic Study*. 3<sup>rd</sup> Edition. Elsevier Science. Available from: [The Yeasts - 3rd Edition \(elsevier.com\)](#)

Krisch, J., Chandrasekaran, M., Kadaikunnan, S., Alharbi, NS., et al., 2016. *Latest about spoilage by yeasts: Focus on the Deterioration of beverages and other plant-derived products*. Journal of Food Protection. Available from: [Latest about Spoilage by Yeasts: Focus on the Deterioration of Beverages and Other Plant-Derived Products | Journal of Food Protection \(allenpress.com\)](#)

Kuchen, B., Vazquez, F., Maturano, Y.P., Scaglia, G.J.E., et al., 2021. *Toward application of biocontrol to inhibit wine spoilage yeasts: The use of statistical designs for screening and optimization*. OENO-ONE. Available from: [Toward application of biocontrol to inhibit wine spoilage yeasts: The use of statistical designs for screening and optimisation | OENO One \(oenone.eu\)](#)

Kunkee, R.E., Bisson, L.F., 1993. Brettanomyces and Dekkera species. Wine-making Yeasts. *The Yeasts*. 2<sup>nd</sup> ed. pp. 69-127.

Kunkee, R.E., Bisson, L.F., 1993. Zygosaccharomyces species. Wine-making Yeasts. *The yeasts*. 2<sup>nd</sup> ed. pp. 69-127. Available from: [Zygosaccharomyces Bailii - an overview | ScienceDirect Topics](#)

Labcell LTD. *Water activity and growth of microorganisms in food*. Labcell LTD. Available from: [aw chart labcell-email.pdf](#)

Lachance, M.A., 1995. *Yeast communities in a natural tequila fermentation*. Antonie van Leeuwenhoek. 68. pp. 151-160.

[Lakna, 2019. What is the difference between halophiles and osmophiles. Pediaa.com. Available from: What is the Difference Between Halophiles and Osmophiles - Pediaa.Com](#)

Lavoie, K., Touchette, M., St-Gelais, D., et al., 2012. Characterization of the fungal microflora in raw milk and specialty cheeses of the province of Quebec. *Dairy Sci Technol* 92: 455-68.

Lesaffre. *History of yeasts*. Egypt: Lesaffre. Available from: [Lesaffre | History of yeasts](#)

Loureiro, V., 2000. Spoilage yeasts in foods and beverages: characterization and ecology for improved diagnosis and control. Sant' Ana, A. *Food Research International*. U.K.: Elsevier Ltd, pp. 247-256. Available from: [Spoilage yeasts in foods and beverages: characterisation and ecology for improved diagnosis and control - ScienceDirect](#)

Lund, B., Baird-Parker, T.C., Grahame, G.W., 2020. *The Microbiological Safety and Quality of Food*. Maryland: Aspen Publisher. Available from: [Microbiological Safety and Quality of Food - Google Books](#)

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J., 2014. *Biology of Microorganisms*. 10<sup>th</sup> Edition. Pearson Education.

Malfeito-Ferreira, M., 2014. Fermenting yeasts. Wine Spoilage Yeasts and Bacteria. Wines. *Encyclopedia of Food Microbiology*. 2<sup>nd</sup> ed. pp. 805-810.

Manchester, K.L., 2007. *Louis Pasteur, fermentation, and a rival*. South African Journal of Science. Available from: [a0810310.pdf \(scielo.org.za\)](#)

MANUALZZ. *3M Clean-Trace™ Surface ATP Test Swab UXL100, 100 per case Οδηγίες λειτουργίας*. MANUALZZ. Available from: [3M Clean-Trace™ Surface ATP Test Swab UXL100, 100 per case Οδηγίες λειτουργίας | Manualzz](#)

Marquina, D., Santos, A., Peinado, J.M., 2002. *Biology of killer yeasts*. PubMed.gov. Available from: [Biology of killer yeasts - PubMed \(nih.gov\)](#)

Martorell, P., Stratford, M., Steels, H., Fernández-Espinar, M., Querol, A., 2007. *Physiological Characterization of Spoilage Strains of Zygosaccharomyces Bailii and Zygosaccharomyces Rouxii Isolated from High Sugar Environments*. Int. J. Food Microbiol. 114, 234–242.

Mattsson, R., Haemig, PD, Olsen, B., 1999. *Feral pigeons as carriers of Cryptococcus laurentii, Cryptococcus uniguttulatus and Debaryomyces hansenii*. Med Mycol 37: 367-369.

- McKinnon, K.M., 2018. *Flow Cytometry: An overview*. PubMed Central. Available from: [Flow Cytometry: An Overview - PMC \(nih.gov\)](#)
- Miah, M.A.S., 2014. *Optimum pH for yeast growth in modified YMPD broth media*. Available from: [Optimum pH for yeast growth in modified YMPD broth media. | Download Scientific Diagram \(researchgate.net\)](#)
- Michan, C., Martinez, J.L., Alvarez, M.C., Turk, M., Sychrova, H., Ramos, J., 2013. *Salt and oxidative stress tolerance in Debaryomyces hansenii and Debaryomyces fabryi*. FEMS Yeast Research, 13 (2), pp: 180-188. Available from: [Salt and oxidative stress tolerance in Debaryomyces hansenii and Debaryomyces fabryi | FEMS Yeast Research | Oxford Academic \(oup.com\)](#)
- Microbiologie-clinique. *API for microorganism identification-API test for bacteria-API 20E*. Available from: [API for Microorganism Identification | API test for Bacteria | API 20E \(microbiologie-clinique.com\)](#)
- Moon, N. J., 1983. *Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures*. J. Appl. Bacteriol. 55:453–460.
- [Morata, A., Loira, I., 2017. Yeasts.IntechOpen. Available from: Wine Spoilage Yeasts: Control Strategy | IntechOpen](#)
- Murray-Brown Labs. *Osmophilic Yeast and Mold*. USA: Murray-Brown Laboratories. Available from: [Osmophilic Yeast & Mold - Murray Brown Labs \(mb-labs.com\)](#)
- MycoCosm. *Pichia membranifaciens v1.0*. California: MycoCosm. Available from: [Home - Pichia membranifaciens v1.0 \(doe.gov\)](#)
- NEOGEN. *Soleris® Next Generation*. NEOGEN. Available from: [The Next Generation of Rapid Microbial Testing System | Neogen](#)
- Nishikawa, A, Tomomatsu, H, Sugita, T, Ikeda, R, Shinoda, T., 1996. *Taxonomic position of clinical isolates of Candida famata*. J Med Vet Mycol 34: 411–419.
- Norkrans, B., 1966. *Studies on marine occurring yeasts: growth related to pH, NaCl concentration and temperature*. Arch Microbiol 54: 374–392.
- Nurzhan, K., Adamo, G.M., Porro, D., Branduardi, P., 2017. *The spoilage yeasts Zygosaccharomyces bailii: Foe or Friend?* USA: National Center for Biotechnology Information. Available from: [The spoilage yeast Zygosaccharomyces bailii: Foe or friend? - PubMed \(nih.gov\)](#)
- Oden, C. *Effect of temperature on the growth of yeast*. Science laboratory technology. Available from: [Effect of Temperature on the Growth of Yeast - Project Topics](#)
- Ogletree, O., 2020. *The role of yeast in brewing*. Atlanta: The beer Connoisseur. Available from: [The Role of Yeast in Brewing | The Beer Connoisseur](#)

Olusegun, F., 2020. *Antonie van Leeuwenhoek: Scientist who saw “animalcules”*. Gideon. Available from: [Antonie van Leeuwenhoek: scientist who saw ‘animalcules’ | by GIDEON | Medium](#)

PALL. *Reduce the risk of spoilage*. PALL. Available from: [Quality Control & Microbial Detection - Spoilage \(pall.com\)](#)

Pandey, A.K., Kumar, P., Singh, P., Tripathi, N.N., et al., 2017. *Essential Oils: Sources of Antimicrobials and Food Preservatives*. *Frontiers in Microbiology*. Available from: [Frontiers | Essential Oils: Sources of Antimicrobials and Food Preservatives | Microbiology \(frontiersin.org\)](#)

Perricone, M., et al., 2016. Chapter 5-Yeasts. *The Microbiological Quality of Food: Foodborne Spoilers*. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. pp. 121-131. Available from: [Yeasts - ScienceDirect](#)

Phale, S., 2018. *Yeast: Characteristics and Economic Significance*. India: Department of Microbiology. Available from: [\(PDF\) Yeast: Characteristics and Economic Significance \(researchgate.net\)](#)

Pitt, J. I., 1974. *Resistance of some food spoilage yeasts to preservatives*. *Food Technol. Australia* 26:238–241.

Pitt, J.I., Hocking, A.D., 2013. *Fungi and Food Spoilage*. 3<sup>rd</sup> ed. Springer. Available from: [Fungi and Food Spoilage - John I. Pitt, Ailsa D. Hocking - Google Books](#)

Rankine, B.C., 1966. *Pichia membranifaciens, a yeast causing film formation and off-flavor in table wine*. *Am. J. Enol. Vitic.* 17 (2) pp: 82-86.

Rapid Microbiology. *Rapid Microbiology of Yeasts and Moulds in Food*. Rapid Microbiology. Available from: [Rapid Detection of Yeasts and Moulds in Food \(rapidmicrobiology.com\)](#)

Rios, M.E., 2014. *Ancient Egyptian Bread*. The Historical cooking Project. Available from: [Ancient Egyptian Bread, by Miguel Esquirol Rios | The Historical Cooking Project](#)

Saez, J S, Lopes, C A, Kirs, V E, Sangorrín, M., 2011. *Production of volatile phenols by Pichia manshurica and Pichia membranifaciens isolated from spoiled wines and cellar environment in Patagonia*. *Food Microbiology*. 28, pp. 503–509.

SAFE FOOD SOLUTIONS. *Soleris System*. SAFE FOOD SOLUTIONS. Available from: [Soleris System \(safefoodltd.com\)](#)

Schmitt, M.J., Breinig, F., 2006. *Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection*. *Nature reviews Microbiology*. Available from: [Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection | Nature Reviews Microbiology](#)



[Semrock.Filters for Flow Cytometry.Semrock. Available from: Flow Cytometry - Semrock](#)

Sharma, A., Sharma, S.C., 2017.*Physiological Basis for the Tolerance of Yeast Zygosaccharomyces bisporus to Salt Stress*.India: HAYATI Journal of Biosciences. Available from: [View of Physiological Basis for the Tolerance of Yeast Zygosaccharomyces bisporus to Salt Stress \(ipb.ac.id\)](#)

Solieri, L., 2021. The revenge of Zygosaccharomyces yeasts in food biotechnology and applied microbiology. *World journal of microbiology and biotechnology*. USA: USDA. 37, pp. 66. Available from:[The revenge of Zygosaccharomyces yeasts in food biotechnology and applied microbiology - PubAg \(usda.gov\)](#)

[StarCellBio.Flow Cytometry Animation. StarCellBio. Available from: \(1076\) Flow Cytometry Animation - YouTube](#)

Steels, H., James, S.A., Roberts, I.N., Stratford, M., 1999.*Zygosaccharomyces lentus: a significant new osmophilic, preservative-resistant spoilage yeast, capable of growth at low temperature*. PubMed.gr. Available from: [Zygosaccharomyces lentus: a significant new osmophilic, preservative-resistant spoilage yeast, capable of growth at low temperature - PubMed \(nih.gov\)](#)

Stratford, M., 2006.Food and beverage spoilage yeasts.In: Querol A, Fleet GH (Eds.). *Yeasts in Food and Beverages*.Berlin: Springer-Verlag, Berlin, pp. 335-80.

Stratford, M., Capell, C.J., 2003. Spoilage yeasts. Soft drinks-Microbiology.*Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*.2<sup>nd</sup> ed. pp. 5358-5366. Available from: [Zygosaccharomyces Bailii - an overview | ScienceDirect Topics](#)

Tarver, T., 2016.*The Good, the Bad, and the Ugly: A Fermentation Saga*. Chicago: Food Technology Magazine.[The Good, the Bad, and the Ugly: A Fermentation Saga \(ift.org\)](#)

ThermoFisher.*BAX<sup>®</sup> YEAST AND MOULD KIT*.ThermoFisher. Available from: [Oxoid - Product Detail](#)

Tilbury,RH., 1980. *Biology and Activities of Yeasts*. Skinner, FA, Passmore, SM, Davenport, RR (eds). Academic Press: London; 153–176.

Tournas, V., Stack, M.E., Mislivec, P.B., Koch, H.A., et al., 2001.*BAM Chapter 18: Yeasts, Molds and Mycotoxins*. FDA. Available from: [BAM Chapter 18: Yeasts, Molds and Mycotoxins | FDA](#)

Tubia, I., Prasad, K., Perez-Lorenzo, E., Abadin, C., et al., 2018.*Beverage spoilage yeast detection methods and control technologies: a review of Brettanomyces*. PubMed.gov. Available from: [Beverage spoilage yeast detection methods and control technologies: A review of Brettanomyces - PubMed \(nih.gov\)](#)

Tudor, E.A., Board, R.G., 1993. Pickled Vegetables. *The Yeasts*. 2<sup>nd</sup> ed. pp. 435-516.

UCDAVIS. *Hansenula anomala*. USA: UCDAVIS. Available from: [Hansenula anomala | Viticulture and Enology \(ucdavis.edu\)](#)

Veiga, A, Madeira-Lopes, A., 2000. *Effects of weak acid preservatives on the growth and thermal death of the yeast Pichia membranifaciens in a commercial apple juice*. International Journal of Food Microbiology. 56, pp. 145–151.

Visser, W., Scheffers, W.A., Batenburg-van der Vegte, W.H., Dijken, J.P., 1990. *Oxygen requirements of yeasts*. PubMed.gov. Available from: [Oxygen requirements of yeasts - PubMed \(nih.gov\)](#)

Walker, G.M., 2010. *Pichia anomala: cell physiology and biotechnology relative to other yeasts*. Scotland: University of Abertay Dundee. Available from: [WalkerAntVanLeuwInPress2010 \(abertay.ac.uk\)](#)

Wang, Y., Zhao, Y., Fan, L., Xia, X., et al., 2018. *Identification and characterization of Pichia membranifaciens Hmp-1 isolated from spoilage blackberry wine*. Journal of Integrative Agriculture. 17 (9). pp: 2126-2136. Available from: [\(PDF\) Identification and characterization of Pichia membranifaciens Hmp-1 isolated from spoilage blackberry wine \(researchgate.net\)](#)

Weisstein E.W. *Cagniard-Latour, Charles (1777-1859)*. Scienceworld. Available from: [Cagniard-Latour, Charles \(1777-1859\) -- from Eric Weisstein's World of Scientific Biography \(wolfram.com\)](#)

Wong, B, Kiehn, TE, Edwards, F, et al., 1982. *Bone infection caused by Debaryomyces hansenii in a normal host: a case report*. J Clin Microbio. 16: 545–548.

Wyk, S., Silva, F.V.M., 2019. Brettanomyces Yeast. *Nonthermal Preservation of Wine. Preservatives and Preservation Approaches in Beverages*. 15. pp. 203-235.

## ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Γιαβάσης, Ι. *Μικροβιολογία Τροφίμων*. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. Διαθέσιμο από: [PowerPoint Presentation \(uth.gr\)](#)

Γκιαούρης, Ε. *Ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί (μύκητες, φύκη, πρωτόζωα και ελμινθες)*. Πανεπιστήμιο Αιγαίου. Διαθέσιμο από: [Microsoft PowerPoint - 8? T? \(E??a???? μ?????a??ςμ??\) \[Compatibility Mode\] \(aegean.gr\)](#)

Καρράς, Α., 2006. *Ζύμες και Μύκητες*. SlidePlayer. Διαθέσιμο από: [Ζύμες και μύκητες. - ppt κατάβασμα \(slideplayer.gr\)](#)

Μπαλατσούρας, Γ., 2006. *Μικροβιολογία Τροφίμων*. Αθήνα: Εκδόσεις Εμβρυο

Σάκκας, Η., 2007. *Μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης αιθέριων ελαίων*. Ιωάννινα: Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων. Διαθέσιμο από: [Μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης αιθέριων ελαίων \(didaktorika.gr\)](#)

Ταούκης, Π. *Μικροβιολογία Τροφίμων*. Αθήνα: Μετσόβιο Πολυτεχνείο. Διαθέσιμο από: [FoodMicrobiology\\_XMAT-2021-post .pdf](#)