



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

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

**Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία
Μικροοργανισμοί αλλοίωσης του ζύθου και τρόποι ανίχνευσης
τους στο μικροζυθοποιείο**

Του

Δημήτριου Μίντζα

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

Επιβλέπων: Παναγιώτης Ταταρίδης

ΑΘΗΝΑ, 2022



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

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

**Master Thesis
Beer spoilage microorganisms and ways of detection in
microbreweries**

**By
Dimitrios Mintzas**

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

Supervisor: Panagiotis Tataridis

Athens, 2022

Διασαφήσεις

Οι υπογράφωντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία (master thesis) με τίτλο «**Μικροοργανισμοί αλλοίωσης του ζύθου και τρόποι ανίχνευσης τους στο μικροζυθοποιείο**» που παρουσιάστηκε από τον/την **Δημήτριο Μίντζα** και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

The signatories declare that we have examined the postgraduate diploma thesis titled “**Beer spoilage microorganisms and ways of detection in microbreweries**” presented by **Dimitrios Mintzas** and we affirm that it is accepted.

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

Δρ. Ταταρίδης Παναγιώτης

**Όνοματεπώνυμο & Υπογραφή 2^{ου} Μέλους Επιτροπής
(Name and Signature of 2nd Commission Member):**

Δρ. Σεχάντε Αντνάν

**Όνοματεπώνυμο & Υπογραφή 3^{ου} Μέλους Επιτροπής
(Name and Signature of 3rd Commission Member):**

Δρ. Κεχαγιά Δέσποινα

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο κάτωθι υπογεγραμμένος Δημήτριος Μίντζας του Κωνσταντίνου, με αριθμό μητρώου 19211 φοιτητής του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Επιστήμη Οίνου και Ζύθου» κατεύθυνση «Ζύθος» του Τμήματος Επιστημών Οίνου, Αμπέλου και Ποτών της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

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

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

Ο Δηλών



Δημήτριος Μίντζας

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα χαρακτηριστικά του ζύθου όπως η περιεκτικότητα του σε αιθανόλη, τα ισομεριωμένα α-οξέα του λυκίσκου και οι φαινολικές του ουσίες, το διοξείδιο του άνθρακα, η έλλειψη θρεπτικών συστατικών και το χαμηλό pH, τον καθιστούν ένα αφιλόξενο περιβάλλον για την ανάπτυξη αρκετών μικροοργανισμών, ενώ υπάρχουν ορισμένοι που μπορούν να αναπτυχθούν ακόμη και κάτω από αυτές τις αντίξοες συνθήκες (Suzuki, 2015). Ακόμη, το ζυθογλέυκος αποτελεί ένα άριστο υπόστρωμα για την ανάπτυξη αρκετών μικροοργανισμών (Bokulich et al. 2012).

Οι μικροοργανισμοί που μπορούν να επιμολύνουν τον ζύθο ανήκουν στα βακτήρια και στις ζύμες. Τα αποτελέσματα της δράση των μικροοργανισμών επιμόλυνσης κυμαίνονται από ανεπαίσθητες μεταβολές στην γεύση και το άρωμα, έως την παραγωγή δυσάρεστων γεύσεων και αρωμάτων, την εμφάνιση θολερότητας και ιζημάτων. Επίσης η δράση τους μπορεί να επηρεάσει την πορεία των ζυμώνσεων δημιουργώντας προβλήματα στο τελικό προϊόν (Turvey et al., 2017).

Ο μικροβιολογικός έλεγχος κατά τα στάδια παραγωγής και στο τελικό προϊόν μπορεί να αποτρέψει την διάθεση στην αγορά μιας παρτίδας που δεν πληροί τις προδιαγραφές της ποιότητας. Οι μικροβιολογικοί έλεγχοι απαιτούν πόρους όπως χρόνο, χρήματα και καταρτισμένο ανθρώπινο δυναμικό, οπότε η εφαρμογή τους από τα μικροζυθοποιεία είναι δύσκολη (Turvey et al., 2017).

Σκοπός της εργασίας είναι η περιγραφή των μικροοργανισμών επιμόλυνσης του ζύθου και των θρεπτικών υποστρωμάτων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση τους, με τρόπο που να είναι εφικτό αυτοί οι έλεγχοι ώστε να πραγματοποιηθούν από ένα μικροζυθοποιείο όπου οι πόροι (χρόνος, χρήματα και ανθρώπινο δυναμικό), είναι περιορισμένοι.

Λέξεις κλειδιά: μικροοργανισμοί επιμόλυνσης του ζύθου, πλάνο δειγματοληψίας, μικροβιολογικός έλεγχος

ABSTRACT

Beer spoilage microorganisms and ways of detection in microbreweries

Mintzas Dimitrios

Department of Wine, Vine & Beverage Sciences,
University of West Attica, 2022

Beer hurdles which consist of alcohol content, hops iso-a-acids, phenolics, carbon dioxide, the lack of nutrients and low pH, are making beer a very difficult environment for microorganisms to grow, but still there are some microorganisms that can thrive even in these difficult conditions (Suzuki, 2015). Also, wort is very rich in nutrients and is a very good substrate for many microorganisms (Bokulich et al. 2012). The result of microorganisms' contamination varies from subtle changes in flavor, to the production of unacceptable flavors and the production of turbidity and sentiments. Also, it can alter yeast performance during the fermentation stages (Turvey et al., 2017).

Microbiological control during production and in finished goods can prevent the release in the market of a product that does not meet quality standards. Microbiological control is demanding in terms of cost, time and human resources, and these makes the implementation of such controls a difficult task for microbreweries (Turvey et al., 2017).

The aim of this thesis is to present the beer spoilage microorganisms and the culture media that can be used for their detection and identification, in a way that is feasible for a microbrewery to implement these controls, where resources like time, money and personnel are limited.

Keywords: beer spoilage microorganisms, sampling plan, microbiological control

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να εκφράσω την εκτίμηση μου στον επιβλέποντα καθηγητή μου Δρ. Π. Ταταρίδη για τις πολύτιμες και εποικοδομητικές προτάσεις του κατά τον σχεδιασμό και την συγγραφή αυτής της βιβλιογραφικής εργασίας. Η προθυμία του να αφιερώνει τον χρόνο του τόσο γενναιόδωρα και οι χρήσιμες και εποικοδομητικές παρατηρήσεις του βοήθησαν στην αποπεράτωση αυτού του έργου. Ένα μεγάλο ευχαριστώ για την συνεχή υποστήριξη, την υπομονή του και την διαρκή παρακίνηση του.

Επίσης θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου προς την οικογένεια μου, τους συναδέλφους και τους φίλους μου για την στήριξη και την ενθάρρυνση τους.

Βιβλιογραφικό CV

Δημήτριος Μίντζας

Μεταπτυχιακός Τίτλος Σπουδών
«Επιστήμη Οίνου και Ζύθου», κατεύθυνση: Ζύθος

Τίτλος: Τεχνολόγος Τροφίμων

Επιστημονικό Πεδίο: Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής

Βιογραφικά Στοιχεία: Ελεύθερος Επαγγελματίας

Εκπαίδευση: (προηγούμενα Απώφοιτός του Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων, ΑΤΕΙ
πτυχία ή διπλώματα) Θεσσαλονίκης

Εκπλήρωσε τις απαιτήσεις για το Μεταπτυχιακό Τίτλο Σπουδών Επιστήμη Οίνου & Ζύθου με κατεύθυνση: Ζύθος στο Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, Τμήμα Επιστημών Οίνου, Αμπέλου & Ποτών, τον Ιούλιο, 2022.

Πίνακας περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	i
ABSTRACT	ii
Ευχαριστίες	iii
Βιβλιογραφικό CV	iv
Κατάλογος Πινάκων	vii
Κατάλογος Σχημάτων	viii
1 Εισαγωγή και Σκοπός της Εργασίας	1
2 Μικροοργανισμοί επιμόλυνσης ζύθου	2
2.1 Βακτηριακές επιμόλυνσεις	4
2.1.1 Θετικά κατά Gram βακτήρια.....	6
2.1.2 Αρνητικά κατά Gram βακτήρια	18
2.2 Ζύμες επιμόλυνσης – Άγριες Ζύμες.....	35
2.2.1 Αναερόβιες ζύμες επιμόλυνσης	36
2.2.2 Αερόβιες ζύμες επιμόλυνσης	43
2.3 Θρεπτικά υποστρώματα στην μικροβιολογία του ζύθου.....	50
2.3.1 Ανίχνευση Γαλακτικών Βακτηρίων	52
2.3.2 Ανίχνευση αυστηρώς αναερόβιων Gram αρνητικών βακτηρίων.....	53
2.3.3 Ανίχνευση άλλων βακτηρίων.....	54
2.3.4 Ανίχνευση άγριων ζυμών και ζυμών επιμόλυνσης.....	54
2.3.5 Προμηθευτές θρεπτικών υποστρωμάτων μικροβιολογίας και εργαστήρια μικροβιολογικών αναλύσεων	55
2.3.6 Λίστες μεθόδων επίσημων οργανισμών.....	56
2.3.7 Βιοχημικοί έλεγχοι διαχωρισμού	58
2.3.7 Έλεγχος των επιφανειών μέσω ATPμετρίας.....	59
3 Μικροβιολογικός ποιοτικός έλεγχος ζυθοποιείου	60
3.1 Σημεία δειγματοληψίας.....	62

3.1.1 Γλεύκος μετά τον εναλλάκτη	63
3.1.2 Εμβόλιο μαγιάς	65
3.1.3 Τελικό συσκευασμένο προϊόν	65
3.1.4 Αναγνώριση των μικροοργανισμών αλλοίωσης του ζύθου	66
5 Συμπεράσματα.....	68
6 Βιβλιογραφία	71
Παράρτημα Α:	75

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1. Γαλακτικά βακτήρια αλλοίωσης του ζύθου (Bokulich & Bamforth, 2013).....	7
Πίνακας 2. Αριθμός εντοπισμού και περιστατικών (σε παρένθεση) ανά είδος η ομάδα βακτηρίων (Schneiderbanger et al. 2018).	8
Πίνακας 3. Θετικά κατά Gram βακτήρια επιμόλυνσης του ζύθου και τα μικροβιολογικά τους χαρακτηριστικά (Suzuki, 2015).....	16
Πίνακας 4. Επιπτώσεις και μεταβολικά προϊόντα επιμόλυνσης από Gram αρνητικά βακτήρια (Paradh & Hill, 2016)	34
Πίνακας 5. Τυπικά σημεία επιμόλυνσης των ζυμών επιμόλυνσης (Powell & Kerruish, 2017).	35
Πίνακας 6. Χαρακτηριστικά των αναερόβιων ζυμών επιμόλυνσης (Powell & Kerruish, 2017).	37
Πίνακας 7. Χαρακτηριστικά των αερόβιων ζυμών επιμόλυνσης (Powell & Kerruish, 2017).	44
Πίνακας 8. Μέθοδοι ανίχνευσης μικροβιακού φορτίου σε δείγματα παραγωγής, τελικά προϊόντα και ελέγχους καθαριότητας. (Storgards, 2000).....	50
Πίνακας 9. Απαιτούμενη ευαισθησία για τους μικροοργανισμούς σε δείγματα ζυθοποιείου (Jespersen & Jakobsen, 1996)	51
Πίνακας 10. Παραδείγματα θρεπτικών υποστρωμάτων για την ανίχνευση μικροοργανισμών αλλοίωσης του ζύθου (Sakamoto & Konings, 2003)	52
Πίνακας 11. Εταιρείες με υποστρώματα για την ζυθοποιεία.	55
Πίνακας 12. Εργαστήρια μικροβιολογικών αναλύσεων ζύθου.	56
Πίνακας 13. Λίστα μεθόδων του ASBC για την ανίχνευση των μικροοργανισμών αλλοίωσης (https://www.asbcnet.org/Methods/MicrobiologyMethods/Pages/default.aspx)	56
Πίνακας 14. Λίστα μεθόδων του EBC για την ανίχνευση των μικροοργανισμών αλλοίωσης (https://brewup.eu/ebc-analytica/category/microbiology/detection-of-contaminants).....	57
Πίνακας 15. Μικροβιακή χλωρίδα που συναντάται στο ζυθοποιείο (Turvey et al., 2017).....	61
Πίνακας 16. Πλάνο δειγματοληψίας μικροζυθοποιείου.....	63

Κατάλογος Σχημάτων

Σχήμα 1. Τα αντιμικροβιακά χαρακτηριστικά του ζύθου (Vriesekoop et al., 2013)	2
Σχήμα 2. Μικροβιακές επιμολύνσεις κατά την ζυθοποίηση (Hill, A., 2015)	3
Σχήμα 3. Μορφολογικά χαρακτηριστικά των κυττάρων (https://microscopeclarity.com/how-to-identify-bacteria/).....	4
Σχήμα 4. Εμφάνιση των χρωμάτων της χρώσης κατά Gram (https://www.technologynetworks.com/)	5
Σχήμα 5. Διαφορές στο κυτταρικό τοίχωμα ανάμεσα στα Gram θετικά και αρνητικά βακτήρια. (https://www.technologynetworks.com/)	5
Σχήμα 6. <i>Lactobacillus brevis</i> . Χρώση Crystal Violet 100x/Oil, Total Magnification 1.125x (ASBC, 2008).....	9
Σχήμα 7. <i>Lactobacillus brevis</i> σε mixed cellulose ester filters. (ASBC, 2008)	9
Σχήμα 8. <i>L. brevis</i> και <i>L. lindneri</i> σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Asano et al., 2007).	10
Σχήμα 9. <i>P. damnosus</i> σε μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης, διάμετρος κυττάρων 0.7-0.8 μm (Holzapfel et al. 2006).....	13
Σχήμα 10. <i>Pediococcus damnosus</i> . Χρώση Crystal Violet 100x/Oil, Total Magnification 1.125x και σε mixed cellulose ester filter. (ASBC, 2008)	14
Σχήμα 11. <i>Kocuria kristinae</i> (Matoulkova & Kubizniakova, 2018)	15
Σχήμα 12. <i>Pectinatus frisingensis</i> όπως φαίνεται στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Haikara A. & Helander I., 2006).....	22
Σχήμα 13. Αποικίες <i>Pectinatus cerevisiiphilous</i> σε thioglycolate-dextrose agar (ASBC, 2008)	22
Σχήμα 14. <i>Megasphaera cerevisiae</i> όπως φαίνεται στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Haikara A. & Helander I., 2006).....	24
Σχήμα 15. <i>Megashaera sueciensis</i> όπως φαίνεται στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Junoven, 2015).....	24
Σχήμα 16. <i>Selenomonas lacticifex</i> σε μεγέθυνση x630 (Felsberget al. 2014).....	25
Σχήμα 17. <i>Acetobacter</i> και <i>Gluconobacter</i> (www.sciencephoto.com)	27
Σχήμα 18. <i>Zymomonas mobilis</i> ανάπτυξη σε τρυβλίο με την μέθοδο pour plate. (ASBC, 2008)	29
Σχήμα 19. <i>H. uvarum</i> όπως φαίνεται στο μικροσκόπιο και σε τρυβλίο με UBA (ASBC, 2018)	38
Σχήμα 20. <i>Kluyveromyces marxianus</i> όπως φαίνεται στο μικροσκόπιο και σε τρυβλίο με UBA (ASBC, 2018).....	38

Σχήμα 21. <i>Saccharomyces diastaticus</i> όπως φαίνεται στο μικροσκόπιο και σε τρυβλίο με UBA (ASBC, 2018).....	40
Σχήμα 22. <i>Schizosaccharomyces pombe</i> σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (x6500) (https://www.sciencephoto.com/media/879138/view/s-pombe-yeast-sem).....	40
Σχήμα 23. <i>Sch. pombe</i> όπως φαίνεται στο μικροσκόπιο και σε τρυβλίο με UBA (ASBC, 2018)	41
Σχήμα 24. <i>T. delbrueckii</i> όπως φαίνεται στο μικροσκόπιο και σε τρυβλίο με UBA (ASBC, 2018).....	42
Σχήμα 25. <i>Z. bailii</i> όπως φαίνεται στο μικροσκόπιο και σε τρυβλίο με UBA (ASBC, 2018).	43
Σχήμα 26. <i>Z. rouxii</i> όπως φαίνεται στο μικροσκόπιο και σε τρυβλίο με UBA (ASBC, 2018)	43
Σχήμα 27. <i>Candida intermedia</i> όπως φαίνεται στο μικροσκόπιο και σε τρυβλίο με UBA (ASBC, 2018).....	46
Σχήμα 28. <i>Candida kefyr</i> (<i>Kluyveromyces marxianus</i>) όπως φαίνεται στο μικροσκόπιο και σε τρυβλίο με UBA (ASBC, 2018)	46
Σχήμα 29. <i>P. Membranifaciens</i> όπως φαίνεται στο μικροσκόπιο και σε φίλτρο μεμβάνης σε τρυβλίο (ASBC, 2018)	47
Σχήμα 30. <i>Rhodotorula glutinis</i> όπως φαίνεται στο μικροσκόπιο και σε φίλτρο μεμβάνης σε τρυβλίο (ASBC, 2018)	48
Σχήμα 31. Ένα από τα κιτ API που προσφέρονται από την εταιρεία Biomerieux (https://www.biomerieux-usa.com/clinical/api).	58
Σχήμα 32. Φορητό λουμινόμετρο και ειδικός στυλεός της εταιρίας CHARM (https://www.charm.com/wp-content/uploads/2022/05/MRK-9491.pdf).	59
Σχήμα 33. Εκτεταμένο μικροβιολογικό πλάνο δειγματοληψίας	62
Σχήμα 34. Διάγραμμα αναγνώρισης των βακτηρίων στο ζύθο (www.sigmaaldrich.com)	66
Σχήμα 35. Διάγραμμα αναγνώρισης των ζυμών στο ζύθο (Hill A., 2015).	67
Σχήμα 36. Αποικίες και κυτταρική μορφολογία ζυμών και βακτηρίων που συναντώνται στα ζυθοποιεία (Hill A., 2015).....	67

Συντμήσεις, ακρωνύμια, σύμβολα και ορισμοί

LAB	Lactic Acid Bacteria
VBNC	Viable But Not Culturable
EPS	Exopolysaccharides
GNB	Gram Negative Bacteria
AAB	Acetic Acid Bacteria
VDK	Vicinal Diketones
POF	Phenolic Off-Flavor
C&S	Cleaning & Sanitation
CIP	Clean in Place
GMP	Good Manufacturing Practice
EBC	European Brewery Convention
ASBC	American Society of Brewing Chemists
BCOJ	Brewery Convention of Japan
BBT	Bright Beer Tank
PCR	Polymerase Chain Reaction

1 Εισαγωγή και Σκοπός της Εργασίας

Οι μικροοργανισμοί επιμόλυνσης του ζύθου ανέκαθεν απασχολούσαν τους ζυθοποιούς δημιουργώντας προβλήματα στα παραγωγικά στάδια και στο τελικό προϊόν. Η αναγνώριση τους, η κατανόηση των μηχανισμών δράσης τους και των αναπτυξιακών χαρακτηριστικών τους, όπως επίσης και οι διαδικασίες που εφαρμόζονται για την εξάλειψη τους οδηγούν σε μεγαλύτερο έλεγχο της παραγωγικής διαδικασίας και διασφαλίζουν την ακεραιότητα του τελικού προϊόντος.

Σκοπός της εργασίας είναι η περιγραφή των μικροοργανισμών επιμόλυνσης του ζύθου και των θρεπτικών υποστρωμάτων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση τους, με τρόπο που να είναι εφικτό αυτοί οι έλεγχοι να πραγματοποιηθούν από ένα μικροζυθοποιείο όπου οι πόροι – χρήματα, χρόνος και ανθρώπινο δυναμικό - είναι περιορισμένοι. Η κατανόηση των μικροοργανισμών και τα πιθανά σημεία επιμόλυνσης από αυτούς είναι το πρώτο βήμα για την μικροβιολογική επαγρύπνηση. Το δεύτερο βήμα είναι να καθοριστούν τα κρίσιμα σημεία ελέγχου ώστε να επιτευχθεί ο έλεγχος της παραγωγικής διαδικασίας και να διασφαλιστεί η ακεραιότητα του τελικού προϊόντος.

Στο δεύτερο κεφάλαιο περιγράφονται οι μικροοργανισμοί επιμόλυνσης του ζύθου, ο τρόπος εισαγωγής τους στα ζυθοποιεία, οι συνθήκες ανάπτυξης τους, τα στάδια που μπορεί να υπάρξει επιμόλυνση, οι επιπτώσεις που έχουν στο προϊόν και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους. Στην συνέχεια γίνεται αναφορά στα θρεπτικά υποστρώματα και σε ορισμένους βιοχημικούς ελέγχους που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση τους.

Στο επόμενο κεφάλαιο περιγράφονται τα σημεία δειγματοληψίας στο μικροζυθοποιείο και προτείνονται τα ελάχιστα σημεία δειγματοληψίας που θα πρέπει να ακολουθεί ένα ζυθοποιείο ώστε να διασφαλίσει την παραγωγική του διαδικασία και το τελικό προϊόν από μικροβιολογική σκοπιά.

Τέλος, στο παράρτημα υπάρχουν οι συνταγές για μια πληθώρα θρεπτικών υποστρωμάτων που ανταποκρίνονται στις απαιτήσεις του ζύθου.

2 Μικροοργανισμοί επιμόλυνσης ζύθου

Ο ζύθος χαρακτηρίζεται ως ένα μικροβιολογικά σταθερό προϊόν. Συνήθως το ποσοστό αιθανόλης στον ζύθο κυμαίνεται από 0.5 – 10% w/w, τα ισομερειωμένα α-οξέα του λυκίσκου συνήθως είναι μεταξύ 17-55 ppm, το ποσοστό του διαλυμένου διοξειδίου του άνθρακα είναι περίπου 0.5% w/v. Η συγκέντρωση του οξυγόνου είναι πολύ χαμηλή και συνήθως είναι λιγότερο από 0.3 ppm, το pH κυμαίνεται συνήθως από 3.8 έως και 4.7 ενώ σε ορισμένους τύπους μπορεί να είναι ακόμη και στο 3.2-3.4. Αυτά τα χαρακτηριστικά τον καθιστούν ένα αφιλόξενο περιβάλλον για την ανάπτυξη μικροοργανισμών (Suzuki, 2015).

Δεν ισχύει όμως το ίδιο και για το ζυθογλεύκος, το οποίο αποτελεί ένα άριστο υπόστρωμα για την ανάπτυξη μιας ευρείας γκάμας μικροοργανισμών, οπότε εμβολιάζεται με το επιθυμητό στέλεχος μαγιάς και χρησιμοποιούνται οι βέλτιστες συνθήκες για την γρήγορη μετατροπή του σε ζύθο (Bokulich et al. 2012).

Η κατανάλωση των θρεπτικών συστατικών κατά το στάδιο της ζύμωσης από την μαγιά, καθιστά το ζύθο ένα δύσκολο υπόστρωμα για την ανάπτυξη μικροοργανισμών (Suzuki, 2015).

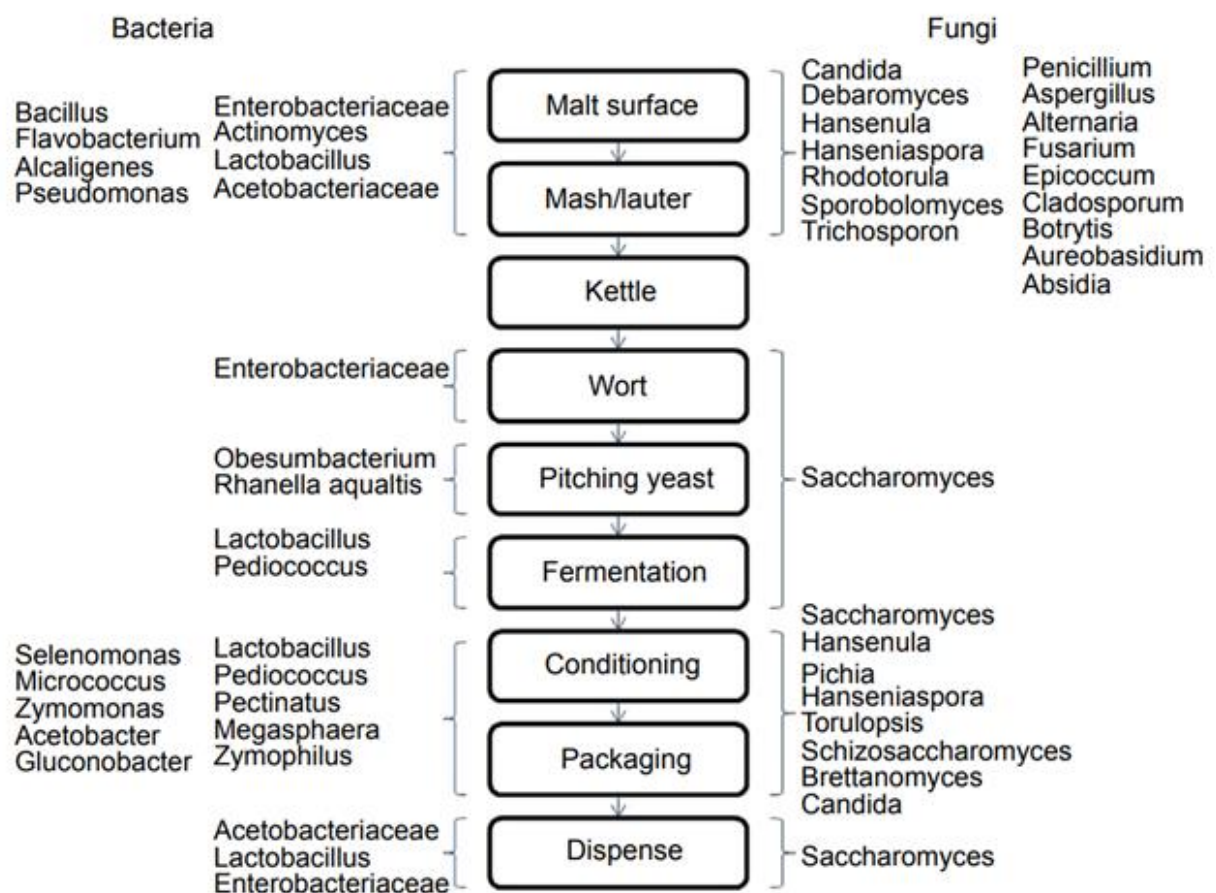
Από μικροβιολογική σκοπιά, κατά το παρελθόν η κατανάλωση ζύθου ήταν ασφαλέστερη σε σχέση με το νερό. Αυτό οφείλονταν εν μέρη στο ότι υπάρχει το στάδιο του βρασμού κατά την παρασκευή του άλλα και στην μικροβιολογική σταθερότητα που του προσδίδουν τα χαρακτηριστικά του (www.biomerieux-industry.com).



Σχήμα 1. Τα αντιμικροβιακά χαρακτηριστικά του ζύθου (Vriesekoop et al., 2013)

Υπάρχουν όμως συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί επιμόλυνσης που μπορούν να αναπτυχθούν στο ζύθο και είναι ικανοί να προκαλέσουν αλλοίωση στο προϊόν καθώς παράγουν δυσάρεστες γεύσεις και αρώματα, οργανικά οξέα και θολερότητα. Ακόμη μπορούν να ανταγωνιστούν την μαγιά για θρεπτικά συστατικά οδηγώντας σε διαφορετικό βαθμό ζύμωσης (www.biomerieux-industry.com).

Δύο μεγάλες ομάδες μικροοργανισμών μπορούν να προκαλέσουν αλλοιώσεις στο ζύθο, τα βακτήρια και οι μύκητες/ζύμες.


























Σχήμα 2. Μικροβιακές επιμολύνσεις κατά την ζυθοποίηση (Hill, A., 2015)

2.1 Βακτηριακές επιμολύνσεις

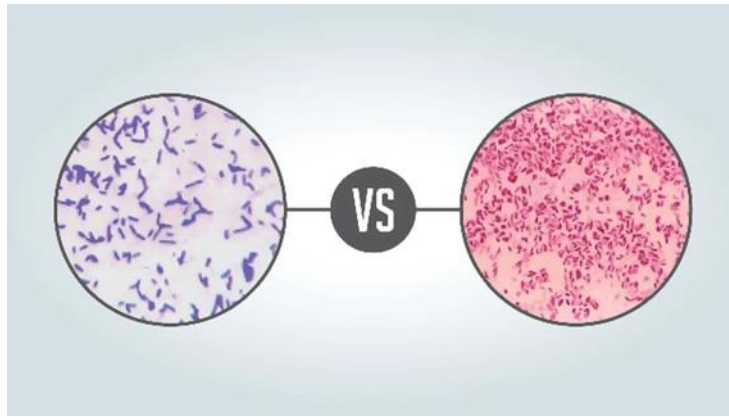
Οι βακτηριακές επιμολύνσεις του ζύθου περιλαμβάνουν την ανεπιθύμητη ανάπτυξη μικροοργανισμών στα διάφορα στάδια της παραγωγικής του διαδικασίας, όπως και στο τελικό προϊόν, οι οποίοι μπορεί να αλλοιώνουν τα χαρακτηριστικά του ζύθου ή και όχι.

Η ταυτοποίηση άγνωστων μικροοργανισμών παραδοσιακά έχει στηριχθεί σε ιδιότητες όπως η εμφάνιση των καλλιεργειών στα θρεπτικά υποστρώματα, στο κυτταρικό τοίχωμα και στην κινητικότητα.

shape	size	surface	color	opacity	elevation	margin
 circular	 small	smooth	 white	transparent	 flat	 even
 punctiform	 medium	glistening	 creamy-white	translucent	 umbonate	 wavy
 filamentous	 large	rough	 yellow	opaque	 raised	 filamentous
 irregular		wrinkle	 orange		 convex	 lobate
 rhizoid		dull	 green		 pulvinate	 curled

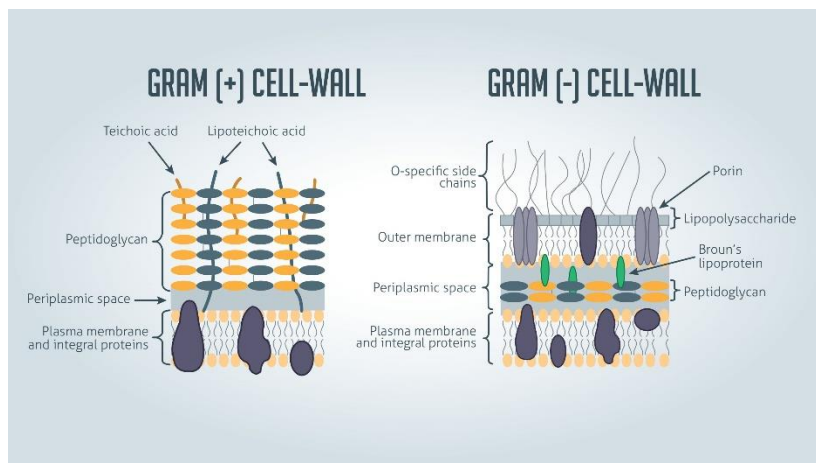
Σχήμα 3. Μορφολογικά χαρακτηριστικά των κυττάρων (<https://microscopeclarity.com/how-to-identify-bacteria/>).

Διαφορές στο κυτταρικό τοίχωμα γίνονται εμφανείς με την χρώση Gram και γίνεται διαχωρισμός των βακτηρίων σε θετικά και αρνητικά κατά Gram. Τα θετικά κατά Gram βακτήρια συγκρατούν την χρωστική crystal violet και φαίνονται ως μωβ, ενώ τα αρνητικά κατά Gram αποχρωματίζονται και βάφονται κόκκινα από την safranin (Juvonen, 2015).



Σχήμα 4. Εμφάνιση των χρωμάτων της χρώσης κατά Gram (<https://www.technologynetworks.com/>)

Τα Gram θετικά βακτήρια έχουν ένα παχύ στρώμα πεπτιδογλυκάνης και δεν έχουν εξωτερική λιπιδική μεμβράνη, ενώ τα Gram αρνητικά βακτήρια έχουν λεπτή στοιβάδα πεπτιδογλυκάνης και έχουν εξωτερική λιπιδική μεμβράνη. (<https://www.technologynetworks.com/>)



Σχήμα 5. Διαφορές στο κυτταρικό τοίχωμα ανάμεσα στα Gram θετικά και αρνητικά βακτήρια. (<https://www.technologynetworks.com/>)

Αυτός ο διαχωρισμός αποτελεί έναν από τους κύριους αρχικούς διαχωρισμούς για την μελέτη των μικροοργανισμών. Με βάση αυτόν, θα επιχειρηθεί να παρουσιαστούν οι μικροοργανισμοί επιμόλυνσης του ζύθου.

2.1.1 Θετικά κατά Gram βακτήρια

Τα Gram θετικά βακτήρια που απασχολούν την βιομηχανία του ζύθου ανήκουν κατά κύριο λόγο στα γαλακτικά βακτήρια (Lactic Acid Bacteria – LAB).

Τα τυπικά γαλακτικά βακτήρια είναι Gram θετικά, μη σπορογόνοι και μη κινητικοί κόκκοι ή βάκιλοι. Υπολείπονται το ένζυμο της καταλάσης και είναι ομοζυμωτικοί ή ετεροζυμωτικοί, δηλαδή παράγουν μόνο γαλακτικό οξύ κατά τον μεταβολισμό της γλυκόζης ή παράγουν μίγμα γαλακτικού οξέος, διοξειδίου του άνθρακα, οξικού οξέος και/ή αιθανόλης ως τα κύρια μεταβολικά προϊόντα του καταβολισμού των σακχάρων. Παρουσιάζουν αντοχή στα οξέα και έχουν περίπλοκες απαιτήσεις σε θρεπτικά συστατικά. Η ικανότητα ανάπτυξης σε ποικίλα περιβάλλοντα, ο μεταβολισμός και η ζυμωτική ικανότητα τους, όπως και οι φυσιολογικές ιδιότητες παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια (Priest, 2003).

Τα LAB βρίσκονται σε αφθονία στη φύση, και σχετίζονται με την φυτική ύλη (συμπεριλαμβανομένου του κριθαριού και της βύνης) και τους ανθρώπους, μεταξύ των άλλων περιβαλλόντων. Ο εντοπισμός τους στα περιβάλλοντα ζύθοποίησης συνδέεται με την σκόνη βύνης, με τα αερολύματα και με τον εξοπλισμό, όμως τα αντιμικροβιακά χαρακτηριστικά του ζύθου καθιστούν αδύνατη την ανάπτυξη των περισσότερων LAB. Ωστόσο, κάποια έχουν προσαρμοστεί στις αντίξοες συνθήκες του ζύθου και είναι οι πιο διαδεδομένοι μικροοργανισμοί αλλοίωσης στα ζυθοποιεία της σημερινής εποχής (Bokulich & Bamforth, 2013).

Πίνακας 1. Γαλακτικά βακτήρια αλλοίωσης του ζύθου (Bokulich & Bamforth, 2013)

<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Pediococcus damnosus</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Pediococcus inopinatus</i>
<i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>Pediococcus dextrinicus</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
<i>Lactobacillus buchneri</i>	<i>Pediococcus parvulus</i>
<i>Lactobacillus curvatus</i>	<i>Pediococcus claussenii</i>
<i>Lactobacillus coryneformis</i>	
<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	
<i>Lactobacillus fermentum</i>	
<i>Lactobacillus fructivorans</i>	
<i>Lactobacillus paucivorans</i>	
<i>Lactobacillus paracollinoides</i>	
<i>Lactobacillus amylolyticus</i>	
<i>Lactobacillus lindneri</i>	
<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	
<i>Lactobacillus brevisimilis</i>	
<i>Lactobacillus malefermentans</i>	

Ο Πίνακας 1 περιλαμβάνει όλα τα αναγνωρισμένα είδη LAB που έχουν ανιχνευθεί στο ζύθο, χωρίς όμως όλοι να παρουσιάζουν υψηλές δυνατότητες αλλοίωσης. Τα περισσότερα περιστατικά επιμόλυνσης σε τελικά προϊόντα οφείλονται κυρίως στους *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus lindneri* και *Pediococcus damnosus* (Bokulich & Bamforth, 2013; Suzuki, 2015).

Ένας σημαντικός παράγοντας που περιορίζει τους οργανισμούς που μπορούν να αλλοιώσουν το ζύθο (ιδιαίτερα τα Gram-θετικά βακτήρια που είναι ανθεκτικά στην αιθανόλη και το χαμηλό pH) είναι η παρουσία πικρικών ενώσεων που προέρχονται από τον λυκίσκο. Οι ενώσεις αυτές εμποδίζουν τα θετικά κατά Gram βακτήρια να αναπτυχθούν. Τα κυριότερα από αυτά είναι τα ισο-α-οξέα, τα οποία παράγονται από τα α-οξέα του λυκίσκου κατά τη διάρκεια του βρασμού του γλεύκους (Bokulich & Bamforth, 2013).

Τα περισσότερα είδη LAB παρουσιάζουν υψηλό βαθμό ανοχής στην αιθανόλη, αλλά η ανοχή στην αιθανόλη διατηρείται μεταξύ των ειδών, ενώ η αντίσταση στον λυκίσκο παίζει μεγαλύτερο ρόλο στην ικανότητα αλλοίωσης του ζύθου (Bokulich & Bamforth, 2013).

Τα περισσότερα περιστατικά αλλοίωσης που παρατηρήθηκαν την περίοδο 1980 έως το 2002 στη Γερμανία οφείλονται στους *Lactobacillus* και *Pediococcus*. Οι μελέτες που πραγματοποιήθηκαν από το 2010 έως το 2013 εμφανίζουν παρόμοια τάση στην εμφάνιση αυτών των μικροοργανισμών (Suzuki, 2015).

Οι Schneiderbanger et al. (2018) σε έρευνα τους που έγινε στο Research Center Weihenstephan for Brewing and Food Quality μεταξύ του 2010 και του 2016, αναφέρουν ότι περίπου το 97% των επιβεβαιωμένων περιστατικών επιμόλυνσης οφείλονταν στα γαλακτικά βακτήρια με τα μεγαλύτερα ποσοστά να οφείλονται στους *Lactobacillus brevis* με 34.6%, *Lactobacillus (para-)casei* με 10.3% και τον *Lactobacillus backii* με 9.9%.

Πίνακας 2. Αριθμός εντοπισμού και περιστατικών (σε παρένθεση) ανά είδος η ομάδα βακτηρίων (Schneiderbanger et al. 2018).

	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	Total
<i>L. brevis</i>	43 (29)	105 (23)	58 (28)	44 (21)	57 (21)	36 (19)	88 (30)	431 (161)
<i>L. lindneri</i>	9 (6)	12 (7)	4 (3)	0 (0)	0 (0)	21 (3)	19 (8)	68 (29)
<i>L. backii</i>	4 (3)	21 (9)	15 (6)	9 (5)	16 (5)	14 (7)	23 (11)	102 (46)
<i>L. (para-)casei</i>	8 (5)	20 (7)	17 (10)	5 (4)	10 (4)	25 (8)	26 (10)	111 (48)
<i>L.group^a</i>	4 (4)	6 (3)	4 (1)	12 (4)	8 (5)	8 (5)	22 (10)	64 (32)
<i>L. collinoides</i>	0 (0)	2 (1)	5 (5)	1 (1)	5 (3)	5 (3)	8 (7)	23 (18)
<i>L. (para-)buchneri</i>	3 (2)	9 (5)	1 (1)	15 (5)	13 (3)	13 (3)	10 (8)	52 (25)
<i>L. rossiae</i>	1 (1)	0 (0)	0 (0)	1 (1)	2 (1)	2 (1)	10 (8)	16 (13)
<i>L. perolens/harbinensis</i>	2 (2)	8 (2)	2 (1)	4 (2)	9 (4)	9 (4)	25 (11)	61 (25)
<i>M. cerevisiae</i>	5 (4)	2 (1)	2 (1)	0 (0)	3 (1)	3 (1)	16 (3)	28 (10)
<i>P. group^b</i>	3 (2)	7 (3)	11 (3)	0 (0)	5 (3)	5 (3)	3 (2)	36 (18)
<i>Pd. damnosus</i>	1 (1)	6 (3)	18 (10)	6 (3)	5 (5)	5 (5)	10 (8)	55 (35)
<i>Pd. inopinatus</i>	0 (0)	0 (0)	1 (1)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (2)
<i>Pd. clausenii</i>	0 (0)	2 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (1)
<i>Pd. group^c</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (1)	3 (2)
Total	83 (49)	200 (65)	138 (70)	98 (47)	136 (57)	137 (61)	262 (116)	1054 (465)

^a *L. (para-)plantarum, L. coryniformis*;

^b *P. cerevisiiphilus, P. frisingensis, P. haikarae*;

^c *Pd. parvulus, Pd. pentosaceus, Pd. acidilactici*.

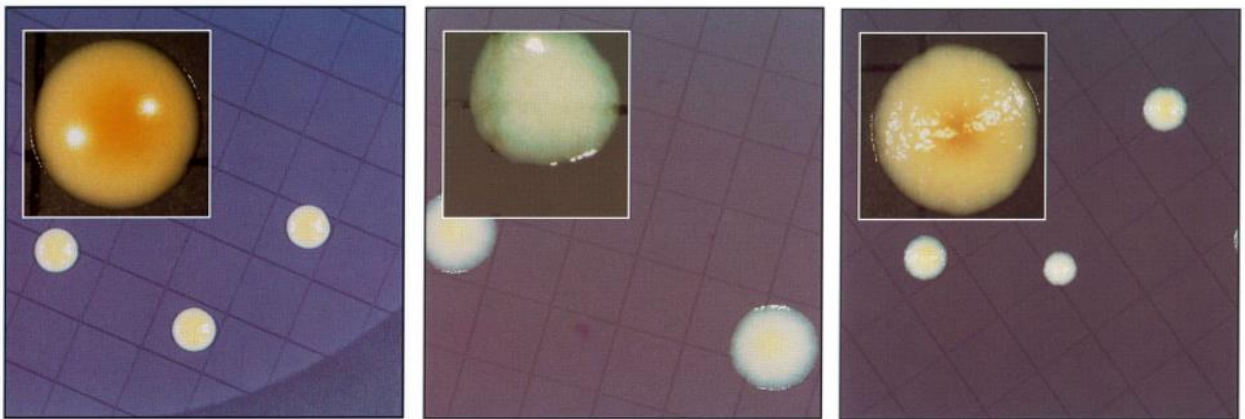
2.1.1.1 *Lactobacilli*

Το είδος που ανιχνεύεται συχνότερα είναι ο *L. brevis* και εντοπίζεται από τα στάδια της ζύμωσης και της ωρίμανσης, όπως και σε τελικά προϊόντα. Είναι γενικά αποδεκτό ότι είναι ευπροσάρμοστος και ότι αναπτύσσεται σχετικά καλά σε πολλά και διάφορα υποστρώματα και σε θερμοκρασίες ευρύτερες σε σύγκριση με τα περισσότερα άλλα είδη LAB που επιμολύνουν το ζύθο (Suzuki, 2015).

Η μορφολογία του είναι λεπτές ράβδοι 0.7-1.0 x 2-4 μm και συναντάται ως μονάδες, ζευγάρια και μικρές ή μεγάλες αλυσίδες. Οι αποικίες είναι κυκλικές ή ακανόνιστες/κυκλικές και είναι επίπεδες ή κυρτές (ASBC, 2008).



Σχήμα 6. *Lactobacillus brevis*. Χρώση Crystal Violet 100x/Oil, Total Magnification 1.125x (ASBC, 2008)



Σχήμα 7. *Lactobacillus brevis* σε mixed cellulose ester filters. (ASBC, 2008)

Το στέλεχος και η πηγή απομόνωσης του *L. brevis* επηρεάζουν σημαντικά την ικανότητα του να αλλοιώνει τον ζύθο. Υπάρχουν στελέχη έχουν την ικανότητα να αλλοιώνουν όλα τα είδη ζύθου ανεξαρτήτου των παρεμποδιστικών χαρακτηριστικών. Αποτέλεσμα της αλλοίωσης είναι η θολερότητα, η πρόκληση ιζημάτων και η οξίνιση, χωρίς όμως να έχουν παραγωγή διακετυλίου. Αντίθετα, στελέχη *L. brevis* που απομονώνονται από πηγές εκτός του περιβάλλοντος του ζυθοποιείου γενικά παρουσιάζουν καθόλου ή πολύ ασθενή ικανότητα αλλοίωσης του ζύθου. Σημαντική παράμετρο για την βιομηχανία του ζύθου αποτελεί η διαφοροποίηση της ικανότητας του *L. brevis* να αλλοιώνει τον ζύθο. Υπάρχουν στελέχη που

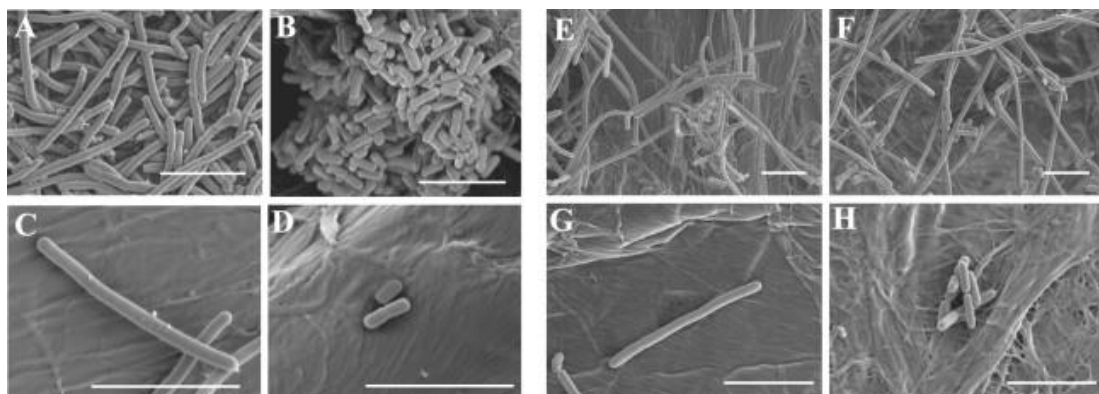
μπορούν να παράγουν εξωκυτταρικές κάψουλες και έχουν την ικανότητα να αντέχουν έως και 25 μονάδες παστερίωσης και να αντέχουν τα απολυμαντικά που χρησιμοποιούνται στα ζυθοποιεία. Αυτή η συγκεκριμένη υποομάδα στελεχών *L. brevis* προκαλεί σοβαρά θολώματα, ιζήματα και υφές σαν ίνες - κλωστές στο ζύθο και παλαιότερα είχε χαρακτηριστεί ως *Lactobacillus frigidus* (Suzuki, 2015).

Κάποια στελέχη του *L. brevis* έχουν την ικανότητα να ζυμώνουν τις δεξτρίνες και ως αποτέλεσμα να προκαλούν μεγαλύτερο βαθμό ζύμωσης. Αυτά τα στελέχη στο παρελθόν έχουν χαρακτηριστεί ως *L. diastaticus* (Suzuki, 2015).

Ο *L. lindneri* έχει την ικανότητα να αντέχει τις ενώσεις του λυκίσκου και η ιδανική θερμοκρασία ανάπτυξης του κυμαίνεται μεταξύ 19–23 ° C. Αναφέρεται επίσης ότι ο *L. lindneri* δεν μπορεί να αναπτυχθεί σε θερμοκρασίες υψηλότερες από 28 ° C, αλλά μπορεί να αντέξει έως και 15 μονάδες παστερίωσης (Suzuki, 2015).

Ένα ακόμη πρόβλημα του *L. lindneri* είναι ότι μπορεί να διαφύγει την ανίχνευση κατά τους μικροβιολογικούς ελέγχους διότι η ανάπτυξη του σε πολλά θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία του ζύθου είναι φτωγή. Ο *L. lindneri* προκαλεί σχετικά αχνή θολερότητα και ίζημα με πολύ μικρή παραγωγή δυσάρεστων γεύσεων στο ζύθο. Σπάνια αναφέρεται η εμφάνιση του εκτός των περιβαλλόντων ζυθοποιίας, αν και ένα είδος LAB που σχετίζεται στενά με το *L. lindneri* έχει απομονωθεί από σταφύλια και τις διαδικασίες οινοποίησης (Suzuki, 2015).

Ένα χαρακτηριστικό των στελεχών *L. brevis* και *L. lindneri* που αφορούν την βιομηχανία του ζύθου είναι ότι έχουν μειωμένο κυτταρικό μέγεθος και έτσι μπορούν να διαπεράσουν ευκολότερα ορισμένα από τα φίλτρα μεμβράνης που χρησιμοποιούνται κατά την στείρα διήθηση στις ζυθοποιίες (Suzuki, 2015).



Σχήμα 8. *L. brevis* και *L. lindneri* σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Asano et al., 2007).

Στο Σχήμα 8 παρουσιάζονται στελέχη του *L. brevis* και του *L. lindneri* που έχουν προσαρμοστεί στο ζύθο. Τα Α και C είναι ο *L. brevis* που δεν έχει προσαρμοστεί στο περιβάλλον του ζυθοποιείου, τα Β και D είναι ο *L. brevis* που έχει καταφέρει να προσαρμοστεί, τα Ε και G είναι ο *L. lindneri* που δεν είναι προσαρμοσμένος και τα F και Η είναι ο *L. lindneri* που έχει προσαρμοστεί στο περιβάλλον του ζυθοποιείου. Η μπάρα σε κάθε περίπτωση είναι 5 μm (Asano et al., 2007)

Τα *L. paracollinoides*, *Lactobacillus backi* και *Lactobacillus raucivorans* έχουν προταθεί πρόσφατα ως νέα είδη και οι συχνότητες στα περιστατικά αλλοίωσης δεν είναι καλά γνωστές. Τα δύο πρώτα αποδεικνύεται από τον γενετικό χαρακτηρισμό ότι σχετίζονται στενά με τους *Lactobacillus collinoides* και *Lactobacillus coryniformis*, αντίστοιχα. Τα δύο αυτά είδη παρουσιάζουν μειωμένη ανάπτυξη στα θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία του ζύθου. Ένα ακόμη είδος που έχει αναγνωρισθεί πρόσφατα ως είδος που προκαλεί αλλοίωση στον ζύθο είναι ο *Lactobacillus acetotolerans*. Η μειωμένη ανάπτυξη στα θρεπτικά υποστρώματα είναι ίσως ο κύριος λόγος που αυτά τα είδη *Lactobacillus* παρέμεναν αχαρακτήριστα και δεν είχαν αναφερθεί μέχρι πρόσφατα (Suzuki, 2015).

Τα στελέχη των *L. paracollinoides*, *L. backi*, *L. raucivorans* αφορούν μόνο περιβάλλοντα ζυθοποιίας και δεν έχουν απομονωθεί εκτός αυτών. Οι *Lactobacillus casei/paracasei*, ο *Lactobacillus plantarum* και ο *L. coryniformis* εντοπίζονται παντού στην φύση αλλά παρουσιάζουν ασθενή αντοχή στις ουσίες του λυκίσκου. Επομένως, αυτά τα είδη *Lactobacillus* αλλοιώνουν μόνο το ζύθο που περιέχει λίγο λυκίσκο ή έχει υψηλές τιμές pH. Αν και η συχνότητα των περιστατικών αλλοίωσης από αυτούς τους σχετικά ευαίσθητους στο λυκίσκο γαλακτοβάκιλλους είναι γενικά χαμηλή, είναι γνωστό ότι προκαλούν δυσάρεστες γεύσεις διακετυλίου στο ζύθο (Suzuki, 2015).

Μια τάση που πρέπει να σημειωθεί, ωστόσο, είναι ότι τα περιστατικά αλλοίωσης από το *L. (para)casei* φαίνεται να έχουν αυξηθεί από το 2010. Οι *Lactobacillus curvatus* και *Lactobacillus malefermentans* αναγνωρίστηκαν επίσης ως είδη LAB που αλλοιώνουν το ζύθο, αλλά τα περιστατικά αλλοίωσης από αυτά τα είδη LAB είναι πλέον σπάνια και θεωρούνται ως είδη LAB μικρότερης σημασίας για την αλλοίωση του ζύθου (Suzuki, 2015).

Επί του παρόντος, περίπου 20 είδη LAB έχουν αναγνωρισθεί ως υποχρεωτικοί ή πιθανοί μικροοργανισμοί αλλοίωσης του ζύθου, αλλά συχνά παρατηρούνται διαφορές στην ικανότητα αλλοίωσης ανάμεσα στα στελέχη του ίδιου είδους. Επιπλέον, η ικανότητα αλλοίωσης του ζύθου από τα στελέχη LAB επηρεάζεται σημαντικά από τις φυσιολογικές τους συνθήκες (ο

βαθμός προσαρμογής στα πικρικά οξέα του λυκίσκου) και τους τύπους του ζύθου (μονάδες πικράδας, τιμές pH, περιεκτικότητα σε αιθανόλη και άλλους αντιβακτηριακούς παράγοντες). Εκτός από τα περιστατικά αλλοίωσης των έτοιμων ζύθων, ορισμένοι θερμοφιλοι γαλακτοβάκιλλοι, συμπεριλαμβανομένου του *Lactobacillus delbrueckii*, έχουν επισημανθεί ως επιμολυντές του γλεύκους. Σκοτώνονται με τη διαδικασία βρασμού, αλλά εάν το γλεύκος διατηρηθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα, ακόμη και ζεστό (λιγότερο από 60 °C), οι θερμοφιλοι γαλακτοβάκιλλοι αλλοιώνουν το γλυκό γλεύκος παράγοντας γαλακτικό οξύ (Suzuki, 2015).

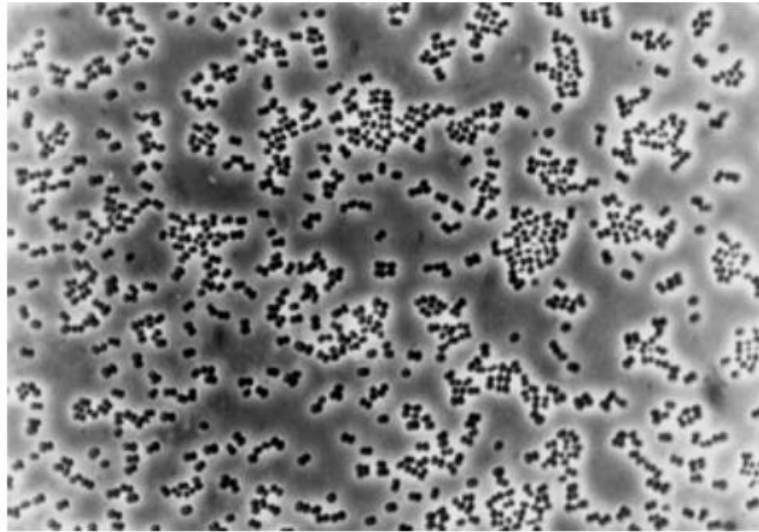
Τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος και κυρίως οι γαλακτοβάκιλλοι έχουν την ικανότητα όταν υποβληθούν σε αντίξοες συνθήκες να περάσουν σε μια κατάσταση η οποία χαρακτηρίζεται ως Viable But Not Culturable. Αυτή η κατάσταση αποτελεί μια στρατηγική επιβίωσης για τα βακτήρια που δεν μπορούν να παραγάγουν σπόρια. Τα κύτταρα παραμένουν μεταβολικά ενεργά, αλλά δεν μπορούν να δημιουργήσουν αποικίες όταν γίνει ενοφθαλμισμός τους σε καλλιεργητικά μέσα. Η χαμηλή θερμοκρασία, η έλλειψη θρεπτικών συστατικών, το χαμηλό pH είναι κάποιοι από τους παράγοντες που μπορεί να οδηγήσουν τα κύτταρα στην κατάσταση VBNC. Επίσης τα κύτταρα αυτά μπορούν κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες να επανέλθουν σε ενεργή κατάσταση και να μπορούν και πάλι να δημιουργήσουν αποικίες (Liu et al., 2017b, Li et al., 2020).

Όταν βρίσκονται στην κατάσταση VBNC δεν μπορούν να εντοπιστούν με τους παραδοσιακούς μικροβιολογικούς ελέγχους αλλά διατηρούν την ικανότητα τους να αλλοιώνουν. Αυτό αποτελεί πρόβλημα για την ζυθοποιία διότι χωρίς να έχουν εντοπιστεί από τους μικροβιολογικούς ελέγχους μπορούν να προκαλέσουν αλλοίωση στο τελικό προϊόν (Liu et al., 2017a).

2.1.1.2 *Pediococci*

Η αλλοίωση στο ζύθο που προκαλείται από τον *P. damnosus* χαρακτηρίζεται από σχηματισμό οξέος και την δυσάρεστη γεύση βουτύρου που προκαλεί το διακετυλίο. Ο *P. damnosus* έχει την ικανότητα να παράγει υψηλά επίπεδα διακετυλίου ακόμη και όταν τα επίπεδα μόλυνσης είναι χαμηλά. Ορισμένα στελέχη έχουν την ικανότητα να παράγουν εξωπολυσακχαρίτες με αποτέλεσμα να αποκτά ο μολυσμένος ζύθος μια ζελατινώδη υφή. Ο *P. damnosus* κυρίως

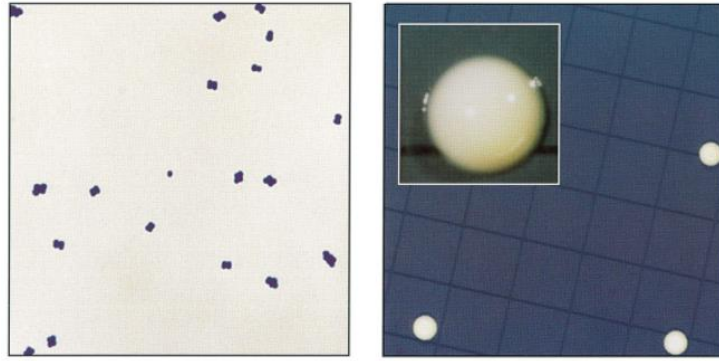
εντοπίζεται ως επιμόλυνση στη μαγιά και στο ζύθο. Στο παρελθόν ήταν γνωστός ως *Sarcina* λόγω της μορφολογίας τους σε κυβικά πακέτα (Suzuki, 2015).



Σχήμα 9. *P. damnosus* σε μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης, διάμετρος κυττάρων 0.7-0.8 μm (Holzapfel et al. 2006).

Η ικανότητα του *P. damnosus* να επιμολύνει τον ζύθο κατά την ζύμωση και την ωρίμανση οφείλεται στο ότι μπορεί να αναπτυχθεί σε χαμηλές θερμοκρασίες. Αν επιμολύνει την ζύμωση θα παραγάγει απροσδόκητα υψηλά επίπεδα διακετυλίου ενώ επειδή έχει την ικανότητα να προσκολλάται στην μαγιά μπορεί να προκαλέσει πρόωρη καθίζηση των κυττάρων της με αποτέλεσμα την βραδύτερη ζύμωση έως και την παύση της. Ο *L. lindneri* παρουσιάζει επίσης την ικανότητα προσκόλλησης στην μαγιά, οπότε αυτά τα δύο είδη θεωρούνται λανθάνοντα στις διαδικασίες ζύμωσης και ωρίμανσης. Επιπλέον, ο *P. damnosus* αναπτύσσεται αργά στα εργαστηριακά θρεπτικά υποστρώματα ανίχνευσης και συχνά απαιτεί ορισμένα συγκεκριμένα στοιχεία του ζύθου για την ανάπτυξη του (Suzuki, 2015).

Ο *P. damnosus* είναι μικροί κόκκοι 0.7-1 μm , συναντώνται ως μονάδες, ζεύγη, τετράδες ή συστάδες (clusters). Οι αποικίες εμφανίζονται ως κυκλικές και κυρτές (ASBC, 2008)



Σχήμα 10. *Pediococcus damnosus*. Χρώση Crystal Violet 100x/Oil, Total Magnification 1.125x και σε mixed cellulose ester filter. (ASBC, 2008)

Ο *P. damnosus* αναπτύσσεται σε σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες και η βέλτιστη θερμοκρασία του είναι περίπου 22–25 °C. Επομένως, η θερμοκρασία επώασης των εργαστηριακών θρεπτικών υποστρωμάτων ανίχνευσης που χρησιμοποιούνται στις δοκιμές ποιοτικού ελέγχου θα πρέπει να διατηρείται σε σχετικά χαμηλά επίπεδα (συνήθως 25–28 °C) για την πλήρη ανίχνευση ειδών LAB που αλλοιώνουν το ζύθο, συμπεριλαμβανομένου του *P. damnosus* και *L. lindneri*.

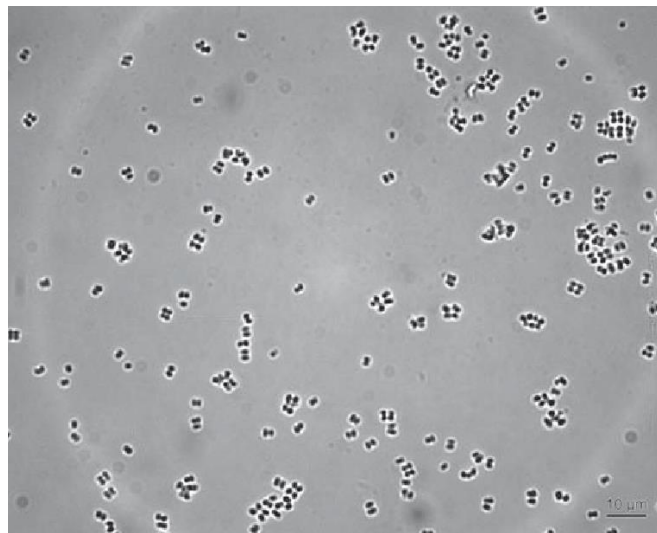
Ο *P. damnosus* δείχνει προτίμηση σε περιβάλλοντα με υψηλά ποσοστά διοξειδίου του άνθρακα οπότε οι κύριες πηγές απομόνωσης του είναι τα περιβάλλοντα ζυθοποιίας και οινοποίησης (Suzuki, 2015).

Ο *Pediococcus inopinatus* μπορεί να ανιχνευθεί στην μαγιά, άλλα σπάνια στα υπόλοιπα στάδια της ζυθοποίησης. Αυτό το είδος έχει την ικανότητα να επιμολύνει ζύθους με τιμές pH πάνω από 4.2 και με χαμηλή περιεκτικότητα σε αλκοόλη και πικρικά οξέα λυκίσκου. Σε περίπτωση επιμόλυνση η παραγωγή διακετυλίου δεν είναι το ίδιο έντονη και αισθητή όπως με τον *P. damnosus* (Suzuki, 2015).

Ένα νέο είδος που αλλοιώνει τον ζύθο είναι ο *Pediococcus clausenii*. Μερικά στελέχη *P. clausenii* παράγουν εξωπολυσακχαρίτες. Ένα ακόμη είδος που έχει βρεθεί ότι αλλοιώνει το ζύθο είναι ο *Pediococcus dextrinicus* (Suzuki, 2015).

2.1.1.3 Gram Θετικοί πέραν *Lactobacilli* και *Pediococci*

Ελαχιστοι Gram θετικοί μικροοργανισμοί έχουν αναφερθεί ως επιμόλυνση στον ζύθο, πλην των *Lactobacilli* και των *Pediococci*. Ένας από τους λοιπούς Gram θετικούς μικροοργανισμούς είναι η *Kocuria kristinae* όπου στο παρελθόν ήταν ταξινομημένη ως *Micrococcus kristinae* (Bokulich & Bamforth, 2013). Το μέγεθος των κυττάρων κυμαίνεται από 0.7-1.2 μm και συναντάται σε ομάδες των δυο, τεσσάρων ή ακόμη και ακανόνιστου αριθμού κυττάρων. Οι αποικίες είναι διογκωμένες με ζαρωμένη επιφάνεια και το μέγεθος τους είναι μέχρι 2 mm. Ο χρωματισμός των αποικιών ποικίλει από ελαφρύ κρεμ έως πορτοκαλί. Τα στελέχη του *Kocuria kristinae* παρουσιάζουν ανθεκτικότητα απέναντι στον λυκίσκο. Ακόμη και μικρή επιμόλυνση έχει μεγάλο αντίκτυπο στα γευστικά χαρακτηριστικά του ζύθου (Matoulkova & Kubizniakova, 2018). Το συγκεκριμένο βακτήριο είναι προαιρετικά αναερόβιο οπότε η ικανότητα ανάπτυξης του επηρεάζεται από την περιεκτικότητα του ζύθου σε οξυγόνο. Η επιμόλυνση από το *K. Kristinae* προσδίδει μια άτυπη γεύση στο ζύθο και ένα φρουτώδες άρωμα (Suzuki, 2015).



Σχήμα 11. *Kocuria kristinae* (Matoulkova & Kubizniakova, 2018)

Οι *Bacillaceae* δεν θεωρούνταν παραδοσιακά ικανοί να αλλοιώσουν το ζύθο, αλλά τέσσερα είδη που περιέχουν το γονίδιο αντοχής στον λυκίσκο *horA* - *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Staphylococcus epidermidis* και *Paenibacillus humicus* - έχουν απομονωθεί από αλλοιωμένη σπιτική ζυθοποίηση και παρουσίασαν ανάπτυξη όταν επαναενοφθαλμίστηκαν σε ζύθο (Bokulich & Bamforth, 2013).

Πίνακας 3. Θετικά κατά Gram βακτήρια επιμόλυνσης του ζύθου και τα μικροβιολογικά τους χαρακτηριστικά (Suzuki, 2015).

Είδος	Ικανότητα αλλοίωσης ζύθου ^α	Πρωταρχική/ δευτερεύουσα επιμόλυνση ^β	Σχηματισμός EPS	Σχηματισμός διακετυλίου ^γ	Ανάπτυξη σε άγαρ MRS ^δ
<i>L. acetotolerans</i>	+	δ>π	-	NA	Φτωχή
<i>L. backi</i>	++	π>δ	-	-	Πιθανώς καλή
<i>L. brevis</i>	++	δ>π	+	-	Σχετικά καλή
<i>L. (para-)buchneri</i>	+	π>δ	+	-	Πιθανώς καλή
<i>L. (para-)casei</i>	+	δ>π	-	+	Καλή
<i>L. coryniformis</i>	+	δ>π	-	+	Καλή
<i>L. (para-)collinoides</i>	++	δ>π	-	NA	Φτωχή
<i>L. lindneri</i>	++	π>δ	-	-	Φτωχή
<i>L. perolens/harbinensis</i>	+	δ>π	-	+	Πιθανώς καλή
<i>L. paucivorans</i>	++	π	-	NA	Πιθανώς καλή
<i>L. plantarum</i>	+	δ>π	-	+	Καλή
<i>L. rossiae</i>	+	δ>π	+	-	Πιθανώς καλή
<i>Lactococcus lactis</i>	-/+	δ>π	-	+	Καλή
<i>Leuc. (para-)mesenteroides</i>	-/+	δ>π	+	+	Καλή
<i>Kocuria kristinae</i>	-/+	δ	-	+	NA
<i>Ped. claussenii</i>	+	π>δ	+	+	Πιθανώς καλή
<i>Ped. dammosus</i>	++	π>δ	+	+	Φτωχή
<i>Ped. inopinatus</i>	+	π>δ	-	-/+	Φτωχή

^α ++: ισχυρή κανότητα αλλοίωσης, +: ενδιάμεση ικανότητα αλλοίωσης, -/+ : ασθενής ή αρνητική ικανότητα αλλοίωσης

^β π: πρωταρχική επιμόλυνση, δ: δευτερεύουσα επιμόλυνση, π>δ: περισσότερες πρωταρχικές επιμολύνσεις,

δ>π: περισσότερες δευτερεύουσες επιμολύνσεις

^γ NA: η πληροφορία δεν είναι διαθέσιμη, -/+ : παραγωγή λιγότερο αισθητής ποσότητας διακετυλίου

^δ NA: η πληροφορία δεν είναι διαθέσιμη, "Πιθανώς καλή" υποδηλώνει ότι τουλάχιστον κάποια στελέχη έχουν αναφερθεί ότι αναπτύσσονται σε άγαρ MRS. Είναι πιθανό όμως κάποια άλλ αστελέχη που ανήκουν στο ίδιο είδος να είναι δύσκολα να καλλιεργηθούν στο άγαρ MRS.

Ο *Lactococcus lactis* είναι ένα είδος που εντοπίζεται σχετικά συχνά σε περιβάλλοντα ζυθοποιίας όπου η παραγωγή αφορά ζύθους με χαμηλές μονάδες πικράδας και αυξημένες τιμές pH. Αυτό το είδος LAB είναι ένας κοινός μικροοργανισμός στα φυτά, αλλά είναι περισσότερο γνωστός για την παραγωγή διακετυλίου από κίτρικό και το ρόλο του στην παραγωγή βουτύρου (Suzuki, 2015).

Ένας ακόμη μικροοργανισμός που έχει την ικανότητα να επιμολύνει ζύθους με χαμηλές μονάδες πικράδας είναι ο *Leuconostoc (para)mesenteroides*, ο οποίος είναι ανθεκτικός στα οξέα και η απομόνωση του γίνεται συχνά από πολτούς φρούτων (Suzuki, 2015).

Άλλα γαλακτικά βακτήρια όπως ο *Streptococcus* και *Enterococcus* δεν έχουν απασχολήσει την βιομηχανία του ζύθου, εκτός σπάνιων περιπτώσεων (Suzuki, 2015).

Τα γένη *Bacillus*, *Paenibacillus* και *Clostridium* μπορούν να παράγουν σπόρια. Τα σπόρια αντέχουν την θερμική επεξεργασία και δείχνουν αντοχή απέναντι στα απολυμαντικά. Αυτά τα χαρακτηριστικά καθιστούν την εξάλειψη τους πολύ δύσκολη από το περιβάλλον της ζυθοποιίας. Αποτέλεσμα είναι να εντοπίζονται ορισμένες φορές σε ημιέτοιμα και τελικά προϊόντα ζύθου. Η ικανότητα ανίχνευσης τους εξαρτάται από την εκλεκτικότητα των θρεπτικών υποστρωμάτων. Όσο μικρότερη η εκλεκτικότητα, τόσο μεγαλύτερη η πιθανότητα να αναπτυχθούν. Αυτά τα βακτήρια που σχηματίζουν σπόρους είναι γενικά ευαίσθητα στο χαμηλό pH και στα πικρικά οξέα του λυκίσκου οπότε δεν προκαλούν προβλήματα στο ζύθο με φυσιολογικά επίπεδα λυκίσκου. Ωστόσο, μπορεί να χρειάζεται προσοχή για ζύθους με ασυνήθιστα υψηλή τιμή pH ή/και χαμηλή πικράδα, καθώς ορισμένα *Clostridium spp.*, συμπεριλαμβανομένου του *Clostridium (aceto)butyricum*, μπορεί να αναπτυχθούν σε αυτούς τους ζύθους (Suzuki, 2015).

Ένα από τα είδη που απομονώνεται συχνά από το περιβάλλον ζυθοποιίας είναι το *Bacillus cereus*. Κάποια από τα στελέχη προκαλούν ναυτία, εμετό και διάρροια και θεωρούνται παθογόνα των τροφίμων. Ωστόσο, χάρη στη μικροβιολογική σταθερότητα του ζύθου δεν έχουν τεκμηριωθεί περιστατικά τροφικής δηλητηρίασης από βακτήρια στο ζύθο, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που προκαλούνται από το *B. cereus* (Suzuki, 2015).

Σπόρια βακτηρίων εντοπίζονται στην βύνη και στα πρόσθετα δημητριακών, οπότε θερμοφιλα ή και θερμοάντοχα βακτήρια που έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν σπόρια μπορούν να επιβιώσουν και να αναπτυχθούν σε ζεστό γλεύκος ανάμεσα στους 55-66 °C. Λόγω όμως του χαμηλού pH και της ευαισθησίας που παρουσιάζουν στις πικρικές ενώσεις του λυκίσκου η ανάπτυξη τους γίνεται πολύ δύσκολη, οπότε δεν προκαλούν αλλοίωση στα επόμενα στάδια και στο τελικό προϊόν. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι ο *Bacillus coagulans* (Suzuki, 2015).

Σχετικά συχνά εντοπίζονται στα ζυθοποιεία στελέχη που ανήκουν στους *Staphylococcus* και *Micrococcus*, αλλά δεν θεωρούνται σημαντικά ως προς την ικανότητα τους να αλλοιώνουν τον ζύθο. Ωστόσο κάποιιο όπως ο *Staphylococcus epidermidis* και ο *Staphylococcus saprophyticus* έχουν την ικανότητα να επιβιώνουν για μεγάλα χρονικά διαστήματα στον ζύθο και έτσι ανιχνεύονται μέσω των μικροβιολογικών ελέγχων ποιότητας, αλλά δεν έχουν την ικανότητα να αναπτυχθούν λόγω της ευαισθησίας στις πικρικές ενώσεις του λυκίσκου και του χαμηλού pH (Suzuki, 2015).

2.1.2 Αρνητικά κατά Gram βακτήρια

Τα βακτήρια βρίσκουν αναπόφευκτα το δρόμο τους στο περιβάλλον της ζυθοποιίας, είτε μέσω των πρώτων υλών που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή ζύθου, είτε μέσω περιβαλλοντικών πηγών (π.χ. αέρας ή νερό), είτε μέσω των ανθρώπων που εργάζονται στις ζυθοποιίες και στους χώρους που σερβίρουν βαρελίσια μπύρα. Ανεξάρτητα από την πηγή και τον τρόπο εισαγωγής τους, από τη στιγμή που ένα βακτήριο εγκατασταθεί σε ένα ζυθοποιείο ή ένα χώρο σερβιρίσματος βαρελίσιας μπύρας, η εξάλειψη του είναι δύσκολη, με αποτέλεσμα να υπάρχει μεγάλη πιθανότητα ο μικροοργανισμός να αναδύεται περιοδικά και να προκαλεί αλλοίωση του ζύθου, π.χ. δυσάρεστες γεύσεις, αρώματα ή θολερότητα. Στα Gram-αρνητικά βακτήρια δυο ομάδες εμπλέκονται σε εκείνα που αποτελούν πρόβλημα για τις ζυθοποιίες. Η μια ομάδα αποτελείται από βακτήρια που αναπτύσσονται κάτω από αερόβιες ή τουλάχιστον μικροαερόφιλες συνθήκες και η άλλη από βακτήρια που είναι αυστηρά αναερόβια (Ziola & Bergsveinson, 2017).

Σε όλα τα στάδια της ζυθοποίησης μπορούν να εντοπιστούν αερόβια Gram-αρνητικά βακτήρια (GNB - Gram Negative Bacteria), εκτός από το συσκευασμένο προϊόν, διότι οι σύγχρονες μέθοδοι συσκευασίας δημιουργούν ουσιαστικά ένα αναερόβιο περιβάλλον. Αυτά τα βακτήρια μπορούν επίσης να βρεθούν να αναπτύσσονται σε σημεία μετά το άνοιγμα της συσκευασίας των βαρελιών και σε γραμμές διανομής βαρελίσιας μπύρας, εάν δεν τηρούνται οι κατάλληλες διαδικασίες για τον περιορισμό της εισόδου οξυγόνου και τη διατήρηση της υγιεινής. Αν αφαιρεθεί το οξυγόνο, τότε τα αερόβια GNB δεν μπορούν να αποτελέσουν πρόβλημα για τον συσκευασμένο ζύθο (Ziola & Bergsveinson, 2017).

Η κατάσταση για τα αναερόβια GNB που σχετίζεται με την ζυθοποιία είναι ακριβώς η αντίθετη, με αυτά τα βακτήρια να προκαλούν αλλοίωση του συσκευασμένου ζύθου χωρίς οξυγόνο, αλλά γενικά να μην μπορούν να αναπτυχθούν καλά σε άλλα σημεία της παραγωγικής διαδικασίας λόγω της παρουσίας μεταβλητών επιπέδων οξυγόνου. Αν και η ανάπτυξη των αναερόβιων GNB είναι περιορισμένη στην ζυθοποιία, οι ζυθοποιοί τα φοβούνται πολύ περισσότερο από τα αερόβια αντίστοιχά τους, καθώς η ανάπτυξη των αναερόβιων GNB συνοδεύεται από ισχυρότερους δείκτες αλλοίωσης του ζύθου όπως θολερότητα και έντονα δυσάρεστες γεύσεις και αρώματα. Η εμπειρία έστω και ενός επεισοδίου τέτοιας αλλοίωσης θα μπορούσε να επηρεάσει την εμπιστοσύνη του καταναλωτή στο ζύθο και το ζυθοποιείο (Ziola & Bergsveinson, 2017).

Τα Gram-αρνητικά βακτήρια που είναι υπεύθυνα για την αλλοίωση του ζύθου μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει τα αναερόβια GNB που

ανήκουν τα γένη *Pectinatus*, *Megasphaera*, *Zymophilus* (*Propionispira*) και *Selenomonas*. Τα σημαντικότερα εξ αυτών είναι τα *Pectinatus* και *Megasphaera* και κυρίως στο μη παστεριωμένο ζύθο. Η δεύτερη κατηγορία αποτελείται από αερόβια και προαιρετικά αναερόβια GNB όπως τα βακτήρια οξικού οξέος (AAB), *Zymomonas* και ορισμένα είδη *Enterobacteriaceae* (Paradh, 2015).

Η πρώτη κατηγορία παρουσιάζει την ιδιαιτερότητα ότι χρωματίζονται αρνητικά κατά Gram αλλά εξελικτικά σχετίζονται με τα θετικά κατά Gram βακτήρια. Τα κύτταρα διαθέτουν χαρακτηριστικά τόσο των αρνητικών κατά Gram όσο και των θετικών κατά Gram βακτηρίων που περιβάλλονται από ένα παχύ στρώμα πεπτιδογλυκάνης τυπικό των θετικών κατά Gram βακτηρίων και μια εξωτερική μεμβράνη τυπική για τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια (Junoven, 2015). Τα καλλιεργητικά και κυτταρικά χαρακτηριστικά των αναερόβιων επιμολυντών του ζύθου παρουσιάζονται παρακάτω.

2.1.2.1 Αυστηρά Αναερόβιοι Gram αρνητικοί μικροοργανισμοί

Με την βελτίωση των συσκευαστικών μηχανών και συνεπώς την μείωση του οξυγόνου στον συσκευασμένο ζύθο συνέβησαν δύο πράγματα ταυτόχρονα. Ο ρόλος που διαδραμάτιζαν τα αερόβια GNB μειώθηκε τόσο που τα περιστατικά αλλοίωσης έγιναν σπάνια. Ταυτόχρονα, το ολοένα και πιο αναερόβιο περιβάλλον στο ζύθο επέτρεψε στα αναερόβια GNB να αναδυθούν και να κυριαρχήσουν ως επιμολυντές του ζύθου.

Εννέα είδη είναι αυτά που αποτελούν τον μεγαλύτερο κίνδυνο και ανήκουν σε τέσσερα γένη. Είναι τα *Megasphaera* (*cerevisiae*, *paucivorans* και *sueciensis*), *Pectinatus* (*cerevisiophilus*, *frisingensis* και *haikarae*), *Propionispira* (*paucivorans* και *raffinosisivorans*, πρώην *Zymophilus*), και *Selenomonas lactificifx*. Από αυτά έχουν μελετηθεί αρκετά καλά τα είδη των *Megasphaera* και *Pectinatus*, ενώ δεν έχει γίνει αρκετή έρευνα για τα είδη του *Propionispira* και του *Selenomonas lactificifx* (Ziola & Bergsveinson, 2017).

Τα αυστηρά αναερόβια βακτήρια που προκαλούν αλλοίωση στο ζύθο είναι μια ομάδα μικροοργανισμών που σχετίζονται μεταξύ τους φυσιολογικά και εξελικτικά. Σε αντίθεση με άλλα μικρόβια αλλοίωσης που σχετίζονται με τη ζυθοποιία, απαιτούν ένα περιβάλλον σχεδόν χωρίς οξυγόνο για να αναπτυχθούν στο ζύθο.

Έμμεσες ενδείξεις για την ύπαρξη τους εμφανίζονται από το 1946, ωστόσο οι πρώτες καταγραφές έγιναν στα τέλη της δεκαετίας του 1970. Η βελτίωση της τεχνολογίας των συσκευαστικών μηχανών σε συνδυασμό με την αύξηση της παραγωγής μη παστεριωμένων

ζύθων δημιούργησαν τις συνθήκες για την αύξηση των περιστατικών αλλοίωσης από αυτά τα αυστηρά αναερόβια βακτήρια. Τα περιστατικά επιμόλυνσης δεν περιορίζονται γεωγραφικά αλλά συναντώνται παγκοσμίως (Junoven, 2015).

Κυρίως χαλάνε τους μη παστεριωμένους ζύθους και εκείνους που παστεριώνονται με εναλλάκτες θερμότητας που παράγονται σε σύγχρονες ζυθοποιίες με συσκευαστικές μηχανές που μπορούν να περιορίσουν στο ελάχιστο την εισαγωγή του οξυγόνου στο τελικό προϊόν. Η αλλοίωση αποδεικνύεται από την ανάπτυξη θολερότητας και δυσάρεστων οσμών που περιγράφονται ως σάπιο αυγό, τάγγισμα ή κόπρανα και καθιστούν το προϊόν μη πόσιμο. Υψηλές οικονομικές απώλειες συνήθως προκύπτουν από αλλοίωση λόγω καταστροφής της εταιρικής επωνυμίας και του υψηλού κόστους απόρριψης των μολυσμένων παρτίδων ή/και διατήρησης του παραγόμενου ζύθου σε καραντίνα (Junoven, 2015).

Η χρήση τεχνικών διαφορετικών από την καλλιέργεια μικροοργανισμών αποδεικνύει ότι υπάρχουν και νέα αναερόβια βακτηρία αλλοίωσης του ζύθου που δεν έχουν ανακαλυφθεί και ταξινομηθεί ακόμη (Junoven, 2015).

2.1.2.1.1 *Pectinatus*

Το γένος *Pectinatus* περιλαμβάνει τρία είδη, το *Pectinatus cerevisiiphilus*, το *Pectinatus frisingensis* και το *Pectinatus haikarae* που ονομάστηκε από την Dr Auli Haikara για τις πολλές συνεισφορές της στη μελέτη των βακτηρίων *Pectinatus*. Στα τέλη της δεκαετίας του 1970 απομονώθηκε το πρώτο είδος, *P. cerevisiiphilus*, από χαλασμένο ζύθο στις ΗΠΑ. Ένας παρόμοιος οργανισμός που βρέθηκε λίγο μετά σε αλλοιωμένο ζύθο στη Φινλανδία και αναγνωρίστηκε αρχικά λανθασμένα ως *P. cerevisiiphilus*, περιεγράφηκε τελικά το 1990 ως νέο είδος, το *P. frisingensis*. Στα τέλη της δεκαετίας του 1980, ένας μικροοργανισμός επιμόλυνσης του ζύθου που μοιάζει με τον *Pectinatus* αλλά είναι γενετικά διαφορετικός από το ήδη αναγνωρισμένο είδος, κατατέθηκε σε μια συλλογή γερμανικών καλλιιεργειών όπου λίγα χρόνια αργότερα εντοπίστηκε και πάλι στην Φινλανδία οπότε και αποτέλεσε το τρίτο είδος αλλοίωσης του ζύθου, το *P. haikarae* (Junoven, 2015).

Παγκοσμίως εντοπίζονται οι *P. cerevisiiphilus* και *P. frisingensis*, ενώ στις σκανδιναβικές χώρες και τη Γερμανία περιορίζεται η εύρεση του *P. haikarae*. Ο τρόπος μετάδοσης και οι φυσικές πηγές μετάδοσης στα ζυθοποιεία είναι σε μεγάλο βαθμό άγνωστα. Η σχετικά υψηλή θερμοκρασία και η υγρασία των αιθουσών συσκευασίας, όπως και η παρουσία θρεπτικών ουσιών από υπολείμματα προϊόντων παρέχουν ένα καλό περιβάλλον για την ανάπτυξη

μικροοργανισμών. Μελέτη που πραγματοποιήθηκε το 2012 σε 11 γραμμές συσκευασίας σε 10 διαφορετικά εργοστάσια ζυθοποιίας στην Τσεχική Δημοκρατία έδειξε ότι το *Pectinatus* απομονώθηκε από όλες τις ζυθοποιίες, ανεξάρτητα από την παραγωγή και τον τύπο του παραγόμενου ζύθου, το μέγεθος, το σχεδιασμό, τη χωρητικότητα της γραμμής συσκευασίας, το ρυθμό, την ηλικία ή τη μέθοδο καθαρισμού. Οι πιο συχνά μολυσμένες περιοχές με *Pectinatus*, σε περισσότερο από το 50% των δειγμάτων, ήταν τα μέρη μέσα και κάτω από τους μεταφορικούς ιμάντες και οι διάφορες κατασκευές που μπορούν να καθαριστούν δύσκολα, όπως οι επιφάνειες των σωληνώσεων κάτω από τους πάγκους (Junonen, 2015).

Εκτός από τα παραπάνω σημεία τα είδη *Pectinatus* εντοπίζονται καθ' όλη την παραγωγική διαδικασία, από τις δεξαμενές ζύμωσης και ωρίμανσης έως τις δεξαμενές τυποποίησης (BBT) και τον τελικό συσκευασμένο ζύθο. Κυρίως ο εντοπισμός τους γίνεται στο τμήμα της συσκευασίας των ζυθοποιείων. Ωστόσο, ζώντα κύτταρα έχουν ανακτηθεί μόνο από τις αίθουσες συσκευασίας και από αλλοιωμένους μη παστεριωμένους ή παστεριωμένους με εναλλάκτη ζύθους. Άλλες αναφερόμενες πηγές εντός των αιθουσών συσκευασίας περιλαμβάνουν τον αέρα και την οροφή των αιθουσών όπως και τα λιπαντικά των αλυσίδων. Ο ρόλος των πρώτων υλών ζυθοποιίας ως πηγή μόλυνσης δεν έχει ακόμη αποσαφηνιστεί. Επίσης, εντοπίζονται στην δειγματοληψία του δαπέδου, συμπεριλαμβανομένων των συστημάτων αποστράγγισης, ρωγμών και θρυμματισμένων αρμών στο δάπεδο (Junonen, 2015).

Η εμφάνιση του *Pectinatus* παρουσιάζει μια διακύμανση ανάλογα με την εποχή. Αυτή η εποχική διακύμανση έχει μια κορύφωση των περιστατικών αλλοίωσης κατά τους θερμούς μήνες. Δεν θεωρούνται όμως περιστασιακοί εισβολείς στο ζυθοποιείο, αλλά μόνιμοι, πάρα την εποχικότητα (Junonen, 2015).

Τα περιστατικά αλλοίωσης από τα είδη του *Pectinatus* ανέρχονται στο 20-30% των περιστατικών αλλοίωσης. Το *P. frisingensis* είναι το κυρίαρχο είδος στα περιστατικά αλλοίωσης και είναι επίσης το πιο συχνά αναφερόμενο είδος στις ζυθοποιίες (Junonen, 2015).

Τα κύτταρα *Pectinatus* είναι μη σπορογόνοι, ελαφρώς καμπυλωτοί με στρογγυλεμένα άκρα ελικοειδείς ράβδοι, 0.4–1.0 μm σε διάμετρο και 2–30 μm ή περισσότερο σε μήκος. Εμφανίζονται μεμονωμένα ή σε ζευγάρια και σπάνια σε κοντές αλυσίδες. Σε γηρασμένες καλλιέργειες μπορούν να εντοπιστούν επιμήκη κύτταρα με ελικοειδές σχήμα (Haikara & Junonen, 2009). Ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα των κυττάρων *Pectinatus* είναι η χτενοειδής τους μαστιγιακή διάταξη στην οποία τα μαστίγια προβάλλουν μόνο από τη μία πλευρά του κυττάρου (Junonen, 2015).



Σχήμα 12. *Pectinatus frisingensis* όπως φαίνεται στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Haikara & Helander, 2006).

Για την καλλιέργεια και την απομόνωση τους έχουν χρησιμοποιηθεί το θρεπτικό υπόστρωμα de Man-Rogosa-Sharpe (MRS) ως έχει και ως τροποποιημένο με την προσθήκη Tetra (tetrahydroiso- α -acids). Επίσης έχει χρησιμοποιηθεί υπόστρωμα με πεπτόνη, εκχύλισμα μαγιάς και φρουκτόζης (PYF). Το εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιείται για την απομόνωση και διαφοροποίηση από άλλους μικροοργανισμούς του ζυθοποιείου είναι το Selective Medium *Megashaera, Pectinatus* (SMMP) (Haikara & Helander, 2006, Matoulkova et al., 2012) .

Οι αποικίες εμφανίζονται ως γυαλιστερές, αδιαφανείς και κυκλικές σε θρεπτικό υπόστρωμα PYF. Το χρώμα τους ποικίλλει από μπεζ έως λευκό ενώ για το *P. haikarae* είναι από κρεμ έως γκριζωπό (Junoven, 2015).



Σχήμα 13. Αποικίες *Pectinatus cerevisiiphilous* σε thioglycolate-dextrose agar (ASBC, 2008)

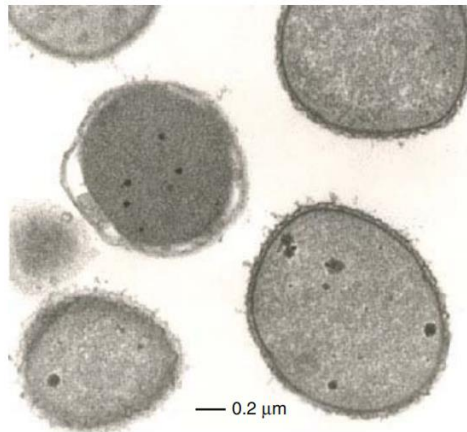
2.1.2.1.2 *Megasphaera*

Το γένος *Megasphaera* («μεγάλη σφαίρα») δημιουργήθηκε το 1971 και περιλαμβάνει τρία είδη που προκαλούν αλλοίωση του ζύθου: *Megasphaera cerevisiae*, *Megasphaera raucivorans* και *Megasphaera sueciensis*. Τα άλλα είδη αυτού του γένους περιλαμβάνουν το *Megasphaera elsdenii*, το *Megasphaera micronuciformis*, το *Megasphaera indica* και το *Megasphaera massiliensis*. Τα είδη που έχουν την ικανότητα να αλλοιώσουν τον ζύθο έχουν κοινά χαρακτηριστικά και διακρίνονται ανάμεσα στα άλλα είδη *Megasphaera* (Junoven, 2015).

Το *M. cerevisiae* φαίνεται να είναι γεωγραφικά πιο περιορισμένο σε σύγκριση με το είδος *Pectinatus* που αλλοιώνει το ζύθο. Μολύνσεις έχουν αναφερθεί σε διάφορες χώρες όπως η Νορβηγία, η Φιλανδία, η Γερμανία, το Ηνωμένο Βασίλειο, η Σουηδία και η Αυστραλία. Κυρίως εντοπίζονται σε αλλοιωμένους ζύθους, στις γραμμές συσκευασίας και έχουν αναφερθεί σποραδικά σε μαγιά προς εμβολιασμό, όπως και σε γραμμές διοξειδίου του άνθρακα. Το *M. cerevisiae* είναι λιγότερο συχνός επιμολυντής στην ζυθοποιία σε σχέση με το βακτήριο *Pectinatus*. Στη Γερμανία, το *M. cerevisiae* προκάλεσε το 2-7% των τεκμηριωμένων περιπτώσεων αλλοίωσης ζύθου κατά τη χρονική περίοδο 1990-2002 (Junoven, 2015).

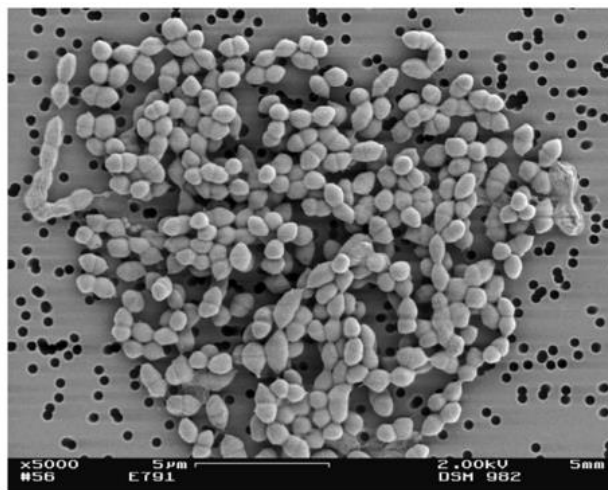
Το *M. raucivorans* πρώτη φορά απομονώθηκε από αλλοιωμένο ζύθο στην Ιταλία και το *M. sueciensis* από αλλοιωμένο ζύθο στην Σουηδία. Το 2011 εντοπίστηκαν στελέχη *Megasphaera* σε ζυθοποιείο του Ηνωμένου Βασιλείου όμως δεν ήταν δυνατός ο διαχωρισμός τους σε είδη λόγω της ανάλυσης DNA που χρησιμοποιήθηκε στην μελέτη (Junoven, 2015).

Σε αντίθεση με τα άλλα αυστηρώς αναερόβια είδη που αλλοιώνουν το ζύθο, τα κύτταρα *Megasphaera* είναι μη κινητικοί κόκκοι που δεν σχηματίζουν σπόρους. Τα κύτταρα είναι σφαιρικά ή οβάλ με διάμετρο 1.3-1.6 μm. Συναντώνται μεμονωμένα ή σε ζευγάρια και ορισμένες φορές σε κοντές αλυσίδες (Junoven, 2015).



Σχήμα 14. *Megasphaera cerevisiae* όπως φαίνεται στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Haikara & Helander, 2006).

Τα τρία είδη που αλλοιώνουν το ζύθο μπορούν να διακριθούν μεταξύ τους λόγω του μεγέθους τους. Το μικρότερο είναι το *M. sueciensis* και το μεγαλύτερο είναι το *M. cerevisiae* (Junoven, 2015).



Σχήμα 15. *Megashaera sueciensis* όπως φαίνεται στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Junoven, 2015).

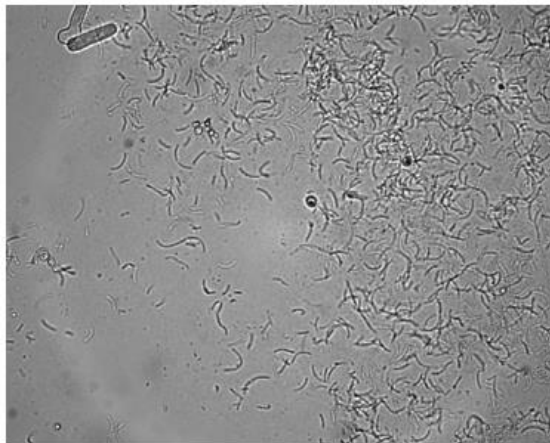
Όλα τα είδη που αλλοιώνουν το ζύθο αναπτύσσονται σε άγαρ PYF. Αν αντί για φρουκτόζη χρησιμοποιηθεί γλυκονικό οξύ ή πυροσταφυλικό οξύ, τότε η ανάπτυξη για τους *M. sueciensis* και *M. raucivorans* βελτιώνεται κατά πολύ. Ο χρόνος που απαιτείται για να αναπτυχθούν τα τρία είδη στο θρεπτικό υπόστρωμα PYF είναι διαφορετικός. Τα *M. raucivorans* και *M. sueciensis* χρειάζονται 3-4 ημέρες ώστε να σχηματίσουν ορατές αποικίες ενώ το *M. cerevisiae* μόλις 1-2 ημέρες. Οι αποικίες και για τα τρία είδη είναι κυκλικές, αδιαφανείς και

γαλιστερές. Το χρώμα των αποικιών για το *M. cerevisiae* είναι υπόλευκο, ενώ για τα *M. raucivorans* και του *M. sueciensis* είναι κιτρινωπό (Junoven, 2015).

2.1.2.1.4 *Zymophilus (Propionispira) – Selenomonas*

Το γένος *Zymophilus* με δύο είδη που σχετίζονται με τη ζυθοποιία, δηλαδή, *Zymophilus raucivorans* («χρήστης λίγων υποστρωμάτων») και *Zymophilus raffinovorans* («εκείνος που τρώει ραφινόζη»), συνδυάστηκε πρόσφατα με το γένος *Propionispira* καθώς αποδείχθηκε ότι έχουν κοινό πρόγονο. Εκτός από τα *Propionispira raucivorans* και *Propionispira raffinovorans*, αυτό το γένος περιλαμβάνει το *Propionispira arboris* από υγρό ξύλο ζωντανών δέντρων και *Propionispira arcuata* από απόβλητα βοοειδών για την παραγωγή μεθανίου. Τα είδη που σχετίζονται με τη ζυθοποιία είναι εξελικτικά πιο κοντά μεταξύ τους (Junoven, 2015).

Το *Selenomonas* («σε σχήμα μισοφέγγαρου») *lacticifex* («παραγωγός γαλακτικού οξέος») είναι το μόνο είδος που σχετίζεται με τη ζυθοποιία στο γένος του που περιλαμβάνει οκτώ άλλα είδη που απαντώνται κυρίως από στοματικά και στομαχικά περιβάλλοντα (oral and ruminal habitats). Το γένος *Selenomonas* θα πρέπει να επαναταξινομηθεί στο μέλλον, διότι φαίνεται να προέρχεται από πολλούς προγόνους (Junoven, 2015).



Σχήμα 16. *Selenomonas lacticifex* σε μεγέθυνση x630 (Felsberget al. 2014).

Τα *S. lacticifex*, *P. raucivorans* και το *P. raffinovorans* έχουν εντοπιστεί σε μαγιά προς εμβολιασμό στην Φιλανδία και στη Γερμανία. Στα τέλη της δεκαετίας του 1980, εξετάστηκαν περισσότερα από 3000 δείγματα ζύμης από γερμανικές ζυθοποιίες και βρέθηκε ότι το 0-0.03% των δειγμάτων είχαν επιμολυνθεί από *S. lacticifex* και το 0.12-0.17% ήταν μολυσμένα με είδη *Propionispira*. Έχουν αναφερθεί ακόμη ως πιθανές πηγές επιμόλυνσης με *P.*

raffinivorans στα ζυθοποιεία τα ρεύματα των αποβλήτων και τα συστήματα αποστράγγισης (Junoven, 2015).

Οι Vanrova et al. (2014) εξέτασαν 58 δείγματα που ελήφθησαν από το περιβάλλον αίθουσας συσκευασίας ζυθοποιείου και διαπίστωσαν ότι στα 19 δείγματα εντοπίστηκε το *S. lacticifex*.

Το *S. lacticifex* και τα είδη *Propionispira* που αλλοιώνουν το ζύθο είναι κινητά βακτήρια σε σχήμα ράβδου. Μετά από επαναλαμβανόμενες καλλιέργειες η κινητικότητα τους μπορεί να χαθεί. Αυτά τα είδη δεν είναι ικανά να παράγουν ενδοσπόρια. Τα κύτταρα του *S. lacticifex* είναι κυρτές ράβδοι σε σχήμα μισοφέγγαρου, μεγέθους 0.6–0.9 έως 5–15 μm (Junoven, 2015). Τα κύτταρα του *P. raucivorans* είναι κυρτά, ελικοειδή ή σε σχήμα μισοφέγγαρου και έχουν μήκος 5-30 μm. Εντοπίζονται ως μονάδες, σε ζευγάρια ή σε κοντές αλυσίδες. Τα κύτταρα του *P. raffinivorans* είναι ίσιες έως ελαφρώς καμπυλωτές ράβδοι με μήκος 3-15 μm (Haikara & Helander, 2006). Ακόμη και σε νεαρές καλλιέργειες μπορούν να παρατηρηθούν ελικοειδής διευθετήσεις. Ενδιαφέρον έχει ότι τα τρία είδη έχουν παρόμοια δομή πεπτιδογλυκάνης με τα βακτήρια *Pectinatus*. Δεν έχουν μελετηθεί προς το παρόν άλλες δομές της κυτταρικής τους μεμβράνης.

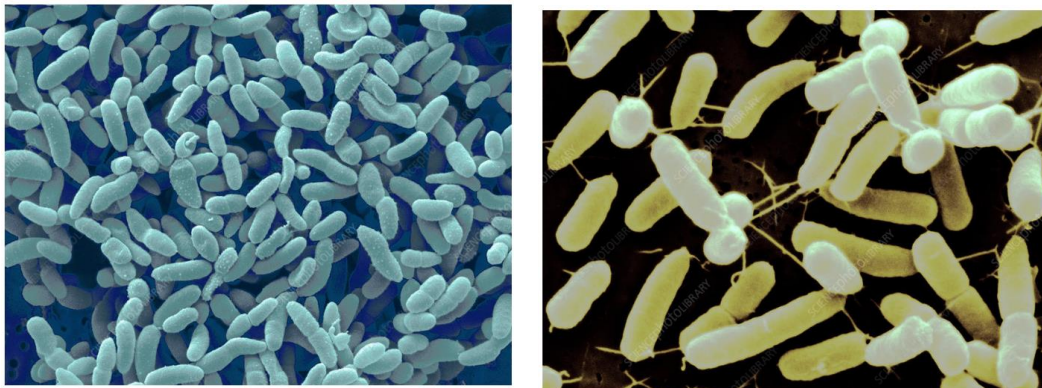
Για τον προσδιορισμό των καλλιεργητικών χαρακτηριστικών των ειδών *Propionospira* που αλλοιώνουν τον ζύθο έχει χρησιμοποιηθεί το τροποποιημένο θρεπτικό υπόστρωμα MRS όπου οι αποικίες που σχηματίζονται είναι κυκλικές, λείες, αδιαφανείς και ελαφρώς κίτρινες με διάμετρο 1-2 mm μετά από 3 μέρες επώασης (Junoven, 2015., Haikara & Helander, 2006).

Τα είδη *Propionispira* μεταβολίζουν την γλυκόζη σε οξικό και προπιονικό οξύ. Το *P. raucivorans* παράγει επιπλέον και μικρή ποσότητα γαλακτικού οξέος. (Haikara & Helander, 2006). Το κύριο οξύ που παράγεται από την δράση του *S. lacticifex* είναι το γαλακτικό οξύ. Τα επόμενα οξέα που παράγει σε μικρότερη αναλογία είναι το οξικό και το προπιονικό οξύ (Felsberget al. 2014., Hespell et al., 2006, Haikara & Helander, 2006).

2.1.2.2 Προαιρετικά Αναερόβιοι Gram αρνητικοί μικροοργανισμοί

2.1.2.2.1 Acetic Acid Bacteria

Αν και τα αερόβια (ή μικροαερόφιλα) βακτήρια οξικού οξέος (AAB-Acetic Acid Bacteria) βρίσκονται σχεδόν παντού, είναι συγκεκριμένα στο σημείο διανομής της βαρελίσιας μύρας που τα βακτήρια οξικού οξέος *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus* και *Gluconobacter oxydans* δημιουργούν συχνότερα πρόβλημα. Εάν εισέλθει αέρας σε ένα βαρέλι ή εάν ο ζύθος παραμένει στον διανεμητή για πολύ καιρό, μπορεί να υπάρχει αρκετό οξυγόνο για την ανάπτυξη βακτηρίων οξικού οξέος. Τα βακτήρια αυτά έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν την αιθανόλη σε οξικό οξύ, ενώ παράγουν και υφές που αυξάνουν το ιξώδες ή δημιουργούν επιφανειακή μεμβράνη. Το γένος *Acetobacter* έχει την ικανότητα να μεταβολίζει περαιτέρω το οξικό οξύ σε διοξείδιο του άνθρακα και νερό. Τα βακτήρια του γένους *Gluconobacter* στερούνται αυτής της ικανότητας. Λόγω των αναγκών τους σε οξυγόνο για ανάπτυξη, τα βακτήρια οξικού οξέος, όπως και τα εντεροβακτήρια, έχουν εξαλειφθεί σχεδόν εξ ολοκλήρου ως πρόβλημα στις σύγχρονες ζυθοποιίες. Ωστόσο, η πρόσφατη περιγραφή ενός νέου βακτηρίου οξικού οξέος *Gluconobacter cerevisiae* που απομονώθηκε σε περιβάλλον ζυθοποιίας υποδεικνύει την ανάγκη συνεχούς επαγρύπνησης από τους ζυθοποιούς για αυτήν την ομάδα GNB (Ziola & Bergsveinson, 2017).



Σχήμα 17. *Acetobacter* και *Gluconobacter* (www.sciencephoto.com)

Στο παρελθόν, τα AAB όπως το *Acetobacter* και το *Gluconobacter* ήταν σημαντικοί μικροοργανισμοί επιμόλυνσης του ζύθου, λόγω της ικανότητας τους να μεταβολίζουν την αιθανόλη σε οξικό οξύ, προσδίδοντας μια γεύση ξυδιού στο ζύθο. Πλέον όμως δεν θεωρούνται σημαντικά διότι η εφαρμογή αποτελεσματικών διαδικασιών καθαρισμού και απολύμανσης όπως και ο αποτελεσματικός περιορισμός του οξυγόνου από τις διαδικασίες

ζυθοποίησης και εμφιάλωσης, περιορίζουν τα περιστατικά αλλοίωσης στα συστήματα διανομής βαρελίσιας μύρας και σε ζύθους με επαναζύμωση στο βαρέλι (Paradh, 2015). Τα AAB είναι αερόβια, δεν σχηματίζουν σπόρια, αρνητικά κατά Gram έως μεταβλητά κατά Gram βακτήρια με μορφολογία ελλειψοειδούς έως μικρής ράβδου. Η εμφάνιση των AAB είναι είτε μεμονωμένα είτε σε ζευγάρια είτε ακόμη και σε μικρές αλυσίδες. Ορισμένες φορές είναι κινητικά και η διάταξη των μαστίγιων τους μπορεί να ποικίλει από περίτριχη σε πολική. Η αντίδραση τους είναι θετική κατά τον έλεγχο της καταλάσης, ενώ αρνητική είναι κατά τον έλεγχο της οξειδάσης. Η βέλτιστη ανάπτυξη των AAB εμφανίζεται μεταξύ pH 5 και 6.5, αλλά η ανάπτυξή τους μπορεί επίσης να συμβεί σε πολύ όξινο pH 3–4. Οι πηγές από όπου έχουν απομονωθεί τα AAB είναι αρκετές και συμπεριλαμβάνουν φρούτα, λουλούδια και αλκοολούχα ποτά όπως ο ζύθος και το κρασί (Paradh, 2015).

Η ικανότητα που έχουν να οξειδώνουν τα σάκχαρα και την αιθανόλη σε οργανικά οξέα όπως το οξικό οξύ τα καθιστούν πολύ σημαντικά για την βιομηχανία (Paradh, 2015). Τα είδη *Glucanobacter* επιλέγονται από την βιομηχανία ξυδιού λόγω της ικανότητας να παράγουν μεγάλες συγκεντρώσεις οξικού οξέος κατά τον μεταβολισμό της αιθανόλης κάτω από αερόβιες συνθήκες. Άλλα AAB επιλέγονται από την βιομηχανία για την παραγωγή κυτταρίνης, σορβόζης και διυδροξυακετόνης (Paradh, 2015).

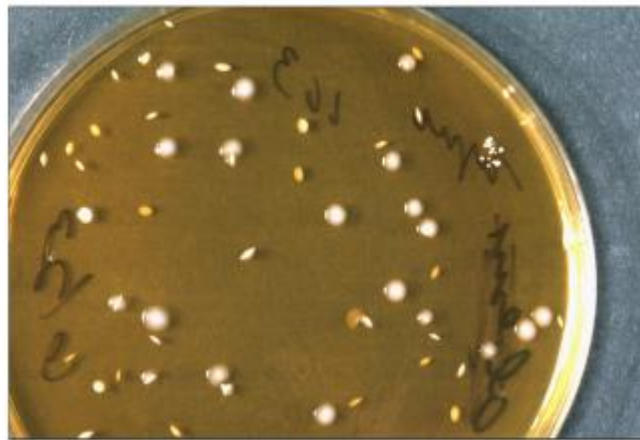
Τα AAB είναι σημαντικά για την ζυθοποιεία, λόγω της ικανότητας τους να αλλοιώνουν τον ζύθο. Η αλλοίωση από AAB προκαλεί θολρότητα στο ζύθο και σχηματισμό υμένιου στην επιφάνεια. Η μεγαλύτερη επίπτωση εντοπίζεται στο άρωμα και την γεύση όπου μπορεί και να προσομοιάζει εκείνη του ξυδιού. Τα AAB χρειάζονται οξυγόνο για την ανάπτυξη τους και ανήκουν στα αυστηρώς αερόβια βακτήρια, αν και ορισμένα είδη που έχουν απομονωθεί από βαρελίσια μύρα έχουν χαρακτηριστεί ως μικροαεροανεκτικά (Paradh, 2015).

2.1.2.2.2 *Zymomonas*

Το επόμενο GNB αλλοίωσης του ζύθου που μπορεί να αναπτυχθεί παρουσία οξυγόνου είναι το *Zymomonas mobilis*. Αυτός ο μικροοργανισμός μπορεί να αναπτυχθεί αερόβια ή αναερόβια και εμφανίζει αυξημένη ανοχή στην αιθανόλη εάν η ανάπτυξη λαμβάνει χώρα χωρίς παρουσία οξυγόνου, όχι όμως πάνω από 10% αιθανόλη v/v. Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης για το *Z. mobilis* είναι ανάμεσα στους 25-30°C και όταν το pH είναι πάνω από 3.4. Ως εκ τούτου απαντάται σπανίως σε ζυθοποιείες που παράγουν ζύθους τύπου lager λόγω των χαμηλών θερμοκρασιών που χρησιμοποιούν (8-12°C). Επιπλέον, ο μικροοργανισμός αυτός

έχει αυστηρές απαιτήσεις σε υδατάνθρακες. Αυτά τα βακτήρια μεταβολίζουν τη σακχαρόζη, τη γλυκόζη και τη φρουκτόζη ως πηγή άνθρακα από τις οποίες παράγει ποσοτικά αιθανόλη και CO₂, αλλά δεν μπορούν να χρησιμοποιήσουν τη μαλτόζη και τη μαλτοτριόζη (Ziola & Bergsveinson, 2017., Paradh, 2015).

Τα είδη *Zygomonas* είναι αρνητικά κατά Gram, που δεν σχηματίζουν ενδοσπόρια, είναι θετικά στην καταλάση, αεροανεκτικά, προαιρετικά αναερόβια βακτήρια. Μορφολογικά, αυτά τα βακτήρια είναι κοντές φουσκωτές ράβδοι που εμφανίζονται μεμονωμένα, σε ζευγάρια και μερικές φορές σε αλυσίδες, με μέγεθος 1.0-1.4 μm x 2.0-6.0 μm. Οι αποικίες που σχηματίζει είναι στρογγυλές, γυαλιστερές, λευκές ή κρεμ με διάμετρο 1-2 mm, ενώ όταν αναπτύσσονται σε αερόβιες συνθήκες έχουν διάμετρο 1-4mm (ASBC, 2008)



Σχήμα 18. *Zygomonas mobilis* ανάπτυξη σε τρυβλίο με την μέθοδο pour plate. (ASBC, 2008)

Το *Z. mobilis* έχει απομονωθεί από προς ενανθράκωση σάκχαρα (Paradh, 2015).

Η κύρια αλλοίωση του ζύθου από το *Z. mobilis* είναι στην εμβαραλωμένη μύρα με προσθήκη ζάχαρης για την επίτευξη ενανθράκωσης (cask conditioned). Η αλλοίωση προκαλεί θολερότητα και τη σύνθεση μεταβλητών επιπέδων ακεταλδεΐδης και υδρόθειου, τα οποία μαζί δίνουν μια μυρωδιά σάπιου μήλου ή φρούτου και μια γεύση εστέρα ή θείου (Ziola & Bergsveinson, 2017)

Η αρχική πηγή μόλυνσης από το είδος *Zygomonas* στο ζυθοποιείο είναι ακόμα άγνωστη. Το έδαφος προτείνεται ως η πιθανή πηγή μόλυνσης, καθώς τα περιστατικά μόλυνσης του *Z. mobilis* συνδέονται με περιόδους κατασκευής νέων εγκαταστάσεων και εκσκαφής σε ζυθοποιεία. Τα περιστατικά μόλυνσης που οφείλονται στο *Zygomonas* περιορίζονται σε ζύθο όπου γίνεται χρήση σακχάρων για ενανθράκωση (Paradh, 2015).

2.1.2.2.3 *Enterobacteriaceae*

Ιστορικά, πολλά αερόβια GNB έχουν βρεθεί ότι αλλοιώνουν το ζύθο μέσω της παραγωγής δυσάρεστων αρωμάτων και θολερότητας. Σε αυτά συγκαταλέγονται η ομάδα των κολοβακτηριδίων. Περιστασιακά έχουν απομονωθεί τα *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter agglomerans* και *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Hafnia alvei* και *Hafnia protea* (στο παρελθόν *Obesumbacterium proteus*), *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae* και *Rahnella aquatilis*. Αυτά τα βακτήρια θεωρούνται ότι είναι επιμολυντές του ζυθογλεύκους και στην τυπική παραγωγή του ζύθου η ανάπτυξη αυτών των αερόβιων βακτηρίων στο πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά γλεύκος και σε pH 5 έως 6 μπορεί να προκαλέσει δυσάρεστες γεύσεις μέσω της παραγωγής 2,3-βουτανοδιόλης, οξικού οξέος, μυρμηκικού οξέος και διμεθυλοσουλφιδίου, μαζί με χαμηλά επίπεδα ανώτερων αλκοολών. Ο αλλοιωμένος ζύθος αποκτά γλυκές γεύσεις φρούτων ή λαχανικών όπως του σέλινου ή του μαγειρεμένου λάχανου (Ziola & Bersveinson, 2017). Αυτά τα βακτήρια δεν μπορούν κανονικά να αναπτυχθούν στο τελικό ζύθο, αλλά περιστασιακά βρίσκονται στα αρχικά στάδια της διαδικασίας παρασκευής, προκαλώντας ανεπιθύμητες δυσάρεστες γεύσεις στο τελικό προϊόν (Paradh, 2015).

Πολλά από τα βακτηριακά είδη που θεωρούνται ως επιμολυντές του ζυθογλεύκους είναι υποχρεωτικά στην αυθόρμητη ζύμωση που οδηγεί στην παραγωγή της παραδοσιακής μπίρας Lambic. Εντεροβακτήρια όπως τα *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Serratia* και *Pectobacter* κυριαρχούν κατά τα πρώιμα στάδια της ζύμωσης και συμβάλλουν στο άρωμα αυτού του τύπου ζύθου με την παραγωγή οργανικών οξέων, 2, 3-βουτανοδιόλης, οξικού αιθυλεστέρα και ορισμένων ανώτερων αλκοολών. Στην τρέχουσα βιομηχανικά παραγόμενη μπίρα Lambic, η πρόιμη φάση των *Enterbacteriaceae* απουσιάζει, με τα βακτήρια του οξικού οξέος να διαδραματίζουν μεγαλύτερο ρόλο (Paradh, 2015).

Λόγω όμως της ευαισθησίας στην αυξημένη αιθανόλη, στα χαμηλά επίπεδα pH και οξυγόνου, τα περισσότερα εντεροβακτήρια μπορούν να επιμολύνουν το ζυθογλεύκος αλλά δεν επιβιώνουν κατά τα τελευταία στάδια της ζύμωσης. Υπάρχουν όμως ορισμένα που μπορούν να ανεχθούν το περιβάλλον του έτοιμου ζύθου, όπως τα *H. alvei*, *H. protea*, *E. agglomerans*, *E. cloacae* και *R. aquatilis*. Αυτά αποτελούν μεγαλύτερο πρόβλημα για την ζυθοποιία λόγω της πιθανότητας να μεταφερθούν σε επακόλουθες ζυμώσεις όταν γίνεται επαναχρησιμοποίηση της μαγιάς. Η βελτιωμένη υγιεινή της ζυθοποιίας, οι προσεκτικοί χειρισμοί του αποστειρωμένου γλεύκους μέσω του κατάλληλου καθαρισμού, της απολύμανσης των γραμμών μεταφοράς και των δεξαμενών και η μειωμένη

επαναχρησιμοποίηση ζύμης, δηλαδή πιο συχνή παρασκευή νέου εμβολίου ζύμης, έχουν συμβάλει σε σημαντικά μειωμένα προβλήματα με εντεροβακτήρια στην παραγωγή του ζύθου (Ziola & Bersveinson, 2017). Τα εντεροβακτηρίδια περιλαμβάνουν πολλά παθογόνα και μη γένη. Τα παθογόνα εντεροβακτηρία όπως η *Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Serratia* και *Shigella* αναστέλλονται λόγω των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων του ζύθου και των βελτιωμένων τεχνικών παραγωγής του. Επιπλέον, τα τεχνολογικά εμπόδια και τα εμπόδια επεξεργασίας, όπως το βράσιμο του ζυθογλεύκου, η παστερίωση και η στείρα διήθηση διασφαλίζουν ότι τα περισσότερα παθογόνα που μεταφέρονται από τα τρόφιμα και τα εντερικά παθογόνα δεν αναπτύσσονται, ούτε επιβιώνουν στο ζύθο. Προβλήματα μπορούν να προκύψουν σε ζύθους με χαμηλό ή χωρίς αλκοόλ και σε διάφορα παραδοσιακά προϊόντα που μοιάζουν με το ζύθο. Αρκετά είδη που ανήκουν στα *Enterobacteriaceae* έχουν απομονωθεί από περιβάλλοντα ζυθοποιίας με την τάση να επιμολύνουν το ζυθογλεύκος και όχι τον τελικό ζύθο (Paradh, 2015).

Μεγαλύτερο ενδιαφέρον για την ζυθοποιία παρουσιάζουν τα *Hafnia*, *Klebsiella*, *Citrobacter* και *Obesumbacterium*, διότι είναι έμμεσα βακτήρια αλλοίωσης του ζύθου. Δεν μπορούν να αναπτυχθούν στο τελικό προϊόν, αλλά αν αναπτυχθούν κατά τα αρχικά στάδια της ζύμωσης, μπορούν να προκαλέσουν ανεπιθύμητες δυσάρεστες γεύσεις στο τελικό προϊόν (Paradh, 2015).

2.1.2.2.3.1 *Hafnia protea* (*Obesumbacterium proteus*)

Το *Hafnia protea* είναι ένας μικροοργανισμός επιμόλυνσης του ζύθου που ανήκει στα *Enterobacteriaceae*. Είναι αρνητικό κατά Gram αερόβιο ή προαιρετικά αναερόβιο. Είναι μικρή ράβδος, αλλά έχει αναφερθεί ότι εμφανίζει πλειομορφική μορφολογία ράβδου παρουσία ζύμης στο ζυμούμενο ζυθογλεύκος. Το *H. protea* παρουσιάζει αρνητική αντίδραση στη δοκιμή οξειδάσης και καθυστερημένη και ασθενή θετική αντίδραση στη δοκιμή καταλάσης. Το βακτήριο μπορεί να ανάγει τα νιτρικά άλατα σε νιτρώδη στο ζυθογλεύκος (Paradh, 2015).

Ο εντοπισμός του γίνεται στο εμβόλιο της μαγιάς στο ζυθογλεύκος. Στα αρχικά στάδια της ζύμωσης ανταγωνίζεται τη μαγιά για θρεπτικά συστατικά, με αποτέλεσμα τον βραδύτερο ρυθμό ζύμωσης και την παραγωγή πτητικών συστατικών όπως διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO), ακετοΐνη, γαλακτικό οξύ, προπανόλη, ισοβουτανόλη και 2,3-βουτανودیολη. Η παραγωγή διμεθυλοσουλφιδίου (DMS) προσδίδει ανεπιθύμητη γεύση από παστινάκι στο

μολυσμένο ζύθο. Μια συγκέντρωση στο ζυθογλεύκος του *H. protea* έως και 1% του εμβολίου της ζύμης είναι ικανή να παράγει μόνο 14–18 μg/L DMS, το οποίο είναι χαμηλότερο από την τιμή των 30 μg/L DMS που είναι το κατώφλι αντίληψης. Με την επαναχρησιμοποίηση της μαγιάς σταδιακά η συγκέντρωση του θα αυξάνεται και τελικά θα φτάσει στο επίπεδο που θα μπορεί να παράγει δυσάρεστη οσμή πάνω από το κατώφλι αντίληψης. Ένα ακόμη πρόβλημα που υπάρχει με το *H. protea* είναι ότι μπορούν να χρησιμοποιήσουν τα νιτρικά άλατα ως δέκτες ηλεκτρονίων κατά την αναερόβια αναπνοή, με αποτέλεσμα την μετατροπή τους σε νιτρώδη. Αυτό θα μπορούσε ενδεχομένως να οδηγήσει στον σχηματισμό νιτροζαμίνων λόγω της αντίδρασης των νιτρωδών με δευτερογενείς αμίνες που υπάρχουν στο γλεύκος (Paradh, 2015).

2.1.2.2.4 Coliforms

Τα κολοβακτηρίδια περιλαμβάνουν ευρέως είδη *Enterobacteriaceae* που ανήκουν στα γένη *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Hafnia* και ορισμένα στελέχη *Citrobacter*, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιήσουν τη λακτόζη για σχηματισμό αερίων και οξέος στους 35-37°C εντός 48 ωρών. Τα βακτήρια αυτά αποτελούν δείκτη υγιεινής για τα ζυθοποιεία και η παρουσία τους στο νερό μαρτυρά αναποτελεσματική επεξεργασία νερού. Η εισαγωγή τους στο ζυθογλεύκος γίνεται μέσω μολυσμένου νερού ή με διείσδυση εξωτερικών υγρών στις σωληνώσεις του ζυθοποιείου. Ορισμένα είδη κολοβακτηριδίων, όπως τα *Citrobacter freundii*, *Rahnella aquatilis*, *Klebsiella oxycota* και *Klebsiella terrigena*, έχουν συσχετιστεί με αζύμωτο και ζυμώμενο ζυθογλεύκος (Paradh, 2015).

2.1.2.2.4.1 Citrobacter - Klebsiella - Rahnella

Το *Citrobacter freundii* είναι ένα προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο, μορφολογικά κινητική, λεπτή, κοντή ράβδος που εμφανίζεται μεμονωμένα και σε ζεύγη και είναι θετικό στην καταλάση. Αυτά τα βακτήρια αναστέλλονται από την αιθανόλη, εμφανίζονται μόνο στα πρώτα στάδια της ζύμωσης και σπάνια εμφανίζονται στο ζύθο. Σε περίπτωση επιμόλυνσης αυξάνεται ο ρυθμός της ζύμωσης και παράγονται διακετύλιο, γαλακτικό οξύ, ακεταλδεΐδη και διμεθυλοσουλφίδιο (Paradh, 2015).

Από το γένος *Klebsiella*, δυο είναι τα είδη που συσχετίζονται με την ζυθοποίηση, τα *K. terrigena* και *K. oxycota*. Τα *Klebsiella* spp. αναφέρονται ιδιαίτερα για την παραγωγή

φαινολικών δυσάρεστων οσμών λόγω της 4-βινυλογουαϊκόλης που σχηματίζεται από την αποκαρβοξυλίωση του φερουλικού οξέος που υπάρχει στο γλεύκος (Paradh, 2015).

Η απομόνωση του *Rahnella aquatilis* γίνεται από διάφορες πηγές όπως το νερό, το χώμα, την τροφή. Στα ζυθοποιεία συναντάται ως επιμόλυνση στο εμβόλιο της μαγιάς και στο ζυθογλεύκος. Το *Rahnella aquatilis* έχει αναφερθεί ότι επηρεάζει αρχικά τον ρυθμό ζύμωσης, αλλά η ανάπτυξή του επηρεάζεται από την αιθανόλη κατά τα τελευταία στάδια της ζύμωσης (Paradh, 2015).

Η επιμόλυνση του ζύθου με αυτά τα βακτήρια προκαλεί δυσάρεστες γεύσεις και αρώματα που περιγράφονται ως φρουτώδη, γαλακτώδη και θειούχα. Κατά την δράση τους παράγεται διμεθυλοσουλφίδιο, ακεταλδεΐδη, οξικός μεθυλεστέρας και διακετύλιο (Paradh, 2015).

Πίνακας 4. Επιπτώσεις και μεταβολικά προϊόντα επιμόλυνσης από Gram αρνητικά βακτήρια (Paradh & Hill, 2016)

Βακτήρια	Εμφάνιση στο ζυθοποιείο	Ανεπιθύμητες γευσεις/αρρώματα	Οπτικό αποτέλεσμα επιμόλυνσης	Μεταβολικά προϊόντα
Acetic acid Bacteria				
<i>Acetobacter</i>	Γλέυκος, διανεμητής ζύθου και επανζύμωση στο βαρέλι, ωρίμανση στο βαρέλι, βιοφίλμ στο ζυθοποιείο	Ξινή, ξύδι	Θολερότητα, Roriness	Οξικό οξύ
<i>Gluconobacter</i>	Γλέυκος, διανεμητής ζύθου και επανζύμωση σι βαρέλι	Ξινή, ξύδι	Θολερότητα	Οξικό οξύ, οξικά ιόντα
<i>Zymomonas</i>	Επαναζύμωση στο μπουκάλι	Φρούτο, σάπιο μήλο, σάπιο ανγό, θεικό	Θολερότητα, Roriness	Ακεταλδεΐδη και H ₂ S
Enterobacteriaceae				
<i>Obesumbacterium</i>	Μαγιά και γλέυκος σε ζύμωση	Παστινάκι, θεικό	Θολερότητα	DMS, διακετύλιο, ανώτερες αλκοόλες, νιτροζαμίνες, ακετοΐνη
<i>Citrobacter</i>	Γλέυκος, ζυμούμενο γλέυκος	Παστινάκι, θεικό	-	DMS, διακετύλιο, γαλακτικό οξύ, ακεταλδεΐδη
<i>Rahnella</i>	Μαγιά, αρχικά στάδια ζύμωσης	Φρούτο, θεικό	-	DMS, διακετύλιο, οξικός μεθυλεστέρας, ιξικός αιθυλεστέρας
<i>Klebsiella</i>	Ζυμούμενο γλέυκος, βιοφίλμ	Δυσάρεστο άρωμα	-	4-βινυλογουαϊκόλης, DMS, διακετύλιο
Obligatory anaerobes				
<i>Pectinatus</i>	Χαμηλού αλκοόλ απαστεριώτες μπίρες, συσκευαστήριο, βιοφίλμ	Σάπιο ανγό, δυσάρεστο άρωμα	Θολερότητα	Οξικό οξύ, προπιονικό οξύ, γαλακτικό οξύ, ηλεκτρικό οξύ, H ₂ S, ακετοΐνη, μεθυλομερκαπτάνη και άλλες θειούχες ενώσεις
<i>Megasphaera</i>	Χαμηλού αλκοόλ απαστεριώτες μπίρες, συσκευαστήριο, βιοφίλμ	Δυσάρεστο άρωμα	Θολερότητα	H ₂ S, βουτικό οξύ, ισοβουτυρικό οξύ, καπροϊκό οξύ, βαλερικό οξύ, ισοβαλερικό οξύ
<i>Selomonas</i>	Μαγιά	Δυσάρεστο άρωμα	Θολερότητα	Οξικό οξύ, γαλακτικό οξύ, προπιονικό οξύ
<i>Zymophilus</i>	Μαγιά, απόβλητα ζυθοποιείου	Δυσάρεστο άρωμα	Θολερότητα	Οξικό οξύ, προπιονικό οξύ

2.2 Ζύμες επιμόλυνσεις – Άγριες Ζύμες

Ως μικροοργανισμός επιμόλυνσης θεωρείτε οποιοσδήποτε μικροοργανισμός δεν έχει εισαχθεί σκοπίμως από τον ζυθοποιό. Ζύμες οι οποίες δεν έχουν χρησιμοποιηθεί σκόπιμα και κάτω από τον πλήρη έλεγχο στην παραγωγική διαδικασία του ζύθου χαρακτηρίζονται ως «άγριες». Οι ζύμες αυτές μπορούν να έχουν αρνητική επίδραση στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος, είτε επηρεάζοντας τα παραγωγικά στάδια είτε απευθείας το προϊόν (Campbell, 2003; Powell & Kerruish, 2017; Bokulich & Bamforth, 2013).

Οι ζύμες που αλλοιώνουν το ζύθο αποτελούν μια ευρεία ομάδα οργανισμών. Υπάρχουν φυλογενετικές διαφορές μεταξύ τους, αλλά περιλαμβάνουν και ομάδες που μοιράζονται βασικές φυσιολογικές ιδιότητες. Οι ζύμες που μπορούν να επιμόλυνουν το ζύθο εντοπίζονται σε όλο το εύρος δράσης του ζυθοποιείου, από τις πρώτες ύλες έως και το τελικό προϊόν (Πίνακας 5). Ανεξάρτητα από το περιβάλλον που προτιμούν, οι ζύμες που αλλοιώνουν το ζύθο χαρακτηρίζονται ως *Saccharomyces* ή non-*Saccharomyces*. Οι *Saccharomyces* που προκαλούν αλλοίωση θεωρούνται συχνά ως τα πιο επικίνδυνα διότι είναι δύσκολο να εντοπιστούν, ενώ ανταγωνίζονται απευθείας με το επιθυμητό στέλεχος. Τα είδη non-*Saccharomyces* που συνδέονται με την αλλοίωση του ζύθου περιλαμβάνουν μέλη του γένους *Brettanomyces*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora* (*Kloeckera*), *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Torulaspota* και *Zygosaccharomyces* (Powell & Kerruish, 2017).

Πίνακας 5. Τυπικά σημεία επιμόλυνσης των ζυμών επιμόλυνσης (Powell & Kerruish, 2017).

Στάδιο επεξεργασίας	Είδος
Πρώτες ύλες	<i>Candida</i> , <i>Cryptococcus</i> , <i>Debaryomyces</i> , <i>Pichia</i> , <i>Rhodotorula</i>
Μαγιά	<i>Saccharomyces</i> , non- <i>Saccharomyces</i>
Σάκχαρα	<i>Zygosaccharomyces</i> , <i>Kluyveromyces</i>
Αερόβια στάδια ζύμωσης	<i>Candida</i> , <i>Hanseniaspora</i> (<i>Kloeckera</i>), <i>Pichia</i>
Ζύμωση	<i>Saccharomyces</i>
Επαναζύμωση στο μπουκάλι	<i>Brettanomyces</i>
Ζύθος σε βαρέλι	<i>Candida</i> , <i>Brettanomyces</i> , <i>Torulaspota</i> , <i>Hanseniaspora</i> (<i>Kloeckera</i>), <i>Pichia</i>
Διάφορα σημεία (μη αλλοιωγόνοι)	<i>Rhodotorula</i> , <i>Cryptococcus</i>

Για να αναπτυχθούν ορισμένες non-*Saccharomyces* ζύμες χρειάζονται οξυγόνο. Η έλλειψη οξυγόνου περιορίζει την δράση και την επιρροή τους κατά τα παραγωγικά στάδια. Τα στελέχη αυτά συνήθως δεν μπορούν να μεταβολίσουν την μαλτόζη, επομένως έχουν ανταγωνιστικό μειονέκτημα κατά την ζύμωση. Δεν ανταγωνίζονται το επιθυμητό στέλεχος κατά την ζύμωση και δεν μπορούν να εδραιωθούν κατά τα παραγωγικά στάδια. Η ικανότητα

τους για αλλοίωση περιορίζεται στις πρώτες ύλες και στα αρχικά στάδια της ζύμωσης, όπου υπάρχει οξυγόνο και απλά σάκχαρα. Τα ζυθοποιεία που γίνεται χρήση ανοιχτών δεξαμενών ζύμωσης, οπότε η παρουσία οξυγόνου είναι αναπόφευκτη, αποτελούν καλύτερο περιβάλλον για την ανάπτυξη τους (Powell & Kerruish, 2017).

Η χρήση των ζυμών non-*Saccharomyces* παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον για τον κλάδο της ζυθοποιίας διότι ορισμένα επιλεγμένα στελέχη μπορούν να παράγουν πλήθος ουσιών που συνεισφέρουν στο αρωματικό προφίλ του ζύθου (Tataridis et al., 2013a;b; 2014 2016; Drosou et al., 2022). Αυτό όμως αυξάνει την πολυπλοκότητα στην διαχείριση των στελεχών ζυθοποιήσης, όπως επίσης και τον κίνδυνο να προκύψουν διασταυρούμενες επιμολύνσεις.

2.2.1 Αναερόβιες ζύμες επιμόλυνσης

Οι αναερόβιες ζύμες επιμόλυνσης αποτελούν σοβαρό πρόβλημα διότι ανταγωνίζονται άμεσα το επιθυμητό στέλεχος ενώ οι ομοιότητες τους με το στέλεχος της ζυθοποιίας καθιστούν δύσκολο τον εντοπισμό τους. Οι επιπτώσεις που έχουν στο προϊόν ποικίλουν.

Η επιμόλυνση του εμβολίου με είδη που ανήκουν στα γένη *Saccharomyces*, *Torulaspora*, *Kluyveromyces* και *Zygosaccharomyces* μπορεί να οδηγήσει σε σημαντικά προβλήματα κατά την επαναχρησιμοποίηση της μαγιάς, διότι έχουν την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται τόσο ώστε να ξεπεράσουν σε αριθμό κυττάρων το επιθυμητό στέλεχος. Αυτό θα επηρεάσει την ζύμωση διότι θα προκύψουν διακυμάνσεις στις συγκεντρώσεις της αιθανόλης, των εστέρων, των ανώτερων αλκοολών, των συζηγών δικετονών (VDK) και θα παραχθούν δυσάρεστες γεύσεις και αρώματα. Πολλές ζύμες δεν συσσωματώνονται καλά και δεν αλληλοεπιδρούν με τις διάφορες ουσίες που χρησιμοποιούνται για την διαύγαση του ζύθου, με αποτέλεσμα να προκαλούν προβλήματα όπως η επαναζύμωση και η θολερότητα στο τελικό προϊόν. Ακόμα, υπάρχουν στελέχη που παράγουν ουσίες τοξικές για άλλα κύτταρα (killer) και συνεπώς μπορούν να βλάψουν το στέλεχος της παραγωγής. Μια σύνοψη των χαρακτηριστικών και της δυνατότητας αλλοίωσης των αναερόβιων ζυμών που αλλοιώνουν το ζύθο μπορούν να βρεθούν στον Πίνακα 6 (Powell & Kerruish, 2017).

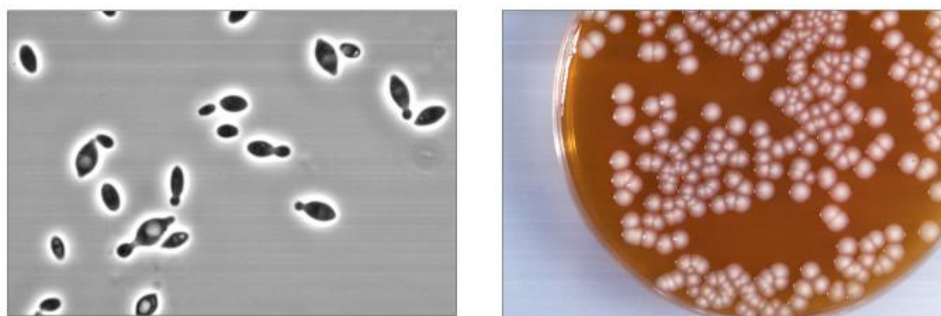
Πίνακας 6. Χαρακτηριστικά των αναερόβιων ζυμών επιμόλυνσης (Powell & Kerruish, 2017).

Γένος	Είδη	Χαρακτηριστικά	Ικανότητα αλλοίωσης	Επιπλέον πληροφορίες
<i>Hanseniaspora</i> (<i>Kloeckera</i>)	<i>H. uvarum</i> (<i>K. apiculata</i>) <i>H. valbeyensis</i> <i>H. vineae</i>	Λεμονοειδές σχήμα, προτιμά αναερόβιες συνθήκες	Ζύμωση, θολερότητα, δυσάρεστες γεύσεις-αρώματα, δεν σχετίζεται τυπικά με το ζύθο αλλά μπορεί να ανιχνευθεί από διασταυρούμενη επιμόλυνση π.χ. αν χρησιμοποιηθούν βαρέλια κρασιού για ωρίμανση ζύθου	Το <i>Hanseniaspora</i> αποτελεί το τελειόμορφο που παράγει σπόρια, το <i>Kloeckera</i> είναι το ανάμορφο. Εντοπίζεται στην παραγωγή του κρασιού και σε συγκεκριμένες μπύρες Lambic
<i>Kluuyveromyces</i>	<i>K. marxianus</i>	Διάφορες κυτταρικές μορφολογίες αλλά τυπικά ελλειψοειδή	Ζύμωση, θολερότητα, δυσάρεστες γεύσεις-αρώματα	Ασκομύκητας, εντοπίζεται σε όλη την βιομηχανία τροφίμων και κυρίως σε αναψυκτικά και γαλακτοκομικά προϊόντα
<i>Saccharomyces</i>	<i>S. bayanus</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>S. pastorianus</i> <i>S. unisporus</i>	Σφαιρικά κύτταρα, περιλαμβάνουν στελέχη και παραλλαγές που δεν σχετίζονται με τα παραγωγικά στελέχη, τα κύτταρα του <i>S. bayanus</i> μπορεί να είναι επιμήκη	Ζύμωση, θολερότητα, δυσάρεστες γεύσεις-αρώματα, κάποια στελέχη έχουν διαφορετικές ικανότητες συσσωμάτωσης που μπορεί να επιρεάσει το στέλεχος παραγωγής, κάποια στελέχη έχουν POF χαρακτήρα ενώ κάποια άλλα είναι διαστατικά	Ασκομύκητες, τα κύτταρα είναι περισσότερο ακανόνιστα σε σύγκριση με τα στελέχη παραγωγής, το μέγεθος των κυττάρων είναι τυοπικά μικρότερο και μπορεί να οδηγήσει σε προβλήματα θολερότητας/φιλτραρίσματος, κάποια στελέχη παράγουν σπόρια σε σχήμα τετράεδρου
<i>Schizosaccharomyces</i>	<i>S. pompe</i>	Κύτταρα σε σχήμα ράβδου	Ζύμωση, θολερότητα, δυσάρεστες γεύσεις-αρώματα	Ασκομύκητας, διαίρεται με σχάση και διακρίνεται εύκολα από τα κύτταρα ζυμών που βλαστάνουν
<i>Torulospora</i>	<i>T. delbrueckii</i>	Σφαιρικά, ελλειψοειδή κύτταρα, αναπτύσσονται ελάχιστα κάτω από αναερόβιες συνθήκες	Ζύμωση, θολερότητα, δυσάρεστες γεύσεις-αρώματα, σχετίζεται με το εμβόλιο της μαγιάς, μπορεί να αλλοιώσει μη παστεριωμένους ζύθους	Ασκομύκητας, είναι το τελειόμορφο του <i>Candida colliculosa</i> , παρουσιάζει μεγάλη οσμωτική αντοχή
<i>Zygosaccharomyces</i>	<i>Z. bailii</i> <i>Z. bisporus</i> <i>Z. rouxii</i>	Κύτταρα οβάλ σχήματος, υψηλή αντοχή στα σάκχαρα	Ζύμωση, θολερότητα, δυσάρεστες γεύσεις-αρώματα	Ασκομύκητες, παρουσιάζουν αντοχή σε αντίξοες συνθήκες εντοπίζονται σε όλη την βιομηχανία τροφίμων, κυρίως όμως όπου υπάρχει υψηλή συγκέντρωση σακχάρων

2.2.1.1 *Hanseniaspora* (*Kloeckera*)

Το γένος *Hanseniaspora* αποτελεί το τελειόμορφο, ενώ το ανάμορφο είναι το *Kloeckera*. Κατά την ασεξουαλική αναπαραγωγή η εκβλάστηση είναι διπολική. Έτσι τα κύτταρα εμφανίζουν ένα χαρακτηριστικό οβάλ σχήμα σαν του λεμονιού (apiculate). Η ανάπτυξη τους στο προϊόν προκαλεί δυσάρεστες γεύσεις και θολερότητα. Υπάρχουν κάποια στοιχεία που υποδεικνύουν ότι λόγω της συσχέτισής τους με τα φρούτα, ορισμένα είδη *Hanseniaspora* όπως το *Hanseniaspora uvarum* και το *Hanseniaspora apiculata* μπορεί να μεταφερθούν από μύγες (drosophila), επομένως είναι πιθανό να αποτελούν μια κύρια διαδρομή προς το ζυθοποιείο, καθώς και τις πρώτες ύλες (Powell & Kerruish, 2017).

Οι αποικίες του *H. uvarum* στο θρεπτικό υπόστρωμα UBA είναι λευκές έως κρεμ στο χρώμα, είναι λείες και γυαλιστερές με ανυψωμένο κέντρο και με λείες άκρες (ASBC, 2018).

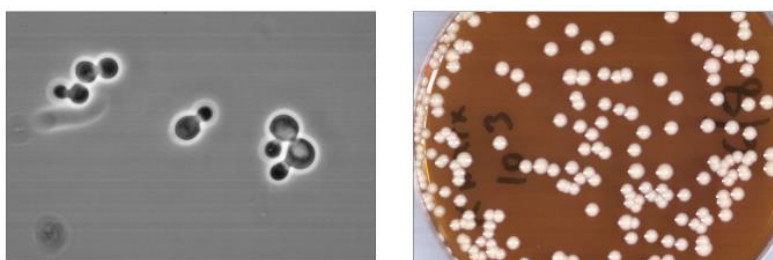


Σχήμα 19. *H. uvarum* όπως φαίνεται στο μικροσκόπιο και σε τρυβλίο με UBA (ASBC, 2018)

2.2.1.2 *Kluyveromyces*

Τα κύτταρα του γένους *Kluyveromyces* είναι ωσειδή ή ελλειψοειδή. Παρατηρούνται και άλλες μορφολογίες όπως τα επιμήκη κύτταρα και οι ψευδοϋφές. Κατά την αυτογονιμοποίηση τους παράγουν ανθεκτικά στην θερμότητα ασκοσπόρια. Η κύρια διαδρομή προς το ζυθοποιείο είναι η βύνη και άλλες πρώτες ύλες. Η επιμόλυνση προκαλεί έντονη ζύμωση με παραγωγή δυσάρεστων γεύσεων και θολερότητας. Ορισμένα στελέχη έχουν χαρακτήρα «killer», το οποίο μπορεί να έχει αρνητικό αντίκτυπο στο εμβόλιο του στελέχους ζυθοποίησης και ως εκ τούτου στην συνολική εξέλιξη της ζύμωσης (Powell & Kerruish, 2017).

Τα κύτταρα του *Kluyveromyces marxianus* έχουν μέγεθος 2-6 x 3-10 μm. Οι αποικίες του στο θρεπτικό υπόστρωμα UBA είναι λευκές ή κρεμ έως ελαφρώς ροζ. Είναι γυαλιστερές έως θολές, έχουν βουτυρώδη υφή και είναι επίπεδες με τάση να απλώνονται (ASBC, 2018).



Σχήμα 20. *Kluyveromyces marxianus* όπως φαίνεται στο μικροσκόπιο και σε τρυβλίο με UBA (ASBC, 2018)

2.2.1.3 *Saccharomyces*

Τα κύτταρα του γένους *Saccharomyces* είναι τυπικά σφαιρικά ή ελλειπσοειδή και η βλαστική αναπαραγωγή γίνεται με περιμετρική (multilateral) εκβλάστηση. Έχουν την ικανότητα σχηματισμού ψευδοϋφών αλλά σπάνια συμβαίνει στα στελέχη που χρησιμοποιούνται από την ζυθοποιία. Μέσα στο γένος, τα περισσότερα είδη μπορούν να αναπαραχθούν σεξουαλικά. Δεν ισχύει το ίδιο για τα ζυθοποιητικά στελέχη, όπου λόγω της υβριδικής τους κατάστασης και της γενετικής τους πολυπλοκότητας σπανίως αναπαράγονται σεξουαλικά. Τα στελέχη *Saccharomyces* που μπορούν να αλλοιώσουν τον ζύθο εντοπίζονται σε διάφορα σημεία στο ζυθοποιείο αλλά κυρίως συνδέονται με τα στάδια της ζύμωσης (Powell & Kerruish, 2017).

Από την ζυθοποιητική σκοπιά οι αλλοιώσεις από το γένος *Saccharomyces* συνήθως αναφέρονται στα στελέχη του *S. cerevisiae*. Στελέχη του *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces kudriavzevii*, και *Saccharomyces mikatae* είναι ικανά να μολύνουν το γλεύκος. Λόγω των σχετικά παρόμοιων ιδιοτήτων με τα ζυθοποιητικά στελέχη είναι δύσκολο να ανιχνευθούν, οπότε αποτελούν σοβαρή απειλή για τις επεξεργασίες ζυθοποίησης (Powell & Kerruish, 2017).

Οποιοσδήποτε μικροοργανισμός που δεν έχει χρησιμοποιηθεί σκοπίμως στην ζυθοποίηση θεωρείται ως επιμόλυνση. Κατά συνέπεια, η τυχαία ανάμιξη διαφορετικών στελεχών παραγωγής ή η χρήση λανθασμένου στελέχους, θεωρείται και αυτό επιμόλυνση λόγω των εγγενών διαφορών στις ζυμωτικές τους ιδιότητες. Ανάλογα τα στελέχη μια τέτοιου είδους επιμόλυνση μπορεί να μην έχει έντονο χαρακτήρα, ειδικά στην περίπτωση που το επίπεδο επιμόλυνσης είναι χαμηλό ή αν η ομοιότητα των στελεχών είναι μεγάλη (Powell & Kerruish, 2017).

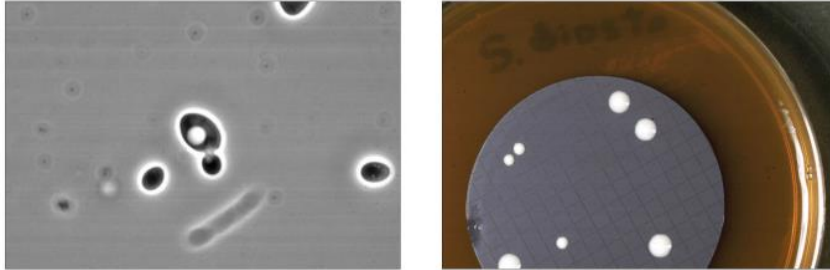
Επίσης οι μεταλλάξεις που μπορεί να προκύψουν στα στελέχη παραγωγής μπορεί να έχουν ένα παρόμοιο φάσμα επιδράσεων στην πορεία της ζύμωσης. Οι δύο συχνότεροι τύποι μεταλλάξεων αφορούν παραλλαγές στην ικανότητα συσσωμάτωσης (flocculation) και στην αναπνευστική ικανότητα των κυττάρων λόγω ελαττωματικών μιτοχονδρίων (petit mutants).

Ο εντοπισμός τέτοιων μεταλλάξεων είναι δύσκολος ειδικά όταν αυτή η αλλαγή στην συγκέντρωση των παραλλαγών γίνεται σε διαδοχικές ζυμώσεις (Powell & Kerruish, 2017).

Τα μη παραγωγικά στελέχη *Saccharomyces* εμφανίζουν ορισμένες ιδιότητες που είναι διαφορετικές και/ή ανεπιθύμητες σε σύγκριση με τα στελέχη παραγωγής. Η ικανότητα παραγωγής φαινολικών ενώσεων (χαρακτήρας POF) και η διαστατική ικανότητα είναι δυο από τις πιο σημαντικές ανεπιθύμητες ιδιότητες που μπορούν να παρουσιάσουν. Οι συνέπειες για μη παστεριωμένες εμφιαλωμένες μπύρες μπορεί να είναι καταστροφικές, καθώς η

αξιοποίηση των υπολειμματικών δεξτρινών μπορεί να οδηγήσει σε παραγωγή ασυνήθιστα υψηλών συγκεντρώσεων διοξειδίου του άνθρακα με αποτέλεσμα τον αυξημένο κίνδυνο έκρηξης των μπουκαλιών. Πολλά διαστατικά στελέχη έχουν επίσης και POF+ χαρακτήρα, με αποτέλεσμα την παραγωγή φαιολικών γεύσεων, καθώς και τον σχηματισμό θολερότητας και άλλων δυσάρεστων γεύσεων (Powell & Kerruish, 2017).

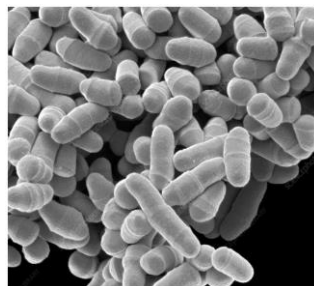
Τα κύτταρα του *Saccharomyces diastaticus* είναι οβάλ, ελλειψοειδή με μέγεθος 5-10 x 6-12 μm. Βρίσκονται μόνα τους ή σε ζευγάρια, σε μικρές αλυσίδες ή ομάδες (ASBC, 2018).



Σχήμα 21. *Saccharomyces diastaticus* όπως φαίνεται στο μικροσκόπιο και σε τρυβλίο με UBA (ASBC, 2018)

2.2.1.4 *Schizosaccharomyces*

Τα κύτταρα του *Schizosaccharomyces* είναι ραβδόμορφα και πολλαπλασιάζονται μέσω πλευρικής σχάσης μέσω σχηματισμού εγκάρσιου τοιχώματος που αναγκάζει τα άτομα να αποκτήσουν μια διαμόρφωση τύπου «v» κατά τη βλαστική ανάπτυξη. Λόγω του χαρακτηριστικού τρόπου εκβλάστησής τους, οι ζύμες *Schizosaccharomyces* φαίνονται πολύ διαφορετικές σε σύγκριση με άλλες ζύμες που συναντώνται στο ζυθοποιείο. Ο *Schizosaccharomyces* είναι κυρίως ετεροθαλικός και παράγει γραμμικούς ή σε σχήμα αλτήρα ασκούς (Powell & Kerruish, 2017).

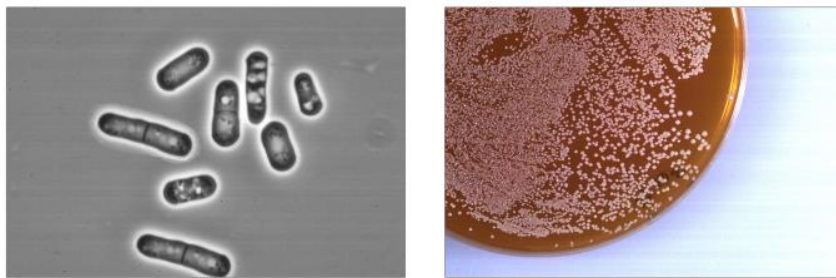


Σχήμα 22. *Schizosaccharomyces pombe* σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (x6500) (<https://www.sciencephoto.com/media/879138/view/s-pombe-yeast-sem>)

Ο *Schizosaccharomyces pombe*, χρησιμοποιείται στην παραγωγή παραδοσιακών Αφρικάνικων ζύθων, σε ορισμένα προϊόντα τσαγιού που έχουν υποστεί ζύμωση και μπορεί να βρεθεί στο έδαφος και στα φυτά συμπεριλαμβανομένου του κριθαριού. Ο *Sch. pombe* είναι θετική στο φαινόμενο Crabtree ζύμη, ικανή για ζύμωση και παρουσιάζει οσμοφιλικές ιδιότητες και αντοχή σε ορισμένα χημικά συντηρητικά. Ο *Sch. pombe* δεν αναφέρεται ευρέως ως ζύμη που αλλοιώνει το ζύθο. Στην περίπτωση αλλοίωσης μπορεί να οδηγήσει σε παραγωγή δυσάρεστων γεύσεων και σε ασυνεπείς ζυμώσεις (Powell & Kerruish, 2017).

Σε αυτό το βίντεο <https://youtu.be/ZeDCc0IJngU>, παρουσιάζεται σε timelapse η διαίρεση των κυττάρων του *Sch. pombe* όπως φαίνεται στο μικροσκόπιο επιφθορισμού.

Τα κύτταρα του *Sch. pombe* είναι ελλειψοειδή έως κυλινδρικά με διαστάσεις 3-5 x 5-15 μm και συναντώνται μόνα ή σε ζευγάρια. Οι αποικίες σε θρεπτικό υπόστρωμα UBA είναι λευκές έως κρεμ, είναι βουτυρώδης, θολές έως γυαλιστερές και είναι ανυψωμένες με έντονο τελείωμα (ASBC, 2018).

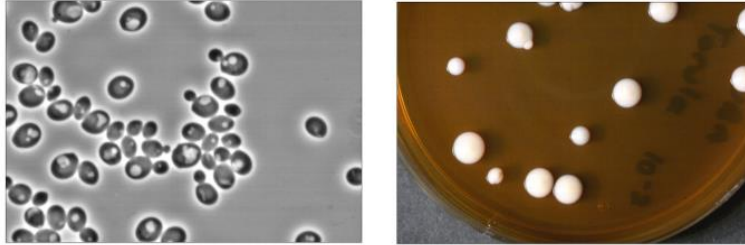


Σχήμα 23. *Sch. pombe* όπως φαίνεται στο μικροσκόπιο και σε τρυβλίο με UBA (ASBC, 2018)

2.2.1.5 *Torulaspora*

Τα *Torulaspora* έχουν σφαιρικό σχήμα και παρουσιάζουν ομοιογένεια στη δομή. Η ενδοπληθυσμιακή διακύμανση είναι μικρή, σε αντίθεση με άλλα γένη ζυμομυκήτων. Σχετίζονται γενετικά στενά με τους *Zygosaccharomyces* και *Saccharomyces*, αν και είναι διακριτά μεταξύ τους. Τα *Torulaspora* είναι καλά προσαρμοσμένα ώστε να ανέχονται οσμωτικά περιβάλλοντα. Συνεπώς, είδη όπως το *Torulaspora delbrueckii* μπορούν συχνά να βρεθούν σε ενδιαιτήματα που συνδέονται με υψηλές συγκεντρώσεις ζάχαρης, συμπεριλαμβανομένων των προϊόντων διατροφής όπως η μελάσα, το μέλι και κυρίως τα σιρόπια με βάση τη ζάχαρη. Αυτό το γένος ζύμης είναι ικανό να αναπτυχθεί υπό αναερόβιες συνθήκες και συνθήκες που σχετίζονται με τη ζύμωση, καθώς και να επιμολύνει πρώτες ύλες όπως τα σάκχαρα ενανθράκωσης. Η κύρια επίπτωση αυτής της ζύμης είναι η πρόκληση θολερότητας και δυσάρεστων γεύσεων στο προϊόν (Powell & Kerruish, 2017).

Τα κύτταρα του *T. delbrueckii* είναι στρογγυλά ή ελλειψοειδή με διαστάσεις 2.5-6.5 x 2.5-7 μm και συναντώνται μόνα τους ή σε ζευγάρια. Οι αποικίες στο θρεπτικό υπόστρωμα UBA είναι λευκές έως κρεμ στο χρώμα, είναι βουτυρώδης, θολές έως γυαλιστερές και είναι ανυψωμένες με έντονο τελείωμα (ASBC, 2018)

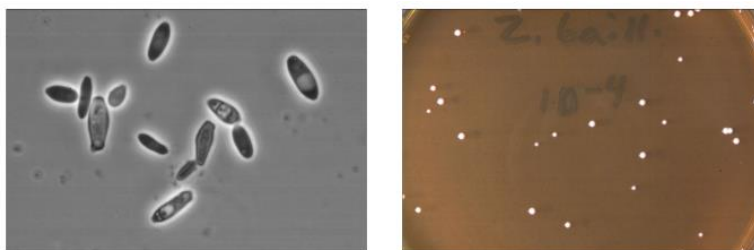


Σχήμα 24. *T. delbrueckii* όπως φαίνεται στο μικροσκόπιο και σε τρυβλίο με UBA (ASBC, 2018)

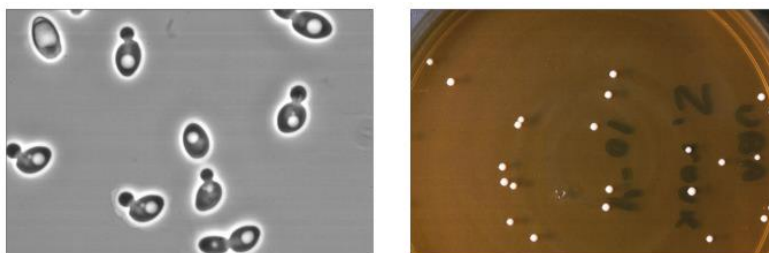
2.2.1.6 *Zygosaccharomyces*

Τα κύτταρα του *Zygosaccharomyces* είναι στρογγυλά ή ελλειψοειδή και σπανίως παράγουν σπόρια και έχουν την ικανότητα να παράγουν ψευδοϋφές. Μπορούν να αντέχουν την αποξήρανση. Μπορούν και αντιστέκονται σε υψηλά επίπεδα αιθανόλης και αντέχουν σε χαμηλό pH. Επίσης, παρουσιάζουν αντοχή σε οξέα όπως το οξικό οξύ. Έχουν οσμοφιλικές ιδιότητες και μπορεί να ευδοκιμήσουν κάτω από υψηλή συγκέντρωση σακχάρων. Τα συνηθέστερα είδη που απασχολούν την ζυθοποιία είναι τα *Zygosaccharomyces bailii* και *Zygosaccharomyces rouxii*. Η επιμόλυνση με αυτούς τους μικροοργανισμούς μπορεί να προκαλέσει προβλήματα στην διαύγεια και την γεύση του ζύθου καθώς ζυμώνουν έντονα παράγοντας μια σειρά από υψηλότερες αλκοόλες καθώς και τυπικές δυσάρεστες γεύσεις (Powell & Kerruish, 2017).

Τα κύτταρα του *Z. bailii* είναι οβάλ, ελλειψοειδή ή κυλινδρικά με διαστάσεις 3.5-7.0 x 5.5-14 μm και συναντώνται σε ζευγάρια, μικρές αλυσίδες ή ομάδες. Τα κύτταρα του *Z. rouxii* είναι οβάλ, ελλειψοειδή ή περιστασιακά επιμήκη με διαστάσεις 2.5-7.0 x 4.0-9.5 μm και συναντώνται σε ζευγάρια ή μικρές ομάδες. Οι αποικίες και για τα δύο στο θρεπτικό υπόστρωμα UBA είναι λευκές έως κρεμ, είναι βουτυρώδης, λείες, γυαλιστερές και γίνονται θολές μετά από 3 μέρες επώασης (ASBC, 2018).



Σχήμα 25. *Z. bailii* όπως φαίνεται στο μικροσκόπιο και σε τρυβλίο με UBA (ASBC, 2018)



Σχήμα 26. *Z. rouxii* όπως φαίνεται στο μικροσκόπιο και σε τρυβλίο με UBA (ASBC, 2018)

2.2.2 Αερόβιες ζύμες επιμόλυνσης

Οι αερόβιες ζύμες απαιτούν οξυγόνο για την εύρωστη ανάπτυξη τους. Σε αναερόβιες συνθήκες πολλά είδη μέσα σε αυτήν την κατηγορία έχουν την ικανότητα να ζυμώσουν σάκχαρα ασθενώς και υπό προϋποθέσεις, ωστόσο άλλα είδη δεν μπορούν να ζυμώσουν σύνθετα σάκχαρα ή παρουσιάζουν περιορισμένη ικανότητα διπλασιασμού.

Ο εντοπισμός των αερόβιων ζυμών στο ζυθοποιείο πραγματοποιείται συνήθως σε περιοχές που δεν σχετίζονται με την ζύμωση. Συνήθως εντοπίζονται σε επιφάνειες, στον εξοπλισμό, στις πρώτες ύλες και στους περιέκτες. Τα αερόβια είδη έχουν την ικανότητα να επιβιώνουν σε χαμηλές συγκεντρώσεις κατά τα στάδια της ζύμωσης και να επιμένουν κατά την επαναχρησιμοποίηση της μαγιάς. Όμως η παρουσία τους στο στάδιο της ζύμωσης είναι απίθανο να επηρεάσει σημαντικά το τελικό προϊόν επειδή κατά πάσα πιθανότητα θα παραμένουν κάτω από έναν οριακό αριθμό κυττάρων ή θα βγουν εκτός ανταγωνισμού από το στέλεχος ζυθοποίησης. Τα πιο σημαντικά είδη επιμόλυνσης είναι οι ζύμες *Pichia* και *Candida*, ωστόσο οι *Kluyveromyces*, *Torulasporea* και *Brettanomyces* μπορούν επίσης να λειτουργήσουν ως ευκαιριακοί επιμολυντές ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια της αερόβια φάση ζύμωσης και σε καταστάσεις όπου η είσοδος οξυγόνου είναι δύσκολο να αποφευχθεί, όπως στις μη παστεριωμένες βαρελίσιες μύρες. Μια περίληψη των χαρακτηριστικά και της

ικανότητας αλλοίωσης των αερόβιων ζυμών που μπορούν να επιμολύνουν το ζύθο βρίσκεται στον Πίνακα 7 (Powell & Kerruish, 2017).

Πίνακας 7. Χαρακτηριστικά των αερόβιων ζυμών επιμόλυνσης (Powell & Kerruish, 2017).

Γένος	Είδη	Χαρακτηριστικά	Ικανότητα αλλοίωσης	Επιπλέον πληροφορίες
<i>Brettanomyces</i> (<i>Dekkera</i>)	<i>B. anomalus</i> (<i>D. anomalus</i>) <i>B. bruxellensis</i> (<i>D. bruxellensis</i>) <i>B. Lambicus</i>	Επιμήκη κύτταρα που σχηματίζουν αλυσίδες, ζυμώνουν παρουσία οξυγόνου, δεν μπορούν να ζυμώσουν την σακχαρόζη και ζυμώνουν περιορισμένα την μαλτόζη	Παραγωγή οξικού οξέος, 4-ethyl phenol, 4-ethyl guaiacol (μυρωδιά στάβλου, σελάς αλόγου ή τσιρότου και φαρμακευτική, μπέικον, μπαχαρικά, γαρίφαλο ή καπνιστή, μυρωδιά ιδρωμένης σέλας, τυριού, ταγγό), ορισμένες φορές σχηματίζει υμένιο στην επιφάνεια, σχηματισμός δυσάρεστων γεύσεων-οσμών σε περίπτωση επαναζύμωσης στο μπουκάλι	Ασκομύκητες με το <i>Brettanomyces</i> να είναι το ανάμορφο και το <i>Dekkera</i> το τελειόμορφο που παράγει σπόρια, ορισμένες φορές χρησιμοποιούνται ως στέλεχος ζυθοποιήσεις ενώ άλλες ως επιπλέον καλλιέργεια στο στάδιο της ωρίμανσης σε ζύθους Lambic ή όπου ο χαρακτήρας "Brett" είναι επιθυμητός
<i>Candida</i>	<i>C. boidinii</i> <i>C. stellata</i> <i>C. tropicalis</i> <i>C. vini</i>	Κύτταρα σφαιρικού σχήματος, ζυμώνουν την γλυκόζη και κάποιες φορές την μαλτόζη, δεν αναπτύσσονται καλά κάτω από αναερόβιες συνθήκες	Ζύμωση, θολερότητα, δυσάρεστες γεύσεις-οσμές, μπορούν να σχηματίσουν υμένιο, η αλλοίωση περιορίζεται στα αερόβια στάδια	Ασκομύκητες, κάποια τελειόμορφα του <i>Candida</i> είναι είδη <i>Pichia</i> , κάποια είδη σχετίζονται με το ανθρώπινο μικροβίωμα
<i>Debaromyces</i>	<i>D. hansenii</i>	Μικρά σφαιρικά κύτταρα, ασθενής ή καθόλου ζυμωτική ικανότητα	Θολερότητα και δυσάρεστες γεύσεις-οσμές μαγιάς, μπορεί να σχηματίσει υμένιο και ίζημα, η αλλοίωση περιορίζεται στα αερόβια στάδια	Ασκομύκητες, παρουσιάζει μεγάλη οσμωτική αντοχή και εντοπίζεται σε όλη την βιομηχανία τροφίμων
<i>Lindera</i> (<i>Williopsis</i>)	<i>L. saturnus</i>	Κύτταρα σφαιρικού σχήματος, ασθενής ή καθόλου ζυμωτική ικανότητα	Προκαλεί έντονες εστερικές γεύσεις-οσμές, έχει τον χαρακτήρα killer	Ασκομύκητες, έχει μελετηθεί αρκετά για την βιομηχανική παραγωγή της γεύσης-αρώματος μπανάνας (isoamyl acetate) για την βιομηχανία τροφίμων
<i>Pichia</i> (<i>Hansenula</i>)	<i>P. anomala</i> <i>P. fermentans</i> <i>P. membranifaciens</i>	Τυπικά οβάλ/ελλειψοειδή ή ραβδοειδή κύτταρα, προτιμά αερόβιες συνθήκες, ασθενής ζυμωτική ικανότητα ή απουσία της	Θολερότητα και δυσάρεστες γεύσεις-οσμές μαγιάς, μπορεί να σχηματίσει υμένιο και ίζημα, προκαλεί αυξημένη παραγωγή εστέρων	Ασκομύκητες, το όνομα <i>Hansenula</i> αποτελεί το κατηγορημένο συνώνυμο του <i>Pichia</i> , είναι τελειόμορφο και παράγει σπόρια
<i>Rhodotorula</i>	<i>R. glutinis</i> <i>R. mucilaginosa</i>	Τυπικά οβάλ/ελλειψοειδή κύτταρα, μπορεί να παράξει ψευδοϋφές, απουσία ζυμωτικής ικανότητας	Μπορεί να μεταβολίσει τα σακχαρα οδηγώντας σε μειώμενο βαθμό ζύμωσης, επιβιώνει στο εμβόλιο της μαγιάς αλλά τυπικά δεν μπορεί να προκαλέσει αλλοίωση στο ζύθο	Βασιδιομύκητες, μπορεί να μειώσει τα νιτρικά και ιθιανόν να συμβάλει στον σχηματισμό νιτροζαμίνων στο ζύθο

2.2.2.1 *Brettanomyces* (*Dekkera*)

Τα κύτταρα του *Brettanomyces* είναι συνήθως σφαιρικά ή έχουν σχήμα «λουκάνικου» αν και η συνολική μορφολογία μπορεί να είναι μεταβλητή. Μπορούν να παράγουν σπόρια και ψευδοϋφές. Το είδος *Dekkera* αποτελεί την σεξουαλική μορφή του γένους. Τα είδη που περιλαμβάνει το γένος είναι τα *Brettanomyces bruxellensis*, *Brettanomyces anomalus*, *Brettanomyces custerianus*, *Brettanomyces nanus* και *Brettanomyces naardenensis*. Τα δυο πιο συχνά αναφερόμενα είδη είναι ο *B. bruxellensis* και ο *B. anomalus*. Τα είδη του

Brettanomyces στην φύση συνδέονται με τα δέντρα και τις επιφάνειες των φρούτων. Μια πιθανή οδός επιμόλυνσης στο ζυθοποιείο μπορεί να αποτελούν οι μύγες των φρούτων (Powell & Kerruish, 2017).

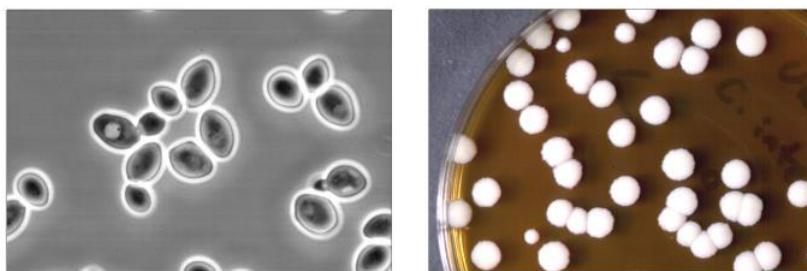
Οι *Brettanomyces* μπορούν να μετατρέπουν τα σάκχαρα σε αιθανόλη και οξικό οξύ παρουσία οξυγόνου λόγω του φαινομένου Custers. Επίσης έχουν την ικανότητα να χρησιμοποιούν πολύπλοκα σάκχαρα όπως τις δεξτρίνες, που δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν εύκολα από το στέλεχος ζυθοποίησης (Powell & Kerruish, 2017). Οι *Brettanomyces* είναι υπεύθυνοι για την παραγωγή του χαρακτήρα «Brett». Ο χαρακτήρας αυτός οφείλεται κυρίως στην παραγωγή πτητικών φαινολικών ενώσεων όπως η 4-ethylphenol όπου συχνά περιγράφεται ως μυρωδιά στάβλου, σελάς αλόγου ή τσιρότου και φαρμακευτική, η 4-ethylguaiacol που περιγράφεται ως μυρωδιά από μπέικον, μπαχαρικά, γαρίφαλο ή καπνιστή, και πτητικά λιπαρά οξέα όπως ισοβαλερικό οξύ που περιγράφεται ως μυρωδιά ιδρωμένης σέλας, τυριού, ταγγό. Η παραγωγή αυτών γίνεται κατά το στάδιο της ωρίμανσης (Hellborg & Piskur, 2009). Πολλές από αυτές τις γεύσεις είναι δυσάρεστες για αρκετά είδη ζύθου, ενώ θεωρούνται επιθυμητές σε ορισμένους τύπους όπως οι lambic, οι gueuze και ορισμένων saison (Powell & Kerruish, 2017).

2.2.2.2 Candida

Μεγάλη ποικιλομορφία υπάρχει μέσα στο γένος *Candida*, με τα είδη να έχουν ένα ευρύ φάσμα χαρακτηριστικών. Ορισμένα είδη είναι αναμορφικές μορφές άλλων ζυμομυκήτων όπως του *Pichia* και ορισμένων ειδών *Kluyveromyces* (Powell & Kerruish, 2017).

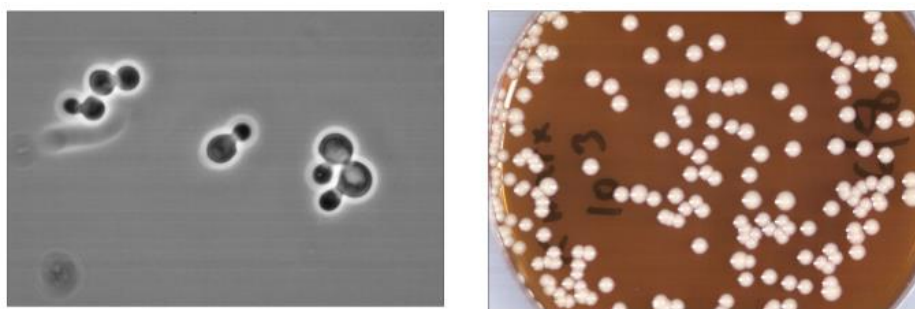
Τα κύτταρα του *Candida* έχουν μικρό μέγεθος και είναι ωοειδή. Τα είδη που εντοπίζονται στο ζυθοποιείο δεν αποτελούν σημαντική απειλή κατά την διάρκεια της ζύμωσης διότι μπορούν να αναπτυχθούν μόνο αερόβια, ωστόσο προβλήματα μπορούν να προκληθούν κατά τα αρχικά στάδια της ζύμωσης. Λόγω του ότι τα κύτταρα είναι συνήθως μικρά σε μέγεθος μπορεί να καθυστερήσουν να καθιζάνουν και να προκαλέσουν προβλήματα θολότητας και φιλτραρίσματος. Παρουσία οξυγόνου μπορούν να οξειδώσουν την αιθανόλη και να παράγουν οξικό οξύ, κάτι που μπορεί να είναι ιδιαίτερα προβληματικό στο εμπόριο βαρελίσιας μπίρας (Powell & Kerruish, 2017).

Τα κύτταρα του *Candida intermedia* είναι ωοειδή με μέγεθος 2.5-5.0 μm x 4.4-8.0 μm. Οι αποικίες σε θρεπτικό υπόστρωμα UBA είναι κρεμ χρώματος, θολές με μαλακή υφή και μπορεί να είναι ελαφρώς ζαρωμένες (ASBC, 2018).



Σχήμα 27. *Candida intermedia* όπως φαίνεται στο μικροσκόπιο και σε τρυβλίο με UBA (ASBC, 2018)

Τα κύτταρα του *Candida kefir* (*Kluyveromyces marxianus*) είναι στρογγυλά, ελλειψοειδή έως κυλινδρικά με μέγεθος 2.0-6.0 μm x 3.0-10.0 μm και συναντώνται μόνα τους, σε ζεύγη ή μικρές αλυσίδες. Οι αποικίες στο θρεπτικό υπόστρωμα UBA είναι λευκές ή κρεμ έως ελαφρώς ροζ. Έχουν βουτυρώδη υφή και είναι επίπεδες, απλωμένες, γυαλιστερές έως θολές (ASBC, 2018).



Σχήμα 28. *Candida kefir* (*Kluyveromyces marxianus*) όπως φαίνεται στο μικροσκόπιο και σε τρυβλίο με UBA (ASBC, 2018)

2.2.2.3 *Debaryomyces*

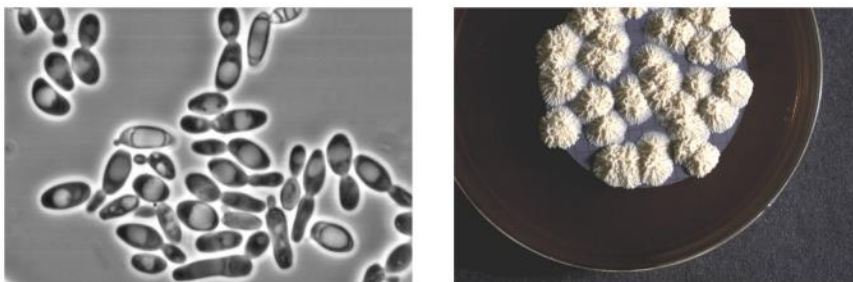
Τα κύτταρα του *Debaryomyces* είναι σφαιρικά έως ελλειψοειδή και αναπαράγονται με πλευρική εκβλάστηση. Τα είδη *Debaryomyces* είναι ασθενώς ζυμωτικοί και χρειάζονται οξυγόνο για την σωστή ανάπτυξη τους. Το *Debaryomyces hansenii* μπορεί να ανεχθεί χαμηλές θερμοκρασίες, και υψηλή αλατότητα και σχετίζεται με την ανάπτυξη αρωμάτων και γεύσεων σε ωριμασμένα τυριά και αλλαντικά. Στην ζυθοποιία αυτό το είδος συνδέεται με τις πρώτες ύλες, ιδιαίτερα την βύνη. Κατά την ανάπτυξη του σε υγρά σχηματίζει μεμβράνη στην επιφάνεια όπου τα κύτταρα συσσωρεύονται στην διεπιφάνεια υγρού-αερίου λόγω των υδρόφοβων συστατικών που υπάρχουν στο κυτταρικό τοίχωμα. Επίσης έχει την δυνατότητα

να παράγει οξικό οξύ και εστέρες όταν η ανάπτυξη συνδέεται άμεσα με το ζυθογλεύκος ή την μύρα (Powell & Kerruish, 2017).

2.2.2.4 *Pichia*

Το γένος *Pichia* αποτελεί έναν από τους πιο κοινούς μικροοργανισμούς αλλοίωσης που βρίσκονται στο ζυθοποιείο. Η αναπαραγωγή τους γίνεται μέσω πλευρικής εκβλάστησης αν και είναι σχετικά συχνός ο σχηματισμός ψευδοϋφών και η σεξουαλική αναπαραγωγή. Τα παραγόμενα σπόρια παρουσιάζουν ποικιλομορφία ανάλογα το είδος. Μπορεί να είναι στρογγυλά, επιμήκη ή σε σχήμα κυπέλου. Τα είδη *Pichia* επιβιώνουν καλύτερα σε αερόβιες συνθήκες και η ανάπτυξη συνήθως συνδέεται με την βαρελίσια μύρα, τις πρώτες ύλες και τα αρχικά στάδια της ζύμωσης. Ζυμώνουν μόνο την γλυκόζη κατά την αναερόβια ανάπτυξη ενώ η περιεκτικότητα σε αλκοόλη και το χαμηλό pH επηρεάζουν την λειτουργία των κυττάρων. Μπορεί να αποτελούν ένα επαναλαμβανόμενο πρόβλημα στο ζυθοποιείο διότι είναι σε θέση να επιβιώνουν μέσω της ζύμωσης. Ο σχηματισμός μεμβράνης στην επιφάνεια δίνει την δυνατότητα αξιοποίησης του οξυγόνου που μπορεί να υπάρχει στον κενό χώρο. Η ανάπτυξη τους συνήθως σχετίζεται με την παραγωγή θολότητας, μιας σειράς εστερικών γεύσεων όπως του οξικού αιθυλεστέρα, καθώς και νότες μαγιάς. Ακόμη έχουν την ικανότητα να οξειδώνουν την αιθανόλη σε οξικό οξύ. Διάφορα είδη έχουν αναφερθεί στην ζυθοποιία όπως τα *Pichia membranifaciens*, *Pichia anomola*, *Pichia fermentans*, *Pichia guilliermondii* και *Pichia Kudriavzevii* (Powell & Kerruish, 2017).

Τα κύτταρα του *P. membranifaciens* είναι οβάλ έως επιμήκη με μέγεθος 1.8-4.5 μm x 2.5-17 μm. Συναντώνται μόνα τους, σε ζευγάρια ή ομάδες. Σε θρεπτικό υπόστρωμα UBA οι αποικίες είναι λευκές έως κρεμ, με βουτυρώδη υφή και γίνονται ξηρές και ζαρωμένες με αυξημένο χρόνο επώασης (ASBC, 2018).



Σχήμα 29. *P. Membranifaciens* όπως φαίνεται στο μικροσκόπιο και σε φίλτρο μεμβάνης σε τρυβλίο (ASBC, 2018)

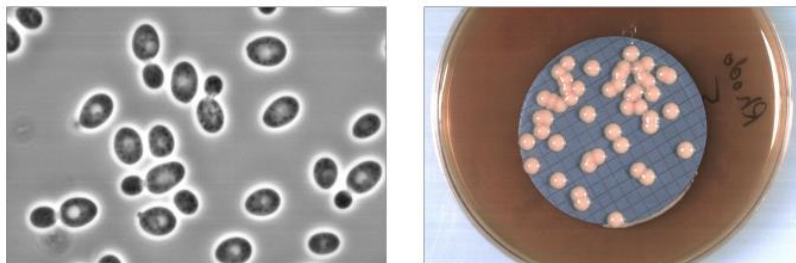
2.2.2.5 *Lindnera* (πρώην *Williopsis*)

Τα κύτταρα του *Lindnera* είναι ελλειψοειδή και αναπτύσσονται κυρίως υπό αερόβιες συνθήκες. Παρουσιάζουν περιορισμένη ικανότητα ζύμωσης που οδηγεί στην παραγωγή διάφορων εστέρων, κυρίως του isoamyl acetate. Το είδος που σχετίζεται με το περιβάλλον του ζυθοποιείου είναι κυρίως το *Lindnera saturnus* (προηγουμένως *Williopsis saturnus*) το οποίο έχει απομονωθεί από τα αρχικά στάδια της ζύμωσης. Το είδος αυτό παράγει χαρακτηριστικά σπόρια σε σχήμα Κρόνου και έχει τον χαρακτήρα killer (Powell & Kerruish, 2017).

2.2.2.6 *Rhodotorula* και *Cryptococcus*

Τα είδη *Rhodotorula* χρειάζονται οξυγόνο για να αναπτυχθούν και είναι μη ζυμωτικά. Είναι ικανά να ευδοκιμούν σε ψυχρές συνθήκες. Ο χρωματισμός των αποικιών σε στερεά θρεπτικά υποστρώματα κυμαίνεται από πορτοκαλί, ροζ ή κόκκινος. Ο εντοπισμός τους στο ζυθοποιείο είναι σχετικά σπάνιος, αν και έχουν ανακτηθεί από επιφάνειες και δείγματα αέρα γύρω από το ζυθοποιείο. Κυρίως σχετίζονται με την μόλυνση του νερού και των πρώτων υλών. Τα είδη *Rhodotorula* βρίσκονται συχνά στο κριθάρι και στην βύνη και αυτό αποτελεί έναν πιθανό τρόπο εισαγωγής τους στα ζυθοποιεία. Έχουν απομονωθεί από μύρες σε βαρέλι και από δείγματα ζύμης και προκαλούν μικρές οργανοληπτικές επιπτώσεις (Powell & Kerruish, 2017).

Τα κύτταρα του *Rhodotorula glutinis* είναι οβάλ έως στρόγγυλα με μέγεθος 2.3-5.0 μm x 4.0-10.0 μm και συναντώνται μόνα τους. Σε θρεπτικό υπόστρωμα UBA οι αποικίες εμφανίζονται ροζ έως κόκκινες με βουτυρώδη υφή (ASBC, 2018).



Σχήμα 30. *Rhodotorula glutinis* όπως φαίνεται στο μικροσκόπιο και σε φίλτρο μεμβάνης σε τρυβλίο (ASBC, 2018)

Τα είδη *Cryptococcus* συνδέονται κυρίως με το έδαφος και το γκουάνο (το μείγμα αποσυντεθειμένων περιττωμάτων από θαλασσοπούλια και νυχτερίδες

<https://en.wikipedia.org/wiki/Guano>) και ορισμένα είδη αποτελούν σοβαρά παθογόνα για τον άνθρωπο. Η ανίχνευση των ειδών *Cryptococcus* γίνεται στο κριθάρι και στο σιτάρι, καθώς και κατά την βυνοποίηση τους. Τα είδη *Cryptococcus* συνήθως δεν συνδέονται με την ζύμωση αν και εντοπίζονται σε διάφορα σημεία των ζυθοποιείων όπως σε σωληνώσεις και επιφάνειες και δεν έχουν σοβαρό αντίκτυπο στην αποδοτικότητα της παραγωγής και στην οργανοληπτική ποιότητα του ζύθου (Powell & Kerruish, 2017).

2.3 Θρεπτικά υποστρώματα στην μικροβιολογία του ζύθου

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη μεθόδων ταχείας ανίχνευσης των μικροοργανισμών επιμόλυνσης. Αυτές οι μέθοδοι περιλαμβάνουν τεχνικές βιοφωταύγειας, τεχνικές επιφθορισμού, ανοσολογικές δοκιμές, αυτόματα θολερόμετρα, τεχνικές μέτρησης της ηλεκτρικής εμπέδησης ή της αγωγιμότητας, όπως και ενός αριθμού μεθόδων που περιλαμβάνουν τεχνολογίες DNA όπως η PCR (Jespersen & Jakobsen, 1996). Μέθοδοι PCR που μπορούν να ανιχνεύσουν από 6-8 είδη σε μια αντίδραση, real-time PCR kits όπως το Beer Screening Kit, GeneDisk Rapid Microbiology System και το GEN-IAL QuickGEN Beer differentiation high υπάρχουν διαθέσιμα στην αγορά. Άλλες μέθοδοι είναι η LAMP (loop-mediated isothermal amplification), η MALDI-TOF-MS (Matrix-Assisted-Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry) και τρίτης γενιάς DNA sequencers. Οι δύο τελευταίες τεχνικές χρησιμοποιούνται από μεγάλα ζυθοποιεία, αλλά το κόστος παραμένει υψηλό για ζυθοποιεία μικρότερης κλίμακας (Suzuki, 2020). Στον Πίνακα 8 παρουσιάζονται διάφοροι μέθοδοι ανίχνευσης μικροβιακού φορτίου σε ζυθοποιεία.

Πίνακας 8. Μέθοδοι ανίχνευσης μικροβιακού φορτίου σε δείγματα παραγωγής, τελικά προϊόντα και ελέγχους καθαριότητας. (Storgards, 2000)

Μέθοδος	Αρχή	Εφαρμογές	Όριο ανίχνευσης
Καλλιεργητικές μέθοδοι (παραδοσιακές μέθοδοι)	Καλλιέργεια σε στερεά ή υγρά υποστρώματα, επώαση από 1 έως αρκετές μέρες	Δείγματα παραγωγής, τελικά προϊόντα, έλεγχοι καθαριότητας	1 cfu/δείγμα
Direct Epifluorescence Filter Technique (DEFT)	Χρώση επιφθορισμού στα κύτταρα, χρήση μικροσκοπίου	Δείγματα παραγωγής, τελικά προϊόντα	200-250 κύτταρα μαγιάς/ μεμβράνη ~ 1000 κύτταρα βακτηρίων/ μεμβράνη
Microcolony method	Χρώση επιφθορισμού σε μικροκαλλιέργειες, χρήση μικροσκοπίου	Δείγματα παραγωγής, τελικά προϊόντα	1-5 cfu/ μεμβράνη 1 cfu/ μεμβράνη
ATP βιοφωτάγεια	Ανίχνευση ολικού ή μικροβιακού ATP	Δείγματα παραγωγής, τελικά προϊόντα, έλεγχοι καθαριότητας	~ 1000 κύτταρα βακτηρίων/ δείγμα 1-20 cfu/ δείγμα
Direct Impedimetry	Ανίχνευση επαγωγικών αλλαγών στο καλλιεργητικό υπόστρωμα	Δείγματα παραγωγής, τελικά προϊόντα, έλεγχοι καθαριότητας	Μαγιά: 100 cfu βακτηρίων/ mL Νερά ξεπλύματος: 20 cfu/ 100 mL
Polymerase Chain Reaction (PCR)	Ανίχνευση των μικροβιακών νουκλεϊκών οξέων (DNA ή RNA)	Δείγματα παραγωγής, τελικά προϊόντα	Ζύθος: 1 cfu/ 250 mL Μαγιά: 1 cfu/ 108 κύτταρα μαγιάς
Flow Cytometry	Ανίχνευση και κατηγοριοποίηση των κυττάρων κατά την ροή	Δείγματα παραγωγής, τελικά προϊόντα	50- 3x10 ⁴ κύτταρα μαγιάς/ mL

Με εξαίρεση την τεχνική της βιοφωταύγειας η οποία έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς στον έλεγχο της καθαριότητας και της απολύμανσης (C&S), όπως επίσης και στα νερά ξεπλύματος του CIP, οι υπόλοιπες τεχνικές δεν έχουν χρησιμοποιηθεί στα ζυθοποιεία διότι συχνά υπολείπονται ταχύτητας, ευαισθησίας και εκλεκτικότητας ή απαιτούν την χρήση εξελιγμένου και ακριβού εξοπλισμού και αντιδραστηρίων. Τα περισσότερα ζυθοποιεία επιλέγουν τεχνικές

με την χρήση εκλεκτικών υποστρωμάτων και διαφόρων συνθηκών επώασης. Η μεγάλη ποικιλομορφία της μικροβιακής χλωρίδας επιβάλλει την χρήση αρκετών υποστρωμάτων και συνθηκών ώστε να μπορέσουν να καλυφθούν τα Gram, είτε θετικά είτε αρνητικά, όπως επίσης και οι ζύμες επιμόλυνσης (Jespersen & Jakobsen, 1996).

Η ευαισθησία ανίχνευσης που θα πρέπει να έχει η μέθοδος εξαρτάται από το στάδιο της ζυθοποίησης που πρέπει να ελεγχθεί. Διαφορετική ευαισθησία απαιτείται διότι συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί ακόμη και σε πολύ χαμηλά επίπεδα, λόγω του μεγάλου χρόνου ζυθοποίησης, 2-3 εβδομάδες και της επιθυμητής διάρκειας ζωής του τελικού προϊόντος, συνήθως 6 μήνες ή και περισσότερο, μπορούν να αποτελέσουν κίνδυνο μικροβιακής επιμόλυνσης. Τα επίπεδα ανίχνευσης των μικροοργανισμών επιμόλυνσης που απαιτούνται για κάθε στάδιο επεξεργασίας παρουσιάζονται στον πίνακα 9 (Jespersen & Jakobsen, 1996). Η αποτελεσματικότητα του προγράμματος καθαρισμού και απολύμανσης θα πρέπει επίσης να ελέγχεται καθώς Gram θετικοί και αρνητικοί μικροοργανισμοί επιμόλυνσης μπορούν να σχηματίσουν βιοφίλμ στις ανοξείδωτες επιφάνειες, στα ευκαμπτά και σε διάφορα σημεία των μηχανών πλήρωσης (Jespersen & Jakobsen, 1996, Matoulkova et al, 2012b, Bittner et al., 2016)

Πίνακας 9. Απαιτούμενη ευαισθησία για τους μικροοργανισμούς σε δείγματα ζυθοποιείου (Jespersen & Jakobsen, 1996)

Δείγματα	Ευαισθησία
Κρύο οξυγονομένο γλεύκος	1 οργανισμός ανά 25 ml
Εμβόλιο μαγιάς	1 βακτήριο ανά ml και 1 άγρια ζύμη ανά 10^6 μαγιάς
Ζυμούμενο γλεύκος	1 οργανισμός ανά ml
Κώνος δεξαμενής ζύμωσης	1 οργανισμός ανά ml
Ζύθος σε ωρίμανση	1 οργανισμός ανά ml
Φιλτραρισμένος ζύθος	1 μικροοργανισμός αλλοίωσης ανά 100 ml ή 10^{-10^2} μη αλλοιογόνων ανά 100 ml
Συσκευασμένος ζύθος μη παστεριωμένος	10^{-10^2} μη αλλοιογόνων ανά 100 ml
Νερό ξεπλύματος	1 οργανισμός ανά ml

Για τον μικροβιολογικό έλεγχο του κρύου ζυθογλεύκου 25-50 mL λαμβάνονται σε αποστειρωμένο δοχείο και τοποθετούνται για επώαση στους 25°C για 3-5 μέρες. Στην συνέχεια το δείγμα εξετάζεται οπτικά για την ύπαρξη μικροβιακής ανάπτυξης και απαιτείται ανακαλλιέργεια και έλεγχος με μικροσκόπιο. Για τον έλεγχο του εμβολίου της ζύμης, του ζυμούμενου ζυθογλεύκου, των κώνων από τις δεξαμενές ζύμωσης και του ζύθου στο στάδιο της ωρίμανσης 1 mL δείγματος επωάζεται στο επιθυμητό υπόστρωμα. Για την φιλτραρισμένη μύρα, για την συσκευασμένη και για τα ξεπλύματα του CIP, 100 mL δείγματος περνάει από φίλτρο μεμβράνης και επωάζεται στο επιθυμητό υπόστρωμα. Στις

περισσότερες περιπτώσεις απαιτούνται διάφορα υποστρώματα και σε διάφορες συνθήκες ώστε να ανιχνευθεί όλο το μικροβιακό φορτίο των δειγμάτων (Jespersen & Jakobsen, 1996). Ένα γενικής χρήσης, μη εκλεκτικό υπόστρωμα πρέπει να χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των μεσόφιλων, αερόβιων μικροοργανισμών ώστε να αποτελεί δείκτη της υγιεινής του ζυθοποιείου (Jespersen & Jakobsen, 1996).

2.3.1 Ανίχνευση Γαλακτικών Βακτηρίων

Για την ανίχνευση των *Lactobacilli* και των *Pediococci* έχει αναπτυχθεί ένας αριθμός από εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα. Κανένα υπόστρωμα δεν είναι ικανό να ανιχνεύσει όλα στελέχη άλλα ο συνδυασμός ορισμένων υποστρωμάτων μπορεί να δώσει πολύ καλά αποτελέσματα (Jespersen & Jakobsen, 1996, Sakamoto & Konings, 2003).

Πίνακας 10. Παραδείγματα θρεπτικών υποστρωμάτων για την ανίχνευση μικροοργανισμών αλλοίωσης του ζύθου (Sakamoto & Konings, 2003)

Υπόστρωμα	Βακτήρια	Προτείνονται από ^a
MRS (de Man, Rogosa and Sharpe)	LAB	EBC, ASBC, BCOJ
Raka-Ray	LAB, G(-) ^β	EBC, ASBC, BCOJ
VLB S7-S (Veruchs und Lechranstalt für Brauerei in Berlin)	LAB	EBC, BCOJ
HLP (Hsu's <i>Lactobacillus</i> and <i>Pediococcus</i> medium)	LAB	EBC, BCOJ
WLD (Wallerstein Differential)	LAB	EBC, BCOJ
Nakagawa	LAB	EBC, BCOJ
SDA (Schwarz Differential Adar)	LAB	EBC, BCOJ
Concentrated MRS	G(-)	EBC, BCOJ
PYF (Peptone, Yeast extract and Fructose)	G(-)	EBC, BCOJ
Thioglycolate Medium	G(-)	EBC
LL-Agar	G(-)	EBC, BCOJ
UBA (Universal Beer Agar)	LAB, G(-)	EBC, ASBC, BCOJ
NBB (Nachweismedium für bierschädliche Bakterien)	LAB, G(-)	EBC, BCOJ
Brewer's Tomato Juice Medium	LAB, G(-)	ASBC
LMDA (Lee's Multi-Differential Agar)	LAB	ASBC
BMB (Barney-Miller Brewery Medium)	LAB	ASBC
SMMP (Selective Medium for Megasphaera and Pectinatus)	G(-)	ASBC, BCOJ

^a EBC, European Brewery Convention; ASBC, American Society of Brewing; BCOJ, Brewery Convention of Japan

^β G(-), Αρνητικά κατά Gram βακτήρια

Οι διάφοροι φορείς όπως το European Brewery Convention (EBC), το American Society of Brewing Chemists (ASBC) και το Brewery Convention of Japan (BCOJ) προτείνουν μια μεγάλη γκάμα από εκλεκτικά υποστρώματα για τα γαλακτικά βακτήρια όπως φαίνεται στον

Πίνακα 10. Το EBC προτείνει το MRS agar (de Man, Rogosa and Sharpe) στο οποίο έχει προστεθεί κυκλοεξιμίδιο για την παρεμπόδιση της ανάπτυξης των αερόβιων μικροοργανισμών όπως οι ζύμες και οι μύκητες, το Raka-Ray με προσθήκη κυκλοεξιμίδιου και το VLB S7-S (Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei in Berlin). Άλλες επιλογές θρεπτικών υποστρωμάτων για την ανίχνευση των γαλακτικών βακτηρίων είναι το UBA (Universal Beer Agar) με προσθήκη κυκλοεξιμίδιου, το HLP (Hsu's *Lactobacillus* and *Pediococcus* medium και το NBB (Nachweismedium für Bierschädliche Bakterien). Επίσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν τα WLD (Wallerstein Laboratory Differential Medium) Nakagawa medium, SDA (Schwarz Differential Agar) και το τροποποιημένο MRS με την προσθήκη εκχυλίσματος μαγιάς και μαλτόζης σε pH 4.7. Από το ASBC προτείνεται η χρήση του Brewer's Tomato Juice Medium, του LMDA (Lee's Multi-Differential Agar) και του BMB (Barney-Miller Brewery Medium). Το BCOJ επίσης προτείνει την χρήση αρκετών από τα υποστρώματα που προαναφέρθηκαν για την ανίχνευση των γαλακτικών βακτηρίων (Sakamoto & Konings, 2003). Συνήθως απαιτείται μεγάλος χρόνος επώασης και η επώαση θα πρέπει να γίνεται σε αναερόβιες ή μικροαερόφιλες συνθήκες λόγω της μικροαερόφιλης φύσης των γαλακτοβάκιλων (Jespersen & Jakobsen, 1996). Στα θρεπτικά υποστρώματα που η συνταγή τους καλεί για την προσθήκη μύρας, θα πρέπει να χρησιμοποιείται μύρα από το εκάστοτε ζυθοποιείο διότι πιθανώς η σύνθεση της να επηρεάσει την ικανότητα των μικροοργανισμών να αναπτυχθούν (Sakamoto & Konings, 2003). Οι συνταγές των περισσότερων υποστρωμάτων για την ανίχνευση των γαλακτικών βακτηρίων βρίσκονται στο Παράρτημα Α.

2.3.2 Ανίχνευση αυστηρώς αναερόβιων Gram αρνητικών βακτηρίων

Για την ανίχνευση των *Megasphaera* και *Pectinatus* οι διάφοροι φορείς προτείνουν το συμπυκνωμένο ζωμό MRS, το PYF (Peptone, Yeast extract and Fructose), το Thioglycollate Medium για τον εμπλουτισμό (enrichment) της μύρας, το LL-Agar (Litmus Lactose Agar) για ανάπτυξη μέσα σε Lee tubes, το UBA, το NBB και το SMMP (Selective Medium for *Megasphaera* and *Pectinatus*). Ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δίνεται ώστε να ελαχιστοποιηθεί η επαφή του δείγματος με το οξυγόνο, διότι αυτοί οι αυστηρά αναερόβιοι μικροοργανισμοί παρουσιάζουν μεγάλη ευαισθησία στο οξυγόνο (Jespersen & Jakobsen, 1996, Sakamoto & Konings, 2003). Οι συνταγές των περισσότερων υποστρωμάτων για την ανίχνευση των αυστηρά αναερόβιων Gram αρνητικών βακτηρίων βρίσκονται στο Παράρτημα Α.

2.3.3 Ανίχνευση άλλων βακτηρίων

Για την ανίχνευση του μεσόφιλου μικροβιακού φορτίου προτείνεται η χρήση μη εκλεκτικών υποστρωμάτων όπως για παράδειγμα το PCA (Plate Count Agar). Επίσης ένα τέτοιο υπόστρωμα θα μπορούσε να εξυπηρετήσει στην ανίχνευση οξικών βακτηρίων με επώαση στους 28°C για 1-3 ημέρες (Jespersen & Jakobsen, 1996).

Για την ανίχνευση του *Zymomonas* το EBC προτείνει επιπλέον την χρήση του *Zymomonas* Enrichment Medium. Επίσης δεν προτείνεται η χρήση φίλτρων μεμβράνης για την ανίχνευση του *Zymomonas* (Jespersen & Jakobsen, 1996).

Για την ανίχνευση των εντεροβακτηριδίων το EBC προτείνει την χρήση του MacConkey agar με την προσθήκη κυκλοεξιμίδιου (10ppm) ώστε να παρεμποδίζεται η ανάπτυξη ζυμών και άλλων μικροοργανισμών που βρίσκονται στο ζυθογλεύκος (Jespersen & Jakobsen, 1996).

2.3.4 Ανίχνευση άγριων ζυμών και ζυμών επιμόλυνσης

Για την ανίχνευση των άγριων ζυμών δεν υπάρχει μια μέθοδος ή ένα υπόστρωμα που θα μπορούσε να αναστείλει την ανάπτυξη της ζύμης ζυθοποίησης και να προάγει την ανάπτυξη των υπολοίπων ζυμών. Για την ανίχνευση των *Saccharomyces* και των non-*Saccharomyces* ζυμών απαιτείται ένας συνδυασμός θρεπτικών υποστρωμάτων. Παραδοσιακά για την ανίχνευση των άγριων ζυμών στο εμβόλιο της ζύμης χρησιμοποιούνταν ο έλεγχος εκβλάστησης (sporulation test) όπου με την χρήση οξικού καλίου ή οξικού νατρίου προκαλούνταν η εκβλάστηση στις άγριες ζύμες και με την βοήθεια του μικροσκοπίου γινόταν ο εντοπισμός τους. Πλέον οι πιο διαδεδομένες μέθοδοι για την ανίχνευση των άγριων ζυμών βασίζονται στην χρήση διάφορων στερεών υποστρωμάτων (Jespersen & Jakobsen, 1996).

Τα στελέχη της παραγωγής και οι περισσότερες ζύμες του γένους *Saccharomyces* δεν μπορούν να μεταβολίσουν την λυσίνη ως την μόνη πηγή άνθρακα. Όποτε το υπόστρωμα Lysine Medium περιέχει την L-(+)-lysine ως την μόνη πηγή άνθρακα και χρησιμεύει στην ανίχνευση των non-*Saccharomyces* άγριων ζυμών. Ένα βελτιωμένο υπόστρωμα με περισσότερες πηγές άνθρακα είναι το CLEN (Cadaverine, Lysine, Ethylamine and Nitrate) όπου επιτρέπει την καλύτερη και γρηγορότερη ανάπτυξη περισσότερων άγριων ζυμών σε σύγκριση με το άγαρ λυσίνης (Jespersen & Jakobsen, 1996).

Το θρεπτικό υπόστρωμα LWYM (Lin's Wild Yeast Medium) περιέχει 0.4 mg crystal violet και 1.0g fuchsin-sulphite mixture στο λίτρο και θεωρείται ως ένα υπόστρωμα που επιτρέπει

την ανάπτυξη αρκετών άγριων ζυμών. Όμως υπάρχουν κάποιες άγριες ζύμες όπως η *Torulaspora fermentatii* και *Torulopsis kefyri* όπου δεν μπορούν να ανιχνευθούν με την χρήση του LWYM. Αυτές οι ζύμες όμως μπορούν να μεταβολίσουν την λυσίνη οπότε εύκολα ανιχνεύονται με το άγαρ λυσίνης. Αυτό επιβεβαιώνει την θεώρηση ότι περισσότερα από ένα θρεπτικά υποστρώματα χρειάζονται για την εκτίμηση της παρουσίας άγριων ζυμών (Jespersen & Jakobsen, 1996, ASBC-Microbiological control 5).

Η προσθήκη 550 ppm CuSO₄ σε θρεπτικά υποστρώματα ζυμών όπως το MYGP (Malt extract, Yeast extract, Glucose, Peptone) προσφέρεται για την ανίχνευση των non-*Saccharomyces* άγριων ζυμών. Στην πορεία διαπιστώθηκε ότι η χρήση 200 ppm CuSO₄ επιτρέπει την ανάπτυξη και στα είδη *Saccharomyces* και στα non-*Saccharomyces*. Για την ανίχνευση των άγριων ζυμών το ASBC συστήνει την χρήση του MYGP με 200 ppm CuSO₄ (Jespersen & Jakobsen, 1996).

Ένας συνδυασμός θρεπτικών υποστρωμάτων που θα μπορούσε να ανιχνεύσει την πλειονότητα από τα είδη *Saccharomyces* και non-*Saccharomyces*, είναι η χρήση του LWYM και του άγαρ λυσίνης ή του CLEN (Jespersen & Jakobsen, 1996). Οι συνταγές των περισσότερων υποστρωμάτων για την ανίχνευση των ζυμών βρίσκονται στο Παράρτημα Α.

2.3.5 Προμηθευτές θρεπτικών υποστρωμάτων μικροβιολογίας και εργαστήρια μικροβιολογικών αναλύσεων

Υπάρχουν πολλές εταιρείες που δραστηριοποιούνται στο κομμάτι της παρασκευής θρεπτικών υποστρωμάτων για την ζυθοποιία. Κάποιες από αυτές αναφέρονται στον Πίνακα 11.

Πίνακας 11. Εταιρείες με υποστρώματα για την ζυθοποιία.

Επωνυμία	Ιστότοπος
Siebel Institute of Technology	https://shop.siebelinstitute.com/laboratory-media
Merck Millipore	https://www.merckmillipore.com
Sigma Aldrich	https://www.sigmaaldrich.com
HIMEDIA	https://www.himedialabs.com
BD	https://www.bd.com/
ThermoFisher Scientific	https://www.thermofisher.com/
Oxoid	http://www.oxoid.com/
Biomerieux	http://www.biomerieux-culturemedia.com/

Στην Ελλάδα δραστηριοποιούνται αρκετά εργαστήρια που είναι σε θέση να παρέχουν μικροβιολογικές αναλύσεις πάνω στο ζύθο. Οι τιμές κυμαίνονται περίπου στα 10 € ανά μικροβιολογικό έλεγχο. Ένδεικτικά στον Πίνακα 12 αναφέρονται ορισμένα από αυτά.

Πίνακας 12. Εργαστήρια μικροβιολογικών αναλύσεων ζύθου.

Επωνυμία	Ιστότοπος
Αναλυτικά Εργαστήρια Αθηνών	https://ergastiria.gr/
BioLab	https://www.biolab.com.gr/
EnvoLab	https://envolab.gr/
HellasChem	https://www.hellaschem.gr/
TROFOanalysis	https://trofoanalysis.gr/
Erganal	https://erganal.gr/
Qlab	https://www.q-lab.gr/
QualiTech	https://www.qualitechengineering.com/

2.3.6 Λίστες μεθόδων επίσημων οργανισμών

Στον Πίνακα 13 παρουσιάζονται οι μικροβιολογικές μέθοδοι που προτείνει το ASBC για την ανίχνευση των μικροοργανισμών αλλοίωσης στο ζύθο.

Πίνακας 13. Λίστα μεθόδων του ASBC για την ανίχνευση των μικροοργανισμών αλλοίωσης (<https://www.asbcnet.org/Methods/MicrobiologyMethods/Pages/default.aspx>)

Microbiological Control

Microbiological Control 1. Aseptic Sampling

Microbiological Control 2. Detection of Microorganisms

Microbiological Control 3. Differential Staining

Microbiological Control 4. General Culture Media

Microbiological Control 5. Differential Culture Media

Microbiological Control 6. Water and Rinse Water Hygiene Using ATP

Στον Πίνακα 14 παρουσιάζονται οι αντίστοιχες μέθοδοι από το EBC για την ανίχνευση των μικροοργανισμών αλλοίωσης του ζύθου.

Πίνακας 14. Λίστα μεθόδων του EBC για την ανίχνευση των μικροοργανισμών αλλοίωσης (<https://brewup.eu/ebc-analytica/category/microbiology/detection-of-contaminants>)

Detection of Contaminants

- 4.1.1 Wort Forcing Test - 2011
 - 4.1.2 General Aerobic Count - 2011
 - 4.1.3.1 Enterobacteriaceae - 2011
 - 4.1.3.2 Lactic Acid Bacteria - 2011
 - 4.2.1 Enrichment - 2011
 - 4.2.2 General Aerobic Count on Samples of Yeast or Fermenting Beer - 2011
 - 4.2.3 General Anaerobic Count on Samples of Yeast or Fermenting Beer - 2011
 - 4.2.4.1 Enterobacteriaceae - 2011
 - 4.2.4.2 Lactobacillus and Pediococcus - 2011
 - 4.2.4.3 Acetic Acid Bacteria - 2011
 - 4.2.5.1 Cu-differentiation - 2011
 - 4.2.5.2 Heat Differentiation - 2011
 - 4.2.6 Non-Saccharomyces Yeasts - 2011
 - 4.2.7.1 Dekkera (formerly Brettanomyces) Detection with FastOrange® BRETT Medium (IM) - 2021
 - 4.2.7 Dekkera (formerly Brettanomyces) - 2011
 - 4.3.1.1 Shelf Life of Beer in Bottles - 2011
 - 4.3.1.2 Shelf Life of Beer in Cans and Kegs - 2011
 - 4.3.1.3 Shelf Life of Kegged Beer Transferred to Bottles - 2011
 - 4.3.1.4 Enrichment - 2011
 - 4.3.2.1 General Aerobic Count on Beer - 2011
 - 4.3.2.2 General Anaerobic Count on Beer - 2011
 - 4.3.3.1 Lactic Acid Bacteria - 2011
 - 4.3.3.2 Pectinatus and Megasphaera - 2011
 - 4.3.3.3 Selective enrichment of Pectinatus and Megasphaera - 2011
 - 4.4.1 General Aerobic Count in Water - 2011
 - 4.4.2 Escherichia coli and Coliform Bacteria - 2011
 - 4.4.3 Enterococci - 2011
 - 4.4.4 Chromogenic/Fluorogenic Method for Escherichia coli and Coliform Bacteria - 2011
 - 4.4.5 Clostridium perfringens (including spores) in water - 2011
 - 4.5.1 Fusarium - 2011
 - 4.5.2 Storage Fungi - 2011
 - 4.5.3 General Method - Cultivation on Wet Filter Paper - 2011
 - 4.5.6 Total aerobic count of yeast and bacteria in malt and barley - 2011
 - 4.5.7 Detection and enumeration of presumptive coliforms in malt and barley - 2011
 - 4.5.8 Detection and Enumeration of Salmonella in Malt, Barley and Brewers' grains - 2011
 - 4.5.9 Total aerobic count of yeast and bacteria in Brewers grains - 2011
 - 4.6.1 Detection of Contaminants in Additives - 2011
 - 4.6.2 General Aerobic Count in Dilute Sugars - 2011
 - 4.6.3 General Aerobic Count in Process Gases - 2011
 - 4.7.1 General Aerobic Count in Acid and Caustic Recovery Systems - 2011
 - 4.7.2 Microbiological Evaluation of the Efficacy of Sterilants and Biocides - 2011
-

2.3.7 Βιοχημικοί έλεγχοι διαχωρισμού

Υπάρχουν αρκετοί βιοχημικοί έλεγχοι που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την ταυτοποίηση των μικροοργανισμών αλλοίωσης. Όμως το σύγχρονο περιβάλλον της ζυθοποιίας χρειάζεται απλούς και με χαμηλό κόστος ελέγχους ώστε να είναι βιώσιμοι. Απλοί έλεγχοι χωρίς μεγάλη απαίτηση σε αναλώσιμα είναι ο έλεγχος της οξειδάσης και της καταλάσης, όπου οι έλεγχοι αυτοί δείχνουν την ύπαρξη ή μη αυτών των ενζύμων. Περισσότερες πληροφορίες για τον έλεγχο της οξειδάσης υπάρχουν στον παρακάτω σύνδεσμο <https://learn.chm.msu.edu/vibl/content/oxidase.html> και για τον έλεγχο της καταλάσης <https://learn.chm.msu.edu/vibl/content/catalase.html>, όπου εξηγούνται ο σκοπός, ο μηχανισμός, τα αντιδραστήρια, η μέθοδος και τα αποτελέσματα των ελέγχων αυτών.

Άλλος ένας χρήσιμος βιοχημικός έλεγχος είναι η ανάπτυξη ζυμών σε θρεπτικό υπόστρωμα που περιέχει φερουλικό οξύ. Αυτό επιτρέπει την ανίχνευση ζυμών που έχουν την ικανότητα να αποκαρβοξυλιώνουν αυτό το οργανικό οξύ και να παραγάγουν την 4-vinyl guaiacol, μια ουσία με ιδιαίτερη φαινολική οσμή γαρύφαλλου και πικάντικη. Περιγραφή της μεθόδου γίνεται από το EBC στην παράγραφο 2.3.9.5 - Phenolic Off Flavour (POF) του οργανισμού (<https://brewup.eu/ebc-analytica/microbiological-techniques/phenolic-off-flavour-pof/2.3.9.5>).

Υπάρχουν στο εμπόριο ειδικά κιτ που προσφέρουν πολλούς βιοχημικούς ελέγχους ταυτόχρονα, τόσο για ζύμες όσο και για βακτήρια. Τα αποτελέσματα αυτών των κιτ ανεβαίνουν στην πλατφόρμα της εκάστοτε εταιρείας όπου λαμβάνετε το αποτέλεσμα της ταυτοποίησης ως ποσοστό ομοιότητας σε επίπεδο είδους. Ένα τέτοιο κιτ προσφέρεται από την εταιρεία Biomerieux και ονομάζεται API (<https://www.biomerieux-usa.com/clinical/api>).



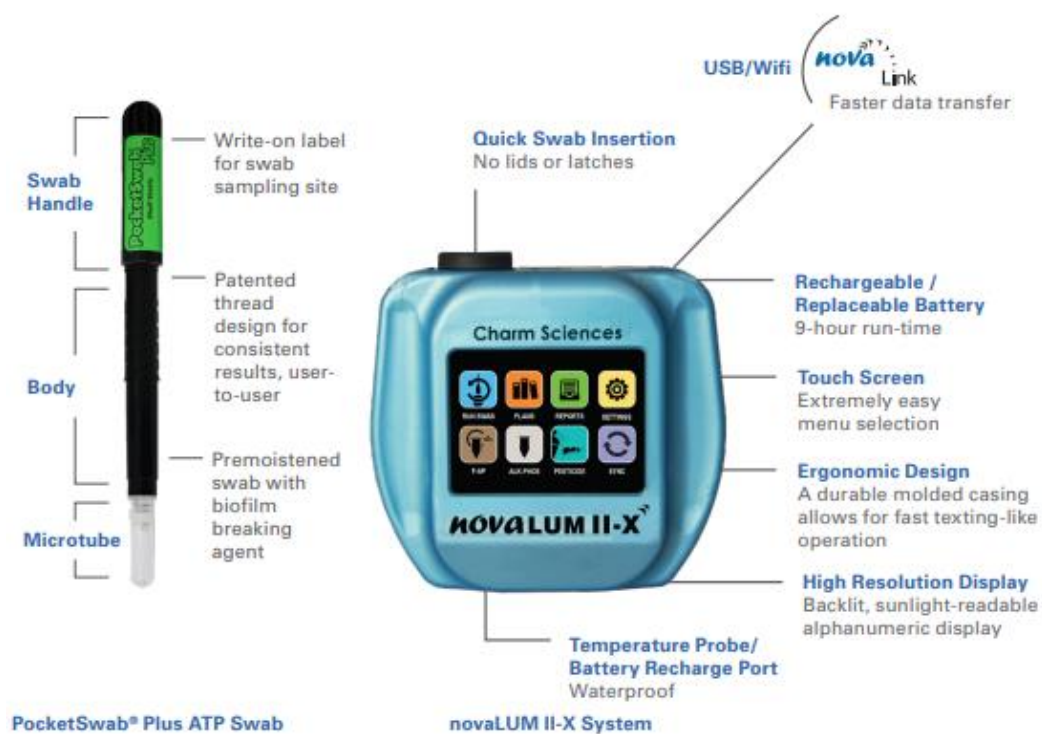
Σχήμα 31. Ένα από τα κιτ API που προσφέρονται από την εταιρεία Biomerieux (<https://www.biomerieux-usa.com/clinical/api>).

2.3.7 Έλεγχος των επιφανειών μέσω ΑΤΡμετρίας

Κάθε ζωντανός οργανισμός έχει στα κύτταρα του τριφωσφορική αδενοσίνη (ΑΤΡ). Υπάρχουν συσκευές που μπορούν πολύ γρήγορα και με χαμηλό σχετικά κόστος να εντοπίσουν την ύπαρξη ή όχι ΑΤΡ. Συνήθως απαιτείται κάποιος ειδικός στυλεός ώστε να συλλεχθεί δείγμα από μια επιφάνεια και στην συνέχεια εμβαπτίζεται μέσα διάλυμα που περιέχει λουσιφεράση. Το ένζυμο αυτό χρησιμοποιεί το ΑΤΡ ώστε να οξειδώσει την λουσιφερίνη, οπότε παράγεται φως που μπορεί να ανιχνευθεί από λουμινόμετρα. Η ύπαρξη ΑΤΡ φανερώνει την ύπαρξη μικροοργανισμών, είτε ζωντανών είτε νεκρών, αλλά και την ύπαρξη οργανικού φορτίου. Όποτε αποτελεί έναν δείκτη για την καθαρότητα μιας επιφάνειας και χρησιμοποιείται για την επιβεβαίωση της αποτελεσματικότητας του προγράμματος CIP.

Η κάθε εταιρεία παρέχει το λουμινόμετρο, που συνήθως είναι μια φορητή συσκευή και τους ειδικούς στυλεούς για την πραγματοποίηση των ελέγχων. Το αποτέλεσμα του ελέγχου λαμβάνεται μέσα σε δευτερόλεπτα συνήθως, οπότε αποτελεί έναν γρήγορο και αποτελεσματικό τρόπο επαλήθευσης της διαδικασίας καθαρισμού.

Εκτός από τις επιφάνειες είναι δυνατό να ανιχνευθεί ΑΤΡ και σε δείγματα νερού, με την ίδια συσκευή ακολουθώντας παρόμοια διαδικασία (<https://www.charm.com/products/test-and-kits/atp-tests/>).



Σχήμα 32. Φορητό λουμινόμετρο και ειδικός στυλεός της εταιρίας CHARM (<https://www.charm.com/wp-content/uploads/2022/05/MRK-9491.pdf>).

3 Μικροβιολογικός ποιοτικός έλεγχος ζυθοποιείου

Οι έλεγχοι ποιότητας είναι απαραίτητοι ώστε να επιτευχθεί η παραγωγή ενός προϊόντος που να πληροί όλες τις προϋποθέσεις για την ποιότητα. Οι έλεγχοι ποιότητας θα πρέπει να εφαρμόζονται σε όλα τα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας, από την επιλογή των πρώτων υλών έως την ζύμωση και την συσκευασία, ακόμη και στα σημεία διανομής. Ο έλεγχος της ποιότητας σε ένα ζυθοποιείο μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε τέσσερα πεδία

- Μικροβιολογικός έλεγχος
- Αναλυτικός-Χημικός έλεγχος
- Οργανοληπτικός έλεγχος
- Έλεγχοι κατά την παραγωγή

Η συστηματική παρακολούθηση αυτών των πεδίων και η εφαρμογή ορθών πρακτικών παραγωγής (GMP) μπορούν να οδηγήσουν στην σταθερή παραγωγή προϊόντων που πληρούν τα πρότυπα ποιότητας (Turvey et al, 2017).

Ο συστηματικός μικροβιολογικός ποιοτικός έλεγχος σε ένα ζυθοποιείο είναι βασικό στοιχείο για την παραγωγή προϊόντων που ανταποκρίνονται στην υψηλή ποιότητα. Οι επιπτώσεις που έχουν οι μικροβιακές επιμολύνσεις κυμαίνονται από μικρές αλλαγές στην γεύση, το άρωμα και την πορεία της ζύμωσης, έως δυσάρεστες γεύσεις και αρώματα, θολερότητα και αλλαγές στην πορεία της ζύμωσης. Οι επιπτώσεις της επιμόλυνσης συμπεριλαμβάνουν οικονομική απώλεια και μειωμένη εμπιστοσύνη των καταναλωτών προς το ζυθοποιείο (Turvey et al, 2017).

Οι μικροοργανισμοί που εντοπίζονται στο ζυθοποιείο μπορούν να κατηγοριοποιηθούν στις έξι ομάδες:

- Μικροοργανισμοί που αλλοιώνουν υποχρεωτικά το ζύθο
- Μικροοργανισμοί που αλλοιώνουν πιθανόν το ζύθο
- Έμμεσοι μικροοργανισμοί αλλοίωσης του ζύθου
- Μικροοργανισμοί δείκτες μικροβιακής χλωρίδας
- Λανθάνουσα μικροβιακή χλωρίδα
- Μικροοργανισμοί ζυθοποίησης

Παραδείγματα των μικροοργανισμών που εντοπίζονται στο ζυθοποιείο παρουσιάζονται στον Πίνακα 15.

Πίνακας 15. Μικροβιακή χλωρίδα που συναντάται στο ζυθοποιείο (Turvey et al., 2017)

Ομάδα μικροοργανισμών	Ορισμός	Τυπικά είδη
Μικροοργανισμοί που αλλοιώνουν υποχρωτικά το ζύθο	Η επιμόλυνση με αυτούς τους μικροοργανισμούς οδηγεί πάντοτε σε αλλοίωση	<i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus lindneri</i> <i>Pediococcus damnosus</i> <i>Megasphaeta cerevisiae</i> <i>Pectinatus frisingensis</i>
Μικροοργανισμοί που αλλοιώνουν πιθανόν το ζύθο	Η επιμόλυνση μπορεί να συνβεί μόνο όταν πληρούνται ορισμένες προϋποθέσεις, όπως χαμηλό αλκοόλ, απουσία λυκίσκων, αυξημένο pH	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Leuconostoc</i> spp.
Έμμεσοι μικροοργανισμοί αλλοίωσης του ζύθου	Μικροοργανισμοί που δεν μπορούν να αναπτυχθούν στο ζύθο αλλά μπορεί να υπάρχουν στις πρώτες ύλες και προκαλούν δυσάρεστες γεύσεις και οσμές	<i>Candida kefyr</i> <i>Obesumbacterium proteus</i>
Μικροοργανισμοί δείκτες μικροβιακής χλωρίδας	Δεν προκαλούν αλλοίωση άλλα η ύπαρξη τους μαρτυρά ελλιπή καθαρισμό, παραγωγικά λάθη και συχνά εντοπίζονται μαζί με αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς	<i>Acetobacter pasteurianus</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>
Λανθάνουσα μικροβιακή χλωρίδα	Αβλαβείς μικροοργανισμοί που εντοπίζονται στο ζυθοποιείο	<i>Micrococcus</i> spp. <i>Bacillus</i> spp. <i>Clostridia</i> spp.
Μικροοργανισμοί ζυθοποίησης	Μικροοργανισμοί που προστίθενται σκόπιμα κατά την παραγωγική διαδικασία	<i>Saccharomyces</i> spp. <i>Lactobacillus</i> spp. <i>Brettanomyces</i> spp. <i>Lachancea</i> spp. <i>Torrulaspora</i> spp.

Οι μικροβιολογικοί έλεγχοι περιλαμβάνουν αναλύσεις που αφορούν την ζύμη ζυθοποίησης, όπως την ζωτικότητα, την καταμέτρηση των κυττάρων, την ύπαρξη άλλων μικροοργανισμών στο εμβόλιο της ζύμης, την παρακολούθηση χαρακτηριστικών της ζύμης όπως η ικανότητα της να συσσωματώνεται και να καθιζάνει στο τέλος της ζύμωσης (<https://www.asbcnet.org/Methods/MicrobiologyMethods/Pages/default.aspx>). Επιπλέον οι μικροβιολογικοί έλεγχοι περιλαμβάνουν αναλύσεις που πραγματοποιούνται στον εξοπλισμό και στο προϊόν σε όλα τα στάδια της παραγωγής του. Οποιοδήποτε μέρος εξοπλισμού έρχεται σε επαφή με ημιέτοιμο ή έτοιμο προϊόν θα πρέπει να ελέγχεται για την καθαρότητα του και την μικροβιολογική του κατάσταση. Θα πρέπει να ελέγχονται μέρη του εξοπλισμού όπως το ζυθοβραστήριο, οι σωληνώσεις του, ο εναλλάκτης θερμότητας, οι βάνες, οι δεξαμενές ζύμωσης και ωρίμανσης, οι αντλίες, οι εύκαμπτοι σωλήνες, το δοχείο τυποποίησης (BBT), τα φίλτρα και η εμφιαλωτική μηχανή. Έλεγχος θα πρέπει να γίνεται στις πρώτες ύλες, στο νερό που χρησιμοποιείται για την ζυθοποίηση και τις διάφορες διεργασίες του ζυθοποιείου, στα αέρια που χρησιμοποιούνται κατά την παρασκευή του ζύθου, στους περιέκτες που χρησιμοποιούνται στην συσκευασία και σε όλα τα πρόσθετα που χρησιμοποιούνται κατά την παραγωγική διεργασία (Turvey et al, 2017).

Οι Schneiderbanger et al. (2018) για την περίοδο από το 2010 έως το 2016 αναφέρουν ότι σε δείγματα που συγκεντρώθηκαν από 128 ζυθοποιεία το 96% των βακτηριακών επιμολύνσεων

που εντοπίστηκαν οφείλονταν σε είδη *Lactobacillus* και *Pediococcus*. Αυτό στρέφει το ενδιαφέρον των ελέγχων προς τα γαλακτικά βακτήρια, χωρίς όμως να περιορίζεται σε αυτά, διότι στην έρευνα δεν συμπεριλαμβάνονται οι επιμολύνσεις από άγριες ζύμες.

3.1 Σημεία δειγματοληψίας

Στην συγκεκριμένη παράγραφο θα γίνει προσπάθεια αποτύπωσης των ελάχιστων σημείων δειγματοληψίας με τέτοιον τρόπο ώστε να είναι εφικτό να πραγματοποιηθεί από ένα μικροζυθοποιείο όπου οι πόροι του είναι περιορισμένοι. Οι προτάσεις θα γίνουν με γνώμονα την ευκολία των ελέγχων λαμβάνοντας υπόψη πάντοτε το κόστος και τον χρόνο.

Ένα εκτεταμένο πλάνο δειγματοληψίας θα μπορούσε να υποδείξει με ακρίβεια το σημείο μιας υποτιθέμενης επιμόλυνσης. Ένα εκτεταμένο πλάνο παρουσιάζεται στο Σχήμα 33.

Κρύο γλεύκος	• Πριν και μετά τον αερίσμο
Επαναχρησιμοποιούμενη μαγιά	• Πριν τον εμβολιασμό
Ζύμωση	• 1-2 μέρες μετά τον εμβολιασμό
Ωρίμανση	• 1-2 μέρες μετά από την απομάκρυνση της μαγιάς
Φίλτρο	• Πριν και μετά το φιλτράρισμα
Δεξαμενή τυποποίησης (BBT)	• Πριν και μετά την ενανθράκωση
Τελικό προϊόν	• Πριν και μετά την παστερίωση, διάφορα σημεία στην γραμμή συσκευασίας
Νερό	• Δεξαμενή ζεστού νερού, Δεξαμενή κρύου νερού, μετά από κάθε φίλτρο, μετά από την λάμπα UV
Αέρια	• Διοξείδιο του άνθρακα, συμπιεσμένος αέρας

Σχήμα 33. Εκτεταμένο μικροβιολογικό πλάνο δειγματοληψίας

Η εφαρμογή όμως ενός εκτεταμένου πλάνου δειγματοληψίας είναι αρκετά δύσκολη για ένα μικροζυθοποιείο. Οπότε τα ελάχιστα σημεία δειγματοληψίας που θα πρέπει να ελέγχονται, η συχνότητα δειγματοληψίας και οι έλεγχοι που θα πρέπει να πραγματοποιούνται παρουσιάζονται στον Πίνακα 16. Τα ελάχιστα σημεία δειγματοληψίας δεν ανταποκρίνονται σε ζύθους με ειδικά χαρακτηριστικά όπως ζύθοι με χαμηλό ή χωρίς αλκοόλ. Σε αυτήν την περίπτωση θα πρέπει να ακολουθείται ένα πιο εκτενές πλάνο δειγματοληψίας ώστε να εξασφαλιστεί η ακεραιότητα του τελικού προϊόντος.

Πίνακας 16. Πλάνο δειγματοληψίας μικροζυθοποιείου

Δείγμα	Συχνότητα	Έλεγχος
Ζυθογλεύκος	Κάθε παραγωγή	LMDA, MRS, LWYM, Lysine agar, Έλεγχος σταθερότητας
Εμβόλιο μαγιάς	Κατά την συλλογή	MRS, LWYM, Lysine agar
Τελικό προϊόν	Κάθε συσκευασία	LMDA, MRS, LWYM, Lysine agar

Ένα τέτοιο πλάνο δειγματοληψίας συμβάλει στο να διασφαλιστεί ότι το προϊόν που θα φτάσει στην αγορά θα είναι χωρίς μικροβιολογικό πρόβλημα. Δεν μπορεί όμως να εντοπίσει το ακριβές σημείο επιμόλυνσης σε ένα πιθανόν συμβάν.

3.1.1 Γλεύκος μετά τον εναλλάκτη

Το πρώτο σημείο δειγματοληψίας είναι στην δεξαμενή ζύμωσης πριν γίνει ο εμβολιασμός με το στέλεχος ζυθοποίησης. Λόγω του ότι κατά την παρασκευή του ζυθογλεύκους υπάρχει το στάδιο του βρασμού, οι βλαστικές μορφές των κυττάρων δεν επιβιώνουν. Στην πορεία όμως το γλεύκος θα έρθει σε επαφή με τις σωληνώσεις του ζυθοβραστήριου, την αντλία, τον εναλλάκτη θερμότητας, θα γίνει προσθήκη οξυγόνου ή αέρα και θα μεταφερθεί με εύκαμπτους σωλήνες στην δεξαμενή ζύμωσης όπου υπάρχουν βάνες. Επειδή πλέον έχει κατέβει η θερμοκρασία του γλεύκους ξεκινάει να γίνεται έναν πολύ καλό υπόστρωμα για την ανάπτυξη μικροοργανισμών. Άρα αν ληφθεί ένα δείγμα μέσα από την δεξαμενή πριν γίνει ο εμβολιασμός με το στέλεχος ζυθοποίησης, ελέγχεται η επιρροή που έχουν στο γλεύκος όλα τα παραπάνω σημεία.

Τα υποστρώματα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι το LMDA, το MRS, το LWYM και το Lysine agar. Το LMDA είναι ένα γενικό υπόστρωμα που προσφέρει μέσω της οπτικής παρατήρησης κάποια αναγνωριστικά χαρακτηριστικά για τους μικροοργανισμούς. Το LMDA

περιέχει CaCO_3 που βοηθάει στην αναγνώριση αποικιών που μπορούν να παραγάγουν οξέα, Bromocresol green όπου προσδίδει τα διαφορετικά χρωματικά χαρακτηριστικά για τα διαφορετικά είδη και κυκλοεξιμίδιο για την παρεμπόδιση του στελέχους ζυθοποίησης.

Το MRS είναι ένα εκλεκτικό υπόστρωμα για την ανίχνευση βακτηρίων. Θα πρέπει το δείγμα να ενοφθαλμιστεί εις διπλούν ώστε η επώαση να γίνει σε αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες. Το LWYM αποτελεί ένα υπόστρωμα για την ανίχνευση των άγριων ζυμών *Saccharomyces* και non-*Saccharomyces*. Κάποιες άγριες ζύμες όπως η *Torulaspora fermentatii* και η *Torulopsis kefir* δεν μπορούν να ανιχνευθούν με αυτό το υποστρώμα, Αυτές οι άγριες ζύμες όμως μπορούν να ανιχνευθούν με το Lysine agar. Το Lysine agar περιέχει ως μόνη πηγή αζώτου την λυσίνη. Οι ζύμες του γένους *Saccharomyces* δεν μπορούν να μεταβολίσουν την λυσίνη, οπότε μπορεί να ανιχνεύσει τις non-*Saccharomyces* ζύμες.

Για τον έλεγχο του γλεύκους 1 mL δείγματος επωάζεται στο επιθυμητό υπόστρωμα (Jespersen & Jakobsen, 1996). Τα όρια για τους μικροοργανισμούς είναι ≤ 1 cfu /mL και 0 cfu/mL για τους μικροοργανισμούς αλλοίωσης του ζύθου, όπως 0 cfu/mL είναι και για τις άγριες ζύμες (Hutzler et al., 2015).

Ο έλεγχος της σταθερότητας του ζυθογλεύκους μπορεί να γίνει με την χρήση ενός αποστειρωμένου περιέκτη όπου συλλέγονται 25 - 50 mL γλεύκους ή και περισσότερα. Το δείγμα επωάζεται σε κλίβανο στους 25 °C για 3 - 5 ημέρες και κατόπιν το δείγμα εξετάζεται για την ύπαρξη θολερότητας, δυσάρεστων οσμών και παραγωγή αερίων. Ο έλεγχος της σταθερότητας του ζυθογλεύκους είναι ένας εύκολος και φθηνός τρόπος για τον έλεγχο της ύπαρξης μικροοργανισμών. Δεν επιτρέπει όμως την ποσοτικοποίηση και την αναγνώριση τους. Για την αναγνώριση τους απαιτείται ανακαλλιέργεια και έλεγχος με μικροσκόπιο (Jespersen & Jakobsen, 1996).

Ένας δεύτερος έλεγχος που μπορεί να γίνει παράλληλα με τον έλεγχο σταθερότητας του ζυθογλεύκους είναι να ληφθεί ένα δεύτερο δείγμα, μετά τον εμβολιασμό με το στέλεχος ζυθοποίησης, όπου στον αποστειρωμένο περιέκτη έχει προστεθεί κυκλοεξιμίδιο. Η χρήση του κυκλοεξιμιδίου θα αναστείλει την ανάπτυξη της μαγιάς. Το δείγμα επωάζεται στους 25 °C για 3 - 5 ημέρες και κατόπιν το δείγμα εξετάζεται για την ύπαρξη θολερότητας, δυσάρεστων οσμών και παραγωγή αερίων. Ο έλεγχος φανερώνει αν στο εμβόλιο που χρησιμοποιήθηκε υπάρχουν βακτήρια σε μεγάλο αριθμό, άλλα δεν προλαμβάνει την επιμόλυνση από αυτά (https://www.morebeer.com/articles/lab_tests_quality_beer). Ένας καλύτερος, αλλά πιο απαιτητικός τρόπος για τον έλεγχο του εμβολίου περιγράφεται στην παράγραφο 3.1.2.

3.1.2 Εμβόλιο μαγιάς

Το εμβόλιο της μαγιάς θα πρέπει να ελέγχεται για την ύπαρξη βακτηρίων και άγριων ζυμών. Σε περίπτωση που η μαγιά συλλέγεται και επαναχρησιμοποιείται ο μικροβιολογικός έλεγχος της μαγιάς θα φανερώσει και την μικροβιολογική κατάσταση του ζύθου από τον οποίο αφαιρέθηκε η μαγιά.

Για τον έλεγχο του εμβολίου της μαγιάς πρέπει να χρησιμοποιηθούν το MRS με την προσθήκη κυκλοεξιμίδιου σε αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες ώστε να παρεμποδιστεί η μαγιά και να μπορέσουν να ανιχνευθούν πιθανά βακτήρια που υπάρχουν στο εμβόλιο. Το LWYM και το Lysine agar για την ανίχνευση των άγριων ζυμών *Saccharomyces* και non-*Saccharomyces*.

Για τον έλεγχο του εμβολίου της ζύμης 1 mL δείγματος επωάζεται στο επιθυμητό υπόστρωμα (Jespersen & Jakobsen, 1996). Τα όρια για τα βακτήρια είναι ≤ 1 cfu/mL και 0 cfu/mL για τα βακτήρια που αλλοιώνουν τον ζύθο, όπως επίσης 0 cfu/mL είναι το όριο για τις άγριες ζύμες (Hutzler et al., 2015).

3.1.3 Τελικό συσκευασμένο προϊόν

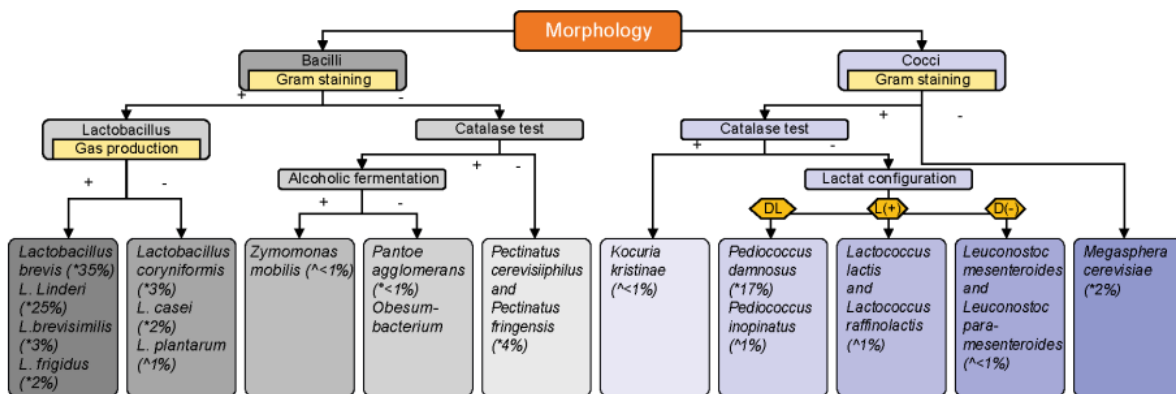
Για τον έλεγχο του τελικού συσκευασμένου προϊόντος πρέπει να χρησιμοποιηθούν το LMDA, το MRS σε αναερόβιες και αναερόβιες συνθήκες για την ανίχνευση των βακτηρίων, καθώς και τα LWYM και Lysine agar για την ανίχνευση των άγριων ζυμών *Saccharomyces* και non-*Saccharomyces*.

Για τον φιλτραρισμένο συσκευασμένο ζύθο, 100 mL δείγματος περνάνε από φίλτρο μεμβράνης και το φίλτρο επωάζεται στο επιθυμητό υπόστρωμα. Στην περίπτωση αφιλτράριστου ζύθου 1 mL δείγματος επωάζεται στο επιθυμητό υπόστρωμα (Jespersen & Jakobsen, 1996).

Τα όρια για τους μικροοργανισμούς είναι ≤ 10 cfu /mL και 0 cfu/mL για τους μικροοργανισμούς αλλοίωσης του ζύθου, όπως 0 cfu/mL είναι και για τις άγριες ζύμες (Hill, 2015).

3.1.4 Αναγνώριση των μικροοργανισμών αλλοίωσης του ζύθου

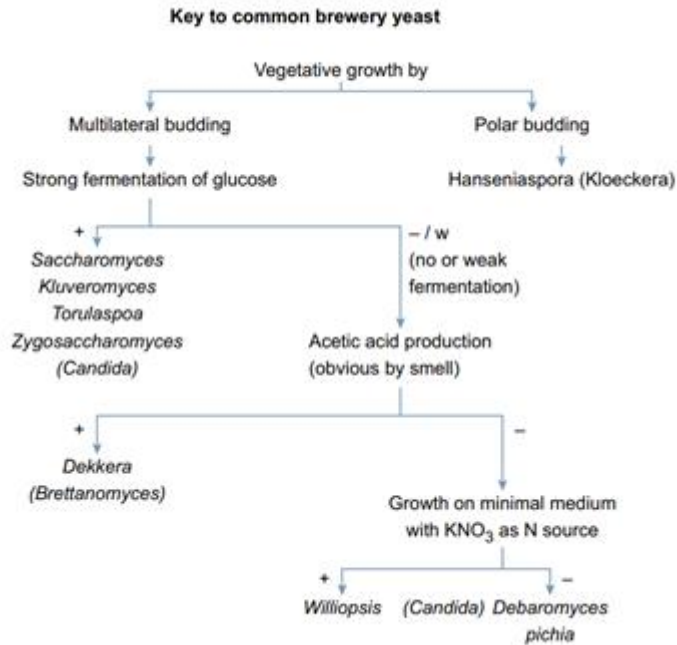
Αφού ανιχνευθούν αποικίες με τα παραπάνω θρεπτικά υποστρώματα, θα πρέπει να γίνει αναγνώριση των ειδών. Η αναγνώριση είναι αναγκαία ώστε να καθοριστεί η επικινδυνότητα των μικροοργανισμών. Η αναγνώριση γίνεται με οπτική παρατήρηση των αποικιών, με μικροσκοπική παρατήρηση της μορφολογίας των κυττάρων, με την χρώση Gram και τον έλεγχο καταλάσης (Sakamoto & Konings, 2003).



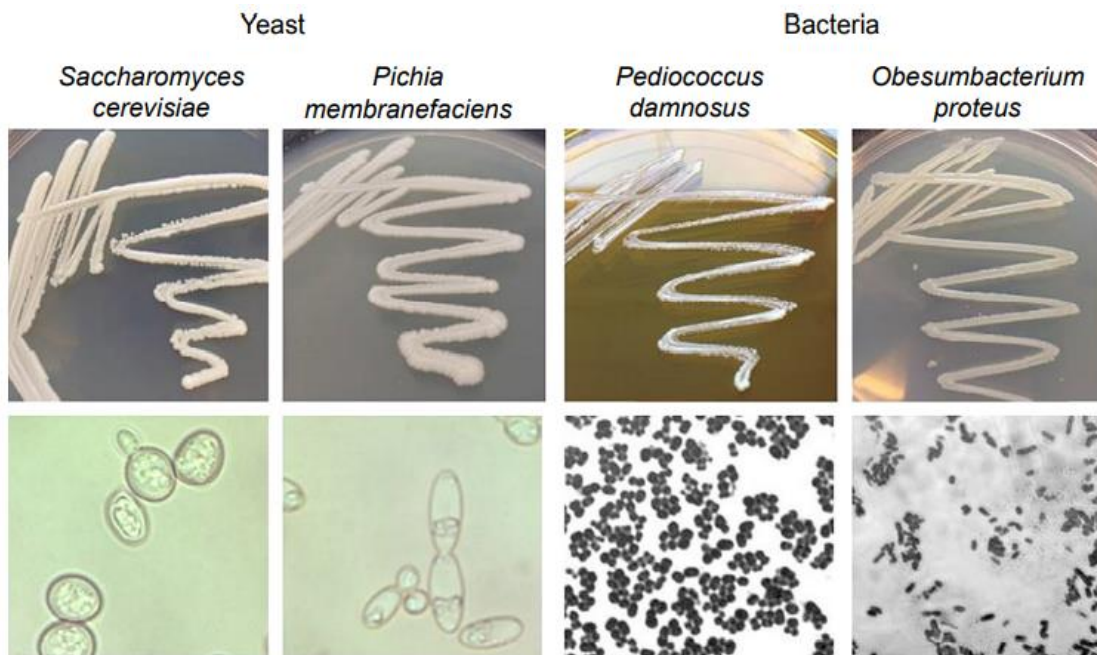
Σχήμα 34. Διάγραμμα αναγνώρισης των βακτηρίων στο ζύθο (www.sigmaaldrich.com)

Τα ποσοστά μέσα στις παρενθέσεις είναι η συχνότητα εμφάνισης των μικροοργανισμών σε ποιοτικά παράπονα ζύθων για την περίοδο (1980-2002).

Στην περίπτωση των ζυμών η αναγνώριση γίνεται με οπτική παρατήρηση των αποικιών, με μικροσκοπική παρατήρηση της μορφολογίας των κυττάρων, με την ικανότητα μεταβολισμού διαφόρων θρεπτικών, όπως για παράδειγμα της γλυκόζης (Hill, 2015).



Σχήμα 35. Διάγραμμα αναγνώρισης των ζυμών στο ζύθο (Hill A., 2015).



Σχήμα 36. Αποικίες και κυτταρική μορφολογία ζυμών και βακτηρίων που συναντώνται στα ζυθοποιεία (Hill A., 2015).

5 Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία έγινε αναφορά στους μικροοργανισμούς επιμόλυνσης του ζύθου, όπου αναφέρθηκαν ο τρόπος εισαγωγής τους στα ζυθοποιεία, οι συνθήκες ανάπτυξης τους, τα στάδια που μπορεί να υπάρξει επιμόλυνση, τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους και οι επιπτώσεις που έχουν στο προϊόν.

Οι συχνότερα εμφανιζόμενοι μικροοργανισμοί που επιμολύνουν τον ζύθο είναι οι *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus lindneri*, *Pediococcus damnosus*, *Megasphaera cerevisiae* και *Pectinatus frisingensis*. Η επιμόλυνση με αυτούς τους μικροοργανισμούς οδηγεί στην παραγωγή δυσάρεστων γεύσεων και οσμών, στην δημιουργία θολερότητας και ιζημάτων και στην παραγωγή οργανικών οξέων. Επίσης η επιμόλυνση από *S. diastaticus* οδηγεί σε επαναζύμωση στη φιάλη, αύξηση του διοξειδίου του άνθρακα και της πίεσης, μείωση του τελικού εκχυλίσματος (απώλεια σε σώμα), αύξηση της αλκοόλης και θολώματα, ενώ είναι επίσης δύσκολο να εξαλειφθεί πλήρως από τους χώρους και τον εξοπλισμό παραγωγής. Το αποτέλεσμα της ανάπτυξης τους είναι να καθιστούν τον ζύθο μη πόσιμο ή λιγότερο ευχάριστο λόγω των αλλοιωμένων οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του, ακόμη και όταν τα επίπεδα επιμόλυνσης είναι χαμηλά. Η διάθεση στην αγορά μιας παρτίδας με αλλοιωμένα χαρακτηριστικά λόγω επιμόλυνσης, μπορεί να οδηγήσει στην απώλεια της εμπιστοσύνης των καταναλωτών απέναντι στα προϊόντα του ζυθοποιού.

Ακόμη έγινε αναφορά στα θρεπτικά υποστρώματα και σε ορισμένους βιοχημικούς και άλλους ελέγχους που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση και αναγνώριση τους. Προτάθηκαν τα ελάχιστα σημεία δειγματοληψίας που θα πρέπει να ακολουθεί ένα μικροζυθοποιείο για την εφαρμογή ενός μικροβιολογικού πλάνου ποιοτικού ελέγχου, με τέτοιον τρόπο ώστε να είναι εφικτό να πραγματοποιηθεί από ένα μικροζυθοποιείο όπου οι πόροι – χρήματα, χρόνος, ανθρώπινο δυναμικό – είναι περιορισμένοι, ώστε να διασφαλίζεται η παραγωγική διαδικασία και το τελικό προϊόν από μικροβιολογική σκοπιά.

Τα περισσότερα ελληνικά μικροζυθοποιεία δεν εφαρμόζουν κάποιο πλάνο δειγματοληψίας και μικροβιολογικών αναλύσεων. Αρκούνται στις διαδικασίες καθαρισμού και απολύμανσης που ακολουθούν και στηρίζονται στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά για την απελευθέρωση των προϊόντων στην αγορά. Η εφαρμογή ορθών πρακτικών κατά τους χειρισμούς και τις διεργασίες, ο σωστός σχεδιασμός του εξοπλισμού και η εφαρμογή διαδικασιών καθαρισμού, βοηθούν στην εξάλειψη του οργανικού φορτίου και στην διατήρηση του εξοπλισμού σε καλό

επίπεδο από μικροβιολογική σκοπιά ώστε να παραχθούν προϊόντα χωρίς μικροβιολογικά προβλήματα.

Συνήθως όμως δεν πραγματοποιείται κάποιος έλεγχος για την αποτελεσματικότητα των καθαρισμών και των απολυμάνσεων, οπότε αρκετές φορές είτε γίνεται γίνετε σπατάλη χημικών και χρόνου ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή αποτελεσματικότητα, είτε δεν επιτυγχάνεται. Ο έλεγχος της αποτελεσματικότητας των διαδικασιών καθαρισμού θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί και με την χρήση φορητών λουμινόμετρων, σχετικά εύκολα και χωρίς μεγάλο κόστος. Η συλλογή των δειγμάτων είναι εύκολη και ο χρόνος ανάλυσης και εξαγωγής του αποτελέσματος συνήθως είναι πολύ σύντομος.

Η εφαρμογή όμως ενός πλάνου δειγματοληψίας και μικροβιολογικού ελέγχου δεν είναι το ίδιο εύκολη, διότι απαιτείται κεφάλαιο για την απόκτηση εξοπλισμού και την δημιουργία ενός χώρου που θα χρησιμοποιείται αποκλειστικά για την ανάλυση των δειγμάτων. Επίσης, θα πρέπει να υπάρχει εκπαιδευμένο προσωπικό που θα εκτελεί τις αναλύσεις οι οποίες απαιτούν χρόνο για την προετοιμασία, την εκτέλεση τους και την εξαγωγή των αποτελεσμάτων. Το κόστος εξοπλισμού και υλικών δεν είναι μεγάλο, το μεγαλύτερο εμπόδιο αποτελεί η ύπαρξη κατάλληλα εκπαιδευμένου προσωπικού για την διεξαγωγή των αναλύσεων.

Υπάρχουν μικροζυθοποιεία που επιλέγουν να επαναχρησιμοποιούν την μαγιά αν και σε ορισμένα δεν υπάρχουν οι υποδομές και το προσωπικό ώστε να εφαρμόζουν μικροβιολογικούς ελέγχους. Αυτή η πρακτική από μια σκοπιά επιτρέπει την μείωση του κόστους παραγωγής, αλλά θέτει σε μεγάλο κίνδυνο την ακεραιότητα ή και την σταθερότητα του τελικού προϊόντος. Σε περίπτωση επιμόλυνσης της μαγιάς το πρόβλημα πιθανόν να λάβει χώρα σε περισσότερες από μια δεξαμενές ζύμωσης, μέχρι να γίνει αντιληπτό. Οπότε τα ζυθοποιεία που δεν εφαρμόζουν μικροβιολογικούς ελέγχους και θέλουν να αποφύγουν τα πιθανά προβλήματα που μπορεί να προκύψουν από την επαναχρησιμοποίηση της μαγιάς καταφεύγουν στην επιλογή της ξηρής μαγιάς κάθε φορά, κάτι που ανεβάζει το κόστος παραγωγής.

Τα μικροζυθοποιεία θα πρέπει να μελετήσουν το ενδεχόμενο εφαρμογής ενός πλάνου δειγματοληψίας και σε συνέχεια να επιλέξουν αν θέλουν να δημιουργήσουν ένα εργαστήριο με εξειδικευμένο προσωπικό ή να χρησιμοποιήσουν τις υπηρεσίες από εξωτερικά εργαστήρια για την ανάλυση των δειγμάτων. Θα πρέπει να μελετήσουν αν το όφελος ενός μικροβιολογικού πλάνου αναλύσεων αξίζει το κόστος σε σχέση με το ρίσκο που λαμβάνουν όταν δεν πραγματοποιούνται έλεγχοι.

Ως περαιτέρω έρευνα θα πρέπει το πλάνο δειγματοληψίας που έχει προταθεί στην παρούσα εργασία να εφαρμοστεί στην πράξη, να αξιολογηθεί και από τα συμπεράσματα που θα προκύψουν να βελτιωθεί ως προς την αποτελεσματικότητα του και την ευκολία εφαρμογής του.

6 Βιβλιογραφία

- Asano, S., Suzuki, K., Iijima, K., Motoyama, Y., Kuriyama, H., & Kitagawa, Y. (2007). Effects of morphological changes in beer-spoilage lactic acid bacteria on membrane filtration in breweries. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 104, 334-338
- ASBC Method of Analysis. (2008). Common Brewery-Related Microorganisms. Retrieved from <https://www.asbcnet.org/Methods/Methods/MicroRefGuide.pdf>
- Bittner, M., Souza, A.C., Brozova, M., Matoulkova, D., Dias, D.R., & Branyik, T. (2016). Adhesion of anaerobic beer spoilage bacteria *Megasphaera cerevisiae* and *Pectinatus frisingensis* to stainless steel. *Food Science and Technology*, 70, 148-154
- Bokulich, N.A., Bamforth, C.W., & Mills, D.A., (2012). A Review of Molecular Methods for Microbial Community Profiling of Beer and Wine. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 70(3):150-162
- Bokulich, N.A., & Bamforth, C.W., (2013). The Microbiology of Malting and Brewing. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 77(2): 157-172
- Campbell, I. (2003). Wild yeast in brewing and distilling. In F.G, Priest, I., Campbell (Eds.). *Brewing Microbiology* (3rd ed. pp. 246-266). New York, NY: Kluwer Academic
- Drosou, F., Anastasakou, K., Tataridis, P., Dourtoglou, V., & Oreopoulou V., (2022). Evaluation of Commercial Strains of *Torulaspora delbrueckii* in Beer Production. *Journal of the American Society of Brewing Chemists.* 80 (3): 1–10
- Felsberg, J., Jelinkova, M., Kubizniakova, P., & Matoulkova D. (2014). Development of a species-specific PCR assay for identification of the strictly anaerobic bacterium *Selenomonas lacticifex* found in biofilm-covered surfaces in brewery bottling halls. *Journal of Applied Microbiology.* 117, 1328—1335
- Haikara, A., & Helander, I. (2006). *Pectinatus*, *Megasphaera* and *Zymophilus*. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, & E. Stackebrandt (Eds.), *The prokaryotes: A handbook on the biology of bacteria* (pp. 965–981). New York: Springer Science + Media, LLC
- Hespell, R.B., Paster B.J., & Dewhirst F.E. (2006). The Genus *Selenomonas*. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, & E. Stackebrandt (Eds.), *The prokaryotes: A handbook on the biology of bacteria* (pp. 965–981). New York: Springer Science + Media, LLC
- Hellborg, L., & Pisky, J. (2009). Yeast Diversity in the Brewing Industry. In V.R. Preedy (Ed.). *Beer in Health and Disease Prevention* (pp. 77-88). Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/dekkera>
- Hill, A.E. (2015). Traditional methods of detection and identification of brewery spoilage microorganisms. In A.E, Hill (Ed.). *Brewing Microbiology - Managing Microbes*,

Ensuring Quality and Valorising Waste (1st ed. pp. 271-286). Cambridge, UK: Woodhead Publishing

- Holzappel, W.H., Franz, C.M.A.P., Ludwig, W., Back, W., & Dicks, L.M.T. (2006). The Genera *Pediococcus* and *Tetragenococcus*. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, & E. Stackebrandt (Eds.), *The prokaryotes: A handbook on the biology of bacteria* (pp. 965–981). New York: Springer Science + Media, LLC
- Hutzler, M., Koob, J., Riedl, R., Schneiderbanger, H., Mueller-Auffermann, K., & Jacob, F. (2015). Yeast identification and characterization. In A.E, Hill (Ed.). *Brewing Microbiology - Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising Waste* (1st ed. pp. 65-104). Cambridge, UK: Woodhead Publishing
- Jespersen, L., & Jakobsen, M. (1996). Specific spoilage organisms in breweries and laboratory media for their detection. *International Journal of Food Microbiology*. 33, 139-155
- Juvonen, R. (2015). Strictly anaerobic beer-spoilage bacteria. In A.E, Hill (Ed.). *Brewing Microbiology - Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising Waste* (1st ed. pp. 195-218). Cambridge, UK: Woodhead Publishing
- Li, Y., Huang, T.Y., Mao, Y., Chen, Y., Shi, F., Peng, R., Chen, J., Bai, C., Chen, L., Wang, K., & Liu, J. (2020). Effect of Environmental Conditions on the Formation of the Viable but Nonculturable State of *Pediococcus acidilactici* BM-PA17927 and Its Control and Detection in Food System. *Frontiers in Microbiology*. Published online 2020 Sep 29;11:586777.
- Liu, J., Li, L., Li, B., Peters, B.M., Deng, Y., Xu, Z., & Shirtliff, M.E. (2017a). First study on the formation and resuscitation of viable but nonculturable state and beer spoilage capability of *Lactobacillus lindneri*. *Microbial Pathogenesis*. 107, 219-224.
- Liu, J., Li, L., Li, B., Peters, B.M., Deng, Y., Xu, Z., & Shirtliff, M.E. (2017b). Study on spoilage capability and VBNC state formation and recovery of *Lactobacillus plantarum*. *Microbial Pathogenesis*. 110, 257-261.
- Matoulková, D., & Kubizniaková, P. (2018). *Brewing Microbiology - Kocuria (Micrococcus) and Cultivation Methods for their Detection - Part 1*. *Kvasny Prumysl* 64(1):10-13
- Matoulková, D., Kosař, K., & Sigler, K. (2012a). Rapid, Simple, and Specific Cultivation-Based Method for Detection of *Pectinatus* spp. in Brewery Samples. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 70(1):29-34
- Matoulková, D., Kosař, K., Slabý, M., & Sigler, K. (2012b). Occurrence and Species Distribution of Strictly Anaerobic Bacterium *Pectinatus* in Brewery Bottling Halls. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 70(4):262-267
- Paradh, A.D. (2015). Gram-negative spoilage bacteria in brewing. In A.E, Hill (Ed.). *Brewing Microbiology - Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising Waste* (1st ed. pp. 175-194). Cambridge, UK: Woodhead Publishing

- Paradh, A., & Hill, A. (2016) Review: Gram Negative Bacteria in Brewing. *Advances in Microbiology*, 6, 195-209
- Powell, C.D., & Kerruish, D.W.M. (2017). Beer-spoiling Yeast: Genomics, Detection, and Control. In N.A, Bokulich, C.W, Bamforth (Eds.). *Brewing Microbiology: Current Research, Omics and Microbial Ecology* (1st ed. pp. 289-327). Norfolk, UK: Caister Academic Press
- Priest, F. (2003). Gram-positive brewery bacteria. In F.G, Priest, I., Campbell (Eds.). *Brewing Microbiology* (3rd ed. pp. 181-218). New York, NY: Kluwer Academic
- Sakamoto, K., & Koning, W.N. (2003). Beer spoilage bacteria and hop resistance. *International Journal of Food Microbiology*, 89, 105-124
- Storgards E., (2000). Process hygiene control in beer production and dispensing. Technical Research Centre of Finland, VTT Publications 410. 105 p. app. 66 p.
- Suzuki, K. (2015). Gram-positive spoilage bacteria in brewing. In A.E, Hill (Ed.). *Brewing Microbiology - Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising Waste* (1st ed. pp. 140-173). Cambridge, UK: Woodhead Publishing
- Suzuki, K. (2020). Emergence of New Spoilage Microorganisms in the Brewing Industry and Development of Microbiological Quality Control Methods to Cope with This Phenomenon: A Review, *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 78:4, 245-259
- Tataridis P., Kanellis A., Logothetis S., Nerantzis E. 2013a. Use Of non-Saccharomyces *Torulaspora delbrueckii* Yeast Strains In Winemaking and Brewing. *Jour. Nat. Sci., Matica Srpska Novi Sad*, No 124, 415-426.
- Tataridis P., Diamantis D., Gialitaki K., Kanellis A., Kechagia D., Nerantzis E. 2013b. Comparison of growth kinetics, major metabolites and sensory profiles in brewing with non-Saccharomyces yeast. 34th European Brewery Convention Congress, May 26-29, 2013, Luxembourg.
- Tataridis P., A. Barbari, M. Lelaj, A. Kanellis, D. Kechagia. (2014). Effect of selected non-Saccharomyces yeast strains in brewing. 11th International Trends In Brewing. April 13th-17th 2014. Ghent, Belgium.
- Tataridis P., Drosou F., Kanellis A., Kechagia D., Logothetis L., Chatzilazarou A., Dourtoglou V. (2016). Differentiating beer aroma, flavor and alcohol content through the use of *Torulaspora delbrueckii*. 5th International Young Scientists Symposium on Malting, Brewing and Distilling. 21-23 April 2016, Chico, California.
- Turvey, M.E., Weiland, F., Keller, E.J. & Hoffmann, P. (2017). The changing face of microbial quality control practices in the brewing industry: Introducing mass spectrometry proteomic fingerprinting for microbial identification. *Institute of Brewing and Distilling*, 123:373-387

- Vavrova, A., Matoulkova, D., Balazova, T., & Sedo, O. (2014). MALDI-TOF MS Analysis of Anaerobic Bacteria Isolated from Biofilm-Covered Surfaces in Brewery Bottling Halls. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 72(2):95-101
- Vriesekoop, F., Krahl, M., Hucker, B., & Menz, G. (2013). 125th Anniversary Review: Bacteria in brewing: The good, the bad and the ugly. *Journal of The Institute of Brewing*, 118 (4), 335-345
- Zimbro, M.J., Power, D.A., Miller, S.M., Wilson, G.E., & Johnson, J.A. (2009). *Difco & BBL Manual: Manual of Microbiological Culture Media* (2nd ed.). Becton, Dickinson and Company. Maryland
- Ziola, B., & Bergsveinson, J. (2017). Brewery- and beer spoilage- related Gram-negative Bacteria: The Unpleasant, the Malodorous and the Outright Fetid. In N.A, Bokulich, C.W, Bamforth (Eds.). *Brewing Microbiology: Current Research, Omics and Microbial Ecology* (1st ed. pp. 275-288). Norfolk, UK: Caister Academic Press

<https://www.technologynetworks.com/immunology/articles/gram-positive-vs-gram-negative-323007>

<https://en.wikipedia.org/wiki/Guano>

<https://www.biomerieux-industry.com/food-safety-quality/resources/scientific-library/2020-11-03-part-1-beer-spoilers-what-are-major>

<https://www.sciencephoto.com/media/79518/view/acetobacter-aceti-bacteria>

<https://www.sciencephoto.com/media/96165/view/gluconacetobacter-bacteria-sem>

<https://learn.chm.msu.edu/vibl/content/oxidase.html>

<https://learn.chm.msu.edu/vibl/content/catalase.html>,

<https://brewup.eu/ebc-analytica/microbiological-techniques/phenolic-off-flavour-pof/2.3.9.5>

<https://brewup.eu/ebc-analytica/category/microbiology/detection-of-contaminants>

<https://www.asbcnet.org/Methods/MicrobiologyMethods/Pages/default.aspx>

<https://www.biomerieux-usa.com/clinical/api>

<https://www.charm.com/products/test-and-kits/atp-tests/>

<https://www.charm.com/wp-content/uploads/2022/05/MRK-9491.pdf>

<https://microscopeclarity.com/how-to-identify-bacteria/>

<https://www.asbcnet.org/Methods/MicrobiologyMethods/Pages/default.aspx>

https://www.morebeer.com/articles/lab_tests_quality_beer

<https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/marketing/global/documents/870/632/T413031H.pdf>

Παράρτημα Α:

Οι συνταγές των θρεπτικών υποστρωμάτων που αναφέρονται στο Παράρτημα Α είναι από την 2^η έκδοση του Difco & BBL Manual και από το Microbiological Control-5 του ASBC.

MRS	
Proteose Peptone	10.0 g
Beef Extract	10.0 g
Yeast Extract	5.0 g
Dextrose	20.0 g
Polysorbate 80	1.0 g
Ammonium Citate	2.0 g
Sodium Acetate	5.0 g
Magnesium Sulfate	0.1 g
Manganese Sulfate	0.05 g
Dipotassium Phosphate	2.0 g
Agar	15.0 g
Final pH 6.5 ± 0.2 at 25 °C	

RAKA-RAY	
Yeast Extract	5.0 g
Tryptone	20.0 g
Liver Concentrate	1.0 g
Maltose	10.0 g
Fructose	5.0 g
Glucose	5.0 g
Betaine Hydrochloride	2.0 g
Di-ammonium Citrate	2.0 g
Potassium Aspartate	2.5 g
Magnesium Sulfate	0.98 g
Manganese Sulfate	0.42 g
Dipotassium Phosphate	2.0 g
N-Acetyl Glucosamine	0.5 g
Potassium Glutamate	2.5 g
Agar	16.0 g
Final pH 5.4 ± 0.2 at 25 °C	

UBA	
Yeast Extract	6.1 g
Peptonized Milk	15 g
Tomato Juice (244mL)	12.2 g
Dextrose	16.1 g
Dipotassium Phosphate	0.31 g
Monopotassium Phosphate	0.31 g
Magnesium Sulfate	0.12 g
Sodium Chloride	0.006 g
Ferrous Sulfate	0.006 g
Manganese Sulfate	0.006 g
Final pH 6.3 ± 0.2 at 25 °C	

LMDA	
Tomato juice solids	20.0 g
Peptonized milk	20.0 g
Yeast extract	10.0 g
Dextrose	10.0 g
Calcium pantothenate	2.0 g
Citric acid monohydrate	1.1 g
Calcium carbonate	5.0 g
Dipotassium phosphate	0.5 g
Monopotassium phosphate	0.5 g
Magnesium sulfate	0.2 g
Manganese sulfate	0.01 g
Ferrous sulfate	0.01 g
Sodium chloride	0.01 g
Tween 80	0.5 g
Bromocresol green	0.022 g
Cycloheximide	0.007 g
Agar 15.0	15.0 g
Distilled water to 1 L	

HLP medium

Sodium acetate anhydrous	3.0 g
Citric acid	1.25 g
Pantothenic acid	1.0 g
Cycloheximide	0.g
Tomato juice broth	19.0 g
Agar powder	1.6 g
FNI 100 dried yeast extract (Lallemand Bio Ingredients or equiv.)	5.0 g
Corn syrup solids (Maltrin 200, Grain Processing Corp. or equiv.)	29.2 g
Malt extract	5.0 g
Sodium sulfate	4.4 g
Mercaptoacetic acid	0.55 g

Thioglycolate Medium

Solution:

4.05% solution, soluble in distilled or deionized water
on boiling; medium amber, clear to very slightly
opalescent with upper 10% or less medium green

Prepared Medium:

Medium amber, clear to very slightly opalescent with
upper 10% or less medium green

Final pH 7.2 ± 0.2 at 25 °C

SMMP

Basal medium	
Yeast extract	75 g
Bacto-peptone	75 g
DL-Lactic acid sodium salt (60% syrup)	75 mL
Sodium thioglycolate	0.75 g
L-Cysteine HCL	0.75 g
Dipotassium phosphate	7.5 g
Monopotassium phosphate	7.5 g
Sodium chloride	7.5 g
Ammonium phosphate	7.5 g
Sodium acetate	7.5 g
Distilled water	736 mL
Selective stock solution	
Sodium fusidate	0.75 g
Cycloheximide	0.6 g
Crystal violet	0.15 g
Absolute ethanol	100 mL

PCA

Pancreatic Digest of Casein	5.0 g
Yeast Extract	2.5 g
Dextrose (Glucose)	1.0 g
Agar	15.0 g
Final pH 7.0 ± 0.2 at 25 °C	

Lysine Medium

Yeast carbon base	2.35 g
	0.46-0.5
Lysine monohydrochloride	g
Agar	4.0 g
Distilled water	200 mL

CLEN Medium

Yeast carbon base	11.7 g
Agar	15 g
Cadaverine dihydrochloride	2.4 g
Ethylamine, 70% (v/v) solution	0.9 g
Lysine monohydrochloride	2.5 g
Potassium nitrate	1.4 g
Distilled water to 1 L	
Hydrochloric acid, concentrated	
Final pH 5.8 ± 0.2 at 25 °C	

LWYM

Yeast extract	4.0 g
Malt extract	2.0 g
Peptone	2.0 g
Dextrose	10.0 g
Dipotassium phosphate	1.0 g
Ammonium chloride	0.5 g
Crystal violet	0.1-0.6 mg
Fuchsin-sulfite mixture	1.0 g
Agar	20.0 g

MYGP + Copper Medium

YM agar	41 g
Cupric sulfate solution 1.56%	20 mL
