



**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

**Μελέτη της επίδρασης διαφόρων συνθηκών στη ζύμωση ζύθου
με *L. thermotolerans***

Του

Αβραμόπουλου Χρήστου

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: Ταταρίδης Παναγιώτης

ΑΘΗΝΑ, 2023



**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

**Study of the effect of different conditions in beer fermentation
with *L. thermotolerans***

By

Avramopoulos Christos

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: Tataridis Panagiotis

Athens, 2023



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

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

Διασαφήσεις

Οι υπογράφωντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία (master thesis) με τίτλο «**Μελέτη της επίδρασης διαφόρων συνθηκών στη ζύμωση ζύθου με *L. thermotolerans***» που παρουσιάστηκε από τον **ΑΒΡΑΜΟΠΟΥΛΟ ΧΡΗΣΤΟ** και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

The signatories declare that we have examined the postgraduate diploma thesis titled “**Study of the effect of different conditions in beer fermentation with *L. thermotolerans***” presented by **Avramopoulos Christos** 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. Κουσίση Ελισάβετ

Όνοματεπώνυμο & Υπογραφή 3^{ου} Μέλους Επιτροπής

(Name and Signature of 3rd Commission Member):

Δρ. Δρόσου Φωτεινή

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο κάτωθι υπογεγραμμένος **Αβραμόπουλος Χρήστος** του **Αθανασίου**, με αριθμό μητρώου 20201 φοιτητής του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών Επιστήμη Οίνου και Ζύθου του Τμήματος Επιστήμης 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



Αβραμόπουλος Χρήστος

Περίληψη

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μια αύξηση στη χρήση ζυμών *non-Saccharomyces* στον τομέα των ποτών. Ο λόγος αυτού του παγκόσμιου ενδιαφέροντος είναι ότι παραγωγοί αλλά και οι επιστήμονες αναζητούν διαφορετικές ζύμες από τις παραδοσιακές για να δημιουργήσουν νέα αρώματα και χαρακτηριστικά στα διάφορα ποτά. Στην παρούσα εργασία αυτό το ενδιαφέρον επικεντρώθηκε στην παραγωγή ξινού ζύθου.

Στην συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *L. thermotolerans* (Philly sour) της Lallemand και εξετάστηκε η ικανότητα ζύμωσης της και ο ρυθμός εξέλιξης της σε διάφορες συνθήκες ζύμωσης. Ο στόχος ήταν να διαπιστωθεί το πώς οι διαφορετικές συνθήκες ζύμωσης μπορούν να επηρεάσουν το τελικό προϊόν και αν αυτό έχει κάποιο όφελος για την βιομηχανία. Αρχικά στο πρώτο πείραμα χρησιμοποιήθηκε το όργανο Bioscreen C για να μελετηθεί η ικανότητα ανάπτυξης της σε υποστρώματα με χρήση διαφορετικών σακχάρων (γλυκόζη, φρουκτόζη, σακχαρόζη, μαλτόζη, μαλτοτριόζη, λακτόζη και συνθετικού υποστρώματος ζύθου), αρχικών τιμών IBU (0, 25, 50, 75, 100) και αρχικών τιμών pH (5.5, 5, 4.5, 4, 3.5, 3). Στο δεύτερο πείραμα παρακολουθήθηκαν δυο σειρές ζυμώσεων (Α και Β) με την μέτρηση της πυκνότητας και του pH σε γλεύκη ζύθου σε διαφορετικές θερμοκρασίες (13, 18, 24, 30 °C), σε διαφορετικές αρχικές πυκνότητες (12.5, 15.5, 19.5 °P) και σε διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις εμβολίου (1, 1.5, 2 g/L). Τέλος μελετήθηκαν τα αρωματικά με χρήση GC-MS στα δείγματα με διαφορετικές αρχικές πυκνότητες (12.5, 15.5, 19.5 °P).

Στην πρώτη σειρά πειραμάτων τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η *L. thermotolerans* κατάφερε να αναπτυχθεί σε όλες τις περιπτώσεις εκτός από τα υποστρώματα που περιείχαν μόνο τα σάκχαρα μαλτοτριόζη και λακτόζη. Πιο συγκεκριμένα έδειξε μειωμένη ανάπτυξη σε σάκχαρα όπως μαλτοτριόζη, στο μείγμα σακχάρων και σε pH 3, ενώ οι αυξανόμενες τιμές IBU δεν την επηρέασαν ιδιαίτερα. Στη δεύτερη σειρά πειραμάτων η *L. thermotolerans* αναπτύχθηκε και ολοκλήρωσε την ζύμωση σε όλες τις θερμοκρασίες αν και χρειάστηκε πολύ περισσότερο χρόνο στις χαμηλότερες θερμοκρασίες, όμως έδειξε να έχει καλύτερους βαθμούς ζύμωσης. Επίσης ζύμωσε επιτυχώς σε όλες τις διαφορετικές αρχικές πυκνότητες με μεγαλύτερη απόδοση σε αλκοόλη, αυξημένη οξύτητα, και γρήγορη μείωση του pH (ως ~3,0) τις πρώτες 2-3 μέρες. Επίσης φάνηκε ότι αυξανόμενης της αρχικής πυκνότητας κάποια επιθυμητά αρωματικά (όπως π.χ. βανιλίνη, λιναλοόλη) εμφανίζονται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Έτσι η ζύμη *L. thermotolerans* που χρησιμοποιήθηκε φαίνεται ικανή να παράγει ξινές μπύρες και να ζυμώσει στις περισσότερες συνθήκες. Ωστόσο, τα προϊόντα που παράγει φαίνεται να διαφέρουν ανάλογα με τις συνθήκες ζύμωσης και δείχνει να υπάρχει μεγάλη ποικιλομορφία στα τελικά χαρακτηριστικά του προϊόντος (όπως π.χ απόδοση σε αλκοόλη, οξύτητα, pH και παραγόμενες αρωματικές ενώσεις).

Λέξεις κλειδιά: *Lachancea thermotolerans*, ξινός ζύθος, κινητική ζύμωσης

Abstract

Impact of different fermentation parameters on *L. thermotolerans*

Avramopoulos Christos
Department of Wine, Vine & Beverage Sciences,
University of West Attica, 2023

In the recent years there has been an increase in the use of non-Saccharomyces yeasts. The reason for this global interest is that the producers as well as the scientists are looking for different yeasts from the traditional ones to create new aromas and flavors in different drinks. This interest in this study is focused on the production of sour beers.

In this study, the strain *L. thermotolerans* (Philly sour) from Lallemand was used and tested for its ability to ferment and its fermentation rate, at different fermentation conditions. The aim was to test how the different fermentation conditions can affect the final product and if this has any benefit for the industry. Initially, in the first experiment, the Bioscreen C instrument was used to study the ability to grow on media using different sugars (glucose, fructose, sucrose, maltose, maltotriose, lactose and synthetic beer media) different initial IBU values (0, 25, 50, 75, 100) and different initial pH values (5.5, 5, 4.5, 4, 3.5, 3). In the second experiment, two series of fermentations (A and B) were monitored by measuring the density of the wort and the pH to test the fermentation ability and the results at different temperatures (13, 18, 24, 30 °C), different original gravities (12.5, ~ 15.5, 19.5 °P) and pitching rate (1, 1.5, 2 g/L). Finally, the aromatic compounds were studied using GC-MS on the samples with different original gravities (12.5, 15.5, 19.5 °P).

In the first series of experiments the results showed that *L. thermotolerans* managed to grow in all cases except for the media containing only the sugars maltotriose and lactose. More specifically, it showed reduced growth in the media containing sugars such as maltotriose, the synthetic beer media (mix) and at pH 3, while the increasing IBU values did not particularly affect it. In the second series of experiments *L. thermotolerans* also developed and completed the fermentations at all temperatures although it took much more time at lower temperatures, but showed higher attenuation rates. Furthermore, it fermented successfully all the media with different original gravities producing higher alcohol yield, increased acidity, and a rapid decrease in pH (~ 3.0) in the first 2-3 days. It was also shown that by increasing the original gravity of the media, some desirable aromatic compounds (such as vanillin, linalool) appear in reduced concentrations. In conclusion, the strain *L. thermotolerans* seems able to produce sour beer and ferment in most conditions. Nevertheless, the products seem to differ depending on the fermentation conditions and there seems to be a great diversity in the final characteristics of the product (such as yield of alcohol, acidity, pH and produced aromatic compounds).

Keywords: *Lachancea thermotolerans*, sour beer, fermentation kinetics

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Τμήμα Επιστημών Οίνου, Αμπέλου και Ποτών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής. Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές κο Παναγιώτη Ταταρίδη για την καθοδήγηση του και για τη βοήθειά της κατά τη διάρκεια της συγγραφής της εργασίας, την κα Δρόσου Φωτεινή για την καθοδήγηση και βοήθεια της στο κομμάτι της GC-MS. Την καθηγήτρια κα Ανθιμία Μπατρίνου και την υποψήφιο διδάκτορα κα Κατερίνα Πυροβόλου από το τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων για την βοήθεια τους στην πειραματική διαδικασία με το όργανο Bioscreen C. Τέλος τους φοιτητές του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών κα Αρτέμης Τσιούκα για την βοήθεια τους με την οργάνωση των πειραμάτων και τους προπτυχιακούς φοιτητές Ματθαίο Καϊστούρα και Γιώργο Κουτσονικόλη για την βοήθεια τους κατά την πειραματική διαδικασία. Τέλος να ευχαριστήσω όλα τα μέλη της τριμελούς επιτροπής για την συμβολή τους στην ολοκλήρωση και στην εξέταση της παρούσας εργασίας.

Περιεχόμενα

Περίληψη	i
Abstract.....	ii
Κατάλογος Σχημάτων.....	vi
Κατάλογος Πινάκων	vi
Κατάλογος Διαγραμμάτων	vii
Εισαγωγή και Σκοπός της Εργασίας	1
1. Θεωρητικό Μέρος	2
1.1 Ζύμες και η επίδραση διαφόρων παραγόντων στις ζυμώσεις	2
1.1.1 Γενικά χαρακτηριστικά των ζυμών	2
1.1.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3
1.1.3 Επίδραση της θερμοκρασίας στην ανάπτυξη του πληθυσμού των ζυμών	4
1.1.4 Η επίδραση των διαφορετικών σακχάρων στην ζύμωση	6
1.1.5 Επίδραση του οξυγόνου στην ζύμωση	9
1.1.6 Επίδραση του pH στις ζυμώσεις.....	10
1.1.7 Επίδραση της αρχικής πυκνότητας και του αζώτου στις ζυμώσεις	10
1.1.8 Επίδραση της συγκέντρωσης του εμβολίου στις ζυμώσεις (pitching rate).....	13
1.2 Non-Saccharomyces ζύμες.....	16
1.2.1 Γενικά χαρακτηριστικά των Non-Saccharomyces ζυμών	16
1.3 Βασικά είδη ζυμών Non –Saccharomyces	17
1.3.1 <i>Starmerella bacillaris</i>	17
1.3.2 <i>Metschnikowia pulcherrima</i>	18
1.3.3 <i>Brettanomyces anomalus</i>	18
1.3.4 <i>Brettanomyces bruxellensis</i>	19
1.3.5 <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	20
1.3.6 <i>Pichia kluyveri</i>	20
1.3.7 Ζύμες γένους <i>Kloeckera</i>	21
1.3.8 Ζύμες γένους <i>Hanseniaspora</i>	21
1.3.9 Ζύμη <i>Torulaspora delbrueckii</i>	22
1.4 <i>Lachancea thermotolerans</i>	23
1.4.1 Γενικά Χαρακτηριστικά.....	23
1.4.2 Η χρήση της <i>L. thermotolerans</i> στην παραγωγή του οίνου	24

1.4.3 Η χρήση της <i>L. thermotolerans</i> στην ζυθοποιία και στην παραγωγή ξινών ζύθων	25
1.4.4 Εμπορικά στελέχη <i>L. thermotolerans</i>	27
1.5 Ξινές μπίρες	28
2. Υλικά και Μέθοδοι	32
2.1 Ανάπτυξη κυττάρων σε διαφορετικά σάκχαρα, pH, IBU	32
2.1.1 Δημιουργία Υποστρωμάτων	32
2.1.2 Δημιουργία εμβολίων και εμβολιασμός.....	34
2.1.3 Παρακολούθηση ανάπτυξης βιομάζας με Bioscreen C.....	34
2.1.4 Ανάλυση αποτελεσμάτων κινητικής ανάπτυξης με Combase	34
2.2 Ζυθοποίηση, ζύμωση και αναλύσεις στην μπίρα	35
2.2.1 Παραγωγή ζυθογλεύκους	35
2.2.2 Ζυμώσεις και μετρήσεις.....	36
2.2.3 Αναλύσεις.....	37
2.2.4 Ανάλυση των αποτελεσμάτων	39
2.2.5 Αναλύσεις αέριας χρωματογραφίας (GC-MS)	39
3. Αποτελέσματα και σχολιασμός.....	40
3.1 Αποτελέσματα ζυμώσεων από Bioscreen C	40
3.1.1 Εξέλιξη ζυμώσεων σε διαφορετικά σάκχαρα για <i>S. cerevisiae</i> και <i>L. thermotolerans</i>	41
3.1.2 Εξέλιξη ζυμώσεων σε διαφορετικά αρχικά pH	43
3.1.3 Εξέλιξη ζυμώσεων σε διαφορετικές τιμές IBU.....	45
3.1.4 Μέγιστοι ρυθμοί ανάπτυξης των ζυμών σε διαφορετικές συνθήκες ζύμωσης	47
3.2 Εξέλιξη των βαθμών Plato του pH και βάρους σε διάφορες συνθήκες ζύμωσης	50
3.2.1 Εξέλιξη των βαθμών Plato και pH σε διαφορετικές θερμοκρασίες ζύμωσης για την <i>L. thermotolerans</i>	50
3.2.2 Εξέλιξη των βαθμών Plato και του pH και βάρους σε γλεύκη με διαφορετικές αρχικές πυκνότητες για την ζυμη <i>L. thermotolerans</i>	53
3.2.3 Εξέλιξη των βαθμών Plato και του pH σε γλεύκη με διαφορετικές ποσότητες εμβολίου (pitching rate)	56
3.2.4 Σύγκριση επαναληψιμότητας αποτελεσμάτων των διαφορετικών συνθηκών ζύμωσης μεταξύ της ζύμωσης A και B για <i>L. thermotolerans</i>	60
3.1.5 Αποτελέσματα αναλύσεων για όλες τις ζυμώσεις με <i>L. thermotolerans</i> και σχολιασμός	65
3.2 Αποτελέσματα GC-MS και σχολιασμός	71
4. Συμπεράσματα.....	73
5. Βιβλιογραφία	75

Κατάλογος Σχημάτων

Εικόνα I: Φάσεις ανάπτυξης ζύμης. _____	3
Εικόνα II: Η ζύμη <i>S. cerevisiae</i> από το μικροσκόπιο. _____	3
Εικόνα III: Κατηγοριοποίηση των αμινοξέων του ζυθογλεύκου ανάλογα με την αφομοίωση τους. _	13
Εικόνα IV: Δείκτης IBU ανά στυλ μπίρας. _____	15
Εικόνα V: <i>L. thermotolerans</i> από μικροσκόπιο _____	23
Εικόνα VI: Διάγραμμα διαδικασίας παραγωγής μπίρας τύπου Lambic και Gueuze. _____	28
Εικόνα VII: Διαφορές μεταξύ μεθόδου kettle souring, wood-aged souring και primary souring. _____	29
Εικόνα VIII: Η μικροβιακή διαδοχή κατά τη διάρκεια μιας διαδικασίας παραγωγής ξινή μπίρας με αυθόρμητη ζύμωση). _____	30

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1 : Συνταγή υποστρώματος αναφοράς _____	32
Πίνακας 2 : Ποσότητα σακχάρων που προστέθηκαν σε κάθε υπόστρωμα _____	33
Πίνακας 3 : Το σύνολο των δοχείων/δειγμάτων με τις διαφορετικές συνθήκες που εξεταστήκαν και με την κωδική τους ονομασία. Τα δείγματα Β είναι οι επαναλήψεις των αντίστοιχων δειγμάτων _____	36
Πίνακας 4: Το σύνολο των δοχείων/δειγμάτων με τις διαφορετικές συνθήκες που εξεταστήκαν με μέτρηση του βάρους του δοχείου _____	36
Πίνακας 5: Τα αποτελέσματα των αναλύσεων όλων των συνθήκων των ζυμώσεων Α και των επαναληπτικών Β. _____	65
Πίνακας 6: Οι συγκεντρώσεις mg/L των σημαντικότερων ενώσεων που επιλέγηκαν από τα δείγματα 3Α (12 °P), 5Α (16°P), 6Α (20°) από τα αποτελεσματα της GC-MS. _____	72

Κατάλογος Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1 : Η καμπύλη της απορρόφησης στα 600nm με υπόστρωμά Mix χωρίς προσθήκη ζυμών. _____	40
Διαγράμματα 1α, 1β : Η οπτική απορρόφηση (OD600) των ζυμώσεων με <i>S. cerevisiae</i> (1α) και <i>L. thermotolerans</i> (1β) προς τον χρόνο (hours) σε διαφορετικά υποστρώματα σακχάρων. _____	42
Διαγράμματα 2α, 2β : Η οπτική απορρόφηση (OD600) των ζυμώσεων με <i>S. cerevisiae</i> (1α) και <i>L. thermotolerans</i> (1b) προς τον χρόνο (hours) σε ίδια υποστρώματα με διαφορετικές αρχικές τιμές pH _____	44
Διαγράμματα 3α, 3β : Η οπτική απορρόφηση (OD600) των ζυμώσεων με <i>S. cerevisiae</i> (3a) και <i>L. thermotolerans</i> (3b) προς τον χρόνο (hours) σε ίδια υποστρώματα με διαφορετικές τιμές IBU _____	46
Διάγραμμα 4α : Ο μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης (growth rate- μ_{max}) από το Combase για την ανάπτυξη του <i>S. cerevisiae</i> σε διαφορετικά υποστρώματα. _____	47
Διάγραμμα 4b : Ο μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης (growth rate- μ_{max}) από το Combase για την ανάπτυξη της <i>L. thermotolerans</i> σε διαφορετικά υποστρώματα. _____	48
Διαγραμμα 5 : Ο μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης (growth rate- μ_{max}) από το Combase για την σύγκριση της ανάπτυξης μεταξύ του <i>S. cerevisiae</i> και της <i>L. thermotolerans</i> σε διαφορετικά υποστρώματα. _____	49
Διαγράμματα 6α, 6β : Εξέλιξη των βαθμών (6a) Plato (°P) και του pH (6b) προς τον χρόνο κατά τη ζύμωση με <i>L. thermotolerans</i> σε διαφορετικές θερμοκρασίες. _____	51
Διαγράμματα 6c, 6d : Εξέλιξη των βαθμών (6a) Plato(°P) και του pH(6b) προς τον χρόνο κατά τη ζύμωση με <i>L. thermotolerans</i> με τις επαναλήψεις των δειγμάτων 3A(3B) και 4A(4B) σε διαφορετικές θερμοκρασίες. _____	52
Διαγράμματα 7α, 7b : Εξέλιξη των βαθμών(7a) Plato(°P) και του pH(7b) προς τον χρόνο κατά τη ζύμωση με <i>L. thermotolerans</i> σε διαφορετικές αρχικές πυκνότητες- βαθμούς Plato(°P) _____	54
Διαγράμματα 7c, 7d : Εξέλιξη των βαθμών(7c) Plato(°P) και του pH(6d) προς τον χρόνο κατά τη ζύμωση με <i>L. thermotolerans</i> σε διαφορετικές αρχικές πυκνότητες- βαθμούς Plato(°P) με τις επαναλήψεις των δειγμάτων 3A(3B) και 5A(5B). _____	55
Διάγραμμα 7e : Εξέλιξη του βάρους του δοχείου που απεικονίζεται ως παραγωγή γραμμάρια (g) CO ₂ /L προς τον χρόνο κατά τη ζύμωση με <i>L. thermotolerans</i> σε διαφορετικές αρχικές πυκνότητες- βαθμούς Plato (°P) _____	56
Διαγράμματα 8α, 8b : Εξέλιξη των βαθμών (8a) Plato (°P) και του pH (8b) προς τον χρόνο κατά τη ζύμωση με <i>L. thermotolerans</i> με διαφορετικές ποσότητες εμβολίου (Pitching rate) _____	58
Διαγράμματα 8c, 8d : Εξέλιξη των βαθμών(8c) Plato (°P) και του pH (8d) προς τον χρόνο κατά τη ζύμωση με <i>L. thermotolerans</i> με διαφορετικές ποσότητες εμβολίου (Pitching rate) με τις επαναλήψεις των δειγμάτων 3A(3B) και 8A(8B). _____	59
Διάγραμμα 9α : Σύγκριση επαναληψιμότητας ζυμώσεων 3A και 3B με την εξέλιξη των βαθμών Plato (°P) και του pH προς τον χρόνο κατά τη ζύμωση με χρήση <i>L. thermotolerans</i> σε συνθήκες αρχικής πυκνότητας 12,5 °P, θερμοκρασία 24 °C και pitching rate 1,5g/L. _____	60
Διάγραμμα 9b : Σύγκριση επαναληψιμότητας ζυμώσεων 4A και 4B με την εξέλιξη των βαθμών Plato (°P) και του pH προς τον χρόνο κατά τη ζύμωση με χρήση <i>L. thermotolerans</i> σε συνθήκες αρχικής πυκνότητας 12,5 °P, θερμοκρασία 30 °C και pitching rate 1,5g/L. _____	61

Διάγραμμα 9c : Σύγκριση επαναληψιμότητας ζυμώσεων 5A και 5B με την εξέλιξη των βαθμών Plato (°P) και του pH προς τον χρόνο κατά τη ζύμωση με χρήση <i>L. thermotolerans</i> σε συνθήκες αρχικής πυκνότητας 15,7 °P(A) και 15,5(B) °P , θερμοκρασία 30 °C και pitching rate 1,5g/L.	62
Διάγραμμα 9d : Σύγκριση επαναληψιμότητας ζυμώσεων 6A και 6B με την εξέλιξη των βαθμών Plato (°P) και του pH προς τον χρόνο κατά τη ζύμωση με χρήση <i>L. thermotolerans</i> σε συνθήκες αρχικής πυκνότητας 19,5 °P , θερμοκρασία 30 °C και pitching rate 1,5g/L.	63
Διάγραμμα 9e : Σύγκριση επαναληψιμότητας ζυμώσεων 8A και 8B με την εξέλιξη των βαθμών Plato (°P) και του pH προς τον χρόνο κατά τη ζύμωση με χρήση <i>L. thermotolerans</i> σε συνθήκες αρχικής πυκνότητας 12,5 °P , θερμοκρασία 30 °C και pitching rate 2 g/L.	64
Διάγραμμα 10 : Σύγκριση παραγόμενης αλκοόλης για τις ζυμώσεις σειράς A και B από το όργανο Anton paar (Alc %vol Anton) και υπολογιζόμενης αλκοόλης (Alcohol % Vol calculated).	67
Διάγραμμα 11 : Σύγκριση φαινομενικού βαθμού ζύμωσης (Apparent degree of fermentation) και απόδοσης αλκοόλης (Alcohol Yield %vol/ °P _{fermented} %) για τις ζυμώσεις σειράς A και B.	68
Διάγραμμα 12 : Σύγκριση ολικής οξύτητας (Total acidity g/l expressed in lactic acid) και τελικών τιμών pH για τις ζυμώσεις σειράς A και B.	69
Διάγραμμα 13 : Σύγκριση χρόνων ζύμωσης για όλες τις σειρές ζυμώσεων A και B.	70

Συντμήσεις, ακρωνύμια, σύμβολα και ορισμοί

X_{max} : Η μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας

μ_{max} : Ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης βιομάζας

FAN : Free Amino Nitrogen, Το ελεύθερο αμινο-άζωτο

IBU : International Bitterness Units, Διεθνείς Μονάδες Πικράδας

OG : Original Gravity, Αρχική σχετική πυκνότητα

FG : Final Gravity, Τελική φαινομενική πυκνότητα

%vol : η ποσότητα της απόλυτης (άνυδρης) αιθανόλης (σε λίτρα) που υπάρχουν σε 100 λίτρα διαλύματος στους 20°C.

Plato (°P) : συγκέντρωση του εκχυλίσματος (gr διαλυμένων στερεών/100 gr διαλύματος)

Εισαγωγή και Σκοπός της Εργασίας

Εκτός του *S. cerevisiae* και των άλλων ζυμών του γένους *Saccharomyces*, υπάρχει και μια άλλη κατηγορία ζυμών γνωστές και ως *non-Saccharomyces* ή εναλλακτικές ζύμες. Αν και πιο παλιά θεωρούνταν δευτερεύουσας σημασίας και πολλές φορές ανεπιθύμητες καθώς αλλοίωναν το προϊόν και υπήρχαν κυρίως στις αυθόρμητες ζυμώσεις. Οι ζύμες αυτές τείνουν να ζυμώνουν πιο αργά και να έχουν μικρότερες αντοχές (όπως π.χ. σε αλκοόλη) από τον *S. cerevisiae*. Σε ορισμένες περιπτώσεις χρησιμοποιούνται επιλεγμένα στελέχη *non-Saccharomyces* μαζί με στελέχη *Saccharomyces* σε μικτές καλλιέργειες στην παραγωγή οίνου με σκοπό τη αύξηση της πολυπλοκότητας των προϊόντων. Υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός από στελέχη αυτών των ζυμών και τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει αρκετές έρευνες σχετικά με την απομόνωση νέων στελεχών και την χρήση τους στην δημιουργία διαφόρων αλκοολούχων ποτών.

Σε αυτήν την εργασία εξετάζεται η *non-Saccharomyces* ζύμη *L. thermotolerans* και ειδικότερα το εμπορικό στέλεχος (Philly Sour) της εταιρείας *Lallemand*, η οποία έχει εμφανίσει ιδιαίτερο επιστημονικό ενδιαφέρον στον τομέα της ζυθοποιίας και συγκεκριμένα στην ικανότητα να παράγει ξινές μπύρες. Αν και παραδοσιακά οι ξινές μπύρες παράγονται με παρουσία βακτηρίων αρκετοί μικροζυθοποιοί που επιθυμούν να παράξουν τέτοιες μπύρες αντιμετωπίζουν τον φόβο των επιμολύνσεων του εξοπλισμού τους. Η συγκεκριμένη ζύμη λόγω της ικανότητας της να παράγει υψηλές οξύτητες και διαφορετικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά σε σχέση με τα στελέχη *S. cerevisiae*, αποτελεί μια εναλλακτική λύση σε αυτό το πρόβλημα και διευκολύνει την απολύμανση του εξοπλισμού.

Η παρούσα μελέτη εξετάζει την ανάπτυξη της *L. thermotolerans* σε διαφορετικές συνθήκες ζύμωσης, όπως: διαφορετικές θερμοκρασίες ζύμωσης, ανάπτυξη σε διαφορετικά υποστρώματα σακχάρων, διαφορετικές αρχικές πυκνότητες του γλεύκους, διαφορετικές τιμές IBU, διαφορετική ποσότητα αρχικού εμβολίου (pitching rate) και διαφορετικές τιμές αρχικού pH. Ο σκοπός είναι να γίνει σύγκριση της ανάπτυξης μεταξύ της *L. thermotolerans* και του *S. cerevisiae*, καθώς και το πώς επιδρούν αυτές οι διάφορες συνθήκες στην εξέλιξη της ζύμωσης με *L. thermotolerans* αλλά και στα χαρακτηριστικά του ζύθου, όπως απόδοση σε αλκοόλη, τελικό pH, οξύτητα, χρώμα, βαθμό ζύμωσης, τελικό εκχύλισμα και στις παραγόμενες αρωματικές ενώσεις.

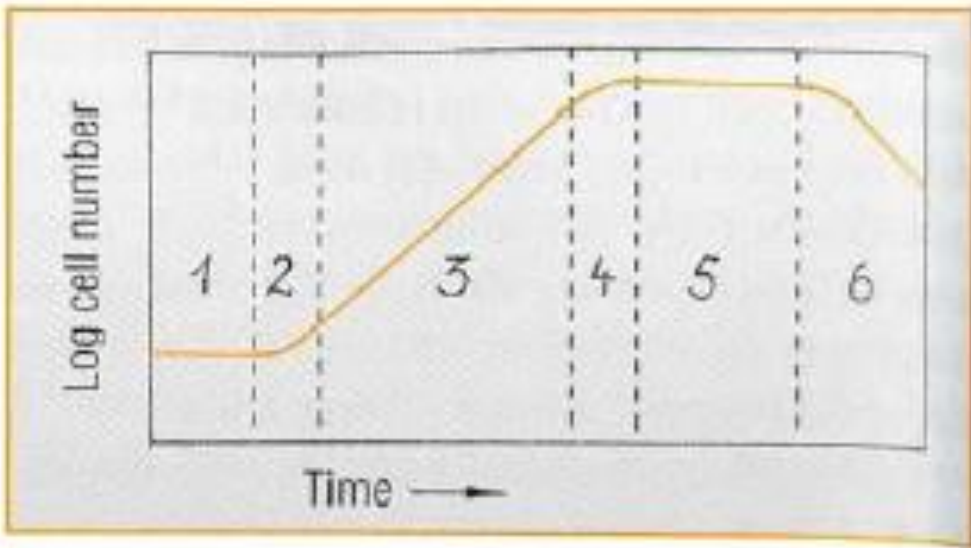
1. Θεωρητικό Μέρος

1.1 Ζύμες και η επίδραση διαφόρων παραγόντων στις ζυμώσεις

1.1.1 Γενικά χαρακτηριστικά των ζυμών

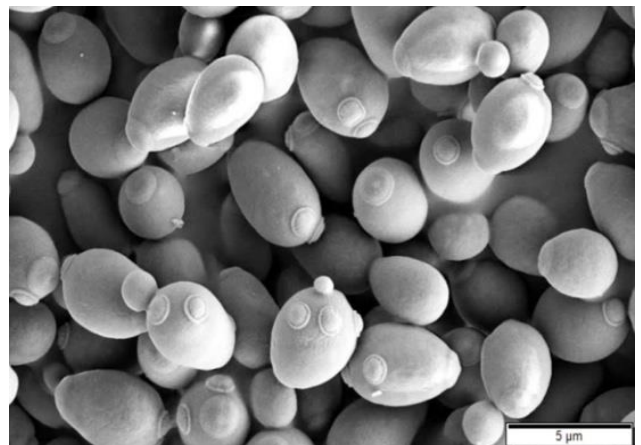
Οι ζυμομύκητες είναι κυρίαρχα μέλη του οικοσυστήματος των μυκήτων και υπάρχουν περίπου 1.500 αναγνωρισμένα είδη που κατανέμονται μεταξύ των ασκομυκήτων και των βασιδιομυκητών (Kurtzman & Fell 2006). Οι περισσότεροι από τους οργανισμούς στο βασίλειο των μυκήτων είναι πολυκύτταροι. Ωστόσο, οι ζυμομύκητες είναι μονοκύτταροι και αναπαράγονται με εκβλάστηση ή σχάση. Σήμερα είναι γνωστό ότι υπάρχουν 100 γένη τέτοιων μυκήτων, που περιλαμβάνουν περισσότερα από 700 είδη (Jolly, et al., 2006). Ένα κύτταρο ζύμης είναι περίπου 5-10 μm σε διάμετρο και έχει συνήθως σφαιρικό, κυλινδρικό ή ωοειδές σχήμα. Οι ζύμες ανάλογα με τον τρόπο παραγωγής τους χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες στις σπορογόνες και στις ασπορογόνες. Οι σπορογόνες πολλαπλασιάζονται με εκβλαστήσεις (αγενώς) και με σπόρια (εγγενώς), ενώ οι ασπορογόνες παράγονται μόνο με εκβλαστήσεις. Η αγενής αναπαραγωγή των ζυμών γίνεται με κυτταρική διαίρεση, με σχάση ή με εκβλάστηση ή με τον συνδυασμό και των δύο. Η αφυλετική αναπαραγωγή είναι η διαδικασία κατά την οποία ένα κύτταρο ζύμης πολλαπλασιάζεται δημιουργώντας ένα νέο θυγατρικό κύτταρο. Ο διαχωρισμός των κύτταρων επιτυγχάνεται όταν τα στρώματα του κυτταρικού τοιχώματος διαχωριστούν και δημιουργηθεί το νέο κύτταρο (Hill 2015). Οι ζύμες προκαλούνται συνεχώς από στρεσογόνα περιβάλλοντα λόγω της θερμοκρασίας, της έλλειψης οξυγόνου, της οξύτητας των περιορισμένων ποσοτήτων αζώτου, λιπιδίων, βιταμινών, ιχνοστοιχείων ή ανόργανων αλάτων κ.α. Ειδικότερα, ένα από τα πιο σημαντικά προβλήματα για τις ζύμες είναι η χαμηλή διαθεσιμότητα αζώτου που μπορεί να βρεθεί στο περιβάλλον τους (Brice et al., 2018).

Η ανάπτυξη όλων των ειδών ζύμης αποτελείται έξη φάσεις (εικόνα 1), τη λανθάνουσα, την ανάπτυξη, την εκθετική ανάπτυξη, τη επιβράδυνση, τη στατική και τη φάση θανάτου (Kunze 2004). Οι ζύμες δρουν μετατρέποντας τα σάκχαρα (όπως πχ γλυκόζη, φρουκτόζη και μαλτόζη) σε αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα, μέσω της διαδικασίας της αλκοολικής ζύμωσης. Οι ζύμες όταν λειτουργούν υπό αναερόβιες συνθήκες, μετατρέπουν τα σάκχαρα σε πυροσταφυλικό οξύ μέσω της γλυκολιτικής οδού και αυτό ύστερα μετατρέπεται κυρίως σε αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα (Queiroi et al., 2018). Η χρήση των ζυμομυκήτων από τους ανθρώπους πιστεύεται ότι ξεκίνησε 7000 χρόνια πριν, από χυμούς ή και φρούτα τα οποία αφήθηκαν σπασμένα σε νερό και τελικά ζύμωσαν, καθώς βρίσκονται ζύμες στον καρπό τους και στον αέρα. Οι ζυμομύκητες στην συνέχεια προστέθηκαν σκόπιμα μέσω υγρών που ζύμωναν και σε άλλες πηγές σακχάρων όπως βύνη ή άλλα φυτικά υλικά, για την παραγωγή πολλών αλκοολούχων ποτών (Duina et al., 2014) χωρίς φυσικά να είναι γνωστοί.



Εικόνα I: Φάσεις ανάπτυξης ζύμης: (1)λανθάνουσα φάση, (2)φάση ανάπτυξης, (3)εκθετική φάση, (4)φάση επιβράδυνσης, (5)στατική φάση, (6)φάση θανάτου. (Kunze 2004 σελ. 88)

1.1.2 *Saccharomyces cerevisiae*



Εικόνα II: Η ζύμη *S. cerevisiae* από το μικροσκόπιο (https://en.wikipedia.org/wiki/Saccharomyces_cerevisiae)

Ο *Saccharomyces cerevisiae* είναι κοινώς γνωστός ως ζύμη της αρτοποιίας ή ζύμη της ζυθοποιίας και της οινολογίας. Είναι ο πιο γνωστός ζυμομύκητας και θεωρείται μικροοργανισμός μοντέλο για τις ζύμες. Ανήκει στην τάξη των ασκομυκήτων (*Phylum Ascomycota*). Το σχήμα των κυττάρων του είναι σχετικά μεγάλο και ωοειδές 5-10 μm σε διάμετρο και αναπαράγεται με εκβλάστηση. Τα στελέχη του *S. cerevisiae* είναι γνωστά για την ικανότητά τους να ζυμώνουν σάκχαρα και να παράγουν αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα, δημιουργώντας έτσι μια ποικιλία από ποτά. Σε ένα τυπικό απλοειδές εκκολαπτόμενο κύτταρο ζύμης, τα περίπου 12.000 kb γονιδιωματικού DNA υποδιαιρούνται σε 16 χρωμοσώματα, που πιστεύεται ότι έχουν προκύψει μετά από ένα αρχαίο γεγονός επανάληψης ολόκληρου-γονιδιώματος από ένα προγονικό σύνολο από 8 διαφορετικά χρωμοσώματα. Το 1996, το γονιδίωμα του *S. cerevisiae* έγινε το πρώτο πλήρες αλληλουχικό γονιδίωμα που μελετήθηκε πλήρως (Duina et al., 2014). Πρόκειται για μια

ισχυρή ζύμη ικανή να αντέχει στις συνθήκες στρες. Έχει υψηλή απόδοση ζύμωσης, ταχεία ανάπτυξη, αποτελεσματική κατανάλωση σακχάρων, ικανότητα παραγωγής αιθανόλης, αντοχή στις υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης και χαμηλά επίπεδα οξυγόνου, αντοχή στο οσμωτικό στρες, όπως επίσης στο στρες λόγω θερμοκρασίας και κυτταρική δραστηριότητα σε όξινα περιβάλλοντα, τα οποία είναι θεμελιώδη για τη βιομηχανική χρησιμότητα του (Reis et al., 2014).

Τέλος, ο *S. cerevisiae* υποστηρίζεται ότι ήταν η βασικότερη ζύμη στις αυθόρμητες ζυμώσεις απρογραμμάτιστα συνεχίστηκαν να γίνονται με αυτό τον μικροοργανισμό για αρκετά χρόνια. Με την πάροδο των χρόνων, ξεκίνησαν να αντιλαμβάνονται οι επιστήμονες αυτό που πραγματικά συνέβαινε κατά τη ζύμωση, και εκείνη τη στιγμή αναγνωρίστηκε και επίσημα ως κυρίαρχη ζύμη για την παραγωγή της μπίρας και του κρασιού (Basso et al., 2016). Μετά από χρόνια έρευνας, η σημερινή γνώση για τον τρόπο λειτουργίας του *S. cerevisiae*, τις συνθήκες ζύμωσης, το χρόνο και τις ρυθμίσεις ζύμωσης, όπως και τον τρόπο μεταβολισμού των σακχάρων και των αμινοξέων, έχει εξελιχθεί και βελτιωθεί. Αποτέλεσμα αυτού, είναι ότι έχει την δυνατότητα να παράγουν ένα προϊόν, το οποίο δίνει μια σταθερή ποιότητα με επιθυμητά χαρακτηριστικά με ευκολία και ταχύ ρυθμό (Michel et al., 2016).

1.1.3 Επίδραση της θερμοκρασίας στην ανάπτυξη του πληθυσμού των ζυμών

Πολλοί παράγοντες επηρεάζουν την αλκοολική ζύμωση και ως εκ τούτου την ποιότητα του προϊόντος. Ένας από αυτούς είναι η θερμοκρασία ζύμωσης. Η θερμοκρασία της ζύμωσης επηρεάζει τους μικροοργανισμούς, οι οποίοι υπάρχουν στο γλεύκος και τον μεταβολισμό τους. Με αυτό τον τρόπο, καταλήγουν να επηρεάζονται σημαντικά δευτερογενείς μεταβολίτες, όπως είναι η γλυκερόλη, το οξικό οξύ, το ηλεκτρικό οξύ, κ.α. (Torija et al., 2003). Κάποιες μελέτες έχουν αναλύσει περαιτέρω το πώς επηρεάζει η θερμοκρασία τη δυναμική του πληθυσμού των ζυμών και συγκεκριμένα των στελεχών του *Saccharomyces cerevisiae*, κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης. Η ανάπτυξη της ζύμης ποικίλλει ανάλογα με την θερμοκρασία. Η συνήθης καμπύλη ανάπτυξης έχει παρατηρηθεί να έχει μορφή εκθετικής φάσης, στατικής φάσης και φάσης θανάτου στους 25 °C και 30 °C. Στις υψηλές θερμοκρασίες παρατηρήθηκε ότι πέθανε μεγάλος πληθυσμός ζυμομυκήτων. Αυτή η υψηλή θνησιμότητα στη ζύμη προκαλεί συνήθως μια πιο αργή τελική ζύμωση και μπορεί να δημιουργήσει διακοπή ζύμωσης με υψηλά ποσοστά αζύμων τελικών σακχάρων. Η βιωσιμότητα των ζυμών μειώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας. Αυτή η μείωση πιστεύεται ότι οφείλεται σε μεγαλύτερη συσσώρευση ενδοκυτταρικής αιθανόλης λόγω υψηλότερων θερμοκρασιών, πράγμα που θα μπορούσε να παράγει μια κυτταρική τοξικότητα όπου θα άλλαζε τη δομή της κυτταρικής μεμβράνης, μειώνοντας έτσι τη λειτουργικότητά του κύτταρου. Είναι γνωστό ότι η ζύμωση στους 35 °C είναι πολύ περιορισμένη και δίνει ένα πρόωρο τέλος στην ζύμωση. Αυτό σημαίνει ότι η ζύμωση είναι ατελής και η συγκέντρωση της αιθανόλης είναι χαμηλή. Επίσης, η ανοχή στην αιθανόλη ορισμένων ειδών ζύμης εξαρτάται από τη θερμοκρασία και αυτό μπορεί να συμβεί και σε ορισμένα στελέχη του *Saccharomyces*. Η θερμοκρασία επηρεάζει όχι μόνο την κινητική της ζύμωσης, αλλά και τον μεταβολισμό. Οι αλκοολικές ζυμώσεις σε χαμηλές θερμοκρασίες γίνονται συχνότερες λόγω της επιθυμίας παραγωγής κρασιών με πιο έντονα αρωματικά προφίλ. Ωστόσο, το μεγαλύτερο μειονέκτημά τους είναι ο υψηλός κίνδυνος κεκολλημένων και αργών ζυμώσεων (Torija et al., 2003).

Η χαμηλή θερμοκρασία είναι μία από τις σημαντικότερες περιβαλλοντικές πιέσεις που επηρεάζουν την ανάπτυξη των ζωντανών οργανισμών. Όπως τα περισσότερα χαρακτηριστικά βιοχημικής σημασίας σε

ζύμες, η προσαρμογή σε χαμηλή θερμοκρασία είναι ένα πολυγενές χαρακτηριστικό που ρυθμίζεται από πολλούς τρόπους αλληλεπίδρασης. Κάποιοι βασικοί καθοριστικοί παράγοντες της προσαρμογής σε χαμηλές θερμοκρασίες είναι η γενετική μεταβολή των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών και η κατανομή των φωσφολιπιδίων στη μεμβράνη του πλάσματος. Στη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*, οι μειώσεις της θερμοκρασίας του περιβάλλοντος έχουν εκτεταμένες επιπτώσεις στην ανάπτυξη και την επιβίωση του. Σε χαμηλές θερμοκρασίες (<15 - 10°C), ο μεταβολισμός και οι ρυθμοί ανάπτυξης είναι χαμηλότεροι. Αυτό ισχύει και για τη βιομηχανική εκμετάλλευση της ζύμης, καθώς ορισμένες ζυμώσεις κρασιού λαμβάνουν χώρα στους περίπου >12-15 °C. Οι χαμηλές θερμοκρασίες χρησιμοποιούνται στις ζυμώσεις κρασιού για να διατηρήσουν τις αρωματικές ενώσεις, οι οποίες επιτρέπουν την παραγωγή λευκών και «ροζέ» οίνων με μεγαλύτερη αρωματική πολυπλοκότητα. Γενικά ισχύει ότι οι ζύμες επιβάλλονται σε σημαντικό στρές κατά τη ζύμωση σε υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων στο γλεύκος, γεγονός που οδηγεί σε υψηλή ωσμωτική πίεση. Καθώς προχωρά η ζύμωση, η υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης, η χαμηλή συγκέντρωση αζώτου, ή ακόμη και η παρουσία SO₂ ή άλλων χημικών, επιβάλλουν περαιτέρω πίεση. Για τη ζύμωση σε χαμηλές θερμοκρασίες, λόγω της μη αντοχής του *S. cerevisiae*, συνήθως επιλέγονται στελέχη του είδους *S. bayanus* (στον οίνο) και *S. pastorianus* (στο ζύθο) τα οποία είναι κρυοανθεκτικά (Tataridis et al., 2011)

Εκτός από αυτές τις εγγενείς δυσκολίες της διαδικασίας, οι θερμοκρασίες κάτω από το βέλτιστο εύρος επηρεάζουν την ανάπτυξη ζύμης, τους ρυθμούς ζύμωσης και προκαλούν τόσο παρατεταμένη λανθάνουσα φάση, όσο και την παραγωγή κολλημένων και αργών ζυμώσεων (García-Ríos et al., 2017). Επίσης, σε χαμηλές θερμοκρασίες ορισμένων περιπτώσεων παρατηρήθηκε ότι δεν υπήρξε πολλές φορές φάση θανάτου, αλλά μονό στατική φάση, η όποια και διήρκεσε μέχρι και το τέλος της ζύμωσης. Βρέθηκε, βεβαία, ότι μερικά στελέχη ζυμών επιβιώνουν και κυριαρχούν πιο εύκολα σε σύγκριση με αλλά σε χαμηλές θερμοκρασίες, ενώ άλλα σε υψηλές. Μελέτη έδειξε ότι, όταν τα στελέχη *Saccharomyces* και τα *non-Saccharomyces* αναπτύχθηκαν στο ίδιο μέσο, τα δεύτερα μπόρεσαν να κυριαρχήσουν στη ζύμωση με χαμηλές θερμοκρασίες (Torija et al., 2003). Βιοχημικά, ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν στους 35 °C παρουσίασαν πολύ υψηλές συγκεντρώσεις φωσφατιδυλινοσιτόλης, ενώ στους 15 °C τα στελέχη του *Saccharomyces cerevisiae* παρουσίασαν υψηλότερα επίπεδα φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης και φωσφατιδυλοχολίνης με λιπαρά οξέα μέσης αλυσίδας. Επιπλέον, οι συγκεντρώσεις της εργοστερόλης στην κυτταρική μεμβράνη ήταν υψηλότερη στο στέλεχος ζυμομυκήτων που παρουσίασε κεκολλημένες ζυμώσεις και στις τρεις θερμοκρασίες. Ως αποτέλεσμα, συμπεραίνεται ότι ο μηχανισμός του *S. cerevisiae* που ρυθμίζει τη σύνθεση λιπιδίων της μεμβράνης, φαίνεται να είναι κατά κάποιο τρόπο εξαρτώμενος από τη θερμοκρασία (Henderson et al., 2013). Όσα κύτταρα ζύμης αναπτύσσονται σε χαμηλές θερμοκρασίες, καταναλώνουν μικρότερες ποσότητες αζώτου από όταν βρίσκονται στους 25 °C. Πιο συγκεκριμένα, οι ζύμες στους 13 °C φαίνεται να καταναλώνουν λιγότερο αμμώνιο και γλουταμίνη και περισσότερη ποσότητα τρυπτοφάνης. Η χαμηλή θερμοκρασία γενικά φαίνεται να επηρεάζει την ποσότητα και την ποιότητα των απαιτήσεων αζώτου του κύτταρου της ζύμης (Beltran et al., 2007).

Σε άλλες έρευνες η χαμηλή θερμοκρασία φαίνεται ότι επηρεάζει μια ποικιλία κυτταρικών διεργασιών. Προηγούμενες μελέτες διαπίστωσαν ότι η μετάφραση των πρωτεϊνών, η ρευστότητα των κυτταρικών μεμβρανών, η σταθερότητα της δευτερογενούς δομής RNA, η ενζυματική δραστηριότητα, η αναδίπλωση των πρωτεϊνών και η ρύθμιση των πρωτεϊνών θερμοκικού σοκ επηρεάζονται σημαντικά από την ανάπτυξη της ζύμης σε χαμηλές θερμοκρασίες (Redón et al., 2012). Οι συνέπειες είναι η μείωση της μεταφοράς και η συσσώρευση λανθασμένων πρωτεϊνών καθώς και η μειωμένη ενζυμική δραστηριότητα. Βέβαια, η διάρκεια της έκθεσης επηρεάζει τον τρόπο και τον τύπο της αντίδρασης σε οποιαδήποτε στρεσογόνα

συνθήκη. Η ξαφνική έκθεση σε διαφορετικές περιβαλλοντικές αλλαγές είναι πιθανό να προκαλέσει μια γρήγορη, πολύ δυναμική αντίδραση στο στρες που έχει ως στόχο την προσαρμογή τους στο νέο περιβάλλον (Redón et al., 2012).

Οι ζύμες αντιδρούν σε αυτές τις αλλαγές τροποποιώντας τις κυτταρικές τους λειτουργίες, όπως είναι η φωσφορυλίωση πρωτεϊνών και άλλων μακροπρόθεσμων επιδράσεων που περιλαμβάνουν μεταγραφικές αλλαγές (Schade et al., 2004). Βέβαια, η εκτεταμένη έκθεση σε ακραίες, αλλά όχι θανατηφόρες συνθήκες, οδηγεί στον εγκλιματισμό τους, δηλαδή στη ανάπτυξη μιας φυσιολογικής κατάστασης, στην οποία οι μηχανισμοί που καθορίζουν την λειτουργία της ζύμης προσαρμόζονται στις δύσκολες περιβαλλοντικές συνθήκες. Ορισμένες μελέτες έχουν αναλύσει την μεταγραφική απόκριση του *S. cerevisiae* σε όλο το γονιδίωμα τόσο κατά τη διάρκεια της προσαρμογής (σε απότομη μείωση της θερμοκρασίας από 30 έως 10 °C) όσο και κατά τη διάρκεια του εγκλιματισμού σε βέλτιστες θερμοκρασίες που δεν είναι περιοριστικές για την ανάπτυξη του (13 °C) (Redón et al., 2012). Οι Schade et al., (2004) εντόπισαν δύο ξεχωριστές ομάδες γονιδίων που χωρίζονται σε δύο φάσεις κατά την αντίδραση των ζυμών στο στρες σε χαμηλές θερμοκρασίες. Αρχικά μια πρώιμη ανταπόκριση στο κρύο περιβάλλον (ECR) εμφανίζεται εντός των πρώτων 2 ωρών μετά την έκθεση σε χαμηλή θερμοκρασία και δεύτερον μια καθυστερημένη ανταπόκριση στις κρύες θερμοκρασίες (LCR), που εμφανίζεται 13 ώρες ή αργότερα μετά την έκθεση. Το RNA και ο μεταβολισμός των λιπιδίων εμπεριέχουν γονίδια ECR. Αντιθέτως, στη διάρκεια της LCR λειτουργούν γονίδια, τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες, που με την βοήθειά τους προστατεύουν το κύτταρο από διάφορες στρεσογόνες συνθήκες (Redón et al., 2012). Μόνο μια ομάδα γονιδίων, που εμπλέκονται στον μεταβολισμό των λιπιδίων, έδειξε παρόμοια ρύθμιση τόσο κατά την προσαρμογή (ψυχρό σοκ) στο κρύο περιβάλλον όσο και στον εγκλιματισμό της ζύμης σε αυτό (συνεχής ανάπτυξη σε χαμηλή θερμοκρασία) (Redón et al., 2012). Έτσι είναι λογικό η θερμοκρασία να επηρεάζει και τα τελικά προϊόντα της ζύμωσης. Αναλυτικότερα, έχει παρατηρηθεί ότι η αύξηση της θερμοκρασίας από 12 σε 24 °C οδηγεί σε μείωση της αιθανόλης, του μηλικού και του κιτρικού οξέος. Αντίθετα, όμως σε αύξηση στις συγκεντρώσεις της γλυκερόλης και της ολικής οξύτητας. Η θερμοκρασία ζύμωσης επηρεάζει επίσης και τις παραγόμενες πτητικές ενώσεις. Σε χαμηλές θερμοκρασίες βρεθήκαν υψηλότερες ποσότητες εστέρων, και πιο συγκεκριμένα οξικού ισοαμυλεστέρα, οξικού αιθυλεστέρα, οξικού ισοβουτύλιου, βουτυρικού αιθυλεστέρα και εξανοϊκού αιθυλεστέρα. Αλλά, παρατηρήθηκε ότι η ισοβουτανόλη, η προπαν-1-όλη, η 2-μεθυλ βουτανόλη, η ακεταλδεΐδη και η ακετόνη είναι σε χαμηλότερη ποσότητα (Tanguier 2013). Βέβαια έχει παρατηρηθεί ότι τα κύτταρα των ζυμών υπό συνθήκες στρες ενεργοποιούν μηχανισμούς άμυνας με αλλαγές στη σύνθεση της κυτταρικής μεμβράνης, μαζί με αυξημένα επίπεδα συμβατών διαλυμένων ουσιών όπως η γλυκερόλη και τρεχαλόζη, που προσδίδουν στα κύτταρα την ικανότητα να επιβιώνουν για μεγάλο χρονικό διάστημα υπό ακραίες συνθήκες. (Logothetis et al., 2014)

1.1.4 Η επίδραση των διαφορετικών σακχάρων στην ζύμωση

Διάφοροι παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν την πορεία της ζύμωσης. Έτσι, τα είδη και τα στελέχη της ζύμης, τα οποία υπάρχουν κατά τη διάρκεια της διαδικασίας, επηρεάζονται σε ορισμένες περιπτώσεις από τις αρχικές συγκεντρώσεις σακχάρων, όπως είναι η γλυκόζη, η φρουκτόζη και η μαλτόζη (Noé Arroyo-López et al., 2009). Σε αναερόβιες συνθήκες είναι γνωστό ότι παρατηρείται η διαδικασία της ζύμωσης, δηλαδή η κατανάλωση των σακχάρων και η παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα και αιθανόλης γνωστή και ως εξίσωση Gay-Lussac. $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CH_2OH + 3CO_2$ (Angustia et al., 2014).

Μερικά από τα πιο κοινά σάκχαρα που υπάρχουν στο γλεύκος και χρησιμοποιούνται για την ζύμωση είναι η γλυκόζη, η φρουκτόζη και η σακχαρόζη και ανάλογα το προϊόν η μαλτόζη σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και είναι φυσικό να επηρεάζουν τα χαρακτηριστικά του προϊόντος που παράγεται όπως: είναι η συγκέντρωση αλκοόλης, η ποσότητα του CO₂ και διάφορα τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Ένας από τους κύριους τρόπους που μπορεί να επηρεαστεί η ζύμωση είναι με τη χρήση διαφορετικών σακχάρων. Η γλυκόζη και η φρουκτόζη είναι μονομερή σάκχαρα. Αυτό σημαίνει ότι έχουν μικρότερη δομή που δεν είναι συνδεδεμένη με άλλους μονοσακχαρίτες. Αντίθετα, η σακχαρόζη είναι ένας δισακχαρίτης, ο οποίος έχει 50/50 γλυκόζη και φρουκτόζη. Η σακχαρόζη όταν διασπάται είναι στην ουσία ένας συνδυασμός ίσης ποσότητας γλυκόζης και φρουκτόζης. Αυτό σημαίνει ότι η ζύμη θα χρειαστεί περισσότερο χρόνο για να σπάσει τους δεσμούς, έτσι η διαδικασία της αναπνοής θα συμβαίνει για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Επιπλέον, είναι αναγκαίο η φρουκτόζη του κυττάρου, για να χρησιμοποιηθεί, χρειάζεται να μετατραπεί σε γλυκόζη. Η ινβερτάση, είναι το ένζυμο που βοηθά να διασπαστεί η σακχαρόζη στα συστατικά μονομερή της στο κύτταρο της ζύμης.

Συγκεκριμένα, λοιπόν, όταν η ζύμη καταναλώσει σχεδόν όλη την γλυκόζη, αρχίζει μετά να χρησιμοποιεί την φρουκτόζη (Emberlin et al., 2018). Άλλες μελέτες έδειξαν ότι κάποια στελέχη ζυμομυκήτων καθυστερούν την ανάπτυξή τους σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης. Για συγκεντρώσεις σακχάρων από 200 g/L έως 300 g/L παρατηρείται ένας μειωμένος ρυθμός ανάπτυξης για τον *S. cerevisiae*, και συγκεκριμένα ο χαμηλότερος ρυθμός ανάπτυξης ήταν στις μεγάλες συγκεντρώσεις γλυκόζης (Argoyo-López et al., 2009), λόγω της αυξημένης ωσμωτικής πίεσης. Όταν η γλυκόζη και η φρουκτόζη ζυμώνονται ξεχωριστά, τα δύο σάκχαρα φάνηκε να χρησιμοποιούνται σε παρόμοιο βαθμό. Ωστόσο, όταν οι ζυμώσεις διεξάγονται σε μέσα που περιέχουν ίσες συγκεντρώσεις γλυκόζης και φρουκτόζης, η γλυκόζη έχει παρατηρηθεί ότι καταναλώνεται περίπου σε διπλάσιο βαθμό από την φρουκτόζη. Επίσης, αυτή η προτίμηση στην γλυκόζη παρατηρήθηκε και όταν η σακχαρόζη, η οποία πρώτα είχε υδροληθεί σε γλυκόζη και φρουκτόζη, χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα. Η κινητική ανάλυση της πρόσληψης γλυκόζης και φρουκτόζης στον *Saccharomyces cerevisiae* έχει δείξει μια υψηλότερη προτίμηση για τη γλυκόζη από τη φρουκτόζη (D'Amore et al., 1989). Επιπλέον, η γλυκόζη ανέστειλε την πρόσληψη φρουκτόζης κατά 60% και παρομοίως η φρουκτόζη ανέστειλε την πρόσληψη γλυκόζης κατά 40%. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η γλυκόζη και η φρουκτόζη μοιράζονται τους ίδιους τρόπους μεταφοράς στην κυτταρική μεμβράνη των ζυμών (D'Amore et al., 1989).

Τα τελευταία χρόνια σε διάφορες μελέτες αναφέρεται ότι ο ρυθμός παραγωγής της αλκοόλης από μια ζύμη περιορίζεται από το ρυθμό πρόσληψης των σακχάρων, ιδιαίτερα από την πρόσληψη της φρουκτόζης. Ο *S. cerevisiae* φαίνεται να είναι γλυκοφιλικός, αν και μερικά στελέχη παρατηρείται να έχουν μια μεγαλύτερη προτίμηση στη φρουκτόζη. Υπάρχουν διαφορές στην απόδοση της ζύμης, στον ρυθμό ανάπτυξης κυττάρων, ρυθμό παραγωγής αιθανόλης και ρυθμό κατανάλωσης των σακχάρων, χρησιμοποιώντας γλυκόζη, φρουκτόζη ή σακχαρόζη ως μόνη πηγή σακχάρων, αντίστοιχα. Όταν χρησιμοποιείται γλυκόζη ως το μοναδικό σάκχαρο, ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης ζύμης και η μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας ήταν υψηλότεροι συγκριτικά με εκείνα άλλων σακχάρων. Αντίθετα, ο μικρότερος μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης (μ_{max}) και μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας (X_{max}), που παρατηρηθήκαν ήταν όταν χρησιμοποιείται φρουκτόζη ως μοναδική πηγή άνθρακα. Έτσι, η γλυκόζη θεωρείται να είναι η πιο κατάλληλη για την παραγωγή βιομάζας. Η ζύμη αυτή φαίνεται να είναι γλυκοφιλική, αν και φαίνεται ότι όταν η φρουκτόζη και η σακχαρόζη είναι στην ίδια συγκέντρωση είναι πιο επωφελείς για την παραγωγή αιθανόλης (Wang et al., 2004).

Έχει παρατηρηθεί ότι η προσαρμογή της ζύμης πρώτα στη χρήση μαλτόζης ελαττώνει την κατασταλτική επίδραση της γλυκόζης στην πρόσληψη της μαλτόζης. Κύτταρα ζύμης προ-καλλιεργημένα σε μαλτόζη, ως μόνη πηγή άνθρακα, είναι καλύτερα προσαρμοσμένα για να χρησιμοποιούν μαλτόζη, όταν το σάκχαρο παραμένει στο μέσο ανάπτυξης. Τα προσαρμοσμένα κύτταρα σε συγκεκριμένο σάκχαρο είναι λιγότερο ευαίσθητα στην αναστολή της γλυκόζης και η πρόσληψη γλυκόζης αναστέλλεται στα αρχικά στάδια της ζύμωσης. Αλλά και τα κύτταρα της ζύμης που αναπτύσσονται για περισσότερο χρόνο ακόμα και μετά την εξάντληση όλης της μαλτόζης, χάνουν την ικανότητά τους να την χρησιμοποιούν κατά προτίμηση. Επιπλέον, γίνονται ικανά να χρησιμοποιούν γλυκόζη γρηγορότερα και γίνονται πιο ευαίσθητα στην καταστολή της, όταν η μαλτόζη υπάρχει ακόμα στο υπόστρωμα. Κατά τη διάρκεια της φάσης προσαρμογής, η μαλτόζη φαίνεται ότι ασκεί επιρροή στην σύνθεση των συστημάτων μεταφοράς της γλυκόζης (Ernandes et al., 1993). Όσο αφορά την κατανάλωση της μαλτόζης σε χαμηλές θερμοκρασίες παρατηρήθηκε, (Hollatz et al., 2005) ότι το στελέχος άγριας ζύμης *csf1D* σε υπόστρωμα με 2% συγκέντρωση σακχάρων στην κατανάλωση, μεταξύ της γλυκόζης και της μαλτόζης σε διαφορετικές θερμοκρασίες, όταν αναπτύχθηκε στους 10 και 30 °C και παρατηρήθηκε ότι οι ψυχρές θερμοκρασίες επηρεάζουν όχι μόνο την κινητική ζύμωση (ρυθμός και χρόνος ζύμωσης), αλλά και τον μεταβολισμό της ζύμης. Παρόλο που στους 30 °C η γλυκόζη ή η μαλτόζη ζυμώθηκαν αποτελεσματικά φτάνοντας ~ 10 g αιθανόλης L⁻¹, στους 10°C οι ρυθμοί ανάπτυξης μειώθηκαν, και παράχθηκαν μικρές ποσότητες αιθανόλης από την ζύμωση της μαλτόζης (~ 1,5 g αιθανόλη L⁻¹), ενώ σε αυτή τη θερμοκρασία η ζύμωση της γλυκόζης απέδωσε (~ 4,5 g αιθανόλη L⁻¹). Αυτό πιθανότατα είναι συνέπεια της υψηλότερης ζήτησης ενέργειας από την ζύμη για την συντήρηση σε χαμηλές θερμοκρασίες, επηρεάζοντας έτσι την ζύμωση της μαλτόζης λόγω της περαιτέρω ενεργειακής απαίτησης για ενεργή πρόσληψη μαλτόζης από τις ζύμες.

Η βιομηχανία δυσκολεύεται να χρησιμοποιήσει τη λακτόζη, καθώς αρκετές ζύμες δεν έχουν συνήθως την δυνατότητα να καταναλώσουν επιτυχώς αυτόν τον δισακχαρίτη. Επίσης, ο ρυθμός ζύμωσης άλλων σακχάρων, κυρίως της μαλτόζης, επηρεάζεται με την παρουσία της γαλακτόζης (Tenney 1980). Έχει εξεταστεί ότι ορισμένος αριθμός των ζυμών έχουν την ικανότητα να ζυμώνουν λακτόζη σε συνθετικά μέσα με γενετική τροποποίηση ώστε να χρησιμοποιηθούν κατά βάση στον χώρο της ζυθοποιίας (Crumplen et al., 1996). Παραδείγματος χάριν τα στελέχη *S. cerevisiae* και *S. pastorianus* (παλαιότερα *S. uvarum* ή *S. carlsbergensis*) έχουν τη δυνατότητα να ζυμώσουν τα προϊόντα υδρόλυσης της λακτόζης, όπως γλυκόζη και γαλακτόζη, αλλά δεν έχουν την ικανότητα να διασπάσουν και να ζυμώσουν την ίδια τη λακτόζη. Κατά τη πρόσληψη της γαλακτόζης υπάρχει πιθανότητα παρεμπόδισης της από τη γλυκόζη, σε σημείο να γίνονται πιο αργές ζυμώσεις και με χαμηλή απόδοση αιθανόλης (Crumplen et al., 1996). Ο *S. cerevisiae* χρησιμοποιεί τη γαλακτόζη, αλλά δεν έχει τη δυνατότητα να αφομοιώσει τη λακτόζη. Επίσης, η μελιβιόζη η οποία μεταβολίζεται από συγκεκριμένα είδη *Saccharomyces* (όπως τα *S. bayanus* και *S. pastorianus*), υδρολύεται σε γλυκόζη και γαλακτόζη από μια εκκρίσιμη α-γαλακτοσιδάση, η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο MEL1, και άλλα γονίδια της οικογένειας MEL. Είναι αναγκαίο να αναφερθεί πως ο *S. cerevisiae* είναι προσαρμοσμένος κατά βάση στη γλυκόζη, ενώ ο *K. lactis* ζυμώνει τη λακτόζη. Έτσι αυτές οι ζύμες φαίνεται έχουν πολλές διαφορές στον τρόπο ζύμωσης με αποτέλεσμα να εμφανίζονται σημαντικές συνέπειες στη συνολική τους απόκριση σε πηγές άνθρακα, που έχουν την ευθύνη για φυσιολογικές διαφορές μεταξύ των ζυμών αυτών (Domingues et al., 2010).

Υπάρχουν δύο θεμελιώδεις θεωρίες σχετικά με τη ζύμωση των δισακχαρίτων. Φαίνεται ότι οι ζύμες που ζυμώνουν λακτόζη και είναι προσαρμοσμένες στη γλυκόζη, τη γαλακτόζη ή τη λακτόζη, κατάφεραν να ζυμώσουν τη λακτόζη πιο γρήγορα από ό,τι ζύμωσαν ένα ίδιο μείγμα γλυκόζης και γαλακτόζης. Ένα

στέλεχος προσαρμοσμένο στη γλυκόζη ζύμωσε πλήρως τη λακτόζη, ενώ δεν κατάφερε να ζυμώσει τη γαλακτόζη σε μείγμα γλυκόζης και γαλακτόζης (Morrison 1948).

Η αποτελεσματική ζύμωση της μαλτοτριόζης είναι μια επιθυμητή ιδιότητα για τον *Saccharomyces cerevisiae* για την βιομηχανία. Σε ένα τυπικό γλεύκος, συνήθως υπάρχει υπολειμματική ποσότητα μαλτοτριόζης στο τελικό προϊόν. Ο κύριος περιοριστικός παράγοντας του μεταβολισμού αυτού του σακχάρου φαίνεται ότι είναι η μεταφορά του, αν και υπάρχουν αντικρουόμενες αναφορές για το εάν υπάρχει μια συγκεκριμένη περμεάση μαλτοτριόζης ή εάν οι μηχανισμοί, που είναι υπεύθυνοι για την πρόσληψη μαλτόζης, συμβάλουν επίσης για την μεταφορά της μαλτοτριόζης (Day et al., 2002). Σε μελέτες που έγιναν με ζυμομύκητες, όπου το ένα δεν περιείχε κανένα ομόλογο του AGT1, έδειξαν ότι η πρόσληψη μαλτόζης και η πρόσληψη μαλτοτριόζης ήταν ανταγωνιστικές και ότι η μαλτόζη ήταν το προτιμώμενο υπόστρωμα. Κατά μεγάλη πιθανότητα έχει σχέση με τη χαμηλή ανάγκη να καταναλώσουν μαλτοτριόζη με τον συνδυασμό συνθηκών στρες, που επικρατούν στα τελικά στάδια ζύμωσης (Day et al., 2002). Γενικά φαίνεται ότι οι ζύμες *lager-S. pastorianus* ζυμώνουν καλύτερα της μαλτοτριόζη από τις ζύμες *ale-S. cerevisiae* (Magalhães et al., 2016).

1.1.5 Επίδραση του οξυγόνου στην ζύμωση

Το οξυγόνο είναι ένα σημαντικό στοιχείο κατά την πλήρη οξειδωση της γλυκόζης, δεδομένου ότι χρησιμεύει ως τελικός δέκτης ηλεκτρονίων υπό αερόβιες συνθήκες. Την ίδια στιγμή κι άλλοι μεταβολικοί μηχανισμοί είναι αναγκαίοι για τις ζύμες, όπως η σύνθεση των δομικών συστατικών της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης η αιθανόλη συσσωρεύεται και επιδρά αρνητικά στη σταθερότητα της πλασματικής μεμβράνης. Υπό αυτήν την κατάσταση, παρέχονται μικρές ποσότητες οξυγόνου στο μέσο ανάπτυξης, που βοηθούν στη σύνθεση των ακόρεστων λιπαρών οξέων και στερολών, με κύριο συστατικό την εργοστερόλη, για την κυτταρική μεμβράνη της ζύμης. Με αυτό τον τρόπο, λοιπόν, μπορεί να παρατηρηθεί ότι οι ενώσεις αυτές χρησιμοποιούνται ως αντικαταστάτες του κατεστραμμένου μέρους της μεμβράνης λόγω της παραγωγής της αιθανόλης, που δρα ως διαλύτης. Με την αντικατάσταση των ακόρεστων λιπαρών οξέων και στερολών επιτυγχάνεται καλύτερη βιωσιμότητα των κυττάρων και έτσι επιτρέπεται στους ζυμομύκητες να ολοκληρώσουν επιτυχώς τη ζύμωση (Estela Escalante 2018).

Επίσης, αξίζει να σημειωθεί ότι σε μια άλλη έρευνα, που έγινε κατά τη διάρκεια ζυμώσεων, όταν προσδιορίστηκαν οι αποδόσεις βιομάζας σε υποστρώματα τα οποία περιέχουν γλυκόζη, μαλτόζη ή σακχαρόζη, η χρήση μεγαλύτερης ποσότητας οξυγόνου είχε ως αποτέλεσμα μια πολύ σημαντική αύξηση των αποδόσεων (από 20% σε γλυκόζη ή σε υπόστρωμα με σακχαρόζη σε 80% σε υπόστρωμα με μαλτόζη) (Pacheco et al., 2012). Από τεχνολογική άποψη, συνιστάται η παροχή μικρών ποσοτήτων οξυγόνου (στην αρχή της ζύμωσης) προκειμένου να αποφευχθούν ορισμένα μειονεκτήματα, όπως η αργή ζύμωση. Επιπλέον, βοηθά να αυξηθεί ο μεταβολισμός των ζυμομυκήτων, οι οποίοι δεν βρίσκονται σε θέση να πραγματοποιήσουν τη ζύμωση σε πλήρως αναερόβιες συνθήκες. Η βελτιστοποίηση του ρυθμού αερισμού και η παροχή οξυγόνου είναι αρκετά σημαντικές για να διασφαλιστεί η ρύθμιση του μεταβολισμού και να επιτευχθεί η υψηλότερη απόδοση αιθανόλης (Estela Escalante 2018). Τέλος πρέπει να σημειωθεί ότι η παροχή οξυγόνου δείχνει να επηρεάζει και την παραγωγή γλυκερόλης. Έτσι, καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση οξυγόνου, η παραγωγή γλυκερόλης μειώνεται. Αυτό φαίνεται να είναι ένα ενδιαφέρον εργαλείο για τον έλεγχο της μεταβολικής δραστηριότητας ειδικά των ζυμομυκήτων που

είναι non- *Saccharomyces* στην βιομηχανία. Επιπροσθέτως, ο μετασχηματισμός των φαινολών μπορεί να προκληθεί από την παροχή οξυγόνου, που χρησιμοποιείται στην οινοποίηση για να βελτιωθεί η ποιότητα των οίνων (Estela Escalante 2018).

1.1.6 Επίδραση του pH στις ζυμώσεις

Ο Norkrans (1966) ανέφερε ότι ο *Saccharomyces cerevisiae* δεν αυξάνεται σε πληθυσμό σε pH 8,0. Πρόσφατα, η επίδραση του υψηλού pH (συνήθως 8,0) μελετήθηκε σχετικά με τις αλλαγές της γονιδιακής έκφρασης και της σύνθεσης αρκετών ενζύμων, αλλά ο ρόλος τους στο πως επηρεάζει τον ζυμομύκητα σε υψηλό pH, όσον αφορά σημαντικές φυσιολογικές ή βιοχημικές αλλαγές, δεν είναι σαφής. Οι Rothstein και Demis (1953) έδειξαν ότι τόσο η προσθήκη ιόντων K^+ σε χαμηλό pH όσο και η αύξηση του pH του μέσου σε περίπου 6,0 αύξησαν τον ρυθμό της ζύμωσης. Το K^+ και το υψηλό pH δεν μπόρεσαν μόνο να αυξήσουν τους ρυθμούς της ζύμωσης, αλλά και την αναπνοή. Είναι γνωστό ότι, ανάλογα με το pH, ο *S. cerevisiae* εμφανίζει μεγάλες αλλαγές στο εσωτερικό του. Ο *S. cerevisiae* διατηρεί το εσωτερικό του pH εντός συγκεκριμένων στενών ορίων. Ωστόσο, εκτός από ορισμένα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε pH 7,5 λίγα είναι γνωστά για τις μεταβολικές αλλαγές, οι οποίες παράγονται σε υψηλές ή ακραίες τιμές που εμποδίζουν την ανάπτυξη ζύμης (Antonio et al., 2015).

Τα περισσότερα στελέχη *S. cerevisiae* αναπτύσσονται σε pH είναι μεταξύ 3,0 και 8,0 αλλά είναι οξεόφιλοι οργανισμοί και αναπτύσσονται καλύτερα σε όξινη συνθήκη. Το βέλτιστο εύρος pH για την ανάπτυξη ζυμομυκήτων μπορεί να ποικίλλει από το pH 4.00 έως 6.00, ανάλογα με τη θερμοκρασία, την παρουσία οξυγόνου, και το στέλεχος της μαγιάς. Στην αρχή της ζύμωσης, τα κύτταρα της ζύμης επηρεάζονται από το ωσμωτικό στρες λόγω της υψηλής συγκέντρωσης σακχάρων, καθώς και του pH. Το pH μπορεί επηρεάσει τη δομή του κυτταρικού τοιχώματος και αλλάζει τη διαμόρφωση των πρωτεϊνών που προεξέχουν από την πλασματική μεμβράνη. Η απώλεια της ακεραιότητας της πλασματικής μεμβράνης αυξάνει την διαπερατότητα του κυττάρου σε ιόντα και άλλους μικρούς μεταβολίτες. Σε χαμηλό αρχικό pH μικρότερο του 3.0 οι ζύμες έχουν μεγαλύτερη λανθάνουσα φάση, αναστέλλεται η ανάπτυξη της, μειωμένο ρυθμό ζύμωσης, αυξημένη τελική περιεκτικότητα οξικού οξέος και γλυκερίνης, μειωμένη τελική περιεκτικότητα σε αιθανόλη και ηλεκτρικό οξύ (Liu et al., 2015).

1.1.7 Επίδραση της αρχικής πυκνότητας και του αζώτου στις ζυμώσεις

Υπάρχουν γλεύκη κανονικής πυκνότητας, αλλά και υψηλής πυκνότητας με διαφορετικές απαιτήσεις σε επίπεδα αζώτου που επηρεάζουν την ζύμωση και τον σχηματισμό των διάφορων αρωματικών ουσιών. Έχει παρατηρηθεί ότι η πυκνότητα και το επίπεδο του αζώτου έχουν σοβαρές συνέπειες όσον αφορά τον ρυθμό ανάπτυξης, τη βιωσιμότητα, την κροκίδωση, τη γονιδιακή έκφραση της ζύμης και τα παραγόμενα επίπεδα των αρωματικών ουσιών στο τελικό προϊόν. (Lei et al., 2012) Γενικά όσο αυξημένα είναι τα σάκχαρα/πυκνότητα, τόσο μεγαλύτερη η απαίτηση σε αφομοιώσιμο άζωτο. Επίσης, η πυκνότητα του γλεύκους και το επίπεδο του αζώτου επηρεάζουν αρκετά τη φυσιολογία της ζύμης και την ισορροπία της γεύσης τη στιγμή της παραγωγής τους (Lei et al., 2012). Μια μέθοδος παραγωγής, είναι η ζυθοποίηση με υψηλές πυκνότητες. Βέβαια, έχει πολλά αρνητικά σχετικά με τη φυσιολογία της ζύμης (π.χ. η αυξημένη ωσμωτική πίεση, το στρες και η τοξικότητα της αιθανόλης μειώνουν τη βιωσιμότητα

και τους ρυθμούς ζύμωσης) επηρεάζοντας αρνητικά την ποιότητα της μπίρας (π.χ. αλλοιωμένη παραγωγή αρωματικών ουσιών, μειωμένη σταθερότητα αφρού, μειωμένη αξιοποίηση λυκίσκου) (Gibson et al., 2007). Το ελεύθερο αμίνο άζωτο (FAN) προβλέπει την ανάπτυξη της ζύμης, τη βιωσιμότητα, την απόδοση μιας ζύμωσης, την ποιότητα και τη σταθερότητα της μπίρας.

Η προσθήκη σιροπιών σακχάρων ως προσθετά σε γλεύκος με κανονική πυκνότητα (12–14°P) είναι μια δημοφιλής προσέγγιση για την αύξηση της πυκνότητας και χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία ζυθοποιίας. Ωστόσο, θα ελαττώσουν επίσης την περιεκτικότητα του γλεύκους σε ελεύθερο αμίνο άζωτο (FAN). Πρέπει να διευκρινιστεί ότι αυτά τα προσθετά δεν περιέχουν ποσότητες αζώτου. Το FAN αποτελείται από αμινοξέα και μικρά πεπτιδία στο γλεύκος όπου χρησιμοποιούνται από τις ζύμες για να διασφαλιστεί η αποτελεσματική ανάπτυξη των κυττάρων και ως εκ τούτου η επιθυμητή απόδοση της ζύμωσης (O'Connor-Cox & Ingledew 1989). Γενικά, οι απαιτήσεις FAN για γλεύκος 12°P είναι στο εύρος από 140–150 mg/L, ενώ στο γλεύκος με >18°P απαιτείται FAN 280 mg/L. Σε κάποιο βαθμό βέβαια, οι απαιτήσεις σε FAN είναι συγκεκριμένες για το κάθε στέλεχος ζύμης ξεχωριστά (Boulton & Quain, 2001). Η προσθήκη πρόσθετων (adjuncts) δηλαδή σιτηρών εκτός βύνης (όπως π.χ. σιτάρι, σόργο, βρόμη, καλαμπόκι κ.α.) στο γλεύκος για την αύξηση της πυκνότητας έχει ως αποτέλεσμα τροποποίηση της ισορροπίας των θρεπτικών συστατικών. Η αυξημένη αρχική πυκνότητα με την προσθήκη σιροπιών στο γλεύκος θα μείωνε τη διαθέσιμη περιεκτικότητα σε αμινοξέα και οι χαμηλότεροι ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης θα οδηγούσαν σε χαμηλότερους ρυθμούς πρόσληψης αμινοξέων (Lekkas et al., 2007). Τέτοιες ζυμώσεις συνδέονται επίσης με ένα τροποποιημένο (μη φυσιολογικό) πρότυπο πρόσληψη σακχάρων και μεταβαλλόμενα επίπεδα ορισμένων πτητικών ουσιών που παράγονται (ειδικά τα αυξημένα επίπεδα οξικού αιθυλεστέρα και οξικού ισοαμυλεστέρα). Από την άλλη πλευρά, για να εξασφαλιστούν οι βέλτιστοι ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης και επιτυχής ζύμωσης, είναι απαραίτητη η υψηλότερη περιεκτικότητα σε FAN σε γλεύκη με υψηλότερη πυκνότητα σε σύγκριση με εκείνη με χαμηλότερη πυκνότητα (Lei et al., 2012).

Η σύνθεση των πτητικών ενώσεων που σχηματίζονται από τη ζύμη κατά τη διάρκεια της ζύμωσης είναι ένα από τις πιο σημαντικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά στις μπίρες. Σε αυτές τις πτητικές ενώσεις οι ανώτερες αλκοόλες και οι εστέρες θεωρούνται γενικά ως οι πιο σημαντικές ενώσεις και συμβάλλουν στη ποιότητα της τελικής μπίρας σημαντικά. Η συμπλήρωση του γλεύκους με βαλίνη, ισολευκίνη και λευκίνη, επάγουν στο σχηματισμό ισοβουτανόλης, αμυλικής και ισοαμυλικής αλκοόλης, αντίστοιχα (Lei et al., 2012). Οι πηγές αζώτου που αφομοιώνονται από τις ζύμες στην ζυθοποίηση είναι κυρίως αμινοξέα, ιόντα αμμωνίου και σε μικρότερο βαθμό διπετιδία και τριπεπτιδία. Το επίπεδο των αμινοξέων στο γλεύκος ποικίλλει ανάλογα με την ποικιλία του κριθαριού, τις συνθήκες βυνοποίησης και τις παραμέτρους πολτοποίησης. Οι απαιτήσεις των ζυμών σε άζωτο διαφέρουν ανάλογα με το είδος και τα επίπεδα για όλα τα διαφορετικά είδη δεν έχουν εξακριβωθεί κυρίως για ζυμώσεις σε υψηλές πυκνότητες (O'Connor-Cox & Ingledew 1989). Κρίσιμης σημασίας είναι τα επίπεδα των ανωτέρων αλκοολών, γειτονικών δικετονών και εστέρων, τα οποία όλα συνδέονται στενά με το προφίλ του αζώτου στο γλεύκος. Οι έρευνες που επικεντρώνεται στις διατροφικές απαιτήσεις και ανάγκες των ζυμών έχουν αυξηθεί πολύ ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια. Αυτό οφείλεται στη συνειδητοποίηση της σημασίας της παροχής επαρκούς θρεπτικών συστατικών για τη βελτίωση της συνολικής απόδοσης της ζύμωσης. Μια κύρια λειτουργία της βύνης είναι να παρέχει μια πηγή αφομοιώσιμου αζώτου για τις ζύμες. Η βύνη παρέχει επίσης άλλα θρεπτικά συστατικά που προάγουν κανονική απόδοση ζύμωσης και το χαρακτηριστικό οργανοληπτικό προφίλ στην τελική μπίρα (O'Connor-Cox & Ingledew 1989). Πρέπει να υπάρχει μια βέλτιστη ποσότητα αφομοιώσιμης συγκέντρωσης αζώτου στο γλεύκος για να υποστηρίξει την απαιτούμενη ανάπτυξη του ζυμομύκητα και την χαρακτηριστική ανάπτυξη του αρωματικού προφίλ

αλλά, αφήνοντας ελάχιστα ή καθόλου υπολειμματικά αμινοξέα στην τελική μπίρα (Pierce 1987). Τα αφομοιώσιμα επίπεδα αζώτου ακόμη σε συνθήκες κανονικών πυκνοτήτων (12°P) έχει βρεθεί ότι μπορεί να είναι περιοριστικά (Patel 1973). Η ανάπτυξη της ζύμης αυξάνεται με σχεδόν γραμμικό βαθμό μέχρι ένα επίπεδο α-αμινοαζώτου 100 mg/L. Αυτό πιστεύεται ότι είναι το ελάχιστο επίπεδο που απαιτείται μια υγιή ανάπτυξη μιας ζύμης όσο και για έναν φυσιολογικό ρυθμό ζύμωσης σε μια ζύμωση κανονικής πυκνότητας (12°P) (Pierce 1987).

Τα επίπεδα FAN στο γλεύκος ποικίλλουν από 100 έως 250 mg/L ανάλογα με τη μέθοδο παρασκευής του γλεύκους και τα επιπλέον πρόσθετα που χρησιμοποιούνται. Συνίσταται συνήθως επίπεδα FAN μεταξύ 140-150 mg/L για γλεύκη κανονικής πυκνότητας (12°P). Ακόμα, με βάση τα ευρήματα των (Jones & Rainbow, 1966) που έγιναν σε γλεύκη υψηλής (HG) ή πολύ υψηλής πυκνότητας (VHG) ή σε γλεύκη που παρασκευάζονται με προσθήκη πρόσθετων, μπορεί να παρουσιάσουν πιο έντονο περιορισμό αζώτου λόγω της αυξημένης ποσότητας σακχάρων που πρέπει να είναι ζυμωθεί. Τα απαιτούμενα επίπεδα αφομοιώσιμου αζώτου ακόμη και για ζυμώσεις υψηλής πυκνότητας (HG) δεν έχουν ακόμη καθοριστεί και αναμένεται να διαφέρουν σημαντικά ανάλογα με τις συνθήκες ζύμωσης που χρησιμοποιούνται. Στο οινοποιείο, η ποσότητα του αζώτου που απαιτείται για την σωστή ανάπτυξη της ζύμης έχει συσχετιστεί με τη συγκέντρωση σακχάρων στο γλεύκος σταφυλιών. Ο Pickrel, (1986) απέδειξε ότι το αρχικό επίπεδο FAN του ζυθογλεύκους επηρεάζει τον ρυθμό πρόσληψης FAN, την κατανάλωση των σακχάρων και το ρυθμό παραγωγής αιθανόλης. Επίσης οι Monk et al., (1986) απέδειξαν ότι ο γραμμικός ρυθμός ανάπτυξης, η αύξηση της μάζας της ζύμης, η τελική συγκέντρωση κυττάρων και ο ρυθμός κατανάλωσης σακχάρων επηρεάστηκε άμεσα από τα αμινοξέα και την περιεκτικότητα σε άζωτο του γλεύκους. Αντίθετα η υπερβολική ποσότητα FAN αύξησε μόνο τον ρυθμό της ζύμωσης. Αν υπάρξει έλλειψη του αφομοιώσιμου αζώτου μπορεί να οδηγήσει σε υποτονικότητα των ζυμών ή διακοπή ζύμωσης. (O'Connor-Cox & Ingledew, 1989).

Το μεγαλύτερο μέρος του α-αμινο-αζώτου του γλεύκους χρησιμοποιείται για να συνθέσουν νέες δομικές και ενζυμικές πρωτεΐνες οι ζύμες (Pierce 1987). Το αφομοιώσιμο άζωτο στο γλεύκος έχει στενή σύνδεση με τα τελικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της μπίρας. Οι ανώτερες αλκοόλες για παράδειγμα είναι υποπροϊόντα του μεταβολισμού των αμινοξέων. Ως εκ τούτου, το επίπεδο και η σύνθεση του αφομοιώσιμου αζώτου του γλεύκους έχει μεγάλη επιρροή στην παραγωγή εστέρων (O'Connor-Cox & Ingledew 1989). Όταν το άζωτο βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις έχει ως αποτέλεσμα την διατάραξη της φυσιολογικής χρήσης μερικών ομάδων αμινοξέων. Αυτό μπορεί να αλλάξει τη παραγωγή των οργανοληπτικών ενώσεων και ως εκ τούτου να αλλάξουν τη γεύση και το άρωμα της τελικής μπίρας. Οι Dufour & Devreux, (1986) μπόρεσαν συσχετίζουν την παραγωγή προδρόμων ουσιών του διακετυλίου με την παρουσία ιδιαίτερων αμινοξέων είτε σε ελλείψεις είτε σε επάρκεια αζώτου. Σε γλεύκος χαμηλής περιεκτικότητας FAN, η σύνθεση των πρόδρομων αυτών ουσιών εξαρτάται από τη συγκέντρωση της βαλίνης, ενώ σε υψηλά επίπεδα FAN αυτή η σύνθεση εξαρτάται από τη συγκέντρωση της θρεονίνης στο γλεύκος. Αμινοξέα που συντίθενται από ζυμομύκητες, συμπεριλαμβανομένης της λυσίνης, της ιστιδίνης, της αργινίνης και της λευκίνης είναι εξαιρετικά κρίσιμα λόγω των δομών άνθρακα τους που προέρχονται εξ ολοκλήρου από εξωγενή αμινοξέα του γλεύκους χωρίς την συνεισφορά άνθρακα από την κατανάλωση σακχάρων (O'Connor-Cox & Ingledew 1989).

Η θρεονίνη είναι ο πιο ενεργός καταστολέας πρόσληψης βαλίνης, σε γλεύκος με επαρκή FAN. Η σειρά της αφομοίωσης των αμινοξέων (εικόνα III) δεν επηρεάζεται από τη συγκέντρωσή τους και οι δομές

άνθρακα και από τα δύο α-αμινοξέα και τα σάκχαρα χρησιμεύουν ως δομικά στοιχεία για τις πρωτεΐνες της ζύμης (Dufour & Devreux, 1986). Αν δεν συντίθενται σε επαρκείς ποσότητες από αυτά τα αμινοξέα μπορεί να προκληθούν σημαντικές αλλαγές στο μεταβολισμό του αζώτου στις ζύμες και να επηρεάζουν την τελική ποιότητα των προϊόντων και πιο συγκεκριμένα της μπίρας. Τέλος, αμινοξέα όπως η βαλίνη, η γλυκίνη, και η τυροσίνη είναι κρίσιμα επειδή καθυστερούν τη ζύμωση χρησιμεύουν ως οι κύριες πηγές άνθρακα της ζύμης (Pierce 1987).

Group A Fast Absorption	Group B Intermediate Absorption	Group C Slow Absorption	Group D Little or No Absorption
Glutamic acid	Valine	Glycine	Proline
Aspartic acid	Methionine	Phenylalanine	
Asparagine	Leucine	Tyrosine	
Glutamine	Isoleucine	Tryptophan	
Serine	Histidine	Alanine	
Threonine		Ammonia	
Lysine			
Arginine			

^a Source: Jones and Pierce (3).

Εικόνα III : Κατηγοριοποίηση των αμινοξέων του ζυθογλεύκου ανάλογα με την αφομοίωση τους (1. Jones & Pierce 2. Lekkas, et al., 2005)

1.1.8 Επίδραση της συγκέντρωσης του εμβολίου στις ζυμώσεις (pitching rate)

Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος είναι γνωστό ότι επηρεάζονται από διάφορες αρωματικές ουσίες, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που παράγονται από την ζύμη στη διαδικασία της ζύμωσης αλλά και εκείνων που παράγονται ως αποτέλεσμα περαιτέρω αντιδράσεων.

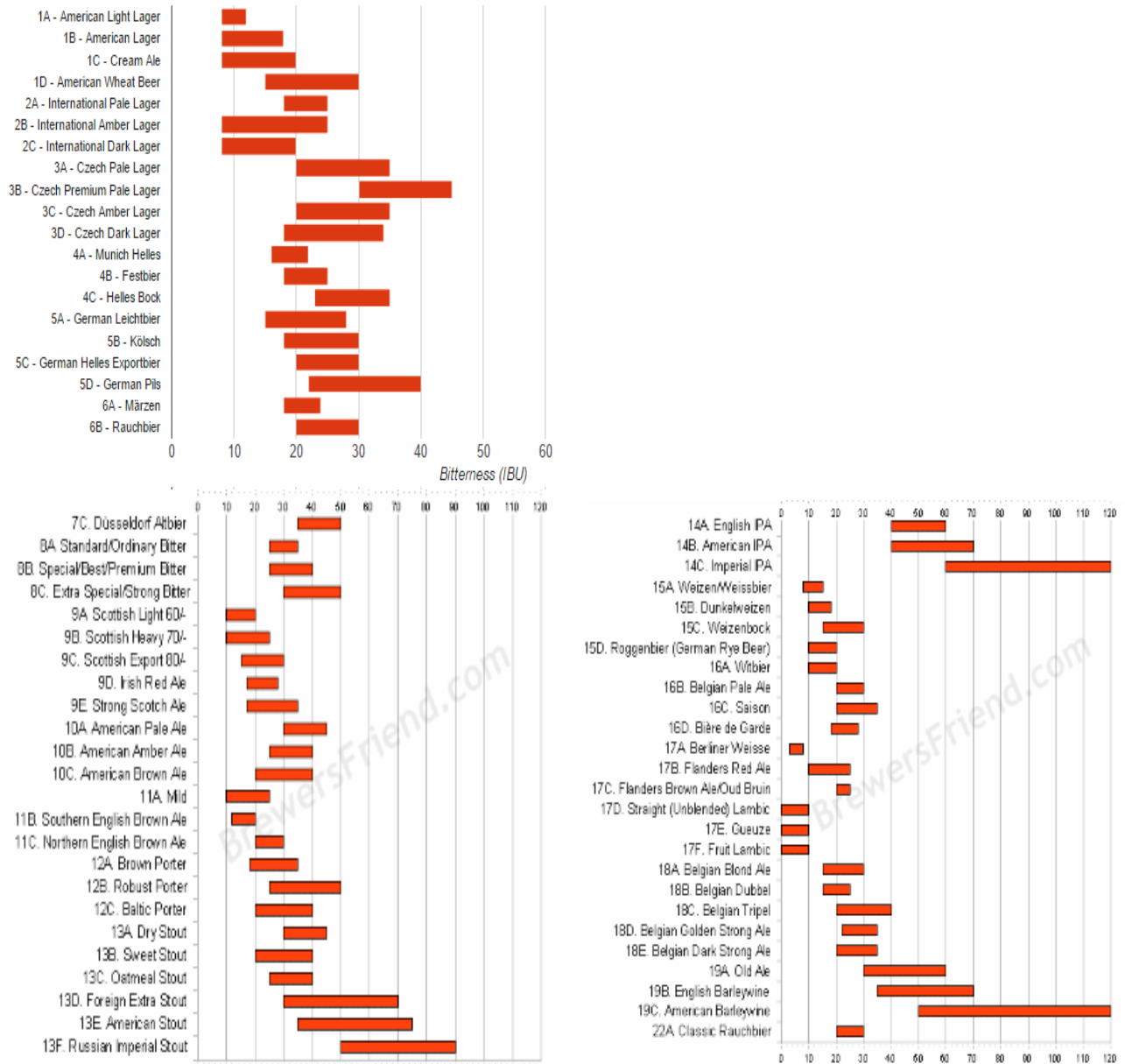
Η αναλογία του εμβολίου της ζύμης είναι ένας σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει τη ζύμωση και αυξάνει τις βιοχημικές διεργασίες. Κάποιες από αυτές είναι η κινητική της ζύμωσης, ο βαθμός της ζύμωσης, ο σχηματισμός της ακεταλδεϋδης και άλλων πτητικών ουσιών, και γενικά η αναλογία προϊόντων του πρωτογενούς και του δευτερογενούς μεταβολισμού. Η ανάλυση της επίδρασης της συγκέντρωσης του αρχικού εμβολίου για την ανάπτυξη νέων κυττάρων έδειξε ότι η αύξηση του εμβολίου έχει ως αποτέλεσμα σημαντικά μικρότερες αυξήσεις στη βιομάζα. Αυτή η μείωση του αριθμού των νέων κυττάρων είναι αποτέλεσμα της μειωμένης διαθεσιμότητας θρεπτικών ουσιών και οξυγόνου (Kucharczyk & Tuszyński 2015). Μια ζύμωση που χρησιμοποιεί μεγαλύτερη ποσότητα εμβολίου είναι πιθανό να περιέχει χαμηλότερα IBU στις προκύπτουσες μπίρες πιθανώς λόγω της πρόσληψης των πικρικών ουσιών από τα κυτταρικά τοιχώματα της ζύμης, στον αυξημένο αφρισμό κατά τη ζύμωση και στους χαμηλότερους ρυθμούς χρήσης ελεύθερου αμινο αζώτου (FAN). Έχοντας ως αποτέλεσμα υψηλότερα υπολειμματικά επίπεδα FAN στις μπίρες, καθώς και υψηλότερα ποσοστά αιθανόλης, χαμηλότερα ποσοστά εστέρων και άλλων πτητικών οργανικών ενώσεων που επηρεάζουν ιδιαίτερα τα

οργανοληπτικά του τελικού προϊόντος (Edelen et al., 1996). Οι αλδεΐδες είναι μια από τις πιο σημαντικές ομάδες ενώσεων που παράγονται κατά την ζύμωση και έχουν σημαντικό αντίκτυπο στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και στη σταθερότητα της μπίρας. Γενικά, πιστεύεται ότι οι αλδεΐδες δρουν αρνητικά στο τελικό προϊόν. Μελέτες απέδειξαν ότι μια αύξηση στην ποσότητα του εμβολίου μείωσε την περιεκτικότητα σε ακεταλδεΐδη. Συγκεκριμένα, ο διπλασιασμός της ποσότητας του εμβολίου (από 10×10^6 σε 20×10^6 κύτταρα/mL) είχε ως αποτέλεσμα την μείωση της συγκέντρωσης αλδεΐδης κατά 8% (Verbelen, et al., 2009). Βέβαια η αύξηση της δοσολογίας της ζύμης κατά $10 - 50 \times 10^6$ CFU/ mL γλεύκους προκάλεσε και σημαντική μείωση στη συγκέντρωση των ανωτέρων αλκοολών (Erten et al., 2007) αλλά η περιεκτικότητα σε οξικό αιθυλεστέρα αυξήθηκε (Lee & Davis 2000). Επιπλέον παρατηρήθηκε ότι η αύξηση της συγκέντρωσης του διακετυλίου είναι αποτέλεσμα της υψηλότερης ποσότητας εμβολίου (Nguyen & Viet Man 2009). Τέλος, ενώ η υψηλότερη ποσότητα αρχικού εμβολίου οδηγεί σε πιο γρήγορη εξασθένηση και πτώση του ρυθμού ζύμωσης η χαμηλότερη ποσότητα εμβολίου βρέθηκε να οδηγεί σε προϊόντα με υψηλότερη ένταση στις συνολικές τους αρωματικές ενώσεις και πιο συγκεκριμένα των αρωμάτων του λυκίσκου και φρούτων στην τελική μπίρα. Είναι επομένως προφανές ότι μια σταθερή ποσότητα εμβολίου είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της ποιότητας του τελικού προϊόντος αλλά και την σταθερότητα του (Edelen et al., 1996).

1.7.9 Η επίδραση της πικράδας και των τιμών IBU στις ζυμώσεις

Η πικράδα του γλεύκους μπορεί να μετρηθεί βρίσκοντας την περιεκτικότητα σε ισο-α οξέα και εκφράζονται ως Διεθνείς Μονάδες Πικράδας (IBU). Αυτή η κλίμακα παρέχει μια προσέγγιση της αντιληπτής της πικράδας για τυπικές μπίρες και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση της ποιότητας, της σταθερότητας αλλά και για να ταξινομήσει ορισμένα στυλ μπίρας, καθώς χαρακτηρίζονται από συγκεκριμένες τιμές IBU (Parazian 2013). Συνήθως οι τιμές IBU από 30 και κάτω θεωρούνται χαμηλής πικράδας ενώ οι μπίρες με τιμή IBU 50 και άνω θεωρούνται πικρές έως πολύ πικρές (Barth 2013). Όπως φαίνεται και στο παράδειγμα στον πίνακα IV τα περισσότερα είδη μπίρας βρίσκονται μεταξύ 20-40 IBU ενώ λίγα είναι αυτά που ξεπερνάγανε τα 70 IBU . Όπως αναφέρθηκε η προσθήκη λυκίσκου δίνει πικράδα, γεύση, άρωμα, καθώς και προστασία του τελικού προϊόντος με την καταστολή ανάπτυξης διάφορων βακτηρίων όπως για παράδειγμα τα βακτήρια γαλακτικού οξέος, τα οποία είναι κοινός μικροοργανισμοί στη βιομηχανία και αλλοιώνουν το τελικό προϊόν (Sakamoto et al., 2003).

Ranges of Bitterness (IBU) by Style



Εικόνα IV : Δείκτης IBU ανά στυλ μπύρας (<https://www.brewersfriend.com/2017/05/07/beer-styles-ibu-chart-2017-update/>)

Ωστόσο, ο αντίκτυπος των επιπέδων IBU στην υγεία της ζύμης και στην απόδοση της ζύμωσης δεν έχει ακόμη διερευνηθεί πλήρως. Από μελέτη έχει βρεθεί ότι τα υψηλά επίπεδα IBU έχουν αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία της ζύμης και στα αποτελέσματα της ζύμωσης. Πιο συγκεκριμένα η ζύμη μετά τη ζύμωση εμφάνισε χαμηλότερη βιωσιμότητα όταν συλέγθηκε από μπύρες με υψηλά IBU (Ederton 2005). Ακόμα σε άλλη μελέτη βρέθηκε ότι η προσθήκη ισο-α οξέων μείωσε τη διαθεσιμότητα του ψευδαργύρου στο γλεύκος. Ο ψευδάργυρος είναι ένας σημαντικός παράγοντας για πολλά ένζυμα απαραίτητα για τον μεταβολισμό της ζύμης. Η κυτταρική μεμβράνη και τα κενοτόπια βρέθηκε ότι κατακρατούσαν ενώσεις που προέρχονταν από τον λυκίσκο. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα να ανασταλεί εν μέρει η ενδοκυτταρική μεταφορά, έτσι αυτοί οι παράγοντες θα μπορούσαν να παρουσιάσουν σοβαρές συνέπειες για την ζύμη

(Hazelwood et al 2009). Σύμφωνα με τον Bryant, (2019) η προσθήκη ισο-άλφα οξέων του λυκίσκου οπού αυξάνουν την τιμή IBU είχε ως αποτέλεσμα την χαμηλότερη βιωσιμότητα στο τέλος της ζύμωσης για όλες τις διαφορετικές αρχικές πυκνότητες και κατά την διάρκεια όλων των κύκλων επαναχρησιμοποίησης. Επίσης οι ζυμώσεις με υψηλές αρχικές πυκνότητες εμφάνισαν χαμηλότερη βιωσιμότητα στις ζύμες απ' ότι αυτές με χαμηλή αρχική πυκνότητα, φαινόμενο που έχει αναφερθεί και σε άλλη ενότητα. Έτσι λοιπόν φαίνεται ότι οι διαφορές μεταξύ των ζυμώσεων χαμηλής και υψηλής πυκνότητας με προσθήκες ισο-α οξέων σε διαφορετικές ποσότητες υποδηλώνουν ότι η αύξηση της πυκνότητας αλλά και της τιμής IBU ταυτόχρονα μπορεί να προκαλέσει στρες στα κύτταρα γεγονός που επίσης εμφανίζει προβλήματα στην περίπτωση που η ζύμη πρέπει να επαναχρησιμοποιηθεί.

1.2 Non-Saccharomyces ζύμες

1.2.1 Γενικά χαρακτηριστικά των Non-Saccharomyces ζυμών

Θεωρείται γνωστό ότι οι ζύμες κρασιού *Non-Saccharomyces*, που στο παρελθόν θεωρούνταν ως ανεπιθύμητες, περιλαμβάνουν στελέχη τα οποία μπορούν να ενισχύσουν την σύνθεση και το προφίλ αρωμάτων των διαφόρων προϊόντων ζύμωσης. Έχει αναφερθεί ότι μερικά στελέχη ζυμών *Non-Saccharomyces* έχουν θετική επιρροή στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και στην ποιότητα των τελικών προϊόντων. Έτσι λοιπόν, τα τελευταία χρόνια πολλές έχουν πολλοί ερευνητές επικεντρώσει το ενδιαφέρον τους στον χαρακτήρα, την φυσιολογία τους αλλά και την ζυμωτική ικανότητα των ζυμών αυτών (Estela Escalante 2018). Η χρήση *Non-Saccharomyces* ζυμών σε συνδυασμό με τα στελέχη *Saccharomyces* συνιστώνται για την απόκτηση των πλεονεκτημάτων της αυθόρμητης ζύμωσης οίνων, αποφεύγοντας παράλληλα και κάποιους από τους κινδύνους (Comitini et al., 2010). Αρκετό ενδιαφέρον υπάρχει σε συνζυμώσεις με μικτές και διαδοχικές καλλιέργειες των *Non-Sacharomyces* με *S. cerevisiae*, που χρησιμοποιούνται για να παραχθούν προϊόντα με διαφορετικά αρωματικά προφίλ. Επίσης, θετικό είναι η βελτίωση της οργανοληπτικής ποιότητας/πολυπλοκότητας του οίνου, της μπίρας κι άλλων ποτών, από τη στιγμή που πραγματοποιείται η παραγωγή μιας μεγάλης ποικιλίας αρωματικών ενώσεων.

Οι περισσότερες από αυτές τις ζύμες κυριαρχούν στο αρχικό στάδιο της αυθόρμητης ζύμωσης μέχρι κάποια συγκέντρωση αιθανόλης (συνήθως μεταξύ 4 και 5% v / v) και στη συνέχεια αναστέλλονται λόγω της επίδρασης της αιθανόλης και την εξάντληση του διαλυμένου οξυγόνου. Στο τέλος συνήθως οι ζυμομύκητες *Saccharomyces*, που είναι πλέον ανθεκτικοί στην αιθανόλη, υπερισχύουν και ολοκληρώνουν τη ζύμωση (Estela Escalante 2018). Το αποτέλεσμα για τα προαναφερθέντα είδη ζύμης με την προσθήκη ορισμένου ποσοστού διαλυμένου οξυγόνου, είναι ότι με πιο γρήγορους ρυθμούς ζύμωσης υπάρχει αύξηση της βιομάζας στα κύτταρα των ζυμών, όπως και μείωση της παραγωγής αιθανόλης. Επιπλέον, άξιο αναφοράς είναι να ότι ορισμένα χαρακτηριστικά που δεν βρίσκονται στον *S. cerevisiae*, φαίνεται να υπάρχουν σε αυτές τις ζύμες. Αυτά είναι η παραγωγή διαφορετικών αρωματικών ενώσεων σε υψηλές ποσότητες, δηλαδή ορισμένοι από τους εστέρες, τα λιπαρά οξέα και τις ανώτερες αλκοόλες (Estela Escalante 2018) καθώς και άλλα χαρακτηριστικά όπως μείωση μηλικού οξέος, παραγωγή γαλακτικού οξέος, φρουκτοφιλικός χαρακτήρας και άλλα.

Υπάρχουν αναφορές πως αρκετά στελέχη ειδών *Non-Saccharomyces* του περιβάλλοντος εμφανίζουν προβλήματα και αποτελούν μικροοργανισμούς επιμόλυνσης, καθώς οδηγούν σε ανεπιθύμητα χαρακτηριστικά, ενώ έχουν και χαμηλή αντοχή σε αλκοόλη και SO₂. Επίσης, έχουν τεχνολογικά προβλήματα, σε σύγκριση με τον *S. cerevisiae*, όπως χαμηλές αποδόσεις αιθανόλης σε ζυμώσεις. Τα νεότερα ευρήματα που έχουν αναφερθεί μέχρι στιγμής οδήγησαν στην επανεξέταση του ρόλου αυτών των ζυμών με προοπτικές στην χρήση των ζυμομυκήτων *Non-Saccharomyces* για την αξιολόγηση τους για την χρήση τους στην παραγωγή (Estela Escalante 2018). Η χρήση ζυμών κρασιού *Non-Saccharomyces* σε καλλιέργειες ως εκκινήτες ζύμωσης έχουν δείξει ότι έχουν κάποια θετικά και αρνητικά χαρακτηριστικά ζύμωσης. Μεταξύ των τελευταίων, υπάρχει η παραγωγή οξικού οξέος, οξικού αιθυλεστέρα, ακεταλδεΐδης και ακετοΐνης σε υψηλές συγκεντρώσεις, το οποίο γενικά εμποδίζουν την χρήση τέτοιων στελεχών. Οι ζύμες *Non-Saccharomyces* είναι μεταβολικά δραστήριες κατά τη διάρκεια αυθόρμητων και εμβολιασμένων γλευκών, και παράγουν μια πληθώρα υποπροϊόντων, που μπορούν να συμβάλουν θετικά (Estela Escalante 2018). Αλλά εκτός από τα αρνητικά, επειδή οι *Non - Saccharomyces* ζύμες, όπως αναφέρθηκε, έχουν κάποια συγκεκριμένα χαρακτηριστικά που δεν υπάρχουν στα είδη *S. cerevisiae*, αυτά μπορεί να έχουν πρόσθετες θετικές επιδράσεις στη γεύση και στο άρωμα των τελικών προϊόντων (Comitini et al., 2010).

Η χρήση μικτών επιλεγμένων ζυμών *Non -Saccharomyces* μαζί με στελέχη *Saccharomyces cerevisiae* στην αρχή των ζυμώσεων θεωρείται μια εναλλακτική λύση στις αυθόρμητες και αλλά και μη ζυμώσεις του οίνου, εκμεταλλευόμενοι τον πιθανό θετικό ρόλο που παίζουν τα είδη ζυμομυκήτων *Non - Saccharomyces* στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου αλλά και από τη στιγμή που οι ζυμομυκήτες *Non -Saccharomyces* έχουν την ικανότητα να παράγουν μεταβολίτες, σαν την γλυκερίνη και την αιθανόλη αλλά και άλλους δευτερογενείς μεταβολίτες (Padilla et al., 2016). Βεβαία, έχει παρατηρηθεί ότι η συμβολή τους στις ζυμώσεις είναι σχετική με το είδος και το στέλεχος, επισημαίνοντας τη βασική σημασία μιας έξυπνης επιλογής στελεχών. Έτσι, έχουν τη δυνατότητα να ικανοποιούν τη συνεχή ζήτηση νέων και βελτιωμένων στελεχών ζυμών, οι οποίες προσαρμόζονται σε διαφορετικούς τύπους οίνων (Padilla et al., 2016). Τέλος, ορισμένες ζύμες *Non -Saccharomyces* έχουν την ικανότητα να απελευθερώνουν πιο πολλούς πολυσακχαρίτες από τα στελέχη *S. cerevisiae*. Ορισμένα στελέχη ειδών από τα γένη *Hanseniaspora* και *Torulaspora*, για παράδειγμα, βελτιώνουν την παρουσία ορισμένων ενδιαφερόντων αρωμάτων και έχουν μειωμένη παραγωγή πτητικής οξύτητας (González-Royo et al., 2014). Γενικά η εφαρμογή τους συνίσταται συνήθως στην έναρξη της ζύμωσης με τον εμβολιασμό με ζύμες *Non-Saccharomyces* και τη συνέχιση της ζύμωσης με εμβολιασμό ενός στελέχους *Saccharomyces*, ώστε να επιτευχθεί τόσο η επιθυμητή αρωματική πολυπλοκότητα, αλλά και η σωστή και πλήρης ζύμωση.

1.3 Βασικά είδη ζυμών *Non -Saccharomyces*

Υπάρχουν αρκετά στελέχη και είδη ζυμομυκήτων *Non -Saccharomyces*. Κάποια αξιοσημείωτα είναι:

1.3.1 *Starmarella bacillaris*

Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει έρευνα για τη χρήση της ζύμης *Starmarella bacillaris* (πρώην *Candida stellata*) σε μικτή ζύμωση με *S. cerevisiae* και έχουν εμφανίσει μια αύξηση ποσότητας γλυκερόλης σε οίνους, η οποία γλυκερόλη έχει σχέση με τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και την πολυπλοκότητα του

κρασιού (García et al., 2016). Το αναλυτικό και οργανοληπτικό μοντέλο των οίνων βελτιώθηκε σε ζύμωση γλεύκους σταφυλιών με παρουσία των στελεχών *S.bacillaris* και *S.cerevisiae*. Η παραγωγή ακεταλδεΐδης και ακετοΐνης είναι αποτέλεσμα του εμβολιασμού του γλεύκους με καθαρές καλλιέργειες *S. bacillaris*. Στην πραγματικότητα, σε σύγκριση με αυτές που ήταν εμβολιασμένες και με *S.cerevisiae*, η χρήση (μεικτών ή διαδοχικών εμβολιασμών), η συνεχής ζύμωση και τα ακινητοποιημένα κύτταρα μπορούν να συμβάλλουν στα εξής: (1) συμπληρωματική κατανάλωση γλυκόζης και φρουκτόζης, (2) ενισχυμένες συγκεντρώσεις γλυκερίνης και ηλεκτρικού οξέος και (3) καμία αύξηση της περιεκτικότητας σε ακεταλδεΐδη και ακετοΐνη, λόγω της παρουσίας του *S. bacillaris* και της ανταλλαγής ακεταλδεΐδης μεταξύ των δύο ειδών χωρίς την οποιαδήποτε αύξηση των επιπέδων της. Τέλος, βελτιώνεται η πολυπλοκότητα των οργανοληπτικών αρωμάτων του οίνου από τη ζύμωση αυτή (García et al., 2016).

1.3.2 *Metschnikowia pulcherrima*

Η *Metschnikowia pulcherrima* είναι γνωστή στον επιστημονικό χώρο λόγω της παρουσίας της σε κυρίως φυτά και φρούτα. Η ζύμη αυτή έχει την ιδιότητα να δημιουργεί αποικίες στις επιφάνειες αρκετών διαφορετικών φρούτων και φυτών, αλλά φαίνεται να λειτουργεί προστατευτικά και θετικά εναντίον διάφορων παθογόνων μικροοργανισμών (Ciani et al., 2014). Αυτή η ζύμη παράγει μεγάλες ποσότητες β-γλυκοσιδάσης, η οποία πραγματοποιεί υδρόλυση διαφόρων γλυκοζιτών και ολιγοσακχαριτών και επιτρέπει την εμφάνιση θετικών αρωματικών ουσιών στο προϊόν (π.χ. λιναλοόλη). Η παρουσία της στις ζυμώσεις μπορεί να προσφέρει σημαντικές βελτιώσεις στον οίνο, όπως η αύξηση της παραγωγής αλκοόλης, τερπενίων, εστέρων, και γλυκερόλης και η μείωση της πτητικής οξύτητας.

Μερικοί αναφέρουν ότι η οξύτητα των οίνων μπορεί να επηρεαστεί από το *M. pulcherrima*. Μπορεί αυτό να έχει θετική ή αρνητική πορεία, ανάλογα βέβαια με το επίπεδο οξύτητας του γλεύκους. Επιπλέον, συγκριτικά με τον *S. cerevisiae*, ο *M. pulcherrima* έχει μεγαλύτερη ικανότητα να ελευθερώνει πολυσακχαρίτες από τα κυτταρικά τοιχώματά του. Το τελευταίο διάστημα, έχει παρατηρηθεί πως μειώνεται η συγκέντρωση της αιθανόλης στον συγκεκριμένο τύπο καλλιέργειας των διαδοχικών ζυμώσεων του *M. pulcherrima* με το *S. cerevisiae* (García et al., 2016). Μια άλλη πτυχή του *M. pulcherrima* είναι ότι έχει αντιμικροβιακή δράση και δεν επηρεάζεται η ανάπτυξη του *S. cerevisiae* με την παρουσία του, όμως δρα αποτελεσματικά παρεμποδίζοντας την ανάπτυξη για κάποιες ανεπιθύμητες άγριες ζύμες (bio-protection) (González Rojo et al., 2015). Αυτό είναι σημαντικό γιατί σε ένα πλαίσιο ζύμωσης χωρίς ιδιαίτερη προστασία από άγριες ζύμες (όπως μη ύπαρξη θειώδων), δίνεται η δυνατότητα αξιοποίησης ζυμών non-Saccharomyces που χρησιμοποιούνται για την προφύλαξη (βιοπροστασία) και ενισχύουν την οργανοληπτική ποιότητα των προϊόντων (Windholtz et al., 2021).

1.3.3 *Brettanomyces anomalus*

Ο ζυμομύκητας *Brettanomyces anomalus* είναι γνωστός στον κλάδο των ποτών. Τα περισσότερα στελέχη του *B. anomalus* μπορούν να ζυμώσουν τα κύρια σάκχαρα που υπάρχουν στο ζυθογλεύκος. Ως αποτέλεσμα της δράσης της β-γλυκοσιδάσης, ο *B. anomalus* μπορεί να υδρολύσει μονοτερπένια δεσμευμένα σε γλυκοζίτη, τα οποία υπάρχουν σε πολλά φρούτα και, επίσης, σε γλεύκος που περιέχει λυκίσκο. Ο διαχωρισμός αυτών των δεσμών απελευθερώνει μονοτερπένια, που επηρεάζουν την τελική γεύση του προϊόντος. Αυτό θα μπορούσε να αυξήσει ή να τροποποιήσει το άρωμα του λυκίσκου και κάποια από τα απελευθερωμένα μονοτερπένια, όπως η λιναλοόλη, που είναι ένα από τα βασικά αρωματικά συστατικά του λυκίσκου (Michel et al., 2016). Παράγονται φρουτώδη και φαινολικά αρώματα

από τον *Brettanomyces anomalus* κατά τη ζύμωση του ζύθου. Αν και συγκριτικά με το εμπορικό στέλεχος ζυθοποιίας *Saccharomyces*, στις παραπάνω μελέτες οι χρόνοι ζύμωσης είναι μεγαλύτεροι. Σε περιβάλλον με χαμηλό αρχικό pH με προσθήκη γαλακτικού οξέος έχει παρατηρηθεί ότι αυξάνεται η παραγωγή των αρωματικών δραστικών ενώσεων. Ωστόσο, η απόδοση ζύμωσης σε αιθανόλη φαίνεται μάλλον χαμηλή στις υψηλές θερμοκρασίες και μπορεί να είναι ενδιαφέρον για την παραγωγή ορισμένων ειδών μπίρας (Michel et al., 2016).

Επίσης διερευνήθηκε η επίδραση του *B. anomalus* στο άρωμα του κρασιού, παρόλο που οι περισσότεροι οινοποιοί εξακολουθούν να απορρίπτουν αυτή την ζύμη, επειδή μπορεί να παράγει και αρνητικά χαρακτηριστικά για την γεύση του οίνου (όπως πτητικές φαινολες που δίνουν αρώματα δερματος ή ιδρωτα αλογου, τετραϋδροπυριδίνες που δίνει αρώματα κλουβίου ποντικίου κ.α.). Βέβαια σε κάποιες περιπτώσεις βοηθά τους ζυθοποιούς ώστε να μεταβάλει μερικά από τα οξέα, τα οποία βρίσκονται στο ζυθογλεύκος, όπως είναι το ρ -κουμαρικό και το φουμαρικό οξύ, και να σχηματίσουν ενώσεις φαινολικών αρωμάτων, όπως είναι η 4-βινυλγουαϊκόλη ή η 4-βινυλφαινόλη (Michel et al., 2016). Οι θερμοκρασίες ζύμωσης γύρω στους 20 ° C, είναι οι πιο βέλτιστες για αυτό το στέλεχος και έχουν αναφέρει πως προσφέρει μια πολύ χαμηλή παραγωγή εστέρων στους 12 ° C (Gamero et al., 2015). Τέλος ο *Brettanomyces anomalus* μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ζύμη για πρωτογενή, δευτερογενή ζύμωση και ζυμώσεις σε φιάλη, στη διαδικασία της παραγωγής μπίρας, καθώς μπορεί να προσαρμόζεται σε ακραίες συνθήκες (Colomer et al., 2019).

1.3.4 *Brettanomyces bruxellensis*

Στην οινολογία η παρουσία του *Brettanomyces bruxellensis* θεωρείται επιμόλυνση, και έχει συσχετιστεί με την παλαίωση σε βαρέλια καθώς και το χαρακτήρα ορισμένων τύπων οίνων και περιοχών, αν και η παρουσία του σε μικρές συγκεντρώσεις ενδέχεται να συμβάλει στην οργανοληπτική πολυπλοκότητα. Στο Βέλγιο υπάρχει μια μακρά παράδοση να χρησιμοποιούν στη ζύμωση μπίρας (lambic, gueuze) το *Brettanomyces bruxellensis*. Τα αρώματα, τα οποία παράγει η ζύμη αυτή, έχουν σχολιαστεί ως οσμής αλόγου, αχυρώνα, στάβλου φρουτώδεις και φαινολικές, ορισμένες φορές γεύση μεταλλική ή πικρή. Επιπλέον, έχει την ικανότητα να παράγει αρκετούς αιθυλεστέρες, σαν τον οξικό αιθυλεστέρα, αν και μπορεί να έχει και κάποια μικρή φαινολικά θετική αρωματική παρουσία. Έχει υψηλή ανοχή σε αιθανόλη σε συγκεντρώσεις μέχρι και 15% (v/v) και μπορεί να ζυμώσει ορισμένα από τα κύρια σάκχαρα (μαλτόζη, τρεχαλόζη, σακχαρόζη). Επίσης, έχει τη δυνατότητα να χρησιμοποιήσει σύνθετους υδατάνθρακες, όπως μαλτοτετραόζη και μαλτοπενταόζη και μπορεί να συνεισφέρει μια ξηρή αίσθηση στο στόμα.

Ορισμένες μελέτες προτείνουν τη χρήση του *B. bruxellensis* ως καθαρό στέλεχος για την βιομηχανία της ζυθοποιίας. Μπίρες που μπορούν να παράγονται με φρουτώδη και πολύπλοκα αρώματα σχηματίζονται με μια ποικιλία εστέρων, όπως είναι ο οξικός αιθυλεστέρας, ο καπρωϊκός αιθυλεστέρας και ο καπρυλικός αιθυλεστέρας. Ακόμα, σε ζυμώσεις με *B. bruxellensis* βρέθηκαν πολύ χαμηλές ποσότητες οξικού ισοαμυλεστέρα, κάτι που θα μπορούσε να εξηγηθεί από την ικανότητα του *B. bruxellensis* να διασπά αυτήν την αρωματική ένωση, η οποία είναι πολύ επιθυμητή στις μπίρες σίτου. (Michel et al., 2016). Η θερμοκρασία που μπορεί να ζυμώσει φαίνεται να είναι πολύ μεταβλητή όπως με τη ζύμωση στους 12 ° C (Gamero et al., 2015), αλλά και με ζυμώσεις στους 20 °C και στους 25 και 27 ° C, όπου σε όλες τις περιπτώσεις αναφέρονται και ορισμένα θετικά αρωματικά χαρακτηριστικά. Ωστόσο, ο χρόνος ζύμωσης στις περισσότερες μελέτες παρατηρείται μακρύς σε σύγκριση με τις ζυμώσεις που διεξάγονται με επιλεγμένες ζύμες *Saccharomyces*. Συνολικά φαίνεται ότι υπάρχει ένα μεγάλο

ενδιαφέρον στη ζυθοποιία με καθαρές ζυμώσεις *Brettanomyces bruxellensis* (Michel et al., 2016). Επιπλέον μελέτες επικεντρώνονται στην εφαρμογή επιλεγμένων στελεχών *Brettanomyces* για τη δημιουργία νέων ποτών. Η πρόοδος της τεχνολογίας επιταχύνει την κατανόηση της βιολογίας του *Brettanomyces*, καθώς κατά την τελευταία δεκαετία, έχουν διαλευκανθεί λίγο καλύτερα οι μεταβολικές οδοί που είναι υπεύθυνοι για την παραγωγή των αρωμάτων του. Η κατανόηση της γενετικής, της φυσιολογίας και της βιοχημείας που σχετίζεται με την παραγωγή των αρωμάτων είναι θεμελιώδης για την παραγωγή ξεχωριστών προφίλ γεύσεων, καθώς θα αναπτύσσονται συνεχώς νέες μέθοδοι και μοριακά εργαλεία για τη διαλογή και τον εντοπισμό κατάλληλων στελεχών (Colomer et al., 2019).

1.3.5 *Zygosaccharomyces rouxii*

Ο *Zygosaccharomyces rouxii* έχει χρησιμοποιηθεί από πολλούς επιστήμονες για να παράγει κυρίως μπίρα με χαμηλή περιεκτικότητα σε αλκοόλ ή και χωρίς αλκοόλ. Έχει ικανότητα για υψηλή ανοχή σε άλατα και σάκχαρα. Λόγω της υψηλής ωσμωτικής ανεκτικότητάς της, δοκιμάστηκε για ζυμώσεις αλλά δεν έδωσε καλό άρωμα, υφή ή χαρακτηριστική γεύση στα τελικά προϊόντα. Η υψηλή ωσμωτική αντοχή του θα μπορούσε ενδεχομένως να χρησιμοποιηθεί σε ζυθοποιία, καθώς κάποια από τα στελέχη έχουν δείξει ότι ζυμώνουν τα περισσότερα σάκχαρα του ζυθογλεύκου. Είναι γνωστό ότι παράγει υψηλές ποσότητες οξικού αιθυλεστέρα, αμυλικών αλκοολών και ισοαμυλικών αλκοολών, οι οποίες είναι γνωστές ενώσεις για ζυθοποιούς για τον χαρακτήρα της μπίρας (Michel et al., 2016). Βρέθηκε, επίσης ότι το στέλεχος DSM 2531 είναι κατάλληλο για παραγωγή μη αλκοολούχας μπίρας λόγω της ανικανότητάς του να ζυμώνει τη μαλτόζη ή τη μαλτοτριόζη (Mohammadi et al., 2011). Ακόμα βρέθηκε ότι ο *Z. rouxii* έχει ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά για την ζυθοποιία συγκεκριμένα εμφάνισε πολύ χαμηλή παραγωγή εστέρων ~ 2 mg / L αλλά αρκετά υψηλή ταχύτητα ζύμωσης (Gamero et al., 2015).

1.3.6 *Pichia kluyveri*

Η *P. kluyveri* ανάλογα με τα στελέχη της είναι ικανή να ζυμώνει κυρίως τη γλυκόζη/φρουκτόζη/σακχαρόζη και λιγότερο ή καθόλου τη μαλτόζη σε ένα γλεύκος παράγοντας έτσι χαμηλά επίπεδα αιθανόλης αλλά, υψηλά επίπεδα επιθυμητών οργανοληπτικά αρωμάτων. Η παραγωγή αυτών των αρωμάτων στην μπίρα οφείλεται και στη μετατροπή των ουσιών του λυκίσκου (υδρόλυση γλυκοζιτών και βιομετατροπές) σε άλλες αρωματικές ουσίες. Παράγει επίσης σημαντικές ποσότητες πτητικών θειολών, όπως οξικό 3-μερκαπτοεξύλιο (άρωμα passion fruit) και 3-μερκαπτοεξαν-1-όλη (άρωμα γκρέιπφρουτ), καθώς και αρώματα μπανάνας και τσιχλόφουσкас (Tataridis et al., 2013b). Η ταχύτητα ζύμωσής της σε ζύμωση τεκίλας ήταν υψηλή, συγκρινόμενη με τον *S. cerevisiae*. Τα τελευταία έτη έχει δοκιμασθεί και υπάρχει ειδικό στέλεχος για την παραγωγή ζύθου/ποτών με μειωμένη αλκοόλη όπως είναι το στέλεχος SMARTBEV™ NEER® από Chr. Hansen για ζύθους με χαμηλή ή καθόλου αλκοόλη λόγω της ιδιότητας του να ζυμώνει μόνο μονοσακχαρίτες (δεν ζυμώνει τη μαλτόζη και είναι αρνητική στο φαινόμενο crabtree). Ακόμα παράγει αρώματα φρούτων (εστέρες, θιόλες) και πολυσακχαρίτες για σώμα.

1.3.7 Ζύμες γένους *Kloeckera*

Για τα είδη ζυμών που ανήκουν σε αυτό το γένος υπάρχει ένα ενδιαφέρον για την χρήση τους στην παραγωγή ποτών. Τα είδη όπως το *Kloeckera apiculata*, το *K. javanica* και το *K. corticis* απομονώθηκαν σε αυθόρμητες ζυμώσεις του γλεύκους σταφυλιών και του μηλίτη. Οι περισσότεροι εκπρόσωποι αυτού είδους έχουν ένα σχήμα λεμονιού και ασεξουαλική αναπαραγωγή με διπολική εκβλάστηση. Το *Kloeckera apiculata* έχει την ικανότητα να παράγει υψηλότερες συγκεντρώσεις οξικού και ισοαμυλικού αιθυλεστέρα συγκριτικά με άλλες ζύμες non-*Saccharomyces*. Φαίνεται ότι οι τεχνικές ακινητοποίησης κυττάρων μπορούν να είναι μια ακόμα στρατηγική για τη βελτίωση της ζυμωτικής ικανότητας και την παραγωγή ενώσεων με οργανοληπτικό ενδιαφέρον (Estela Escalante 2018). Αυτές οι ζύμες δείχνουν να συμμετέχουν θετικά στο πρώιμο στάδιο της αυθόρμητης ζύμωσης του κρασιού, βέβαια τα στελέχη του *Kloeckera apiculata* είναι τα πιο κυρίαρχα. Όσο η αυθόρμητη ζύμωση εξελίσσεται με την αύξηση της συγκέντρωση της αιθανόλης, τόσο επιβραδύνεται η ζυμωτική δράση των ζυμών και τελειώνει με τη διακοπή της ζύμωσης λόγω της επίδρασης της αιθανόλης. Σε τέτοιες περιπτώσεις οι ποσότητες αιθανόλης είναι περίπου 4-5% ο/ο. Σύμφωνα με μελέτες όσες καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν με το *Kloeckera corticis*, δείχνουν ότι οι ζύμες έχουν την δυνατότητα να παράγουν προϊόντας όπως το οξικό οξύ, την ακεταλδεΐδη, το οξικό αιθυλεστέρα και την ακετοΐνη σε υψηλές συγκεντρώσεις (Estela Escalante 2018). Η ικανότητα αυτών των ζυμομυκήτων να παράγουν μια ποικιλία αρωματικών ενώσεων συμβάλουν στην οργανοληπτική πολυπλοκότητα του προϊόντος τις καθιστά δυνητικά εκμεταλλεύσιμες σε διάφορες ζυμώσεις (Estela Escalante 2018).

1.3.8 Ζύμες γένους *Hanseniaspora*

Έχουν διεξαχθεί λίγες μελέτες σχετικά με την πιθανή χρήση ζυμομυκήτων, που ανήκουν στο γένος *Hanseniaspora* για την παραγωγή ποτών και έχουν υποστεί ζύμωση. Έχει αποδειχθεί ότι αυτές οι ζύμες παίζουν σημαντικό ρόλο κατά το αρχικό στάδιο της αυθόρμητης ζύμωσης του κρασιού και κυριαρχούν τα στελέχη του *Hanseniaspora*. Η ανεκτικότητα και η παραγωγή χαμηλών ποσοτήτων αιθανόλης δεν υπερβαίνουν τη τιμή 5,0% v/v. Αυτό, όμως, είναι ένα αρνητικό χαρακτηριστικό για την βιομηχανία του οίνου, καθώς δεν έχουν την δυνατότητα στις αυθόρμητες ζυμώσεις των οίνων να τελειώσουν την ζύμωση και η περιεκτικότητα σε αιθανόλη φτάνει σε τιμές από 10% v/v και άνω. Ωστόσο είναι γνωστό ότι μπορούν να ζυμώσουν ένα μεγάλο φάσμα σακχάρων συμπεριλαμβανομένης της μαλτόζης, το οποίο είναι ένα σημαντικό χαρακτηριστικό για την βιομηχανία της ζυθοποιίας. Βέβαια, η απόδοση τους προς την αλκοόλη τις κάνει ικανές να παράγουν μύρες τυπικής περιεκτικότητας σε αιθανόλη, όπως αυτές του εμπορίου (4,5–5% v/v) (Estela Escalante 2018). Όσον αφορά την παραγωγή οργανοληπτικών αρωματικών ενώσεων, μελέτες έχουν αναφέρει ότι τα στελέχη *Hanseniaspora osmophila* χαρακτηρίζονται από την παραγωγή υψηλών συγκεντρώσεων οξικού οξέος, ακεταλδεΐδης και οξικού αιθυλεστέρα.

Επιπροσθέτως, παρατηρήθηκε ότι μπορεί να παραχθεί ποικιλία εστέρων, οι οποίοι προσδίδουν αρώματα και νότες από διάφορα φρούτα στα ποτά από τα στελέχη του *Hanseniaspora uvarum*. Από την άλλη μεριά, ορισμένες μελέτες δείχνουν ότι, όσο αναμειγνύονται οι καλλιέργειες του *H. uvarum* με *S. cerevisiae*, παράγονται υψηλότερες ποσότητες ανωτέρων αλκοολών από εκείνες που έγιναν με στελέχη *S. cerevisiae* (Estela Escalante 2018). Κατέχει σημαντικό ρόλο το οξυγόνο και η θερμοκρασία για αυτό και χρειάζεται να ελέγχεται, καθώς επιδρούν στη βιωσιμότητα και την απόδοση της ζύμωσης των ζυμομυκήτων *Hanseniaspora*. Επιπλέον, βοηθούν στην παραγωγή ενώσεων οργανοληπτικής σημασίας και τέλος έχουν επιρροή στην τελική ποιότητα των προϊόντων. Ωστόσο, λόγω των σπάνιων

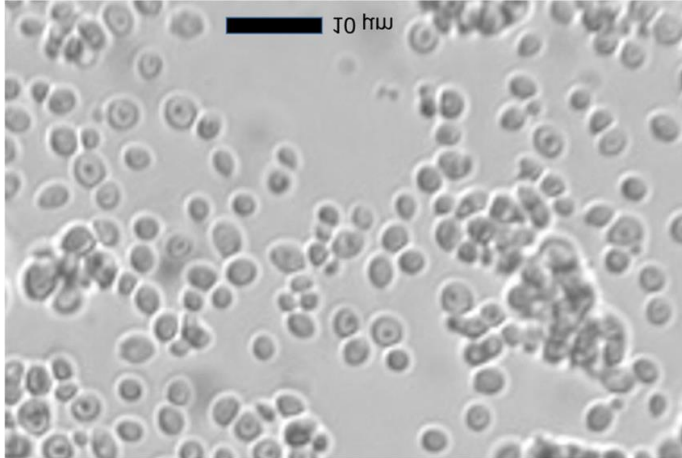
πληροφοριών σχετικά με τη ζυμωτική συμπεριφορά των ζυμομυκήτων *Hanseniaspora*, απαιτούνται πρόσθετες μελέτες για να βρεθούν οι κατάλληλες συνθήκες για τη χρήση τους, για παράδειγμα, στην παραγωγή μπύρας με νέα αρωματικά προφίλ (Estela Escalante 2018).

1.3.9 Ζύμη *Torulaspora delbrueckii*

Τα είδη *Torulaspora* είναι ζυμομύκητες που μπορούν να βρεθούν σε άγριο, αλλά και ανθρώπινο περιβάλλον. Παρατηρείται ότι συνήθως είναι μαζί και με άλλους ζυμομύκητες, όπως τους *Saccharomyces* και *Zygosaccharomyces*. Ακριβώς, επειδή οι τρεις αυτοί οι ζυμομύκητες μοιράζονται όμοια μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά, είχε γίνει λάθος ταξινόμηση κάποιων ειδών στο παρελθόν. Το γένος *Torulaspora* περιλαμβάνει τουλάχιστον τα έξι είδη: *T. delbrueckii*, *T. franciscae*, *T. pretoriensis*, *T. microellipsoides*, *T. globosa* και *T. maleeae* (Ramírez et al., 2018). Ο μικροοργανισμός *Torulaspora delbrueckii* είναι ένα είδος ζύμης, το οποίο ανήκει στο είδος των ασκομυκήτων (*Phylum Ascomycota*). Το μέγεθος των κυττάρων του είναι σχετικά μικρό, το σχήμα στρογγυλό και συναντάται σε φρούτα, βύνη, στο γλεύκος και στο έδαφος. Η *T. delbrueckii* παλαιότερα ήταν γνωστή ως *Saccharomyces delbrueckii* ή *Saccharomyces rosei* λόγω του αρώματος τριαντάφυλλου, που προσδίδει στα προϊόντα ζύμωσης (Jolly et al., 2006). Τα κύτταρα της *Torulaspora* έχουν ως επί το πλείστον σφαιρικό σχήμα (torulu), αν και τα ωοειδή και ελλειψοειδή σχήματα είναι εξίσου συχνά. Το μέγεθος του κύτταρου είναι 2-6 × 3-7 μm και είναι μικρότερο από αυτό του *S. cerevisiae*. Σε αντίθεση με τα άγρια στελέχη *S. cerevisiae*, τα οποία είναι διπλοειδή ή πολυπολίδια κατά τη διάρκεια του αγενούς πολλαπλασιασμού, η *T. delbrueckii* πιστεύεται εδώ και καιρό ότι είναι ένας απλός ζυμομύκητας, κυρίως λόγω του μικρού μεγέθους του κύτταρου. Ωστόσο, έχει πρόσφατα υποδειχθεί ότι η *T. delbrueckii* μπορεί στην πραγματικότητα να είναι διπλοειδής (Ramírez et al., 2018).

Οι μπύρες που παράγονται με *T. delbrueckii* σε μικτές ζυμώσεις και σε καθαρές καλλιέργειες παρουσιάζουν σημαντικά χαρακτηριστικά που σχετίζονται με τη ζυθοποιία, όπως η αύξηση των σημαντικών φρουτώδων εστέρων και η ιδιαίτερη και ευχάριστη αρωματική γεύση (Tataridis et al 2013a;b; 2014). Επίσης η επίδραση της *T. delbrueckii* είναι σαφής σε μεικτές ζυμώσεις (Tataridis et al 2016). Αυτές οι μπύρες παρουσίασαν αύξηση δύο εστέρων με φρουτώδες άρωμα : εξανοϊκός αιθυλεστέρας και οκτανοϊκός αιθυλεστέρας, υπεύθυνος για το άρωμα μήλου. Όσον αφορά τον φαινολογικό αιθυλεστέρα, τα αποτελέσματα έδειξαν αύξηση στις μικτές ζυμώσεις (Canonico et al 2016). Τα στελέχη της *T. delbrueckii*, σε σύγκριση με τα στελέχη του *S. cerevisiae*, εμφανίζουν γενικά μεγαλύτερο στρες λόγω της υψηλότερης ζήτησης αζώτου και οξυγόνου και χαμηλότερη παραγωγή πηκτικής οξύτητας, ακεταλδεΐδης και ακετοΐνης (Tataridis et al 2013a;b; 2014; 2016). Η *T. delbrueckii* παράγει επίσης κρασιά με χαμηλότερες συγκεντρώσεις αιθανόλης από τις παραδοσιακές ζυμώσεις και αυξημένη γλυκερόλη (Contreras et al 2014) Αυτό το χαρακτηριστικό μπορεί να βοηθήσει στα προβλήματα που προκύπτουν από τις κλιματικές αλλαγές, όπως είναι οίνοι υψηλού αλκοολικού τίτλου λόγω των υψηλών συγκεντρώσεων ζάχαρης στα σταφύλια ή στο γλεύκος. Επίσης από έρευνα των έδειξε ότι η ζύμη μπορεί μεταβολίσει όλα σάκχαρα του ζυθογλευκούς σε διάφορες θερμοκρασίες και να παράγει ικανοποιητική ποσότητα αιθανόλης χωρίς να επηρεάζονται οι πηκτικές ενώσεις που παρήχθησαν (Drosou et al., 2022).

1.4 *Lachancea thermotolerans*



Εικόνα V: *L. thermotolerans* από μικροσκόπιο (https://www.researchgate.net/figure/Microscopic-observation-of-Lachancea-thermotolerans-cells-Source-the-authors-data_fig2_325553062)

1.4.1 Γενικά Χαρακτηριστικά

Παλαιότερα γνωστό ως *Kluyveromyces thermotolerans*, η *L. thermotolerans* είναι το γένος *Lachancea*. Αυτό το γένος σύμφωνα με τον (Kurtzman 2003) φιλοξενεί μια ομάδα από πολλά διαφορετικά είδη, που εμφανίζουν ομοιότητες σε επίπεδο rRNA. Μέχρι σήμερα, το γένος φιλοξενεί άλλα 11 είδη: *L. cidri*, *L. dasiensis*, *L. fantastica*, *L. fermentati*, *L. kluyveri*, *L. lanzarotensis*, *L. meyersi*, *L. mirantina*, *L. nothofagi*, *L. quebecensis* και *L. walti*.

Ως αποκαλούμενο πρωτοπλοειδές *Saccharomycetaceae*, τα είδη *Lachancea* έχουν αποκλίνει από τη γενεαλογία του *S. cerevisiae* πριν από τον προγονικό διπλασιασμό ολόκληρου του γονιδιώματος και ως εκ τούτου προσφέρουν ένα συμπληρωματικό μοντέλο για τη μελέτη της εξέλιξης και της ειδογένεσης της ζύμης. Εκτός από την ταξινομική επαναταξινόμηση του *L. thermotolerans*, ο προσδιορισμός της αλληλουχίας του DNA οδήγησε σε εκτεταμένες γονιδιωματικές πληροφορίες (Hranilovic et al., 2017). Αν και υπάρχουν αρκετές πληροφορίες όσον αφορά το γονιδίωμα της *L. thermotolerans*, είναι ακόμα αμφιλεγόμενο, όπως το ίδιο ισχύει και για την ιδιόμορφη ικανότητά του να παράγει γαλακτικό οξύ στην διαδικασία της αλκοολικής ζύμωσης (Jolly et al., 2014). Κάτι ασυνήθιστο, θεωρείται η μεταβολική ικανότητα της παραγωγή μεγάλων συγκεντρώσεων γαλακτικού οξέος (Witte et al., 1989) καθώς, έχει βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση γαλακτικού οξέος κατά την αλκοολική ζύμωση του *L. thermotolerans* είναι 16,6 g/L (Banilas et al., 2016). Συγκριτικά, τα άγρια στελέχη *S. cerevisiae* σε τέτοιες συνθήκες παράγουν κανονικά περίπου 0,2-0,4 g/L (Dequin et al., 1994). Ενώ οι αποδόσεις, που λαμβάνονται από τη *L. thermotolerans*, παραμένουν ανεπαρκείς για τη βιομηχανική παραγωγή χημικών παρουσιάζουν ενδιαφέρον για τις παραγωγές, οι οποίες έχουν σκοπό την αλκοολική ζύμωση με ταυτόχρονη όξυνση (Hranilovic et al., 2017).

Γενικά, όπως αναφέρθηκε τα πιο μελετημένα είδη *Non-Saccharomyces* είναι τα *Torulaspora delbrueckii*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Pichia kluyveri* και *Hanseniaspora uvarum*. Βέβαια, θεωρείται ότι η ζύμη *L. thermotolerans* είναι η πιο αξιόπιστη επιλογή όσον αφορά την αύξηση της οξύτητας και τη μείωση του pH. Αυτό οφείλεται στη μοναδική ικανότητα του να παράγει γαλακτικό οξύ κατά την κατανάλωση των σακχάρων κατά τη διάρκεια της αλκοολικής

ζύμωσης (Boone et al., 2014). Μέχρι τώρα, οι περισσότερες ανασκοπήσεις εστιάζονταν στην εφαρμογή του *L. thermotolerans* και τη ζύμωση κρασιού, παρουσιάζοντας ορισμένα συμπεράσματα, καθιερώνοντας πιθανά κριτήρια επιλογής και προτείνοντας περαιτέρω προκλήσεις (Naumova, et al., 2007). Εξαιτίας των μεγάλων αριθμών στελεχών, που βρίσκονται στα οινολογικά περιβάλλοντα, θεωρείται ως η καλύτερη πηγή απομόνωσης για το *L. thermotolerans*. Αν και, έχει τη δυνατότητα να αναπτύσσεται και σε άλλα περιβάλλοντα, όπως οι χυμοί, που παρουσιάζουν υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων (Freel et al., 2014). Αυτό συμφωνεί με τα βασικά χαρακτηριστικά του *L. thermotolerans*, καθώς το είδος παρουσιάζει εξαιρετική ανοχή σε υψηλές ωσμωτικές πιέσεις και μπορεί να αναπτυχθεί σε συγκεντρώσεις σακχάρου (Vicente et al., 2021). Ακόμα, τα αποτελέσματα των μελετών είναι αντιφατικά και η απόδοση σε αιθανόλη του *L. thermotolerans* θα μπορούσε να εξαρτάται από πρόσθετους παράγοντες. Το μόνο σίγουρο είναι ότι η αύξηση του αριθμού των εμπορικών στελεχών για το κρασί συνοδεύτηκε από αύξηση του επιστημονικού ενδιαφέροντος για το *L. thermotolerans* (Hranilovic et al., 2017).

1.4.2 Η χρήση της *L. thermotolerans* στην παραγωγή του οίνου

Στην παραγωγή του οίνου ορισμένα άρθρα έχουν μελετήσει νέες παραμέτρους, όπως η παραγωγή μαννοπρωτεϊνών και πολυσακχαριτών, με συνδυασμούς των ζυμών *L. thermotolerans* και *Schizosaccharomyces pombe* (Dequin 1994), επιτυγχάνοντας την επιθυμητή μικροβιακή σταθεροποίηση από την άποψη του μηλικού οξέος (Sauer et al., 2010). Πρέπει να αναφερθεί ότι ένα χαρακτηριστικό της *L. thermotolerans* είναι η μειωμένη απόδοση σε αιθανόλη στο κρασί λόγω του μεταβολισμού ενός μέρους των εξόζων σε γαλακτικό οξύ (Gobbi et al., 2013), κάτι που είναι ιδιαίτερα σημαντικό κατά την επεξεργασία σταφυλιών με υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα. Πρόσφατες μελέτες έχουν διερευνήσει την επίδραση του *L. thermotolerans* σε παραμέτρους διαφορετικές από την όξυνση μέσω του γαλακτικού οξέος, που όμως εξακολουθούν να παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον στη σύγχρονη οινολογία, όπως η επίδραση αερισμού, η παραγωγή γλουταθειόνης, η μειωμένη παραγωγή της αιθανόλης, η μείωση της χρήσης του διοξειδίου του θείου, η παραγωγή πολυσακχαριτών και η ανάγκη σε άζωτο (Hranilovic et al., 2017). Η *L. thermotolerans* έχει αναφερθεί ότι παράγει κρασί με υψηλότερα επίπεδα γαλακτικού οξέος, γλυκερόλης και 2-φαινυλαιθανόλης σε μικτές ζυμώσεις (Gobbi et al., 2013). Τα κρασιά σημείωσαν υψηλότερη βαθμολογία στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του «πικάντικου» και «όξιου» για τη ζύμωση της *L. thermotolerans* και του *S. cerevisiae* σε σύγκριση με το κρασί καθαρής καλλιέργειας *S. cerevisiae* (Gobbi et al., 2013). Σε μια μελέτη όπου η *L. thermotolerans* χρησιμοποιήθηκε σε γλεύκος σταφυλιών, παράχθηκε 7,5 g/L γαλακτικού οξέος το οποίο μείωσε το pH στο 3,10 (Mora et al., 1988). Επίσης, αποτελέσματα από άλλες έρευνες (Καψοπούλου et al., 2005) έδειξαν ότι η ζύμωση με αυτό το στέλεχος έδωσε 9,6 g/L L-γαλακτικού οξέος και 7,58% v/v αιθανόλης. Αποδεικνύεται λοιπόν ότι η *L. thermotolerans* αναπτύσσεται σε ποσοστό αλκοόλης μεταξύ 3% v/v και 6% v/v και pH 3,5 στους 20 °C. Όταν έπειτα εμβολιάστηκε σε γλεύκος με αλκοόλη στο 9% v/v δεν αναπτύχθηκε, αλλά επίσης δεν έχασε την βιωσιμότητα της για 10 ημέρες (Καψοπούλου et al., 2005), καθώς είναι γνωστό ότι έχει μέτρια προς υψηλή ανοχή σε αιθανόλη (<13,5 vol.%) (Moreno-Arribas et al., 2009). Επιπλέον, όταν εμβολιάστηκε με ποσότητα 5×10^5 cfu/mL, η *L. thermotolerans* βρέθηκε να έχει ταχεία αύξηση της συγκέντρωσης των κυττάρων φτάνοντας το 1×10^8 cfu/mL σε τέσσερις ημέρες (Καψοπούλου 2005).

Επιπλέον, η χρήση της *L. thermotolerans* αυξάνει την παραγώμενη συγκέντρωση της γλυκερίνης, μειώνει την παραγώμενη συγκέντρωση οξικού οξέος, το οποίο έχει ευεργετική επίδραση στη γεύση του κρασιού (Peskova et al., 2021). Αυτή η μείωση του οξικού οξέος σχετίζεται με την ενεργοποίησή του μηχανισμού για την σύνθεση ακετυλο-CoA, η οποία στη συνέχεια μπορεί να παράγει διάφορα παραπροϊόντα όπως ανώτερες αλκοόλες και οξικούς εστέρες. Βέβαια πρέπει να σημειωθεί ότι παρόλο που η τελική συγκέντρωση οξικού οξέος ξεπέρασε το όριο ανίχνευσης, καμία από τις μπίρες δεν έδωσε μια ευδιάκριτη νότα ξυδιού και ότι η *L. thermotolerans* δεν παρήγαγε ανιχνεύσιμα επίπεδα γαλακτικού οξέος (Toh et al., 2019).

Τέλος τα κρασιά που ελήφθησαν με την χρήση του *L. thermotolerans* είχαν χαμηλότερη περιεκτικότητα σε αιθανόλη σε σύγκριση με τα δείγματα κρασιού που ελήφθησαν χρησιμοποιώντας τον *S. cerevisiae*. Έτσι, η ικανότητα της *L. thermotolerans* να ρυθμίζει την οξύτητα και το pH, να μειώνει τη συγκέντρωση της αιθανόλης χρησιμοποιώντας μέρος των σακχάρων στη σύνθεση του γαλακτικού οξέος, να αυξάνει την περιεκτικότητα σε γλυκερίνη και να συνθέτει μικρές ποσότητες οξικού οξέος υποδεικνύει τις προοπτικές χρήσης αυτού του είδους ζύμης για την παραγωγή ποιοτικών αμπελοοινικών προϊόντων (Peskova et al., 2021). Παρά το γεγονός ότι υπό τις συνθήκες οινοποίησης η *L. thermotolerans* μπορεί να ζυμώνει ενεργά τα σάκχαρα και να παράγει έως και 13,6% vol. αιθανόλη (Ciani et al., 2006) δεν ολοκληρώνει πάντα την ζύμωση με πλήρη κατανάλωση των σακχάρων. Έτσι, χρησιμοποιούνται συχνότερα σε συνδυασμό με *S. cerevisiae*. Ωστόσο, λόγω του ανταγωνισμού μεταξύ *S. cerevisiae* και *L. thermotolerans*, το αποτέλεσμα της συνδυασμένης χρήσης εξαρτάται από διάφορους παράγοντες την ποσότητα των θρεπτικών συστατικών, την παρουσία τοξικών ενώσεων κ.λπ. (Peskova et al., 2021). Υψηλότερη απόδοση ζύμωσης αποδείχθηκε από τα στελέχη *L. thermotolerans* και *L. fermentati*, τα οποία είχαν πολύ καλύτερη απόδοση στον χυμό σταφυλιού Μοσχάτο και το *Lachancea spp.* κατάφερε να ολοκληρώσει την ζύμωση στη μονοκαλλιέργεια. Κατά τη διάρκεια αυτών των ζυμώσεων, και τα τρία *Lachancea spp.* απεικόνισε τη δράση της β-γλυκοσιδάσης, όπου τα υψηλότερα επίπεδα εκφράστηκαν από ένα στέλεχος *L. thermotolerans*, Y940 (Porter 2017).

1.4.3 Η χρήση της *L. thermotolerans* στην ζυθοποιία και στην παραγωγή ξινών ζύθων

Η *Lachancea* είναι η μοναδική, μεταξύ των γενών ζύμης, για την ικανότητά της να παράγει γαλακτικό οξύ, το οποίο μπορεί να επηρεάσει τόσο τη γεύση όσο και την αίσθηση στο στόμα (Tataridis et al 2013b; 2014, Hill 2015). Όπως και με την εμπορική παραγωγή κρασιού, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μαζί με τον *Saccharomyces* σε ζυμώσεις της ζυθοποιίας για να προκαλέσει ταχεία πτώση του pH (Gobbi et al., 2013). Στελέχη που παράγουν υψηλά επίπεδα γαλακτικού οξέος μπορεί ενδεχομένως να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή ξινής μπίρας χωρίς την προσθήκη βακτηρίων κάνοντας πιο απλή την διαδικασία. Υπάρχει αρκετό ενδιαφέρον στην βιομηχανία σχετικά με την εύρεση ενός τρόπου για την παραγωγή ξινής μπίρας με απλές μεθόδους. Η παραγωγή ξινής μπίρας γενικά επιτυγχάνεται με διάφορους τρόπους, συνήθως με χρήση πολλαπλών μικροοργανισμών, τόσο ζυμών όσο και βακτηρίων, και είναι μια μακρά διαδικασία ωρίμασης. Αλλά η εισαγωγή γαλακτικών βακτηρίων προκαλεί διάφορα προβλήματα, όπως για παράδειγμα περιπλέκει τις διαδικασίες καθαρισμού και απολύμανσης εάν πρόκειται να αποφευχθεί η διασταυρούμενη μόλυνση. Επιπροσθέτως, η προσθήκη λυκίσκου προκαλεί στα βακτήρια του γαλακτικού οξέος μια ευαισθησία στα ισο-α-οξέα λυκίσκου, για αυτό θα πρέπει να ελαχιστοποιείται (Domizio et al., 2016). Το στέλεχος *L. thermotolerans* Concerto έδειξε σημαντικά

υψηλότερη παραγωγή ακεταλδεΐδης. Επίσης η πρωτογενής κετόνη που ανιχνεύθηκε στο γλεύκος ήταν η trans-b-damasconone που συχνά που βρίσκεται και στον λυκίσκο και είναι γνωστό ότι συμβάλλει σημαντικά στη γεύση της μπίρας, προσδίδοντας ένα άρωμα βρασμένου μήλου (Toh et al., 2019). Μια ανεπιθύμητη ένωση που ανιχνεύεται στη μπίρα που παράχθηκε από το στέλεχος Concerto είναι η 4-βινυλφαινόλη, η οποία δίνει μια φαρμακευτική γεύση και μπορεί να συμβάλει στην αλλοίωση της γεύσης. Αυτό συμφωνεί με τα ευρήματα των (Domizio et al., 2016), ο οποίος ανέφερε ότι η *L. thermotolerans* Concerto απέδωσε μια δυσάρεστη φαινολικά οσμή. Τέλος η *L. Thermotolerans* Concerto παρήγαγε ποσότητα οξικού 2-φαινυλαιθυλεστέρα και ο οξικού ισοαμυλεστέρα (Toh et al., 2019).

Εκτός από την παραγωγή γαλακτικού οξέος, η *L. thermotolerans* θα μπορούσε επίσης να ενισχύσει άλλες γεύσεις μπίρας. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης γλεύκους κρασιού, αυτή η ζύμη έδωσε αυξημένα επίπεδα γαλακτικού αιθυλεστέρα (Gobbi et al., 2013), (Witrick et al., 2017), που έχει φρουτώδες άρωμα και έχει βρεθεί σε υψηλά επίπεδα σε ορισμένες βελγικές μπίρες (Lambic και Gueuze) (Spraepen, et al., 1978) και στη γερμανική Berliner Weisse (Bamforth 2003). Οι περισσότερες μελέτες της *L. thermotolerans* έχουν επικεντρωθεί στη συνζύμωσή του με *Saccharomyces* λόγω της χαμηλότερης ικανότητας ζύμωσης (Domizio et al., 2016). Αν και, έχει προταθεί να χρησιμοποιούνται ορισμένες ζύμες non-*Saccharomyces* σε μικτές ζυμώσεις για την ενίσχυση των γεύσεων, οι συνζυμώσεις δεν είναι πρακτικές στην παρασκευή ζύθου λόγω της συνήθους πρακτικής της επαναχρησιμοποίησης των ζυμών που συλλέγεται από μια ζύμωση ως εμβόλιο (Domizio et al., 2016). Αρκετά στελέχη *L. thermotolerans* έδειξαν δυνατότητα για ζύμωση μπίρας, ενώ άλλα στελέχη έχουν δείξει ότι δεν είναι ικανά να καταναλώσουν την μαλτόζη και το σάκχαρο σε μεγαλύτερο ποσοστό στο ζυθογλεύκος. Σύμφωνα με ερευνά (Domizio, et al., 2016) τα στελέχη που εξετάστηκαν ήταν κατάλληλα για την ανάπτυξη τους σε μαλτόζη, αν και όχι μαλτοτριόζη. Αυτά τα στελέχη παρήγαγαν, επίσης, υψηλότερα επίπεδα γλυκερίνης και γαλακτικού οξέος από το στέλεχος *S. cerevisiae*. Μόνο το στέλεχος 101 (Domizio et al., 2016) παρουσίασε μεγάλη πτώση του pH σε σύγκριση με το *S. cerevisiae*, αν και το pH ήταν ακόμα πολύ υψηλότερο από αυτό των περισσότερων ξινών μπυρών. Σε μελέτη των (Peskova et al., 2021) οι ζύμες *L. thermotolerans* και *S. ludwigii* παρήγαγαν υψηλότερες συγκεντρώσεις διακετυλίου ($1,9 \text{ mg l}^{-1}$). Το διακετύλιο δίνει ένα άρωμα βουτύρου. Επίσης σε ίδια μελέτη φάνηκε ότι η παραγωγή αιθανόλης δεν είχε σημαντική διαφορά για τα στελέχη *L. thermotolerans* και *S. cerevisiae*. Τα υψηλά επίπεδα διακετυλίου που απαντώνται γενικά στις μπίρες που θα μπορούσαν να σχετίζονται με τη χαμηλή ικανότητα μείωσης των υψηλών ποσοτήτων αυτής της ένωσης (Peskova et al., 2021).

Μελέτες άλλων στελεχών υποδεικνύουν ότι ορισμένα στελέχη παράγουν σημαντικά περισσότερο γαλακτικό οξύ, μειώνοντας το pH της μπίρας σε <3,6. Ως εκ τούτου, είναι πιθανό ότι ορισμένα στελέχη θα μπορούσαν να συμβάλουν στον ξινό χαρακτήρα της μπίρας (Domizio et al., 2016), σε καθαρές και σε όλες τις μικτές ζυμώσεις, σε σύγκριση με το *S. cerevisiae* η *L. thermotolerans*, δείχνει γενικά μεγάλη μείωση του pH (Domizio et al., 2016) Επιπλέον, μια σημαντική αύξηση στην περιεκτικότητα σε οξικού ισοαμυλεστέρα (άρωμα μπανάνας) παρουσιάστηκε σε δοκιμή *S. cerevisiae/ L. thermotolerans* με αναλογία εμβολιασμού 1:20. Σε ζύμωση με στόχο την παραγωγή ξινής μπίρας βρέθηκε μια τάση για μείωση του pH, και παρήγαγε μεγαλύτερη ποσότητα γαλακτικού οξέος ($1,83 \text{ g/L}$), υψηλότερη περιεκτικότητα βουτυρικού αιθυλεστέρα και αύξηση του οξικού αιθυλεστέρα. Η χαμηλή περιεκτικότητα σε αιθανόλη, που επιδεικνύεται από τις καθαρές καλλιέργειες *L. thermotolerans*, ήταν σχετική για την παραγωγή μπίρας χαμηλής αλκοόλης (Domizio et al., 2016).

1.4.4 Εμπορικά στελέχη *L. thermotolerans*

Υπάρχουν διαφορά στελέχη *L. thermotolerans* στο εμπόριο τόσο για την βιομηχανία του οίνου όσο και του ζύθου κάποια από αυτά είναι :

Οίνος :

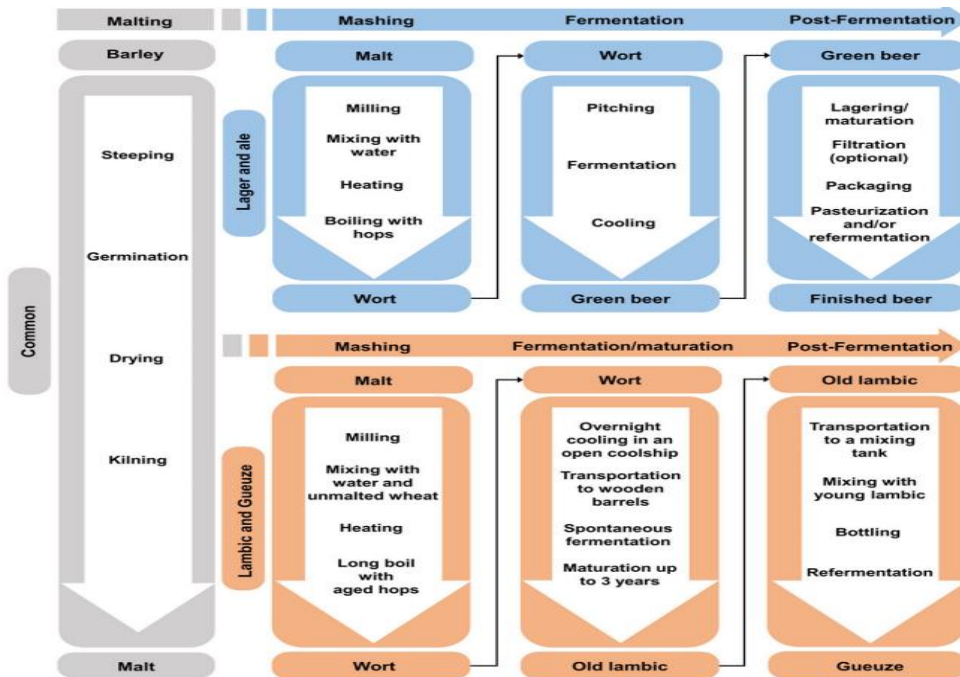
- ***Lachancea thermotolerans*** (Zymaflore Omega – Laffort)
<https://laffort.com/en/bioacidification/>
- ***Lachancea thermotolerans*** (Laktia– Lallemand)
<https://www.lallemandwine.com/en/australia/products/catalogue/wine-yeasts/109/level-2-solutions-laktia/>
- ***Lachancea thermotolerans*** (Excellence X-FRESH – Lamothe Abiet)
<https://lamothe-abiet.com/en/yeasts/excellence-x-fresh/>
- ***Lachancea thermotolerans*** (VIW SHIELD LT – Vason)
<https://www.vason.com/index.cfm/en/products/lieviti-viw-shield-lt-288/>

Ζύθος :

- ***Lachancea thermotolerans*** (Philly Sour- Lallemand)
<https://www.lallemandbrewing.com/en/canada/product-details/wildbrew-philly-sour>
- ***Lachancea thermotolerans*** (Lactic Magic – Escarpment Labs)
<https://escarpmentlabs.com/products/lactic-magic>
- ***Lachancea thermotolerans*** (Lachancea LLC – Lachancea.com)
<https://lachancea.com/yeast>
- ***Lachancea thermotolerans*** (Lachancea - Propagate Lab)
<https://propagatelab.com/product/lachancea-thermotolerans-3/>
- ***Lachancea thermotolerans*** (FERMO Brew Acid – AEB Brewing)
<https://www.aeb-group.com/en/fermo-brew-acid-17711>

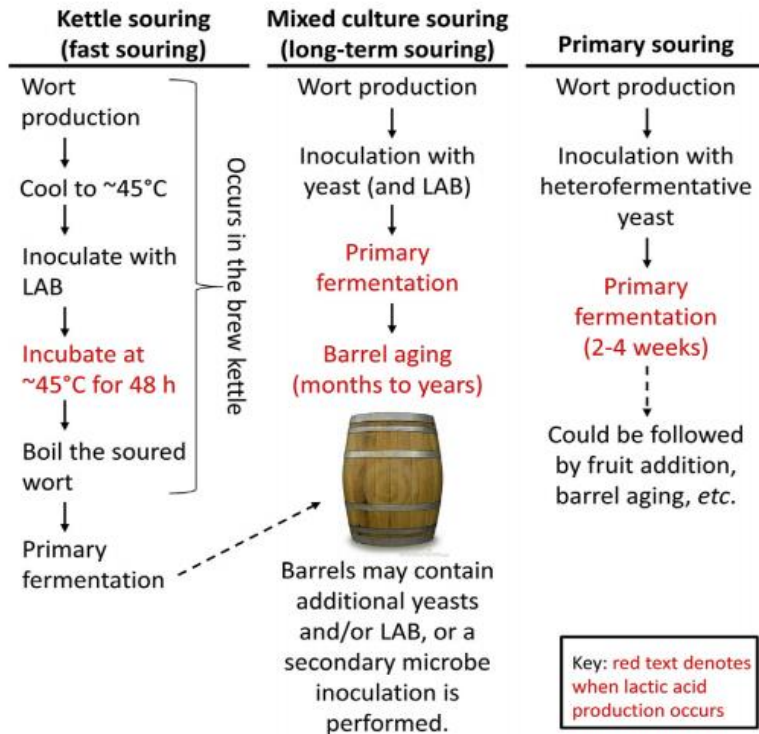
1.5 Ξινές μπύρες

Οι παραδοσιακές ξινές μπύρες σε αντίθεσή με τις μπύρες τύπου π.χ. Lager και Ale έχουν κάποιες διαφορές στην παραγωγή (εικόνα VI). Αρχικά παράγονται κυρίως με αυθόρμητες ζυμώσεις, που περιλαμβάνουν πολλά είδη ζύμης και βακτηρίων. Οι ξινές μπύρες ξεχωρίζουν βασικά, επειδή έχουν υψηλή συγκέντρωση οργανικών οξέων με αποτέλεσμα ένα χαμηλό pH, όπως είναι το γαλακτικό οξύ και το οξικό οξύ και μια συγκεκριμένη όξινη γεύση. Αρκετές προκλήσεις περιπλέκουν την παραγωγή ξινής μπύρας μέσω παραδοσιακών μεθόδων, όπως ο δύσκολος έλεγχος της διαδικασίας, η έλλειψη συνέπειας και επαναληψιμότητας στην ποιότητα του προϊόντος και η χρονοβόρα ζύμωση. Επίσης, η ξινή μπύρα είναι ένα είδος μπύρας με μεγάλη ποικιλία, που δεν περιορίζεται σε έναν συγκεκριμένο ορισμό. Ένας κοινός παρονομαστής για την ξινή μπύρα είναι οι υψηλότερες συγκεντρώσεις οργανικών οξέων, που έχουν ως αποτέλεσμα ένα χαμηλότερο pH (pH 3,0 έως 3,9) σε σύγκριση με τα άλλα είδη μπυρών. Αυτό οδηγεί σε συγκεκριμένα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, όπως η όξινη γεύση. Γενικά, τα αυξημένα επίπεδα οργανικών οξέων στην ξινή μπύρα προέρχονται από τη συμμετοχή βακτηρίων στη διαδικασία της ζύμωσης (Dysvik et al., 2020).



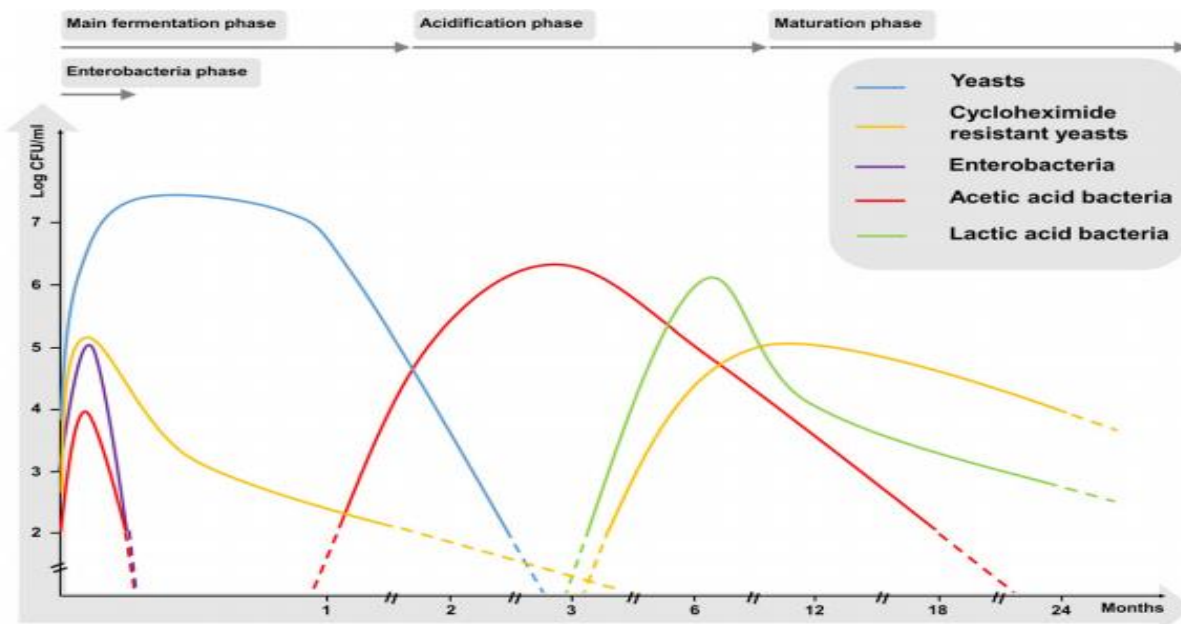
Εικόνα VI: Διάγραμμα διαδικασίας παραγωγής μπύρας τύπου Lambic και Gueuze (De Roos, & De Vuyst 2018).

Ενώ η ζύμωση των συμβατικών ειδών μπύρας περιορίζεται συνήθως σε ζυμώσεις ενός στελέχους, η ξινή μπύρα προέρχεται από τη ζύμωση πολλών μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων τόσο των ζυμών όσο και των βακτηρίων (Van Oevelen et al., 1977). Υπάρχουν διάφορες τεχνικές στη ζύμωση μιας ξινής μπύρας (εικόνα VII), συμπεριλαμβανομένης της αυθόρμητης ζύμωσης, των ελεγχόμενων μικτών ζυμώσεων, της μεθόδου όξυνσης σε βραστήρα (Kettle souring) και της μεθόδου με αρχική όξυνση (primary souring) (Bossaert et al., 2019).



Εικόνα VII: Διαφορές μεταξύ μεθόδου kettle souring, wood-aged souring και primary souring. (Osburn, et al., 2018)

Αυτές οι ζυμώσεις πραγματοποιούνται κυρίως από είδη μικροοργανισμών, όπως είναι ο *Lactobacillus*, ο *Pediacoccus* και ο *Brettanomyces* κλπ (εικόνα VIII) έχουν σαν αποτέλεσμα την μείωση του pH, του γλεύκους και δίνουν στο τελικό προϊόν τα επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (Modrzejewska 2018). Επιπροσθέτως, διάσημες παραδοσιακές ξινές μπύρες βρίσκονται σε ζυθοποιία στο Βέλγιο, που περιλαμβάνει μπύρες τύπου lambic, geuze και kriek, καθώς και κόκκινη μπύρα Φλάνδρας. Η Berliner Weisse και η Gose είναι μπύρες, οι οποίες προέρχονται από την Γερμανία (Bossart et al., 2019), η American coolship ale (ACA) από την Αμερική, με μεγάλη επιρροή από τις μπύρες του Βελγίου (Bokulich et al., 2012).



Εικόνα IX: Η μικροβιακή διαδοχή κατά τη διάρκεια μιας διαδικασίας παραγωγής ξινής μπίρας με αυθόρμητη ζύμωση. (De Roos, & De Vuyst, 2018).

Εν κατακλείδι, η ξινή μπίρα έχει γίνει αρκετά δημοφιλής και έτσι υπάρχουν έρευνες πλέον τόσο για τον παραδοσιακό τρόπο ζύμωσης όσο και για άλλες νέες τεχνικές παραγωγής, καθώς η διαδικασία παραγωγής είναι πολύπλοκη (Dysvik et al., 2020). Βέβαια, η παρασκευή ξινής μπίρας μπορεί να εμφανίσει διάφορα προβλήματα, όπως είναι ο κίνδυνος μόλυνσης ολόκληρου του εξοπλισμού της ζυθοποιίας, ενώ η αποστείρωση και η απολύμανση είναι δύσκολη και δαπανηρή. Επιπλέον, η παραγωγή ξινής μπίρας είναι χρονοβόρα και το τελικό αποτέλεσμα είναι αβέβαιο, γεγονός που καθιστά την τελική τιμή του προϊόντος απαγορευτική (Modrzejewska 2018).

Σύμφωνα με σελίδες αξιολόγησης μπίρας υπάρχουν πολλά εμπορικά προϊόντα ξινών μπιρών :

Beer Advocate (<https://www.beeradvocate.com/>) Συνολο 22845 προιοντα

- Berliner Weisse - 2800 προϊόντα
- Brett Beer - 270 προϊόντα
- Faro - 80 προϊόντα
- Flanders Oud Bruin - 50 προϊόντα
- Flanders Red Ale - 311 προϊόντα
- Fruited Kettle Sour – 10.177 προϊόντα
- Fruit Lambic - 523 προϊόντα
- Gose - 2610 προϊόντα
- Gueuze - 110 προϊόντα
- Lambic - 131 προϊόντα
- Wild Ale - 5783 προϊόντα

Rate Beer (<https://www.ratebeer.com/>) (Η σελίδα δείχνει τα 50 προϊόντα με τις υψηλότερες αξιολογήσεις)

- Berliner Weisse - 50 προϊόντα
- Berliner Weisse - Flavored / Catharina Sour - 50 προϊόντα
- Flanders Oud Bruin - 50 προϊόντα
- Gose - 50 προϊόντα
- Grodziskie / Grätzer / Lichtenhainer - 50 προϊόντα
- Gose Flavored - 50 προϊόντα
- Lambic Faro - 19 προϊόντα
- Lambic Flavored - 50 προϊόντα
- Lambic Gueuze - 50 προϊόντα
- Lambic - Unblended Jonge / Oude - 50 προϊόντα
- Sour / Wild Beer - 50 προϊόντα
- Sour / Wild Beer – Dark - 50 προϊόντα
- Sour / Wild Beer – Flavored - 50 προϊόντα
- Sour Flemish Ale - Flanders Red / Oud Bruin - 50 προϊόντα

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Ανάπτυξη κυττάρων σε διαφορετικά σάκχαρα, pH, IBU

Χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια:

- Όξινο φωσφορικό κάλιο (Potassium phosphate dibasic puriss) >99% SIGMA-ALDRICH
- Δίσοξινο φωσφορικό κάλιο (POTASSIUM DIHYDROGEN POSPHATE) >98% PENTA
- Θειικό αμμώνιο (AMMONIUM SULFATE A.G.) >99.5% PENTA
- Θειικό μαγνήσιο (Magnesium sulfate heptahydrate) >99.5% MERCK
- Θειικός ψευδάργυρος (Zink sulfate heptahydrate) >99.5% MERCK
- Εκχύλισμα ζύμης (Yeast Extract) LAB
- Γλυκόζη (D-(+)-Glucose), 99% Alfa Aesar (άνυδρη)
- Φρουκτόζη (D-FRUCTOSE) >98.5% Duchefa Biochemies
- Μαλτόζη (D-(+)-Maltose monohydrate) > 99% MERCK
- Κουανό του μεθυλενίου
- NaOH Sodium hydroxide pellets pure <99% MERCK
- Δινιτροσαλικυλικό οξύ (3,5-Dinitrosalicylic acid) 98% SIGMA-ALDRICH
- Potassium sodium tartrate tetrahydrate 99% SIGMA-ALDRICH
- Ένυδρο όξινο φωσφορικό νάτριο (di-Sodium hydrogen phosphate dehydrate) >99.5 MERCK
- Θειικό νάτριο (Sodium Sulfate, anh. a.r.) Chem-Lab NV
- HCl (3N)
- Hop extract isomerised 6% 100 ml (Brewferm)
- Φυσιολογικός ορός 500ml (New Sept Plus)

2.1.1 Δημιουργία Υποστρωμάτων

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

Πίνακας 1 : Συνταγή υποστρώματος αναφοράς (Kennedy et al 1997)

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

Το εκχύλισμα ζύμης είναι εμπορικό σκεύασμα το οποίο περιέχει:

- Αμινοξέα
- Πεπτίδια
- Βιταμίνες
- Υδρογονάνθρακες

Αφού ζυγίσθηκαν οι παραπάνω ποσότητες προστέθηκε νερό βρύσης και ακολούθησε ήπια ανάδευση. Στη συνέχεια ρυθμίστηκε το pH του μίγματος ($\approx 5,0$) κοντά σε αυτό ενός κανονικού ζυθογλευκούς με την βοήθεια HCl (3N). Η διαδικασία επαναλήφθηκε για να έχουμε την ανάλογη ποσότητα για το κάθε σάκχαρο. Τέλος έγινε αποστείρωση στους 121 °C για 30 λεπτά.

Πίνακας 2 : Ποσότητα σακχάρων που προστέθηκαν σε κάθε υπόστρωμα (Kennedy et al 1997).

Σάκχαρο	1 (Υπόστρωμα γλυκόζης)	2 (Υπόστρωμα φρουκτόζης)	3 (Υπόστρωμα μαλτόζης)	4 (Υπόστρωμα λακτοζης)	5 (Υπόστρωμα μαλτοτριοζης)	6 (Υποστρωμα σακχαροζης)	6 (Υποστρωμα Mix)
Γλυκόζη	20 g/L	-	-	-	-	-	2 g/L
Φρουκτόζη	-	20 g/L	-	-	-	-	1 g/L
Μαλτόζη	-	-	20 g/L	-	-	-	17 g/L
Σακχαροζη	-	-	-	-	-	20 g/L	-
Λακτοζη	-	-	-	20 g/L	-	-	-
Μαλτοτριοζη	-	-	-	-	20 g/L	-	-

Η αναλογία σακχάρων που επιλέχθηκε για το Mix προέκυψε από την βιβλιογραφία και προσομοιάζει την περιεκτικότητα ενός βυνογλεύκου σε σάκχαρα. Δηλαδή:

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

Η προσθήκη των σακχάρων πραγματοποιήθηκε σε συνθήκες συνεχούς και ήπιας ανάδευσης. Το υπόστρωμα Mix και για τις δυο ζύμες με pH 5,0 και 0 IBU χρησιμοποιήθηκε ως control

Στην συνέχεια σε υπόστρωμα Mix προσδέθηκε σε 4 διαφορετικές συγκεντρώσεις εκχύλισμα λυκίσκου (Hop extract isomerised 6%) για την δημιουργία 4 νέων υποστρωμάτων με διαφορετικά IBU 25, 50, 75 και 100 αντίστοιχα

Παρόμοιος προσθήκες HCl (3N) ή NaOH σε υπόστρωμα Mix σε διαφορετικές συγκεντρώσεις για την δημιουργία τεσσάρων διαφορετικών υποστρωμάτων με διαφορετικό pH 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, και 5.5, αντίστοιχα

Τα υποστρώματα που θα χρησιμοποιηθούν για το Bioscreen έχουν 2% περιεκτικότητα σε σάκχαρα

2.1.2 Δημιουργία εμβολίων και εμβολιασμός

Οι ζύμες που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

- ***Saccharomyces cerevisiae*** (US-05 Safale - Fermentis)
<https://fermentis.com/en/product/safale-us-05/>
- ***Lachancea thermotolerans*** (Philly Sour- Lallemand)
<https://www.lallemandbrewing.com/en/canada/product-details/wildbrew-philly-sour/>

Τα δυο διαφορετικά στελέχη ζύμης προκαλιεργήθηκαν στο παραπάνω συνθετικό υπόστρωμα 2% γλυκόζης Mix μέχρι την εκθετική τους φάση για 24 ώρες με βάση παρόμοιες μελέτες των (Regalado-Gonzalez et al 2018, Christopher et al., 2008). Στην συνέχεια, ξεπλυθήκαν με φυσιολογικό ορό και φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά σε 3500 rpm και χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό των υποστρωμάτων (για το Bioscreen C) με αναλογία 6×10^6 κύτταρα/ml.

2.1.3 Παρακολούθηση ανάπτυξης βιομάζας με Bioscreen C

Συνολικά δημιουργήθηκαν 32 διαφορετικά υποστρώματα εις τριπλούν τα οποία εμβολιαστήκαν ομοίως με *Lachancea thermotolerans* και με *Sacharomyces cerevisiae* και 3 με σέκο υπόστρωμα Mix χωρίς ζύμες για την σύγκριση των αποτελεσμάτων, δηλαδή στο σύνολο 99 δείγματα για το Bioscreen. Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε είναι το **Bioscreen C** (Bioscreen and Growth Curves Ltd., <https://www.bioscreen.fi/>). Το όργανο κατέγραφε την οπτική απορρόφηση στα δείγματα ανά 30 λεπτά για 44 ώρες στα 600nm σε θερμοκρασία 25 °C σύμφωνα με παρόμοιες μελέτες (Koivistoinen et al., 2013) και (Bellut et al., 2018)

2.1.4 Ανάλυση αποτελεσμάτων κινητικής ανάπτυξης με Combase

Το ComBase είναι ένα διαδικτυακό εργαλείο που χρησιμοποιείται για την ποσοτική μικροβιολογία των τροφίμων. Τα κύρια χαρακτηριστικά του είναι η βάση δεδομένων ComBase και τα μοντέλα ComBase.

Το επίκεντρο του ComBase είναι να περιγράφει και να προβλέπει πώς οι μικροοργανισμοί επιβιώνουν και αναπτύσσονται κάτω από μια ποικιλία συνθηκών που σχετίζονται κυρίως με τα τρόφιμα. Αυτό περιλαμβάνει την ανάπτυξη νέων προϊόντων διατροφής και την αναμόρφωση των τροφίμων, το σχεδιασμό πρωτοκόλλων δοκιμών πρόκλησης, την παραγωγή σχεδίων για την ασφάλεια των τροφίμων και τη βοήθεια των οργανισμών δημόσιας υγείας να αναπτύξουν επιστημονικές πολιτικές για τα τρόφιμα μέσω ποσοτικής αξιολόγησης κινδύνου. Αρχεία που έχουν κατατεθεί στο ComBase, περιγράφουν πώς οι συνθήκες, όπως η θερμοκρασία, το pH το νερό, καθώς και άλλοι παράγοντες (π.χ. συντηρητικά και ατμόσφαιρα) επηρεάζουν την ανάπτυξη των βακτηρίων. Κάθε εγγραφή δεδομένων δείχνει στους χρήστες πώς αλλάζουν οι πληθυσμοί των βακτηρίων για έναν συγκεκριμένο συνδυασμό περιβαλλοντικών παραγόντων. Τα μαθηματικά μοντέλα (τα μοντέλα ζυμού ComBase και τροφίμων)

αναπτύχθηκαν σε συστηματικά παραγόμενα δεδομένα για να προβλέψουν πώς αναπτύσσονται ή επιβιώνουν διάφοροι οργανισμοί κάτω από διάφορες συνθήκες

(<https://www.combase.cc/index.php/en/about-us>)

Επειδή στην συγκεκριμένη μελέτη δεν υπήρχαν βακτήρια αλλά ζύμες το μοντέλο που ακολουθήθηκε ήταν το Biphasic-Model καθώς έδινε το μικρότερο ποσοστό σφάλματος (R^2) και χρησιμοποιήθηκε για καθαρά συγκριτικούς σκοπούς.

2.2 Ζυθοποίηση, ζύμωση και αναλύσεις στην μπύρα

2.2.1 Παραγωγή ζυθογλεύκους

Για την δημιουργία του ζύθου χρησιμοποιήθηκε συνταγή που αναγράφεται παρακάτω από τους η οποία φάνηκε να συνιστάτε για χρήση *L. thermotolerans*

Η σύσταση της συνταγής :

Για την παρασκευή 20 L γλεύκους χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω

- 5 kg αλεσμένης βύνης
- 30 g λυκίσκου Centennial A/A 10,6%

Οι αναλογίες ήταν οι εξής

- 80% Pils (Vergina)
- 10% Wheat (Vergina)
- 5% Oat flakes
- 5% FBA (Vergina)

Ακολουθήθηκε πρόγραμμα πολτοποίησης:

1. Η προσθήκη της βύνης έγινε σε νερό 68 °C (strike water temperature) και στην συνέχεια ακολουθήθηκε η παραμονή της για 1 ώρα στους 65 °C
2. Αύξηση της θερμοκρασίας σε 5 λεπτά στους 72 °C και παραμονή για 15 λεπτά
3. Αύξηση της θερμοκρασίας σε 5 λεπτά στους 77 °C και παραμονή για 10 λεπτά

Ακολουθήθηκε διήθηση του γλεύκους για 2 ώρες και βρασμός για 1 ώρα. Οι προσθήκες λυκίσκου έγιναν πρώτα 15 g στα 30 λεπτά του βρασμού και τα υπόλοιπα 15 g, 10 λεπτά πριν το τέλος του βρασμού. Στην συνέχεια έγινε διήθηση με τεχνική whirlpool για 15 λεπτά και ψύξη του γλεύκους το οποίο στην συνέχεια εμβολιάστηκε αναλόγως με τις παραμέτρους του πειράματος.

2.2.2 Ζυμώσεις και μετρήσεις

Το γλεύκος από την ίδια παραγωγή χωρίστηκε ανά 1,2 L σε δοχεία των 1,5 L και επεξεργάστηκε ανάλογα με συνθήκη ζύμωσης που θα μελετηθεί. Το πείραμα επαναλήφθηκε με γλεύκος ίδιας παραγωγής με τις ίδιες συνθήκες για τα δοχεία 3,4,5,6 και 8. Επίσης χωρίστηκε γλεύκος ίδιας παραγωγής σε 3 δοχεία με τον ίδιο τρόπο στα οποία μελετήθηκε μόνο η αλλαγή του βάρους τους κατά την διάρκεια της ζύμωσης. Οι συνθήκες που μελετήθηκαν ήταν η ζύμωση σε θερμοκρασίες των 13, 18, 24, 30 °C, σε αρχικές πυκνότητες των 12,5, 16, και 19,5 °P και με ποσότητες εμβολίου 1, 1,5 και 2 g/l. Οι συνθήκες ζύμωσης και τα κωδικά τους ονόματα που θα χρησιμοποιηθούν στην συνέχεια αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα :

Το σύνολο των δοχείων/δειγμάτων με τις διαφορετικές συνθήκες :

Πίνακας 3 : Το σύνολο των δοχείων/δειγμάτων με τις διαφορετικές συνθήκες που εξεταστήκαν και με την κωδική τους ονομασία. Τα δείγματα B είναι οι επαναλήψεις των αντίστοιχων δειγμάτων

Δοχεία	Or. Extract (°P)	Temp (°C)	Pitching rate (g/L)	Code-name
Δείγμα 1A	12,50	13,0	1,50	1.A-12,5p-13C-1,5g/l
Δείγμα 2A	12,50	18,0	1,50	2.A-12,5p-18C-1,5g/l
Δείγμα 3A	12,50	24,0	1,50	3.A-12,5p-24C-1,5g/l
Δείγμα 4A	12,50	30,0	1,50	4.A-12,5p-30C-1,5g/l
Δείγμα 5A	15,70	24,0	1,50	5.A-15,7p-24C-1,5g/l
Δείγμα 6A	19,50	24,0	1,50	6.A-19,5p-24C-1,5g/l
Δείγμα 7A	12,50	24,0	1,00	7.A-12,5p-24C-1,0g/l
Δείγμα 8A	12,50	24,0	2,00	8.A-12,5p-24C-2,0g/l
Δείγμα 3B	12,50	24,0	1,50	3.B-12,5p-24C-1,5g/l
Δείγμα 4B	12,50	30,0	1,50	4.B-12,5p-30C-1,5g/l
Δείγμα 5B	15,50	24,0	1,50	5.B-15,5p-24C-1,5g/l
Δείγμα 6B	19,50	24,0	1,50	6.B-19,5p-24C-1,5g/l
Δείγμα 8B	12,50	24,0	2,00	8.B-12,5p-24C-2,0g/l

Πίνακας 4: Το σύνολο των δοχείων/δειγμάτων με τις διαφορετικές συνθήκες που εξεταστήκαν με μέτρηση του βάρους του δοχείου

Δοχεία	Or .Extract (°P)	Temp (°C)	Pitching rate(g/L)	Original Net Weight (g)	Code-name
Δείγμα 4A Βάρος	12,50	24,0	1,50	1131,9	3A-Weight
Δείγμα 5A Βάρος	15,70	24,0	1,50	1129,7	5A-Weight
Δείγμα 6A Βάρος	19,50	24,0	1,50	1133,6	6A-Weight

Πρέπει να σημειωθεί ότι :

- Ο εμβολιασμός έγινε κατευθείαν στα δοχεία με ξηρή ζύμη *Lachancea thermotolerans*
- Η αύξηση της αρχικής πυκνότητας έγινε με χρήση γλυκόζης
- Τα δοχεία παρέμειναν σε χώρο με ανάλογη σταθερή θερμοκρασία για όλη την διάρκεια της ζύμωσης

2.2.3 Αναλύσεις

Για τις μετρήσεις και τις αναλύσεις χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω όργανα και αντιδραστήρια

Υλικά

- 0,5% φαινολοφθαλεΐνη
- 0,1N NaOH
- Γλυκόζη (D-(+)-Glucose), 99% Alfa Aesar (άνυδρη)

Όργανα

- pH-μέτρο (HANNA 8081x)
- Φασματοφωτόμετρο
- Αλκοολόμετρο, πυκνόμετρο (Alex 500, Anton Paar)
- Plato-μετρό (DMA 35 Basic, Anton Paar)

Για την παρακολούθηση της ζύμωσης έγιναν μετρήσεις πυκνότητας/σχετικής πυκνότητας/βαθμών Plato (°P) με ψηφιακό πυκνόμετρο DMA 35 Basic (Anton Paar) με τη μέθοδο ASBC Method beer-2B & 3 και pH (ASBC Method beer-9) το οποίο παρέχει αξιολογικά αποτελέσματα τόσο σε *Saccharomyces* όσο και σε non-*Saccharomyces* ζύμες σύμφωνα με την βιβλιογραφία (Johnson, et al., 2022, House 2016). Οι αρχικές και οι τελικές μετρήσεις για το εκχύλισμα έγιναν και με αραιόμετρο/σακχαρόμετρο σε βαθμού °P.

Οι μετρήσεις λαμβάνονταν ανά 24 ώρες εκτός από το τέλος της ζύμωσης που ήταν ανά 48 ή 72 ώρες. Τα δείγματα για τα δοχεία 1-8 λαμβάνονταν υπό ασηπτικές συνθήκες και μετρούνταν εις τριπλούν η πυκνότητα και το pH. Για τα δοχεία B1-B3 λαμβάνονταν μετρήσεις βάρους με ζυγό ακριβείας ενός δεκαδικού ψηφείου ανά 24 ώρες εκτός από το τέλος της ζύμωσης που ήταν ανά 48 ή 72 ώρες, η παρακολούθηση της κινητικής πορείας της ζύμωσης μπορεί να μελετηθεί με βάση την απώλεια βάρους της κωνικής φιάλης που περιέχει το υπόστρωμα λόγω του εκλυόμενου διοξειδίου του άνθρακα.

Μετά το τέλος της ζύμωσης στα δείγματα μετρήθηκε η οξύτητα με την μέθοδο της ογκομέτρησης, η πυκνότητα, το pH, η αλκοόλη με το όργανο Alex 500 και το χρώμα με φασματοφωτόμετρο την μέθοδο του ASBC και ακολουθήσε εμφιάλωση των δειγμάτων με προσθήκη γλυκόζης 6g/L και αποθήκευση στους 20 C για δυο βδομάδες.

A) Προσδιορισμός αλκοόλης, πυκνότητας και πραγματικού εκχυλίσματος (ASBC Method beer-8G)

Αρχικά δείγμα 100 ml φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στα 3500 rpm και φιλτράρεται. Στην συνέχεια το όργανο ξεπλένεται τρεις φορές και μηδενίζεται με απιονισμένο νερό. Υστέρα τοποθετείται δείγμα 50 ml στο σωληνάκι της υποδοχής του οργάνου Alex 500 (Anton Paar) και λαμβάνεται μέτρηση η οποία επαναλαμβάνεται 3 τρεις φορές. Εάν το δείγμα είναι θολό η διαδικασία επαναλαμβάνεται μετά επιπλέον διαύγαση/φιλτράρισμα.

Ο υπολογισμός της αλκοόλης σε παρακάτω διαγράμματα (alcohol calculated) έγινε και σύμφωνα με τον τύπο $Ethanol (\%vol) = (76.08 * (OG-FG) / (1.775-OG)) * (FG / 0.794)$, όπου OG αρχική σχετική πυκνότητα και FG τελική φαινομενική πυκνότητα (Hall, 1995)

B) Προσδιορισμός οξύτητας (ASBC Method beer-8)

250 ml H₂O βράζουν για 2 λεπτά. Από Πιπέτα γρήγορης ροής προστίθενται 25 ml μπύρας αφού προηγουμένως έχει εκδιωχθεί το ανθρακικό. Μετά την εκκένωση της πιπέτας θερμαίνεται για 60 δευτερόλεπτα ρυθμίζοντας τη θερμότητα έτσι ώστε το διάλυμα να συνεχίζει να βράζει κατά τη διάρκεια των τελικών 30 δευτερολέπτων. Προστίθεται 0,5 ml 0,5% φαινολοφθαλεΐνης. Ογκομετρείται με 0,1N NaOH. Ογκομετρείται μέχρι την πρώτη εμφάνιση του αχνού ροζ.

Γ) Προσδιορισμός χρώματος (ASBC Method beer-10)

Για τον προσδιορισμό του χρώματος τοποθετείται για φυγοκέντρωση για να γίνει το δείγμα διαυγές και ύστερα φιλτράρεται με φίλτρα που δεν απορροφούν χρώμα. Έπειτα, το δείγμα φωτομετρείται σε μήκος κύματος 430 nm και 700 nm, αντίστοιχα. Για να ελεγχθεί αν το δείγμα είναι διαυγές γίνονται οι παρακάτω υπολογισμοί:

Αν η τιμή του (A_{700nm}) είναι μικρότερη ή ίση από την τιμή του (A_{430nm}) x 0,039 τότε το δείγμα είναι διαυγές, το ίδιο μπορεί να διαπιστωθεί και με θολερόμετρο αν η θολερότητας είναι <1EBC. Αν είναι μεγαλύτερη ξανά τοποθετείται για φυγοκέντρωση. Ύστερα για το υπολογισμό του χρώματος παίρνεται υπόψιν μόνο η απορρόφηση του (A_{430nm}):

Χρώμα μπύρας EBC : $25 \times A_{430nm} \times D$, όπου D = ο βαθμός διάλυσης

Δ) Φαινομενικός βαθμός ζύμωσης (degree of attenuation %) (ASBC Method beer-6)

Ο φαινομενικός βαθμός ζύμωσης υπολογίστηκε από τις τιμές του αρχικού εκχυλίσματος και του τελικού φαινομενικού εκχυλίσματος σύμφωνα με τη μέθοδο ASBC Method beer-6

2.2.4 Ανάλυση των αποτελεσμάτων

Όλες οι μετρήσεις έγιναν εις τριπλούν και υπολογίστηκε ο μέσος όρος τους. Η τυπική αποκλιση (standard deviation) για όλες τις μετρήσεις υπολογίστηκε με τον τύπο :

$$s = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}$$

Όπου s= η τυπική απόκλιση του δείγματος, N= το πλήθος των δειγμάτων, x_i = οι τιμές των δειγμάτων, \bar{x} = ο μέσος όρος των τιμών των δειγμάτων

2.2.5 Αναλύσεις αέριας χρωματογραφίας (GC-MS)

Η μέθοδος της προετοιμασίας έγινε σύμφωνα με (Dourtoglou 2014) όπως τροποποιήθηκε από (Drosou 2022)

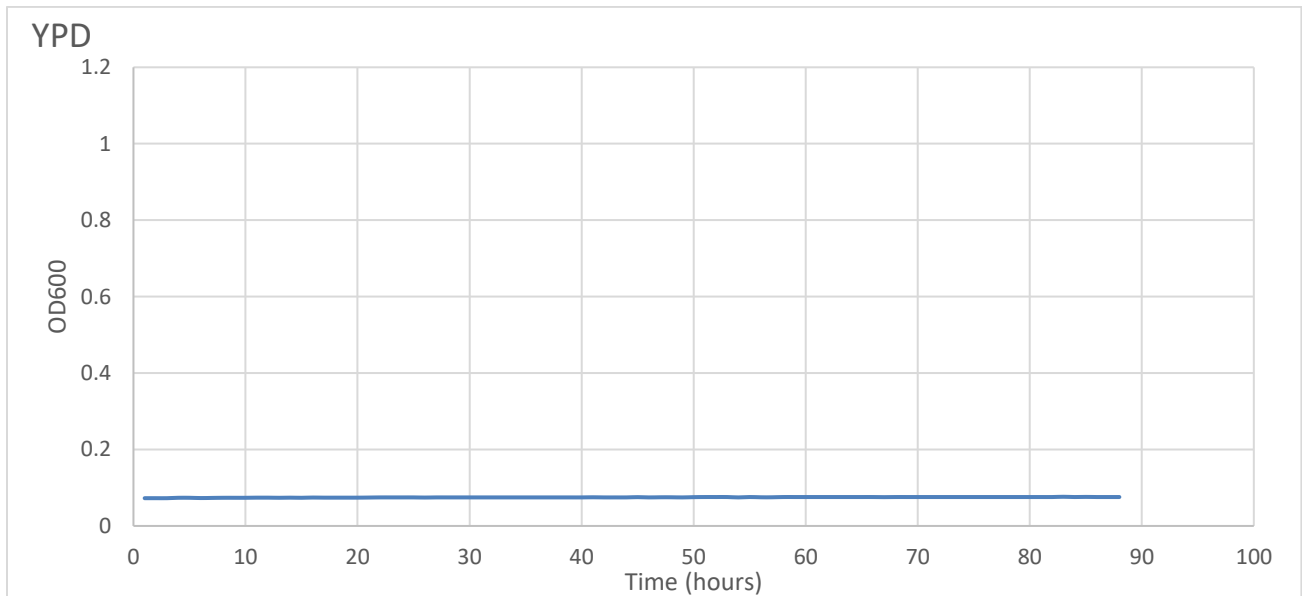
Προετοιμασία δείγματος :

1. Διήθηση 2 φορές του δείγματος με διηθητικό χαρτί και συλλογή 100 ml σε ογκομετρικό κύλινδρο
2. Προσθήκη 50 ml διχλωρομεθανίου (διαλύτη) σε 50 ml δείγμα
3. Γρήγορη ανάδευση 10 λεπτών σε ποτήρι ζέσεως με μαγνητικό αναδευτήρα
4. Μετάγγιση του δείγματος σε 2 falcon (50 ml) και φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στα 3500 rpm
5. Συλλέγεται η οργανική φάση και την μεταφέρεται σε ποτήρι ζέσεως όπου προσθέτουμε 50 ml διχλωρομεθάνιο και επαναλαμβάνουμε το βήμα 3 και 4.
6. Συλλέγεται και πάλι η οργανική φάση και μοιράζεται σε δυο διαχωριστικές χοάνες οι οποίες έχουν 20-25 ml απιονισμένο νερό η κάθε μια. Ακολουθεί ανάδευση και αναμονή 5 λεπτών.
7. Συλλέγεται και πάλι η οργανική φάση στα δείγματα και τοποθετείται σε ποτήρια ζέσεως με μαγνητικό αναδευτήρα για 5 λεπτά όπου προστίθεται άνυδρο θειικό νάτριο.
8. Τα δείγματα διηθούνται και προστίθεται 10ml 3-οκτανολη 2,500 ppm και τοποθετούνται σε συσκευή Rotary evaporator στους 20-22 C και 45 rpm
9. Συλλέγεται το δείγμα και φυλάσσεται σε μικρά φιαλίδια όπου το δείγμα υφίσταται ταχεία συμπύκνωση με χρήση αερίου αζώτου μέχρι η τελική μάζα να είναι περίπου ίση με 100 mg και πραγματοποιείται ένεση του δείγματος στην συσκευή GC-MS.

3. Αποτελέσματα και σχολιασμός

3.1 Αποτελέσματα ζυμώσεων από Bioscreen C

Στο παρακάτω πείραμα χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά συνθετικά υποστρώματα, το Control(mix) καθώς και υπόστρωμα Mix (YPD) χωρίς την προσθήκη ζυμών, ως μάρτυρες για να έλεγχο τυχών επιμολύνσεων στο οποίο δεν υπήρξε αύξηση της απορρόφησης. Η απορρόφηση μετρήθηκε από το όργανο Bioscreen C για 43,5 ώρες και είναι δείγμα της ανάπτυξης του κάθε μικροοργανισμού (*S. cerevisiae* και *L. thermotolerans*) σε αυτές τις διαφορετικές συνθήκες.



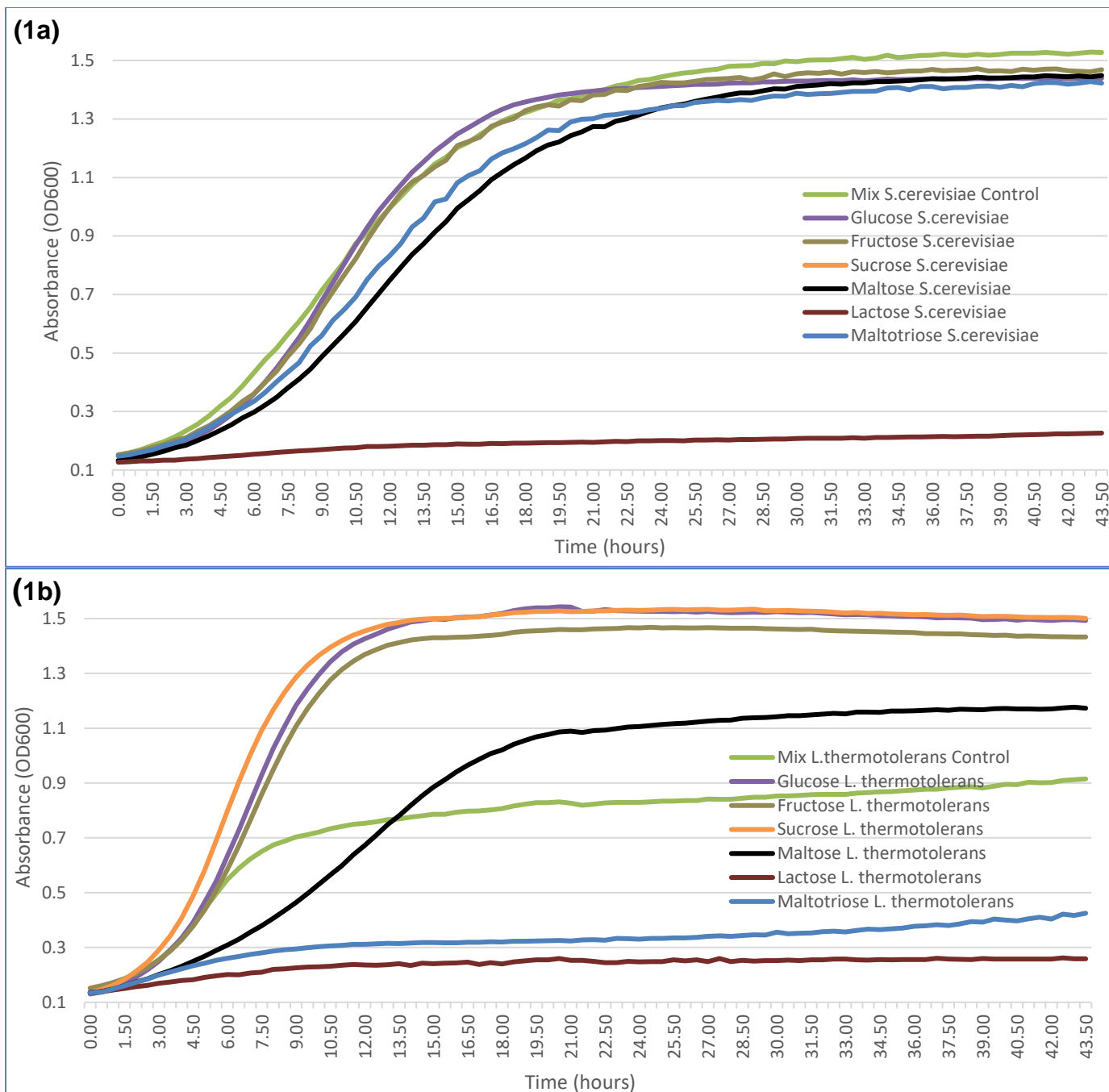
Διάγραμμα 1 : Η καμπύλη της απορρόφησης στα 600nm με υπόστρωμά Mix χωρίς προσθήκη ζυμών. Όλες οι μετρήσεις είχαν τυπική απόκλιση (standard deviation) < 0,01.

3.1.1 Εξέλιξη ζυμώσεων σε διαφορετικά σάκχαρα για *S. cerevisiae* και *L. thermotolerans*

Παρατίθενται διαγράμματα (1a,1b) με την ανάπτυξη μέσω απορρόφησης των ζυμών *S. cerevisiae* και *L. thermotolerans* για διαφορετικά συνθετικά υποστρώματα σακχάρων και ένα μείγμα (mix) σε ποσότητες κοντά σε αυτό ενός προτύπου ζυθογλεύκους σύμφωνα με την βιβλιογραφία και ακολουθείται σχολιασμός τους.

Σύμφωνα με τα διαγράμματα αρχικά για τον *S. cerevisiae* (6a) παρατηρείται: Ο *S. cerevisiae* φαίνεται ικανός να καταναλώσει και να ζυμώσει όλα τα διαφορετικά υποστρώματα εκτός αυτού της λακτόζης και επίσης φαίνεται να υπάρχει μια πιο αργή ζύμωση στα σάκχαρα μαλτόζη και μαλτοτριόζη που δείχνει μια μεγαλύτερη περίοδο προσαρμογής αν και οι τελικές τους τιμές είναι σχεδόν παρόμοιες με ελαφρώς μικρότερες τιμές (στο OD600 ~ 1,3). Τα υπόλοιπα υποστρώματα- σάκχαρα φαίνεται να έχουν παρόμοια ανάπτυξη αν και μικρή διαφορά μπορεί να φανεί στην ταχύτητα στην περίπτωση της γλυκόζης και του mix(το οποίο περιέχει γλυκόζη) που πιθανά δείχνει ότι προτιμάει την γλυκόζη. Την υψηλότερη τελική τιμή (OD600 >1,5) φαίνεται ότι είχε στο mix που δείχνει καθαρά την ικανότητα του να ζυμώσει ένα γλεύκος μπύρας.

Η *L. thermotolerans* (6b) φαίνεται να έχει τελείως διαφορετική συμπεριφορά στα σάκχαρα και μεγαλύτερη ποικιλομορφία στις τελικές τιμές της από ότι ο *S. cerevisiae*. Αρχικά τις υψηλότερες τελικές τιμές φαίνεται να τις είχε στα υποστρώματα με γλυκόζη και σακχαρόζη (OD600 ~1,5) που δείχνει καθαρά την προτίμηση της σε αυτήν. Μετά ακολουθεί η φρουκτόζη με λίγο πιο αργό ρυθμό και τελική τιμή (στο OD600 ~1,4). Έπειτα ακολουθεί η μαλτόζη και το Mix. Αν και η μαλτόζη δείχνει μια μεγαλύτερη τελική τιμή (στο OD600 ~ 1,2) έχει καθαρά έναν μικρότερο ρυθμό ζύμωσης από το Mix που πιθανά δείχνει ότι αν και η *L. thermotolerans* είναι ικανή να ζύμωση την μαλτόζη, οι συνεχόμενες εναλλαγές σε διαφορετικά είδη σακχάρων δημιουργούν στρες στην ζύμη με αποτέλεσμα μικρότερες αποδόσεις αλλά αποδεικνύουν την ικανότητα της να ζυμώσει ένα γλεύκος μπύρας και την πιθανή χρήση της στην παραγωγή. Τέλος τις μικρότερες τιμές φαίνεται να έχουν τα σάκχαρα λακτόζη και μαλτοτριόζη. Η ζύμη φαίνεται να έχει την ίδια συμπεριφορά στην λακτόζη με τον *S.cerevisiae* με μικρή έως καθόλου ανάπτυξη (στο OD ~ 0,3) ενώ για την μαλτοτριόζη φαίνεται ότι αναπτύχθηκε ελάχιστα (OD ~ 0,5).



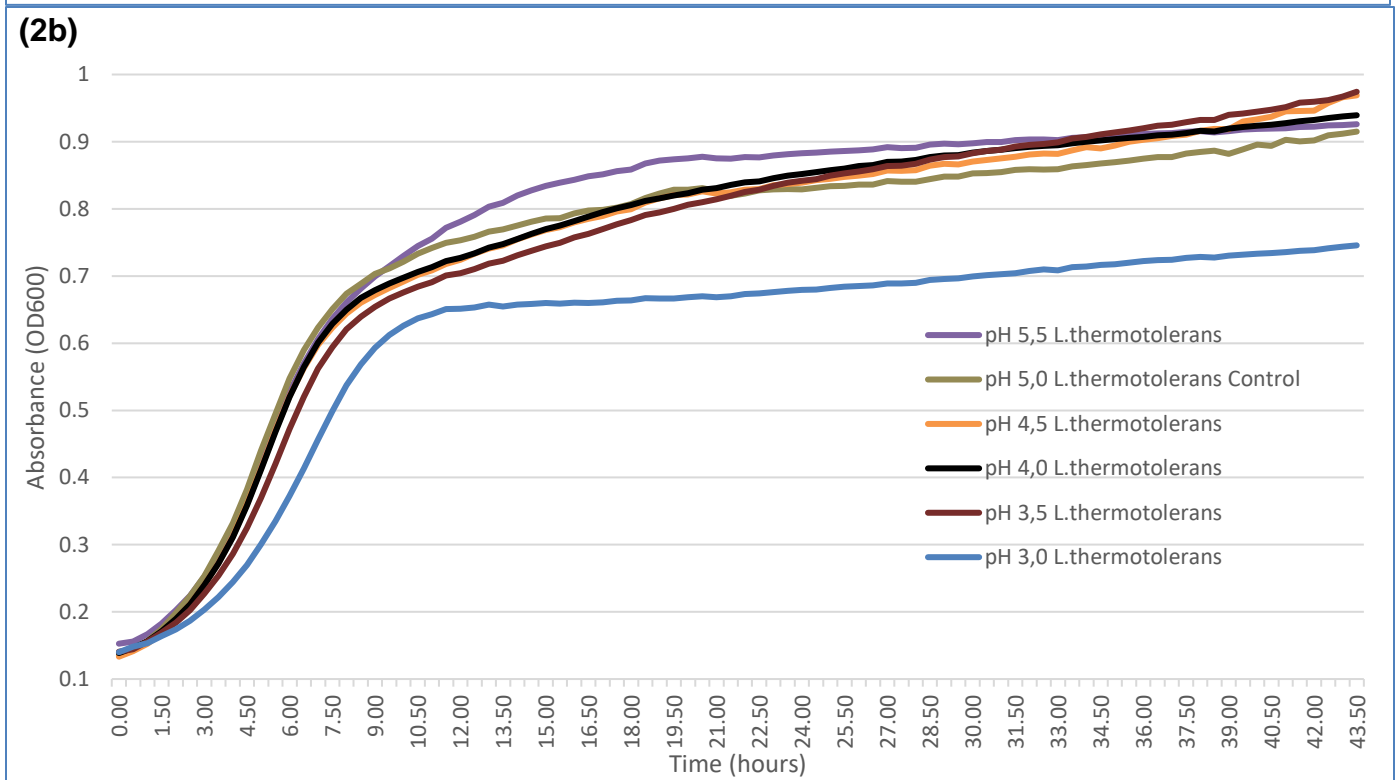
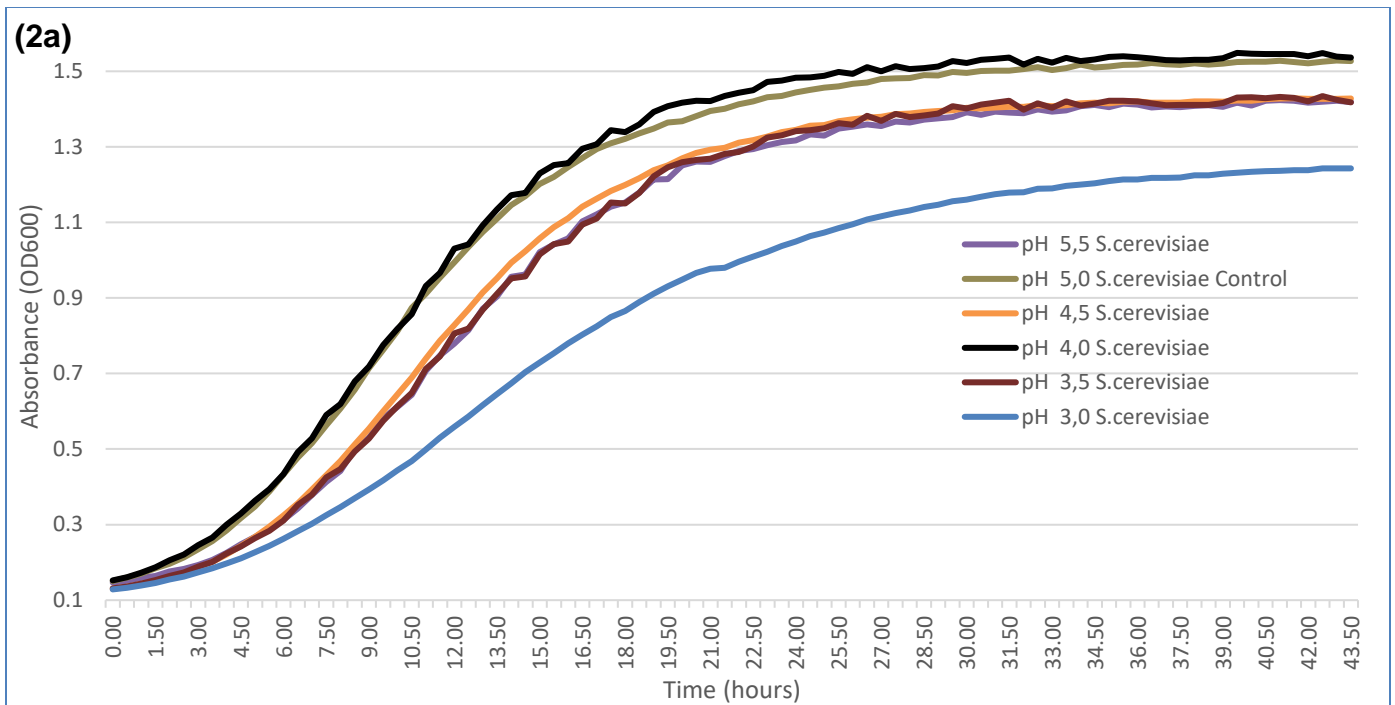
Διαγράμματα 1α, 1β : Η οπτική απορρόφηση (OD600) των ζυμώσεων με *S. cerevisiae* (1α) και *L. thermotolerans* (1β) προς τον χρόνο (hours) σε διαφορετικά υποστρώματα σακχάρων (Mix, γλυκόζη, φρουκτόζη, σακχαρόζη, μαλτόζη, λακτόζη, μαλτοτριόζη). Όλες οι μετρήσεις είχαν τυπική απόκλιση (standard deviation) < 0,05.

3.1.2 Εξέλιξη ζυμώσεων σε διαφορετικά αρχικά pH

Παρατίθενται διαγράμματα (2a, 2b) με την ανάπτυξη μέσω απορρόφησης των ζυμών *S. cerevisiae* και *L. thermotolerans* για ιδιά συνθετικά υποστρώματα mix με διαφορετικές αρχικές τιμές pH και ένα control (pH 5,0) κοντά σε αυτό ενός προτύπου ζυθογλεύκους σύμφωνα με την βιβλιογραφία και ακολουθείται σχολιασμός τους.

Σύμφωνα με το διάγραμμα 2a φαίνεται ότι ο *S. cerevisiae* είχε τις υψηλότερες τελικές τιμές και ρυθμό ζύμωσης στις τιμές του pH 5,0 και 4,0 (με OD600 ~ 1,5) που δείχνει καθαρά μια προτίμηση σε τιμές οι οποίες είναι κοντά σε αυτές ενός ζυθογλεύκους. Στην συνέχεια με μια ελαφριά μείωση τόσο στον ρυθμό ζύμωσης όσο και στις τελικές τιμές (OD600 ~1,3) είναι οι τιμές του pH 5.5, 4.5 και 3.5 που δείχνει μια πολύ ελαφριά ευαισθησία. Τέλος τον μικρότερο ρυθμό ζύμωσης και τελική τιμή απορρόφησης (OD600 ~1,2) φαίνεται να είναι για την τιμή του pH 3,0 η οποία δείχνει πιθανό στρες και ανάγκη μεγαλύτερου χρόνου προσαρμογής στις χαμηλότερες τιμές του pH.

Η ζύμη *L. thermotolerans* στο διάγραμμα 2b φαίνεται να έχει παρόμοια συμπεριφορά. Αρχικά φαίνεται ότι για τιμές τιμές του pH 5,5 και 5,0 είχε μια πιο εύκολη και γρήγορη ανάπτυξη σε σύγκριση με τις χαμηλότερες τιμές (3,5 και 3,0) και παρόμοια συμπεριφορά αν και με ελαφρώς πιο μικρή τελική τιμή απορρόφησης (~0,9) αντίστοιχα. Ενώ για τις τιμές του pH 4,5, 4,0 και 3,5 φαίνεται να έχει παρόμοια συμπεριφορά, ο ρυθμός της ζύμωσης φαίνεται να μειώνεται όσο μειώνεται η τιμή του pH αλλά στα pH 4,5 και 3,5 δείχνει να έχει τις μέγιστες τιμές απορρόφησης (OD600 ~1). Όλα τα αποτελέσματα φαίνεται να είναι παρόμοια όσο αφορά την επιρροή της *L. thermotolerans* από το pH αν και παρατηρήθηκαν χαμηλότερες τελικές τιμές απορρόφησης από τον *S. cerevisiae* (OD600 ~0,7-1,0 αντί για OD600 ~1,3-1,5). Ακόμα, φαίνεται ότι δεν επηρεάζεται ιδιαίτερα από τις συγκεκριμένες τιμές εκτός από αυτή του 3,0 pH στην οποία έδωσε και τον χαμηλότερο ρυθμό αλλά και με διαφορά την χαμηλότερη τελική τιμή (OD600 ~0,7) που δείχνει ότι αν και ζύμη η οποία παράγει γαλακτικό οξύ και μειώνει το pH του γλεύκους κατά την ζύμωση όπως αναφέρθηκε στην βιβλιογραφία εμφανίζει ευαισθησία στις τιμές από pH 3,0.



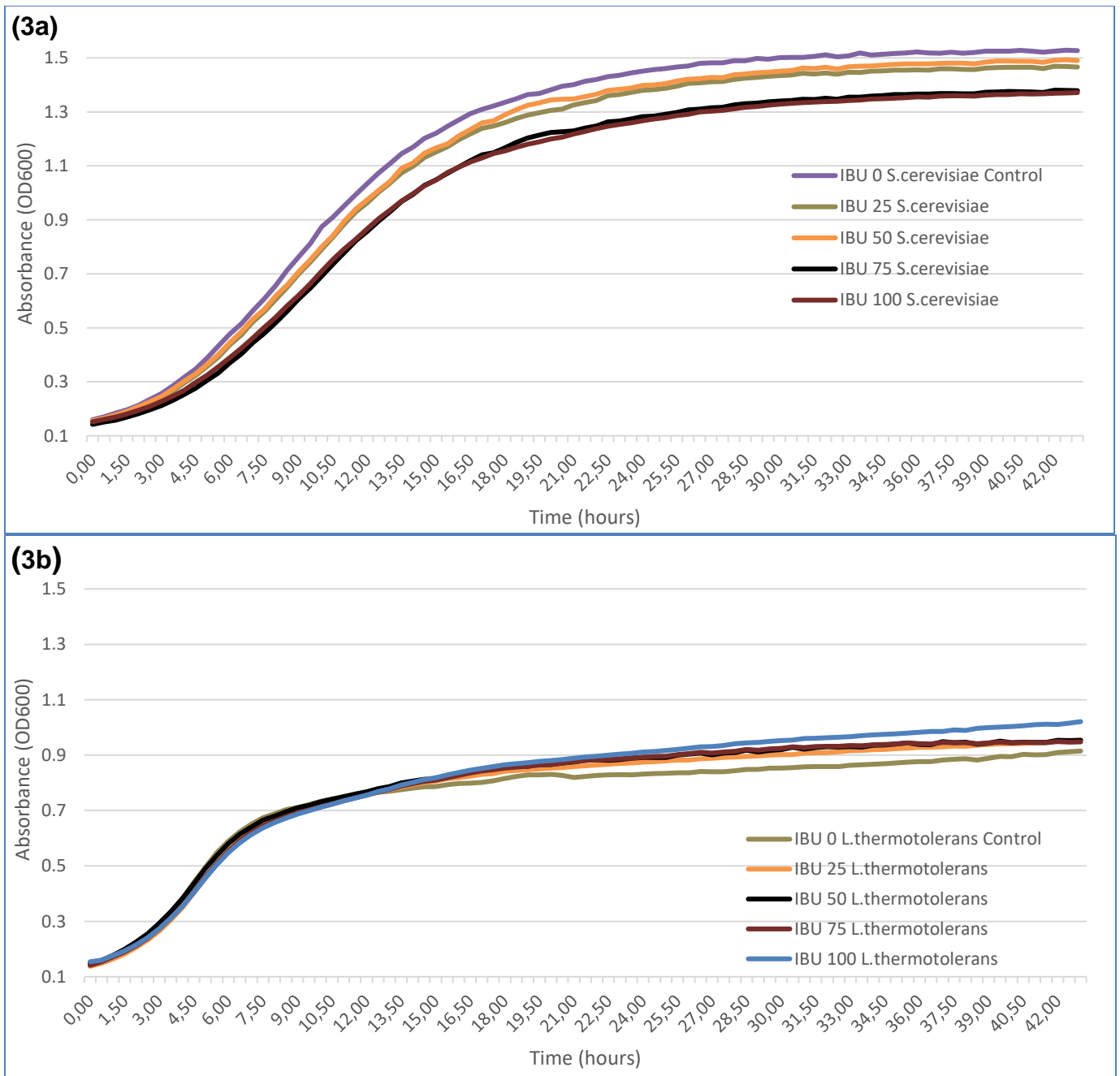
Διαγράμματα 2α, 2β : Η οπτική απορρόφηση (OD600) των ζυμώσεων με *S. cerevisiae* (1α) και *L. thermotolerans* (1b) προς τον χρόνο (hours) σε ίδια υποστρώματα με διαφορετικές αρχικές τιμές pH (5.5, 5.0, 4.5, 4.0, 3.5, 3.0). Όλες οι μετρήσεις είχαν τυπική απόκλιση (standard deviation) < 0,05.

3.1.3 Εξέλιξη ζυμώσεων σε διαφορετικές τιμές IBU

Παρατίθενται διαγράμματα (3a, 3b) με την ανάπτυξη μέσω απορρόφησης των ζυμών *S. cerevisiae* και *L. thermotolerans* για συνθετικά υποστρώματα mix κοντά σε αυτό ενός προτύπου ζυθογλεύκους σύμφωνα με την βιβλιογραφία. Τα υποστρώματα έχουν διαφορετικές αρχικές τιμές IBU και ένα control (IBU 0) για τα οποία ακολουθείται σχολιασμός τους.

Αρχικά για την ζύμη *S. cerevisiae* παρατηρείται ότι στην μηδενική τιμή IBU είχε τον ψηλότερο ρυθμό ανάπτυξης αλλά και τελική τιμή ($OD_{600} > 1,5$). Για τις τιμές IBU 25-50 φαίνεται ότι είχε ελαφρά μικρότερους ρυθμούς ζύμωσης και τελικές τιμές ($OD_{600} \sim 1,4$) σχεδόν παρόμοιες μεταξύ τους. Αντίθετα για τις υψηλές τιμές IBU 75-100 φαίνεται καθαρά ότι είχε τον μικρότερο ρυθμό ανάπτυξης και τελικές τιμές απορρόφησης ($OD \sim 1,3$) που δείχνει ότι ο ζυμομύκητας επηρεάζεται αρνητικά από τις ψηλές τιμές του IBU αλλά με μικρή διαφορά στις τελικές τιμές των απορροφήσεων. Για τιμές IBU μιας φυσιολογικής μπίρας (20-50 IBU) φαίνεται να μην υπάρχουν μεγάλες διαφορές. Βέβαια για την ανάπτυξη του στις υψηλές τιμές IBU (75-100) εμφανίζει μια ευαισθησία.

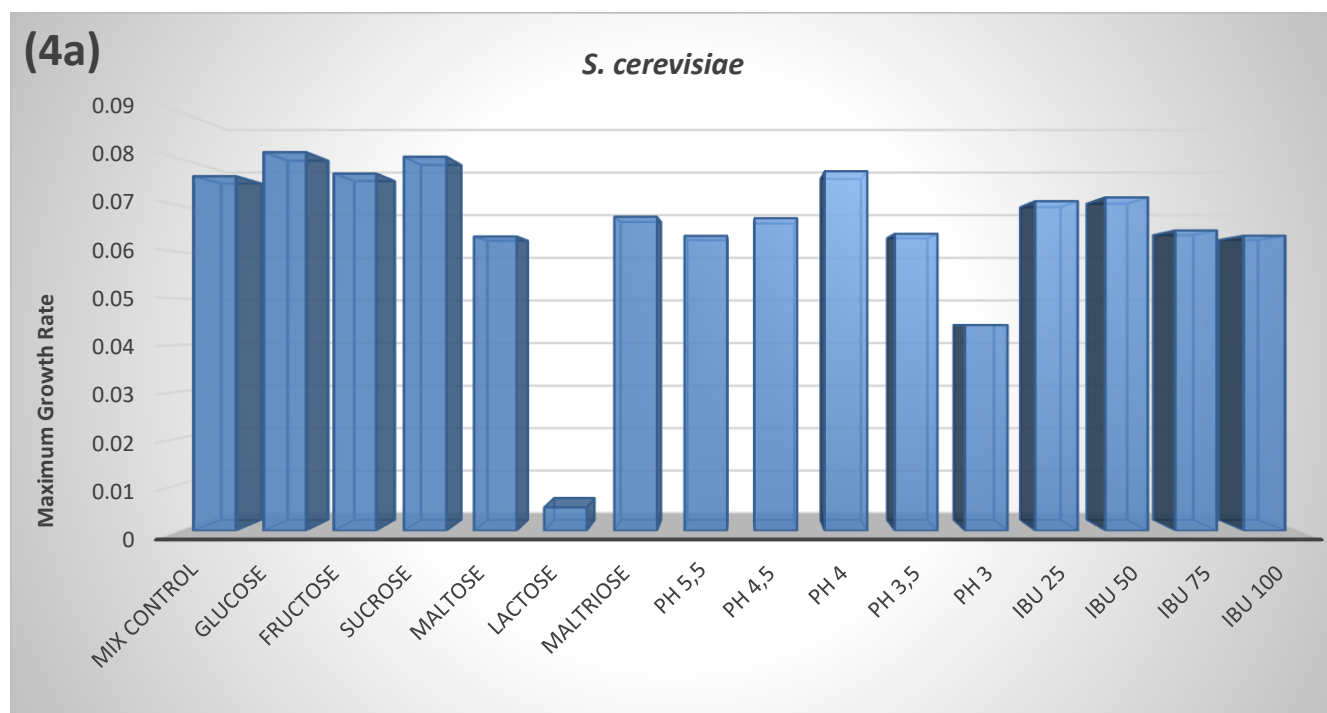
Η ζύμη *L. thermotolerans* φαίνεται να εμφανίζει το ακριβώς ανάποδο μοτίβο από τον *S. cerevisiae*. Η ζύμη δείχνει να έχει τον ίδιο ρυθμό ανάπτυξης για όλες τις τιμές IBU και έχει με μικρή διαφορά την υψηλότερη τελική τιμή απορρόφησης στα 100 IBU ($OD_{600} \sim 1,0$) και τις χαμηλότερες στα 0 IBU ($OD_{600} \sim 0,9$). Βέβαια όπως αναφέρθηκε η διαφορά είναι αμελητέα αλλά δείχνει καθαρά ότι το συγκεκριμένο στέλεχος δεν επηρεάζεται από την προσθήκη του λυκίσκου στην μπίρα πάρα τις αντιμικροβιακές του ιδιότητες. Επίσης την κάνει μια πολύ καλή επιλογή για τύπους μπίρας με υψηλά IBU όπως IPA, DIPA, κ.α.



Διαγράμματα 3a, 3b : Η οπτική απορρόφηση (OD600) των ζυμώσεων με *S. cerevisiae* (3a) και *L. thermotolerans* (3b) προς τον χρόνο (hours) σε ίδια υποστρώματα με διαφορετικές τιμές IBU (0, 25, 50, 75, 100). Όλες οι μετρήσεις είχαν τυπική απόκλιση (standard deviation) < 0,05.

3.1.4 Μέγιστοι ρυθμοί ανάπτυξης των ζυμών σε διαφορετικές συνθήκες ζύμωσης

Από τα παρακάτω διαγράμματα επιβεβαιώνονται όσα έδειξαν και σχολιάστηκαν στα παραπάνω διαγράμματα για τις δυο αυτές ζύμες και τον τρόπο ανάπτυξη της στους στα διαφορετικά υποστρώματα. Αρχικά για τον *S. cerevisiae* στο διάγραμμα 4a φαίνεται ότι τον μέγιστο ρυθμό ανάπτυξης (maximum growth rate- μ_{max}) βρίσκει στην γλυκόζη και στην σακχαρόζη ενώ ακολουθεί η φρουκτόζη και το μείγμα σακχάρων. Αυτό δείχνει μια προφανή προτίμηση σε υπόστρωμα που περιέχει γλυκόζη αλλά επίσης ότι αναπτύσσεται σχεδόν εξίσου γρήγορα και στα υπόλοιπα σάκχαρα όπως μαλτόζη φρουκτόζη και μαλτοτριόζη. Πρέπει να σημειωθεί ότι η ανάπτυξη του στην μαλτοτριόζη ήταν πιο γρήγορη απ' ότι στην μαλτόζη ενώ στην λακτόζη ήταν η πιο χαμηλή που όπως αναφέρθηκε και στα παραπάνω διαγράμματα στο κεφάλαιο 3.1.1 δεν υπήρχε μεγάλη ανάπτυξη. Το pH φαίνεται ότι επηρεάζει τον ρυθμό ανάπτυξης καθώς παρατηρείται μια προτίμηση στο pH 5 (control) 4 και 4,5 καθώς ακολουθεί το 5,5 και 3,5. Στο pH 3 φαίνεται να έχει τον χαμηλότερο ρυθμό ανάπτυξης. Τέλος και οι μονάδες IBU φαίνεται να επηρεάζουν τον ρυθμό ανάπτυξης καθώς φαίνεται ότι μετρά τα 50 IBU έχουμε ελαφριά μείωση του ρυθμού ανάπτυξης.

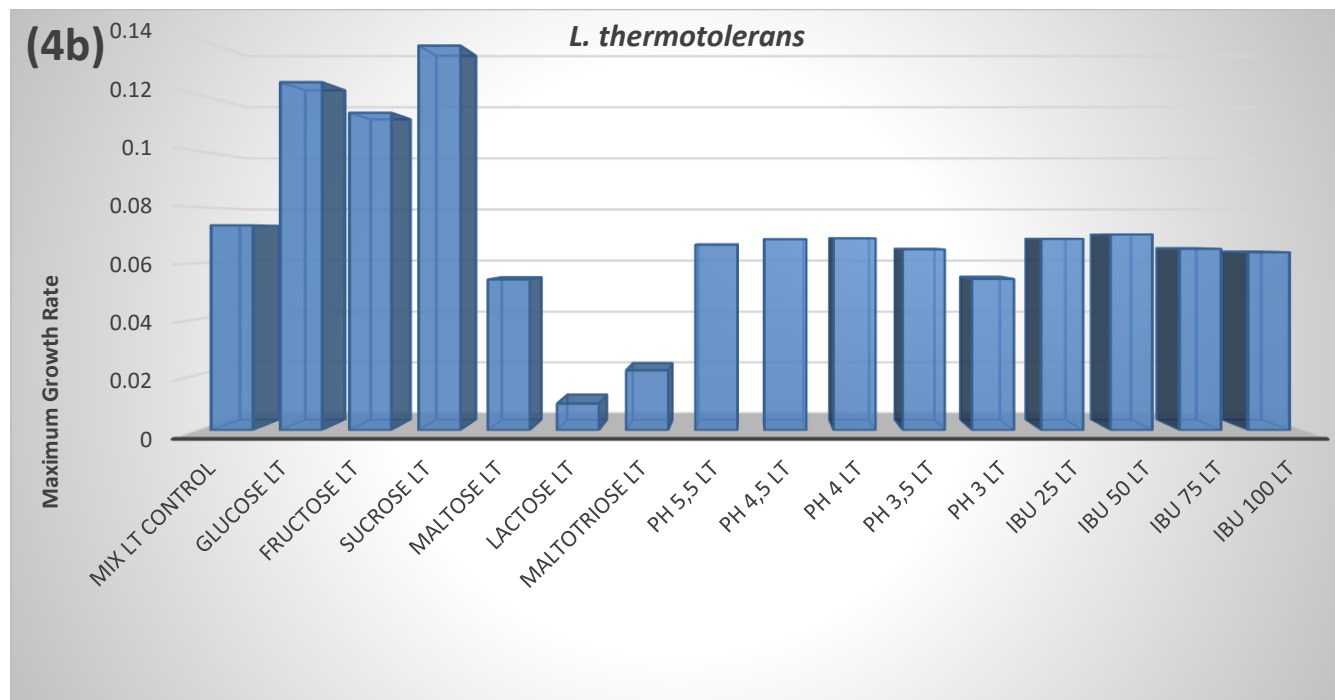


Διάγραμμα 4a : Ο μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης (growth rate- μ_{max}) από το Combase για την ανάπτυξη του *S. cerevisiae* σε διαφορετικά υποστρώματα (όπως μείγμα σακχάρων, γλυκόζη, φρουκτόζη, σακχαρόζη, μαλτόζη, λακτόζη, μαλτοτριόζη, pH5.5, pH4.5, pH3.5, pH3, IBU25, IBU50, IBU75 και IBU100). $R^2 < 0,985$.

Η *L. thermotolerans* παρουσιάζει διαφορετικό προφίλ όσον αφορά τον ρυθμό ανάπτυξης της (growth rate- μ_{max}). Αρχικά φαίνεται ότι τους μεγαλύτερους ρυθμούς τους είχε στα τρία σάκχαρα γλυκόζη, σακχαρόζη και φρουκτόζη με μεγάλες διαφορές από το μείγμα σακχάρων (Mix -Control) και την μαλτόζη. Η διάσπαση των δισακχαρίτων φαίνεται να είναι πιο εύκολη στην σακχαρόζη παρά στην μαλτόζη. Επίσης φαίνεται ότι έχει πολύ χαμηλό ρυθμό στην μαλτοτριόζη και λακτόζη που σημαίνει ότι η ανάπτυξη της σε αυτά το υπόστρωμα δεν είναι ιδανική έως αδύνατη. Στα διαφορετικά pH φαίνεται ότι σε όλα είχε σχεδόν τον ίδιο ρυθμό εκτός από το pH 3 που φαίνεται ελαφρά μειωμένος. Τέλος στα IBU φαίνεται ότι

ο ρυθμός της είναι παρόμοιος με το Control (0 IBU) ενώ υπάρχει μια ελαφριά μείωση σε τιμές άνω των 50 IBU.

Έτσι όλοι οι ρυθμοί φαίνεται να είναι ίδιοι με μέγιστο στα σάκχαρα γλυκόζη, φρουκτόζη και σακχαρόζη ενώ φαίνεται να δυσκολεύεται ελαφριά με την παρουσία IBU >50 και pH 3, περισσότερο με την παρουσία μαλτόζης στο υπόστρωμά και να έχει πολύ χαμηλούς ρυθμούς σε μαλτοτριόζη και λακτόζη.

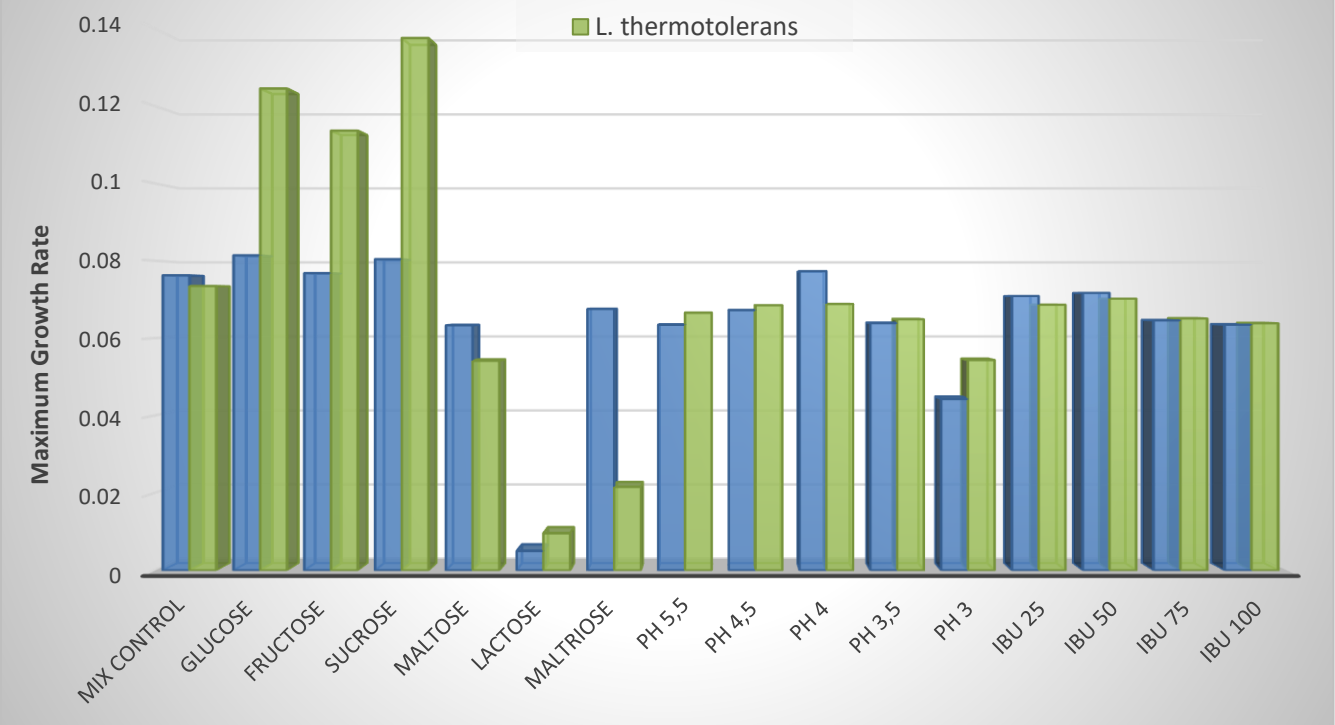


Διάγραμμα 4b : Ο μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης (growth rate- μ_{max}) από το Combase για την ανάπτυξη της *L. thermotolerans* σε διαφορετικά υποστρώματα (όπως μείγμα σακχάρων, γλυκόζη, φρουκτόζη, σακχαρόζη, μαλτόζη, λακτόζη, μαλτοτριόζη, pH5.5, pH4.5, pH3.5, pH3, IBU25, IBU50, IBU75 και IBU100). $R^2 < 0,985$

Στο παρακάτω διάγραμμα φαίνονται οι μέγιστοι ρυθμοί ανάπτυξης της του *S. cerevisiae* και της *L. thermotolerans* και χρησιμοποιούνται για καθαρά συγκριτικούς σκοπούς για την ανάπτυξη της στα διαφορά υποστρώματα.

Αρχικά φαίνεται ότι ο *S. cerevisiae* έχει παντού μεγαλύτερο ρυθμό (μ_{max}) εκτός από τα σάκχαρα γλυκόζη φρουκτόζη και σακχαρόζη όπου δείχνει ότι η ανάπτυξη της *L. thermotolerans* ήταν ραγδαία. Ενώ σε όλα τα υπόλοιπα φαίνεται ότι η *L. thermotolerans* έχει παρόμοιο ή ελαφρώς μικρότερο ρυθμό εκτός από την μαλτοτριόζη και μαλτόζη που ο *S. cerevisiae* φαίνεται να δίνει μεγαλύτερες τιμές και στο pH 3 όπου συμβαίνει το αντίθετο. Έτσι με βάση αυτό το διάγραμμα φαίνεται ότι οι ρυθμοί τους σε ένα τυπικό υπόστρωμά μπύρας να είναι παρόμοιοι.

(5)



Διαγραμμα 5 : Ο μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης (growth rate- μ_{max}) από το Combase για την σύγκριση της ανάπτυξης μεταξύ του *S. cerevisiae* και της *L. thermotolerans* σε διαφορετικά υποστρώματα (όπως μείγμα σακχαρών, γλυκόζη, φρουκτοζη, σακχαροζη, μαλτοζη, λακτοζη, μαλτοτριοζη, pH5.5, pH4.5, pH3.5, pH3, IBU25, IBU50, IBU75 και IBU100). $R^2 < 0,985$

3.2 Εξέλιξη των βαθμών Plato του pH και βάρους σε διάφορες συνθήκες ζύμωσης

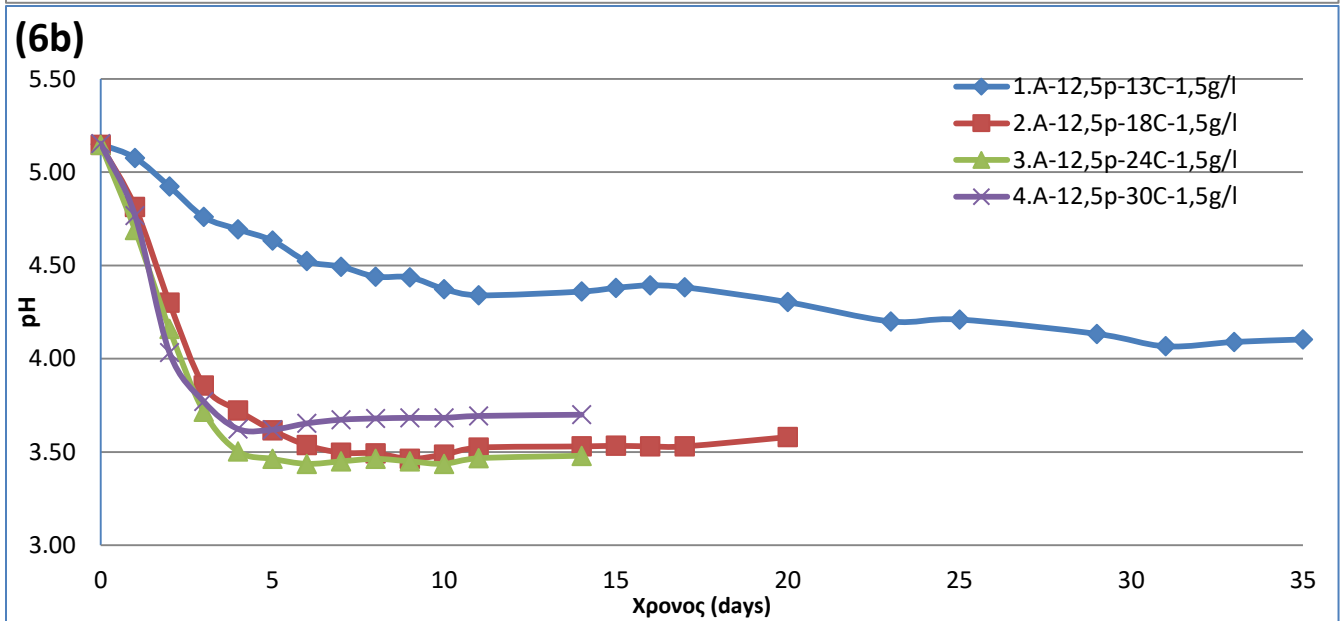
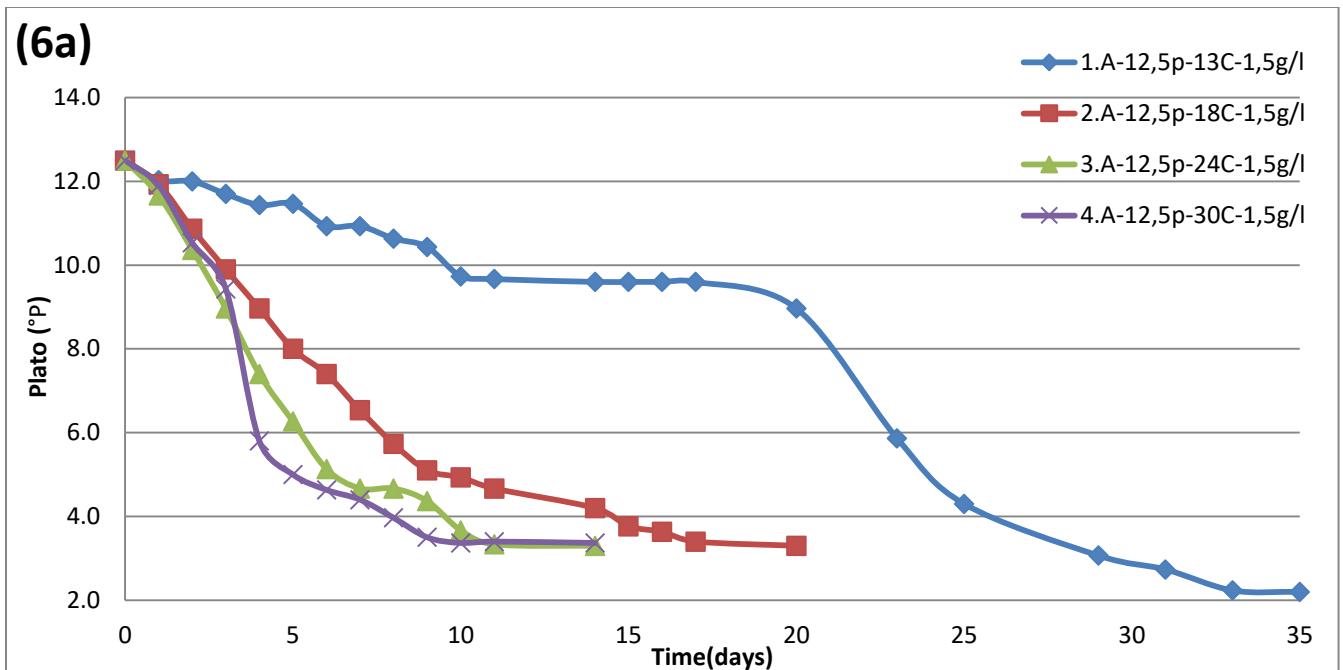
Στο παρακάτω πείραμα έγινε παρατήρηση της ζύμωσης του στελέχους *L. thermotolerans* με μέτρηση της πυκνότητας και pH του γλεύκους, καθώς και του βάρους του δοχείου που απεικονίζεται ως g CO₂/L (διάγραμμα 7e) σε διάφορες συνθήκες ζύμωσης οι οποίες αναφέρονται στον πίνακα 3 και 4. Στην συνέχεια ακολουθήσαν αναλύσεις για τον σχολιασμό του τελικού προϊόντος. Όλες οι μετρήσεις έγιναν εις τριπλούν και στα διαγράμματα αλλά και στις τιμές των αναλύσεων παρουσιάζεται ο μέσος όρός τους.

3.2.1 Εξέλιξη των βαθμών Plato και pH σε διαφορετικές θερμοκρασίες ζύμωσης για την *L. thermotolerans*

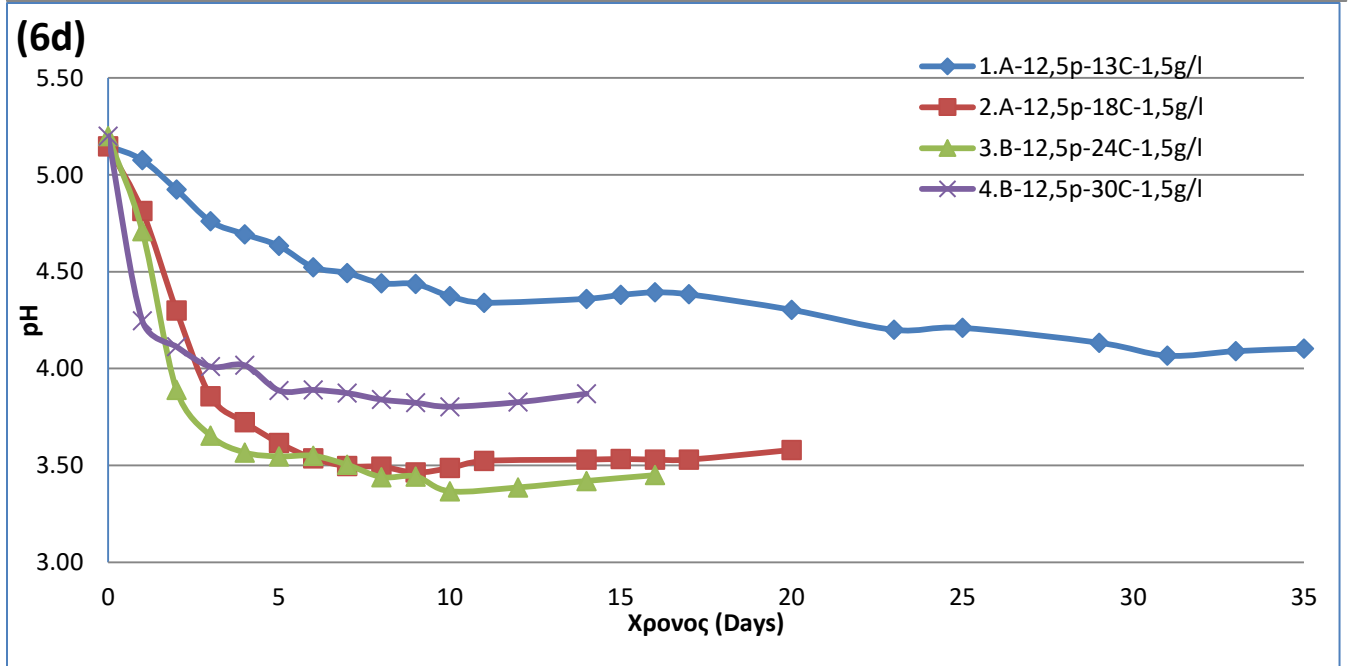
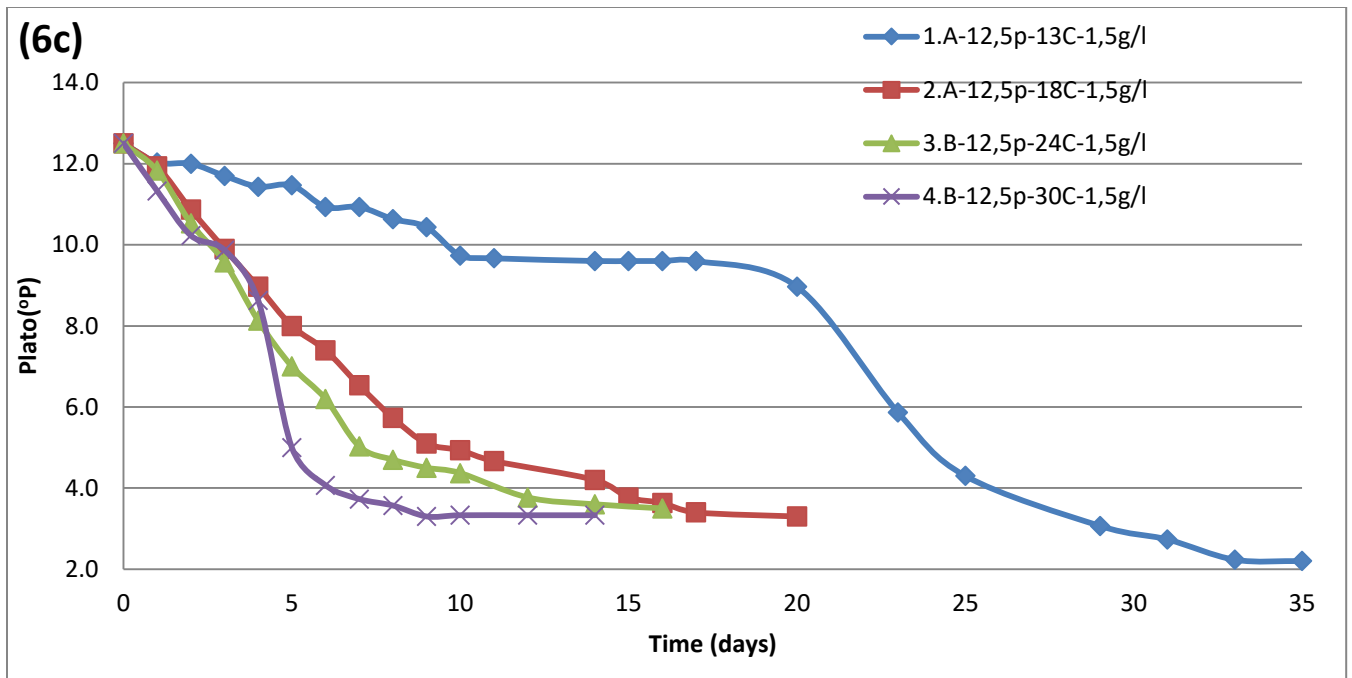
Παρατίθενται διαγράμματα με την εξέλιξη των βαθμών Plato (6a, 6c) αλλά και pH (6b, 6d) κατά την διάρκεια της ζύμωσης του στελέχους *L. thermotolerans* σε διαφορετικές θερμοκρασίες (13, 18, 24, 30 °C).

Στα διαγράμματα 6a και στις επαναλήψεις του πειράματος στο 6c διακρίνεται η σημασία της θερμοκρασίας της ζύμωσης για το συγκεκριμένο στέλεχος. Αρχικά στην θερμοκρασία των 13 °C φαίνεται ότι η ζύμωση ήταν η πιο αργή αλλά πιο αποτελεσματική καθώς έφτασε στην χαμηλότερη τελική πυκνότητα που είναι λογικό λόγω του στρες της χαμηλής θερμοκρασίας. Βέβαια οι 35 μέρες ζύμωσης δεν μπορούν να θεωρηθούν πρακτικές για την βιομηχανία της μπύρας. Ακολουθεί, η θερμοκρασία των 18 °C που είναι φανερά πιο αργή σε ρυθμό και σε χρόνο ζύμωσης με σύνολο τις 20 μέρες. Η τελική πυκνότητα ήταν παρόμοια αν και με λίγο υψηλότερη σε σύγκριση τις άλλες θερμοκρασίες ζύμωσης. Η συγκεκριμένη μπορεί να θεωρηθεί πρακτική αν για ένα παραπάνω αριθμό ημερών ζύμωσης μπορεί να παραχθεί ένα προϊόν με ελαφρά περισσότερη τελική πυκνότητα και σώμα αν και δεν παρατηρείται το ίδιο στην επανάληψη του πειράματος της συνθήκης στους 18 °C στο 6c και οι ζυμώσεις τελειώνουν με την ίδια τελική πυκνότητα. Τέλος οι ζυμώσεις στους 24 και 30 °C τόσο στα διαγράμματα 6a όσο και στα επαναληπτικά 6c φαίνεται να έχουν πιο γρήγορους ρυθμούς ζύμωσης στους 30 °C αντί στους 24 °C, αλλά με παρόμοιες τελικές πυκνότητες αν και στις επαναλήψεις φαίνεται να έχουν ελάχιστα μικρότερες τελικές πυκνότητες στους 30 °C.

Στα διαγράμματα 6b και στις επαναλήψεις του πειράματος στο 6c φαίνεται η επίδραση του pH κατά την διάρκεια των ζυμώσεων. Αρχικά στους 13 °C το pH δεν έπεσε ποτέ κάτω από 4 που μπορεί να έχει χρησιμότητα σε προϊόντα που θέλουν τα αρωματικά χαρακτηριστικά που δίνει αυτό το στέλεχος χωρίς την μείωση του pH λόγω του γαλακτικού οξέος που παράγει. Οι ζυμώσεις τους 18 °C βαθμούς φαίνεται να είχαν ελαφρά υψηλότερο pH (~3,6) από ότι στους 24 (στο 3,5) το οποίο φαίνεται και στις επαναληπτικές ζυμώσεις 6d. Πρέπει να σημειωθεί ότι η πτώση του pH ήταν πιο γρήγορη στις 4-5 ημέρες στους 24 για το διάγραμμα 6a και 7-8 στους 18°C. Ενώ στις επαναλήψεις στο διάγραμμα 6d η πτώση έγινε στις 4-5 μέρες και 3-4 αντίστοιχα. Στους 30 °C η πτώση του pH είναι η πιο γρήγορη με 4 μέρες στο διάγραμμα 6b και 2-3 μέρες στο διάγραμμα 6d και η τελική τιμή του pH ήταν 3,8 και 3,9 αντίστοιχα. Πρέπει να σημειωθεί ότι στις επαναληπτικές ζυμώσεις (6d) οι τιμές του pH έκαναν μια δεύτερη πτώση κατά 0,1 μονάδα στις επόμενες μέρες μέχρι να σταθεροποιηθούν.



Διάγραμμα 6a, 6b: Εξέλιξη των βαθμών (6a) Plato (°P) και του pH (6b) προς τον χρόνο κατά τη ζύμωση με *L. thermotolerans* σε διαφορετικές θερμοκρασίες 1A (13 °C), 2A(18 °C), 3A (24 C) 4A (30 °C). Όλα τα δείγματα έχουν σταθερό αρχικό Plato (12,5 °P) και ποσότητα εμβολίου (pitching rate) 1,5g/L. Τα αποτελέσματα εμφανίζουν τυπική απόκλιση < 0,015.



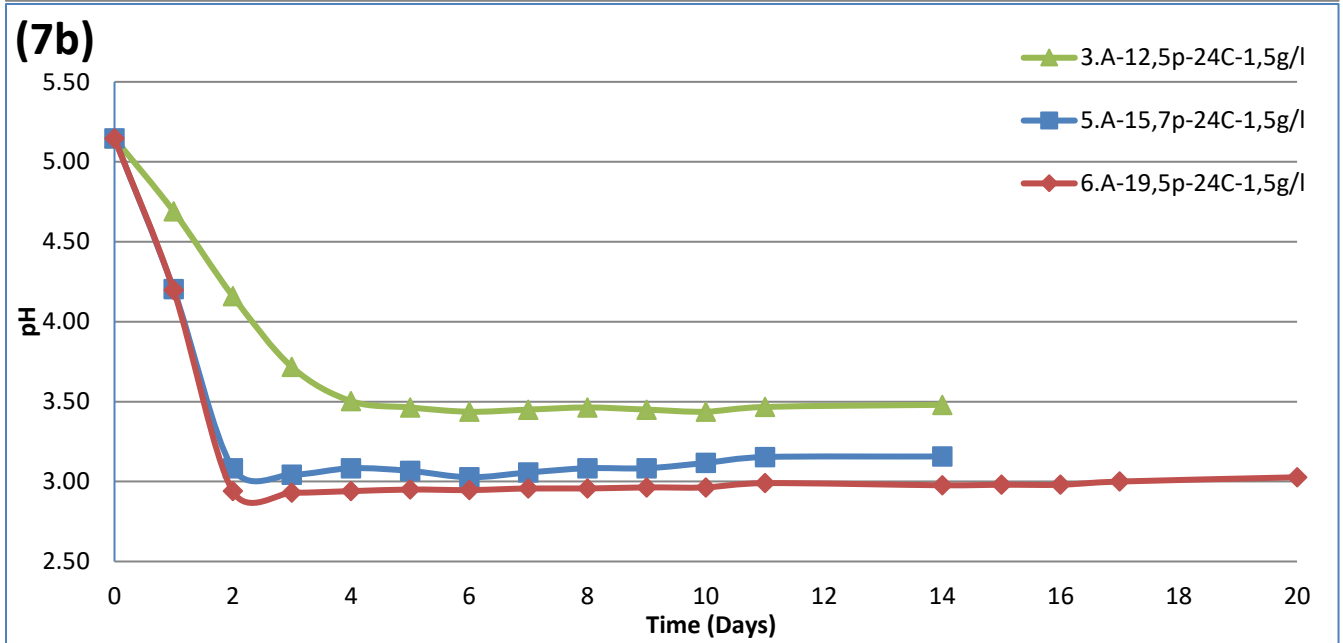
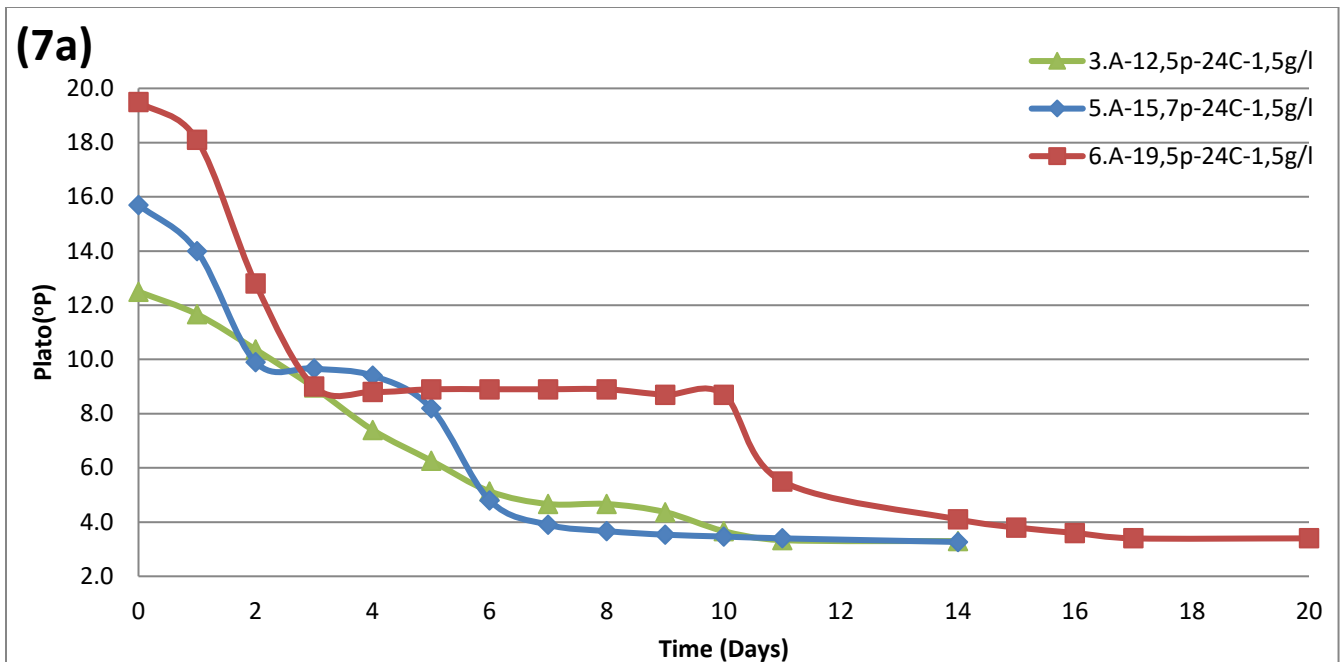
Διαγράμματα 6c, 6d: Εξέλιξη των βαθμών (6a) Plato(°P) και του pH(6b) προς τον χρόνο κατά τη ζύμωση με *L. thermotolerans* με τις επαναλήψεις των δειγμάτων 3A(3B) και 4A(4B) σε διαφορετικές θερμοκρασίες 1A(13C), 2A(18C), 3B(24C) 4A(30C). Όλα τα δείγματα έχουν σταθερό αρχικό Plato (12,5 °P) και ποσότητα εμβολίου (pitching rate) 1,5g/L. Τα αποτελέσματα εμφανίζουν τυπική απόκλιση < 0,015.

3.2.2 Εξέλιξη των βαθμών Plato και του pH και βάρους σε γλεύκη με διαφορετικές αρχικές πυκνότητες για την ζύμη *L. thermotolerans*

Παρατίθενται διαγράμματα με την εξέλιξη των βαθμών Plato (7a,7c), pH (7b, 7d) αλλά και με το βάρος του δοχείου (7e) κατά την διάρκεια της ζύμωσης του στελέχους *L. thermotolerans* σε διαφορετικές αρχικές πυκνότητες 12.5, 15.5 (15.7) και 19.5 °P.

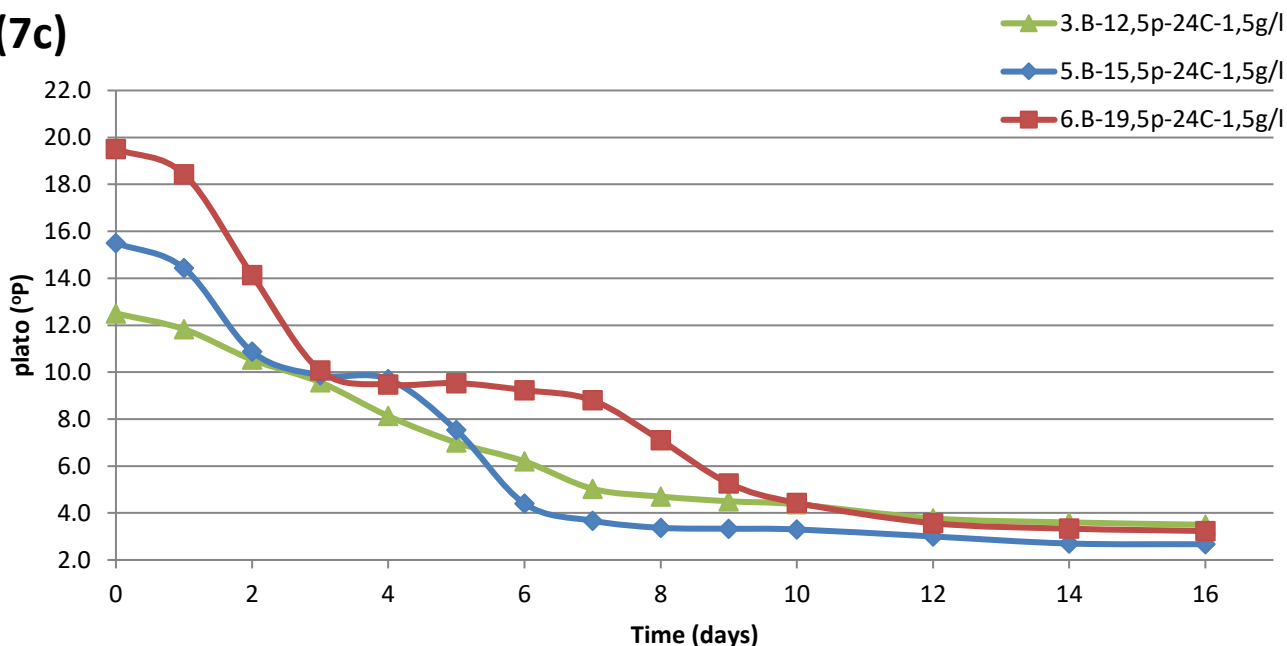
Αρχικά φαίνεται στο διάγραμμα 7a αλλά και στις επαναλήψεις του 7c ότι στα 12,5 °P η ζύμη έχει μια ομαλή καμπύλη. Η ζύμωση τελειώνει στις 10 στο 7a και στις 14 στο 7c ημέρες και φτάνει στις τελικές τιμές των 3,3 και 3,5 °P αντίστοιχα. Στα 15,7 (7a) και 15,5(7c) °P η ζύμωση φαίνεται φτάνει στις ίδιες (3,4 °P στο 7a) και σε ελαφρά χαμηλότερες τελικές πυκνότητες (3,1 °P στο 7b) από τις ζυμώσεις στα 12,5 °P. Επίσης καταφέρνει να ολοκληρώσει την ζύμωση 3 ημέρες στο 7a νωρίτερα απ'ότι στα 12,5 °P. Στο 7c παρατηρείται μια μεγάλη αρχική πτώση της πυκνότητας κοντά στην τελική 6 ημέρες νωρίτερα από ότι στα 12,5 °P ενώ έφτασε στην τελική του πυκνότητα σχεδόν στις ίδιες μέρες. Αυτό δείχνει ότι αν και τα δυο δείγματα είχαν διαφορετικές αρχικές πυκνότητες, η παρουσία παραπάνω ποσότητας γλυκόζης στο δείγμα ακόμα και αν αυξάνει την πυκνότητα φαίνεται να είναι βοηθητικός πάρα κατασταλτικός παράγοντας για την ζύμη κάνοντας την καθαρά γλυκοφιλική όπως φάνηκε και παραπάνω στα διαγράμματα 1b. Για την αρχική πυκνότητα των 19,5 Plato η ζύμη φάνηκε να χρειάζεται και στις δυο περιπτώσεις (7a,7c) τις περισσότερες ημέρες (17 – και 15 αντίστοιχα) για να φτάσει στις τελικές τιμές. Παράλληλα φαίνεται και στις δυο περιπτώσεις (7a, 7c) να ξεκινά μια περίοδος προσαρμογής που κρατάει από ~2-3 ημέρες στο 7c και ~6-7 ημέρες στο 7a για να συνεχίσει η ζύμωση με τελικές πυκνότητες σχεδόν ίδια (~3,4 °P) με τα 12,5 °P στο 7a και πιο χαμηλή (στα 3,0 °P) στο 7c .

Για τις τιμές του pH στα διαγράμματα 7b και 7d φαίνεται ότι την υψηλότερη τιμή με τελική πτώση στις 3-4 ημέρες τις έχουν οι ζυμώσεις στα 12,5 °P (~3,50 pH). Στην συνέχεια ακολουθούν με τελική πτώση στις 2 ημέρες και για τις δυο ζυμώσεις τα δείγματα με 15,7 και 15,5 °P και τελική τιμή στο 3,1. Τέλος και στις κανονικές και στις επαναληπτικές ζυμώσεις την πιο χαμηλή τιμή με πτώση του pH και πάλι στις 2 μέρες παρατηρείται στα δείγματα με 19,5 °P και τελική τιμή ~3 pH. Αυτό δείχνει ότι πιθανά η αύξηση του ποσοστού της γλυκόζης στο γλεύκος της αρχικής πυκνότητας ή και των δυο παραγόντων μαζί έχει ως αποτέλεσμα πιο γρήγορες πτώσεις και χαμηλότερο pH στο τελικό προϊόν που μπορεί να βοηθήσει στην παραγωγή ξινών ζύθων.

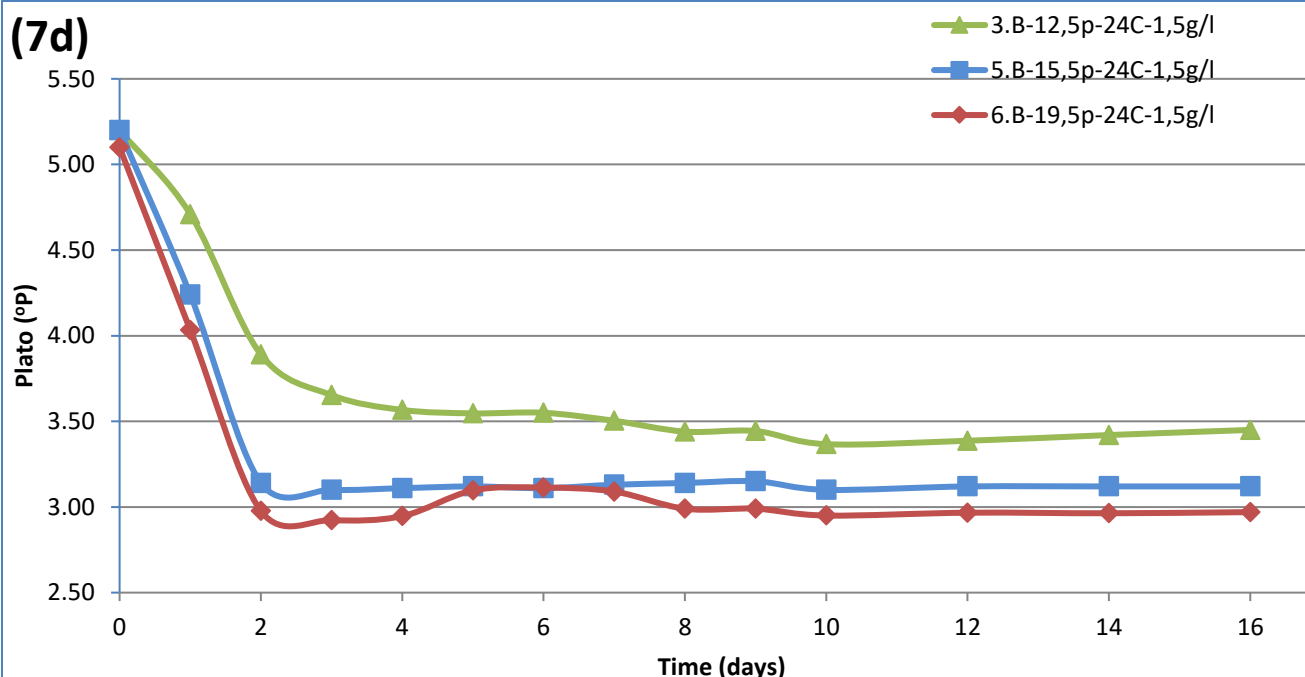


Διαγράμματα 7a, 7b: Εξέλιξη των βαθμών(7a) Plato(°P) και του pH(7b) προς τον χρόνο κατά τη ζύμωση με *L. thermotolerans* σε διαφορετικές αρχικές πυκνότητες- βαθμούς Plato(°P) 3A(12,5 °P), 5A(15,7 °P), και 6A(19,5 °P). Όλα τα δείγματα έχουν σταθερή θερμοκρασία ζύμωσης (24 °C) και ποσότητα εμβολίου (pitching rate) 1,5g/L. Τα αποτελέσματα εμφανίζουν τυπική απόκλιση < 0,015.

(7c)



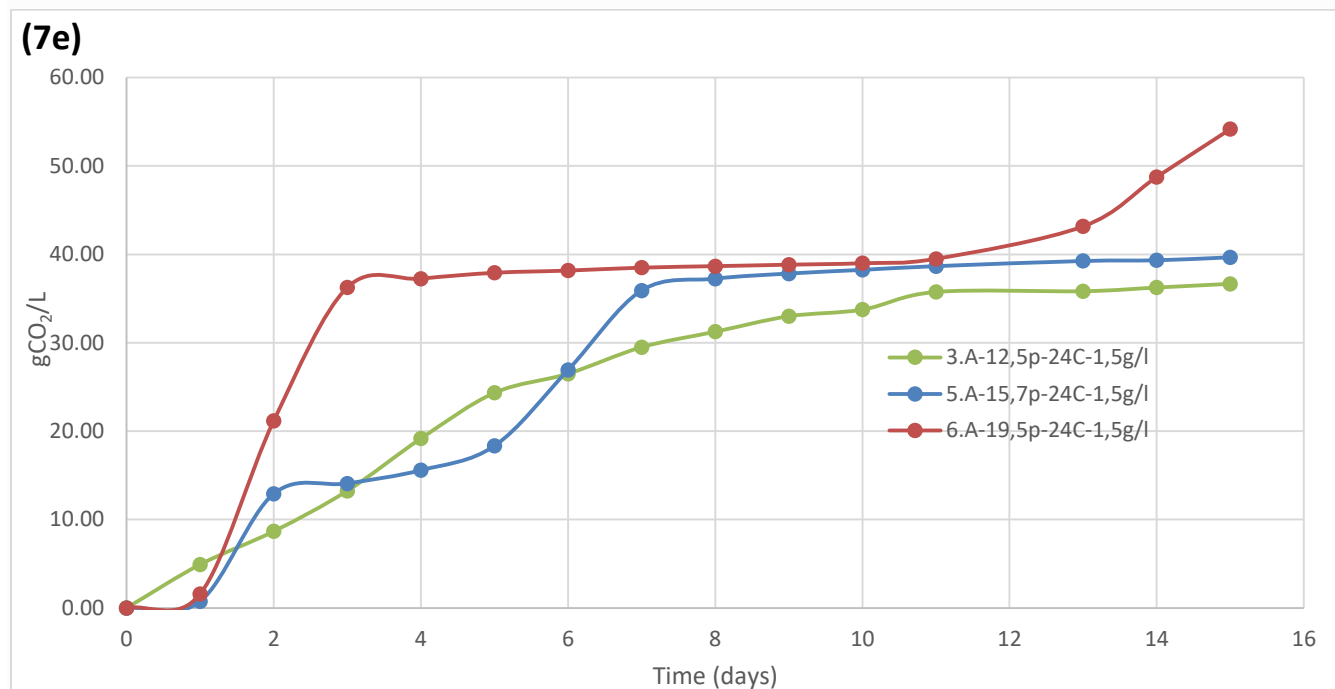
(7d)



Διαγράμματα 7c, 7d: Εξέλιξη των βαθμών(7c) Plato(°P) και του pH(6d) προς τον χρόνο κατά τη ζύμωση με *L. thermotolerans* σε διαφορετικές αρχικές πυκνότητες- βαθμούς Plato(°P) 3A(12,5 °P), 5A(15,7 °P), και 6A(19,5 °P) με τις επαναλήψεις των δειγμάτων 3A(3B) και 5A(5B). Όλα τα δείγματα έχουν σταθερή θερμοκρασία ζύμωσης (24 °C) και ποσότητα εμβολίου (pitching rate) 1,5g/L. Τα αποτελέσματα εμφανίζουν τυπική απόκλιση < 0,015.

Για τις καμπύλες στο διάγραμμα 7e μπορεί να παρατηρηθεί ότι αναφέρθηκε και πιο πάνω. Αρχικά το δείγμα με τα 12 °P φαίνεται να έχει μια ομαλή καμπύλη η οποία σταθεροποιείται στις 11 μέρες και έχει την λιγότερα γραμμάρια διοξειδίου του άνθρακα που είναι λογικό καθώς είχε και την χαμηλότερη αρχική πυκνότητα από τα τρία δείγματα. Στην συνέχεια, ακολουθεί το δείγμα 5A (15,5 °P) όπου φαίνεται να έχει μια φάση προσαρμογής την πρώτη μέρα όπου ακολουθείται από έντονη ανάπτυξη και στην δεύτερη μέρα μια ακόμα φάση προσαρμογής που κρατάει 2-3 μέρες. Στην συνέχεια, αναπτύσσεται πάλι μέχρι

που σταθεροποιείται στην 7η μέρα και ολοκληρώνει πιο γρηγορά την ζύμωση απ' ότι το 3A (12 °P) συμπεριφορά που φάνηκε και στα πιο πάνω διαγράμματα. Τέλος το 6A (19,5 °P) έχει κι αυτό μια περίοδο προσαρμογής για μια μέρα και μετρά αναπτύσσεται ραγδαία αποβάλλοντας 35 g CO₂ σε 2 μέρες όπου ακολουθείται από μια μεγάλη σταθερή φάση η οποία κρατάει για 8 μέρες και στην συνέχεια αναπτύσσεται πάλι μέχρι που φτάνει στο τέλος της ζύμωσης. Το συγκεκριμένο δείγμα ολοκλήρωσε την ζύμωση μαζί με το δείγμα 5A (15,5 °P).



Διάγραμμα 7e: Εξέλιξη του βάρους του δοχείου που απεικονίζεται ως παραγωγή γραμμάρια (g) CO₂/L προς τον χρόνο κατά τη ζύμωση με *L. thermotolerans* σε διαφορετικές αρχικές πυκνότητες- βαθμούς Plato (°P) 3A (12,5 °P), 5A (15,7 °P), και 6A (19,5 °P). όλα τα δείγματα έχουν σταθερή θερμοκρασία ζύμωσης (24 °C) και ποσότητα εμβολίου (pitching rate) 1,5g/L. Τα αποτελέσματα εμφανίζουν τυπική απόκλιση < 0,015.

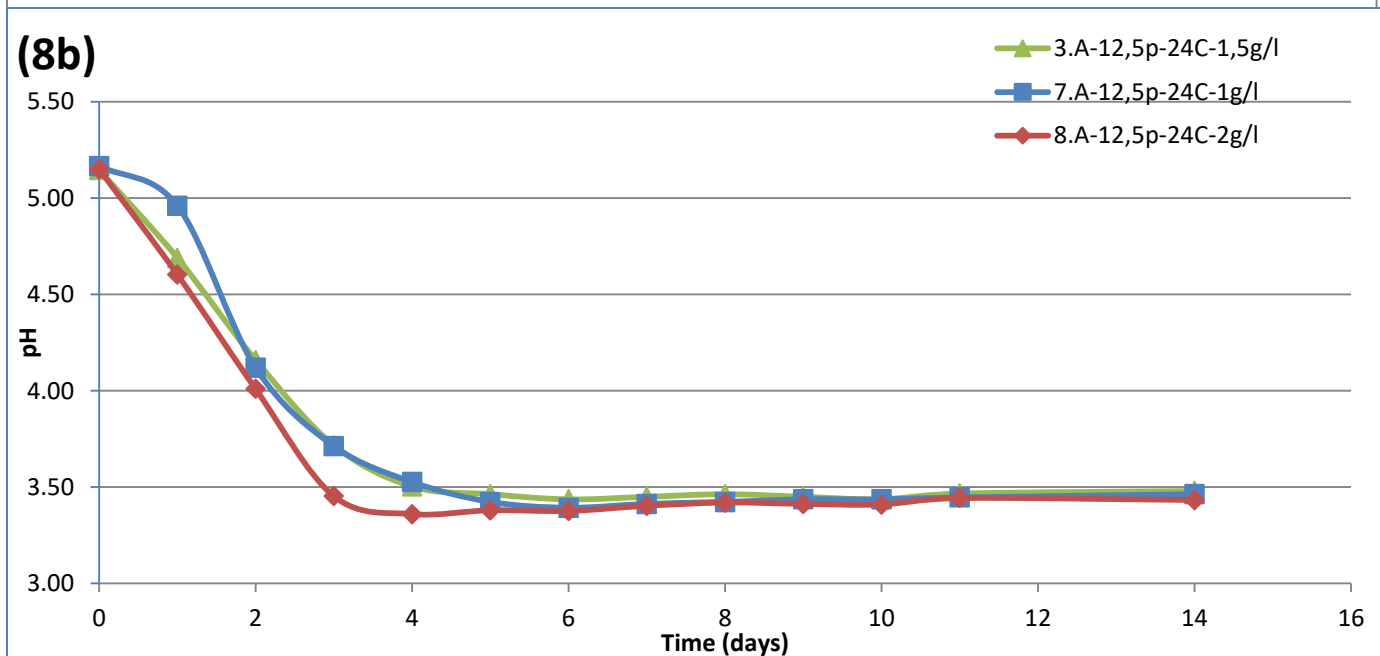
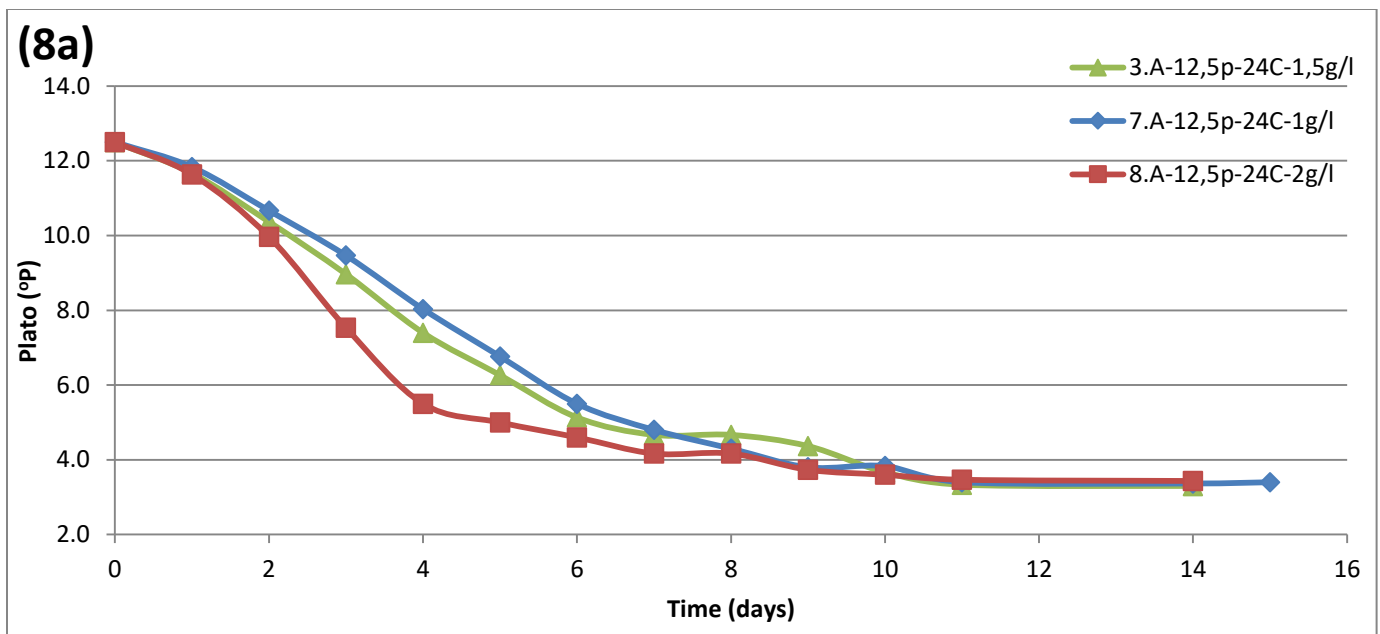
Σαν αποτέλεσμα φαίνεται ότι η ζύμη *L. thermotolerans* δεν επηρεάστηκε ιδιαίτερα από τις υψηλές αρχικές πυκνότητες και σε κάθε περίπτωση κατάφερε να ολοκληρώσει την ζύμωση. Η παραπάνω γλυκόζη φάνηκε να λειτουργεί βοηθητικά και όχι κατασταλτικά σε σημείο όπου σε κάποια δείγματα ακόμα και με μεγαλύτερες αρχικές πυκνότητες η *L. thermotolerans* κατάφερε να ολοκληρώσει πιο γρηγορά την ζύμωση. Σε κάθε περίπτωση φαίνεται ότι οι πυκνότητες άνω των 12 °P προκαλούν μια έντονη δεύτερη φάση στην ζύμωση επιβραδύνοντας την σε κάποιες περιπτώσεις αλλά σε άλλες δεν έχει κάποια επιρροή. Τέλος οι υψηλότερες πυκνότητες φαίνεται ότι επηρεάζουν καθαρά το pH του τελικού προϊόντος με τιμή μέχρι και 0,5 pH χαμηλότερα από μια ζύμωση σε 12 °P.

3.2.3 Εξέλιξη των βαθμών Plato και του pH σε γλεύκη με διαφορετικές ποσότητες εμβολίου (pitching rate)

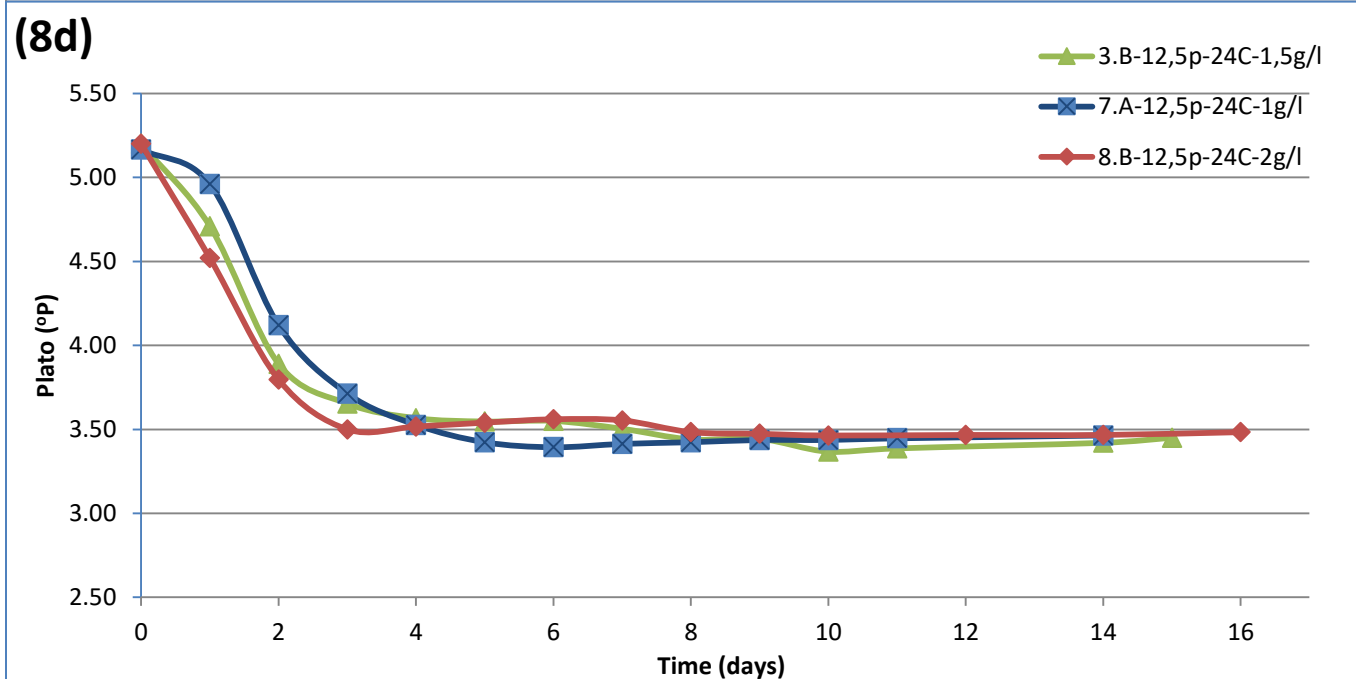
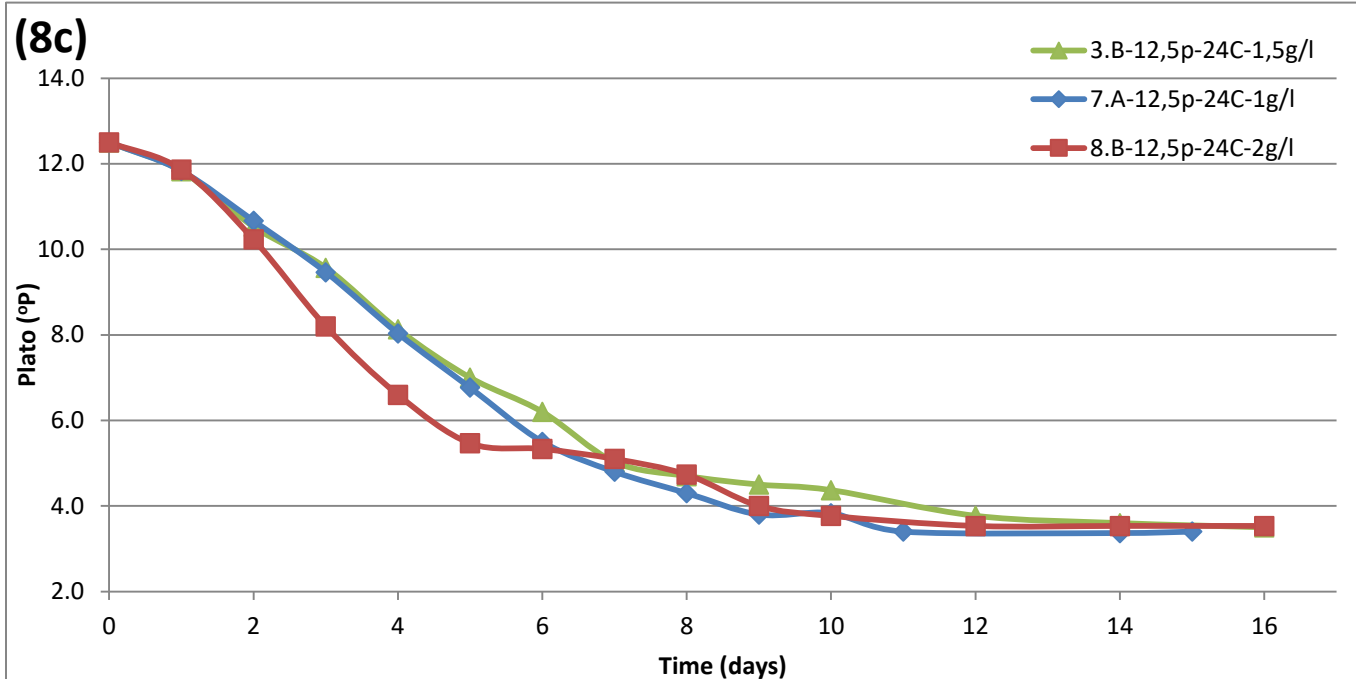
Παρατίθενται τα παρακάτω διαγράμματα με την εξέλιξη των βαθμών Plato (8a,8c) και pH (8b, 8d) κατά την διάρκεια της ζύμωσης του στελέχους *L. thermotolerans* με διαφορετικές αρχικές ποσότητες εμβολίου (pitching rate) 1,0 g/l, 1,5 g/l και 2,0 g/l.

Όπως φαίνεται στα διαγράμματα 8a, 8c οι ζυμώσεις με 1,0 g/l και 1,5 g/l κινούνται με παρόμοιους ρυθμούς (αν και λίγο πιο αργά τα 1,0 g/l στο διάγραμμα 8a) και έφτασαν σε παρόμοιες τελικές πυκνότητες (3,3 - 3,5 °P) καθώς και στον ίδιο χρόνο με διαφορά μόνο την ζύμωση 3B η οποία ήταν σε άλλο κύκλο ζυμώσεων και τέλειωσε 3 μέρες αργότερα. Οι ζυμώσεις με 2,0 g/l φαίνεται να τελείωσαν στις ίδιες ή υψηλότερες τελικές πυκνότητες στα 3,5 °P αν και στο διάγραμμα 8a οι ζυμώσεις φαίνεται να τελείωσαν την ίδια μερα στο 8c τελείωσαν 3 μέρες νωρίτερα. Όλα αυτά δείχνουν ότι η ποσότητα εμβολίου πιθανά δεν επηρεάζει ιδιαίτερα την ζύμωση στην ποσότητα των 1,0 και 1,5 g/l. Αλλα, στα 2,0 g/l φαίνεται ότι οι ζυμώσεις τελείωσαν πιο νωρίς με ίδιες τελικές πυκνότητες.

Για τις τιμές του pH αρχικά φαίνεται ότι, στο διάγραμμα 8b η πτώση ήταν πιο γρήγορη στις 3-4 μέρες για την ποσότητα εμβολίου των 2,0 g/l. Οι ζυμώσεις με 1,0 και 1,5 g/l είχαν μεγάλη πτώση του pH στις 5 μέρες αν και με ελαφρά πιο αργή πτώση στην αρχή (1-2 μέρες) για την ποσότητα των 1,0 g/l . Οι τελικές τιμές φαίνεται να είναι ίδιες για όλες τις ποσότητες εμβολίου στα ~ 3,45 pH. Αντίθετα στις επαναληπτικές ζυμώσεις στο διάγραμμα 8d οι ζυμώσεις των 1,5 (3A) και 2,0 (8B) g/l φαίνεται να εμφανίζουν πτώση αρχικά στις 3 μέρες για τα 2,0 g/l (8B) και 4 μέρες για τα 1,5 g/l (3B) στην τιμή ~3,50 pH και μια δεύτερη πολύ μικρότερη στις 7 μέρες κατά 0,05 - 0,1 pH . Πρέπει να σημειωθεί ότι τα 1,5 g/l έφτασαν ελαφρά χαμηλότερα από τα άλλα δείγματα στο ~3,4 pH. Ακόμα, φαίνεται καθαρά ότι οι δυο επαναληπτικές ζυμώσεις 3B και 8B εμφανίζουν μεγαλύτερη πτώση και πιο γρήγορη από τις πρώτες 3A και 8A αλλά καταλήγουν σε παρόμοια τελικά αποτελέσματα.



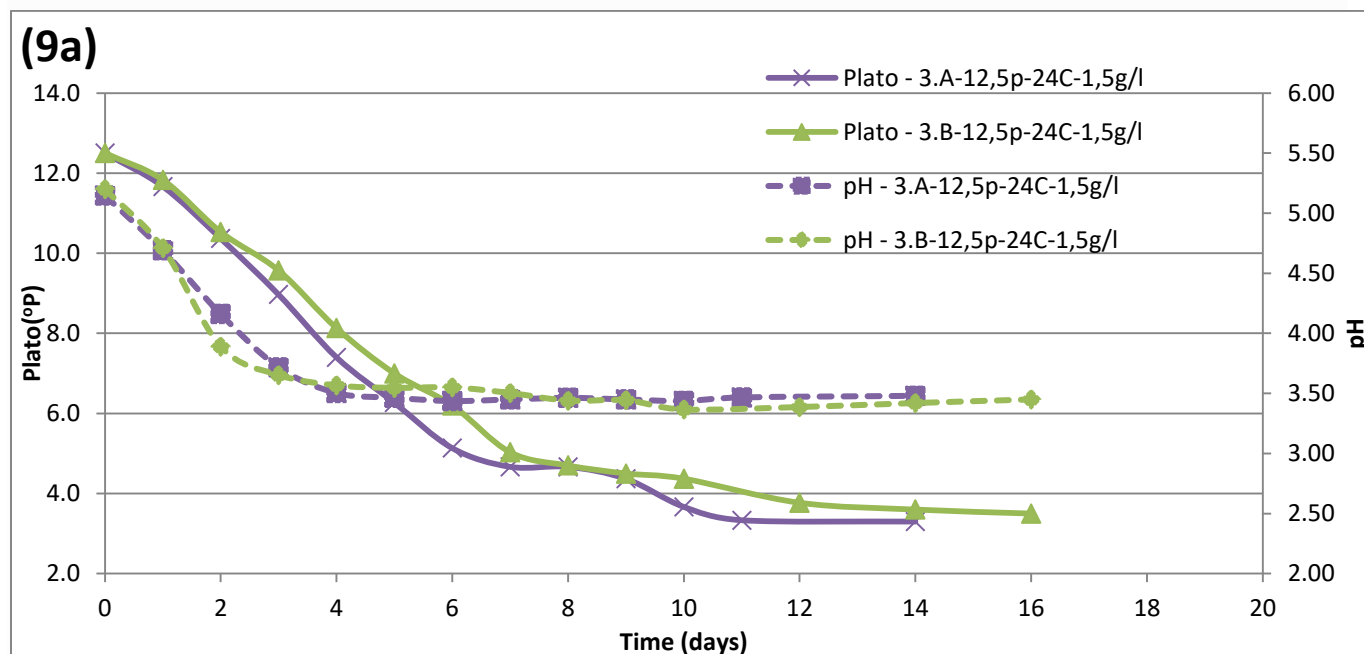
Διαγράμματα 8a, 8b : Εξέλιξη των βαθμών (8a) Plato (°P) και του pH (8b) προς τον χρόνο κατά τη ζύμωση με *L. thermotolerans* με διαφορετικές ποσότητες εμβολίου (Pitching rate) 3A(1,5 g/l), 7A(1,0 g/l), και 8A(2,0 g/l). Όλα τα δείγματα έχουν σταθερή θερμοκρασία ζύμωσης (24°C) και αρχική πυκνότητα - βαθμούς Plato (12,5°P). Τα αποτελέσματα εμφανίζουν τυπική απόκλιση < 0,015.



Διαγράμματα 8c, 8d : Εξέλιξη των βαθμών(8c) Plato (°P) και του pH (8d) προς τον χρόνο κατά τη ζύμωση με *L. thermotolerans* με διαφορετικές ποσότητες εμβολίου (Pitching rate) 3A(1,5 g/l), 7A(1,0 g/l), και 8A(2,0 g/l) με τις επαναλήψεις των δειγμάτων 3A(3B) και 8A(8B). Όλα τα δείγματα έχουν σταθερή θερμοκρασία ζύμωσης (24 °C) και αρχική πυκνότητα - βαθμούς Plato (12,5 °P). Τα αποτελέσματα εμφανίζουν τυπική απόκλιση < 0,015.

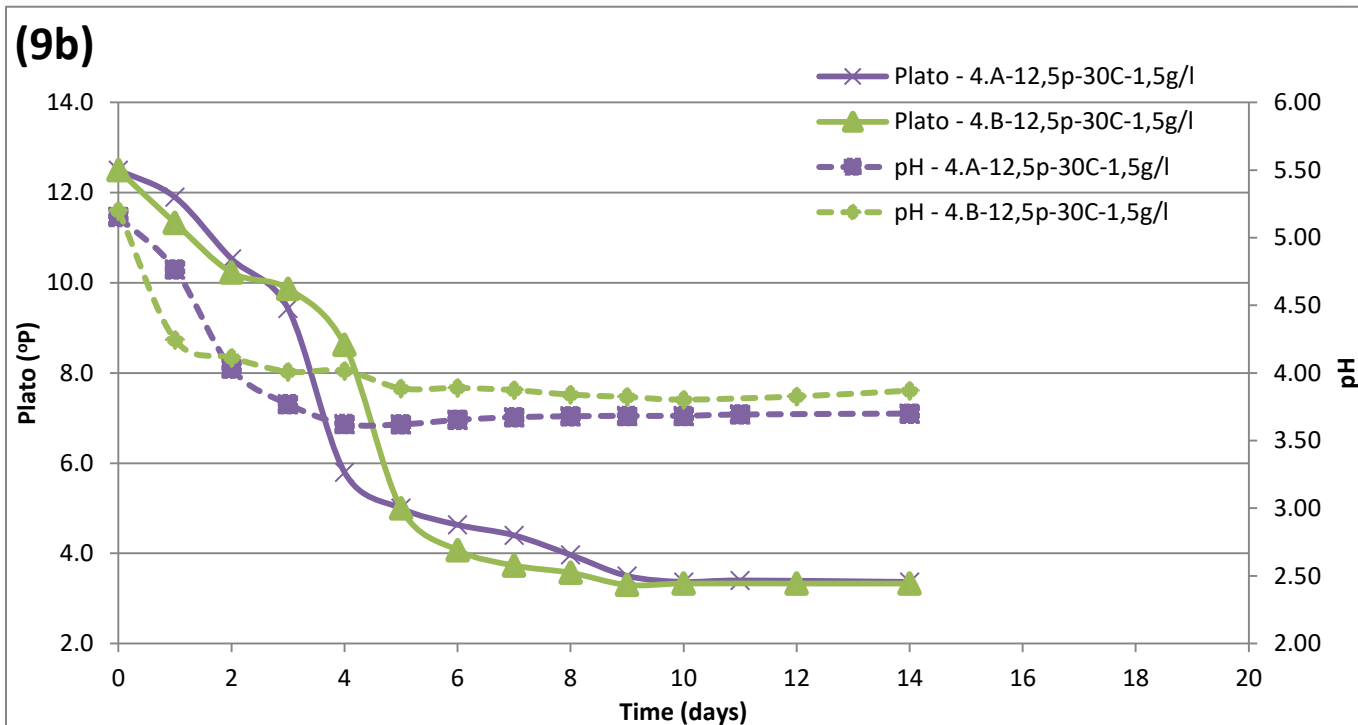
3.2.4 Σύγκριση επαναληψιμότητας αποτελεσμάτων των διαφορετικών συνθήκων ζύμωσης μεταξύ της ζύμωσης A και B για *L. thermotolerans*

Παρακάτω γίνεται σύγκριση των αποτελεσμάτων από τις ζυμώσεις A και τις επαναληπτικές τους B για να αξιολογηθεί η ικανότητα επαναληψιμότητας του συγκεκριμένου στελέχους *L. thermotolerans* καθώς και της ικανότητας της για λήψη παρομοίων χαρακτηριστικών στο τελικό προϊόν.



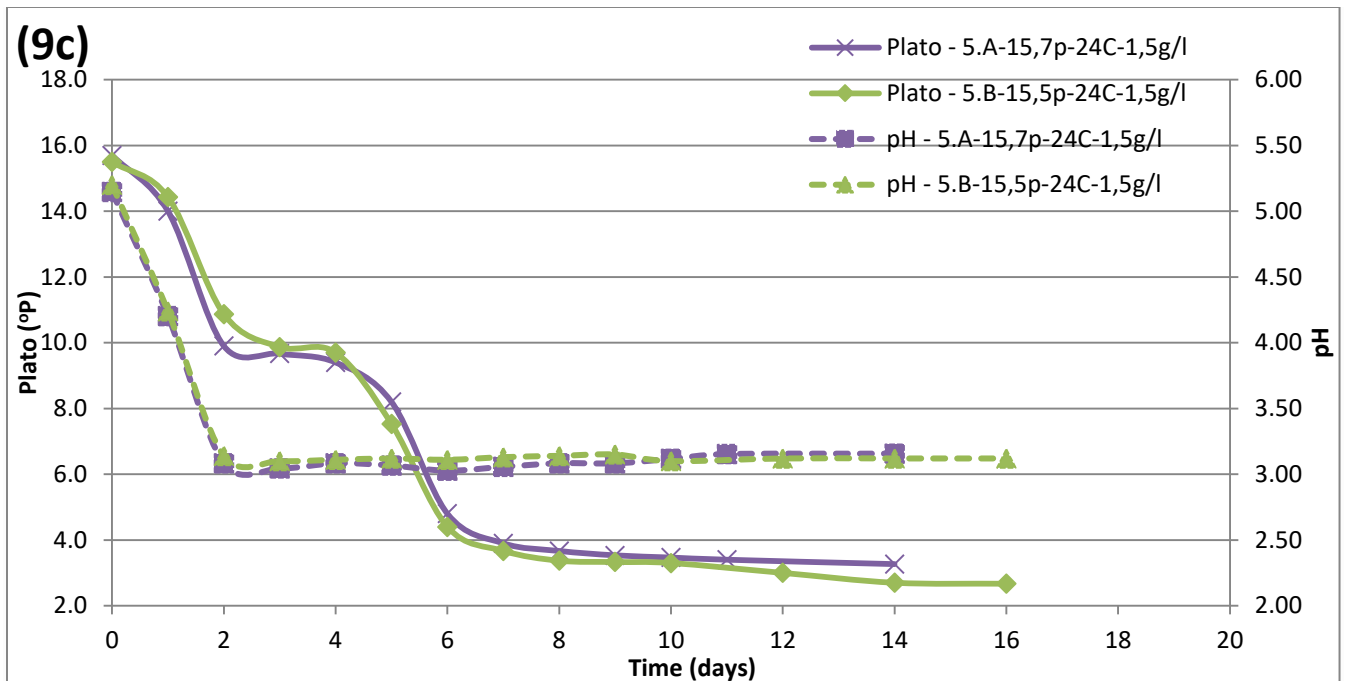
Διάγραμμα 9a : Σύγκριση επαναληψιμότητας ζυμώσεων 3A και 3B με την εξέλιξη των βαθμών Plato (°P) και του pH προς τον χρόνο κατά τη ζύμωση με χρήση *L. thermotolerans* σε συνθήκες αρχικής πυκνότητας 12,5 °P, θερμοκρασία 24 °C και pitching rate 1,5g/L. Τα αποτελέσματα εμφανίζουν τυπική απόκλιση < 0,015

Στο διάγραμμα 9a συγκρίνεται το control 3A με το 3B που είναι η επανάληψη του σε βαθμούς Plato (°P) και pH. Αρχικά φαίνεται ότι οι τελικές τιμές τόσο των βαθμών Plato είναι σχεδόν όμοιες (στα 3,3 °P για το 3A και 3,5 °P για το 3B) όσο και του pH (στα ~3,45 με πτώση στις ~4 μέρες). Στους βαθμούς Plato επίσης παρατηρείται ότι ο ρυθμός ζύμωσης είναι ελαφρώς πιο γρήγορος για την ζύμωση B με μια μικρή παύση στις 8 μέχρι τις 10 μέρες ενώ η ζύμωση A φαίνεται να ακολουθεί μια συνεχόμενη ομφαλική πτώση άθολη την διάρκεια της ζύμωσης. Τέλος η ζύμωση B φαίνεται να διήρκεσε 2 μέρες περισσότερο από ότι η ζύμωση A. Έτσι, ακόμα αν και οι ζυμώσεις A και B έχουν κάποιες διαφορές οι διαφορές είναι μικρές και καταλήγουν σε παρόμοιες τελικές τιμές με μικρή απόκλιση οπότε υπάρχει επαναληψιμότητα με ένα μικρό σφάλμα.



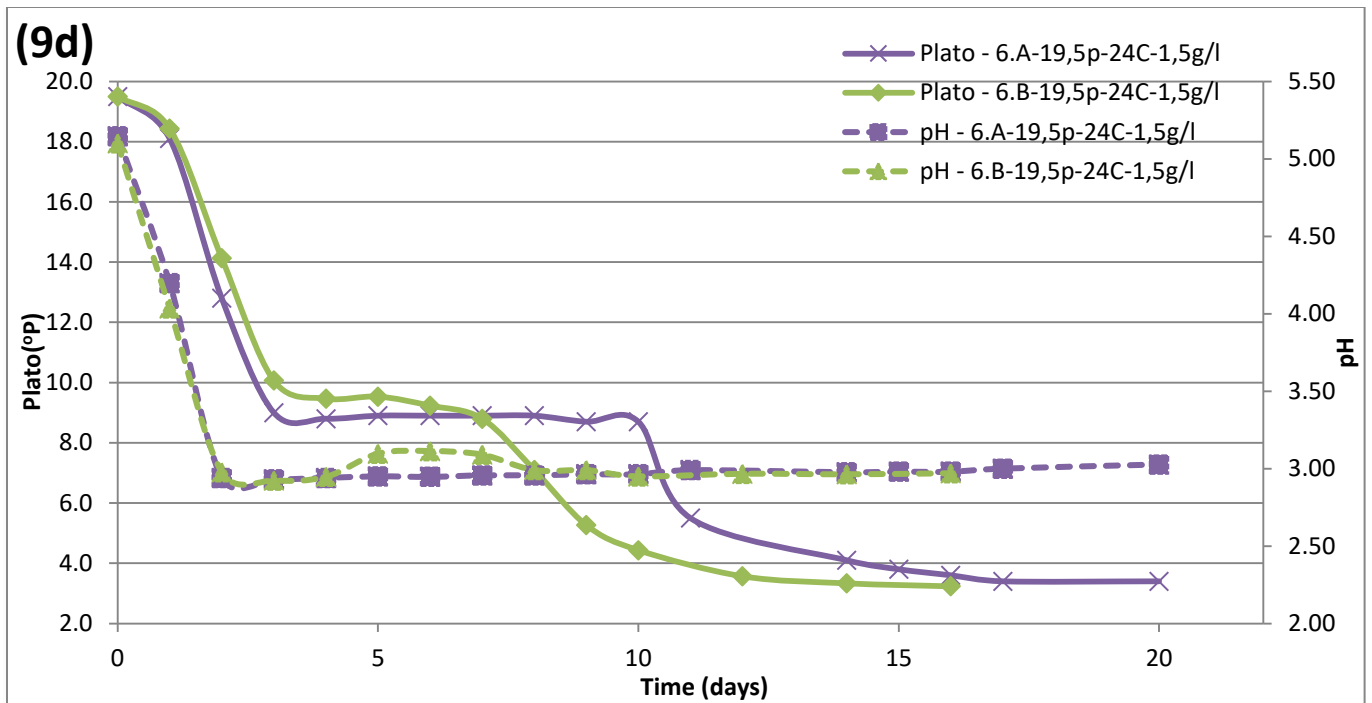
Διάγραμμα 9b : Σύγκριση επαναληψιμότητας ζυμώσεων 4A και 4B με την εξέλιξη των βαθμών Plato (°P) και του pH προς τον χρόνο κατά τη ζύμωση με χρήση *L. thermotolerans* σε συνθήκες αρχικής πυκνότητας 12,5 °P, θερμοκρασία 30 °C και pitching rate 1,5g/L. Τα αποτελέσματα εμφανίζουν τυπική απόκλιση < 0,015

Στο διάγραμμα 9b γίνεται η σύγκριση της ζύμωσης A και B στους 18 °C. Στο συγκεκριμένο διάγραμμα φαίνεται καθαρά η ζύμωση A να εμφανίζει μια γρηγορότερη ταχύτητα στην ζύμωση. Αρχικά, η μεγάλη πτώση των βαθμών Plato (°P) γίνεται στις 4 μέρες για την ζύμωση A και στις 5 για την B αλλά οι τελικές τιμές είναι σχεδόν όμοιες στα 3,4 °P για την ζύμωση A και 3,3 °P για την B. Αντίθετα για τις τιμές του pH παρατηρείται μια αρχική και πιο γρήγορη πτώση στις 1-2 μέρες για την ζύμωση B και μένει σχεδόν σταθερή σε τιμή στα 3,85 pH ενώ η A έχει μια σταθερή πτώση μέχρι την 4η μέρα και μετρά παραμένει σταθερή στα 3,7 pH. Έτσι εδώ και πάλι παρατηρείται μια μικρή διαφορά στα αποτελέσματα όπως στο διάγραμμα 9a αλλά επειδή οι τιμές των αποκλίσεων είναι μικρές θεωρείται ότι και στο συγκεκριμένο υπάρχει επαναληψιμότητα.



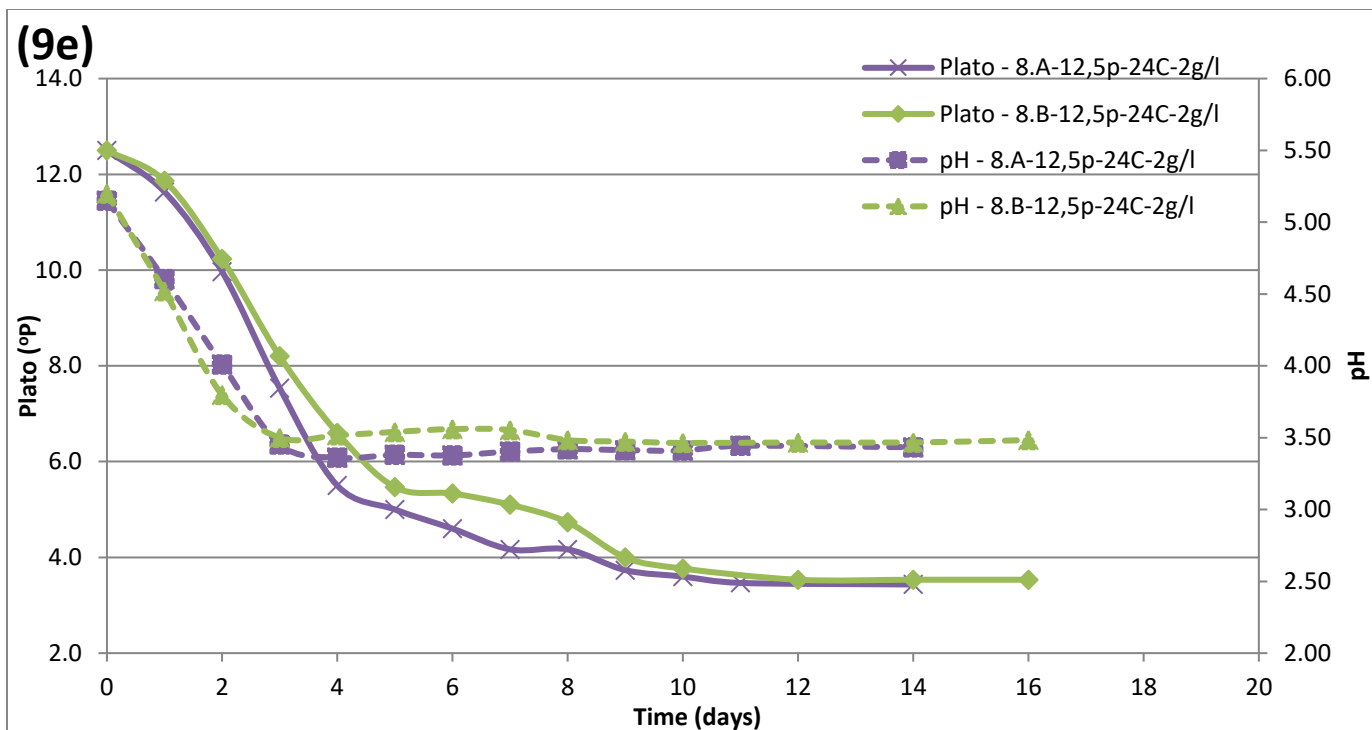
Διάγραμμα 9c : Σύγκριση επαναληψιμότητας ζυμώσεων 5A και 5B με την εξέλιξη των βαθμών Plato (°P) και του pH προς τον χρόνο κατά τη ζύμωση με χρήση *L. thermotolerans* σε συνθήκες αρχικής πυκνότητας 15,7 °P(A) και 15,5(B) °P , θερμοκρασία 30 °C και pitching rate 1,5g/L. Τα αποτελέσματα εμφανίζουν τυπική απόκλιση < 0,015.

Στο διάγραμμα 9c παρουσιάζονται οι ζυμώσεις A και η επαναληπτική B με πυκνότητα στα ~15,5 °P. Αρχικά οι ζυμώσεις φαίνεται να είναι όμοιες με τις διάφορες ότι, η ζύμωση A είχε έναν ελαφρά πιο γρήγορο ρυθμό ζύμωσης στις 2 μέρες από ότι η B, ότι η A τέλειωσε σε πιο υψηλή τελική τιμή στα 3,3 °P ενώ η B στα 2,7 °P και ότι οι ζυμώσεις B φαίνεται να διήρκεσαν 2-3 παραπάνω μέρες απ' ότι οι A. Οι τελικές τιμές pH είναι όμοιες στα ~ 3,15 pH. Έτσι επειδή οι καμπύλες φαίνονται σχεδόν όμοιες αν και οι τελικές τιμές μπορεί να διαφέρουν στους βαθμούς °P, το προφίλ της ζυμώσεις φαίνεται παρόμοιο και φαίνεται να υπάρχει επαναληψιμότητα



Διάγραμμα 9d : Σύγκριση επαναληψιμότητας ζυμώσεων 6A και 6B με την εξέλιξη των βαθμών Plato (°P) και του pH προς τον χρόνο κατά τη ζύμωση με χρήση *L. thermotolerans* σε συνθήκες αρχικής πυκνότητας 19,5 °P , θερμοκρασία 30 °C και pitching rate 1,5g/L. Τα αποτελέσματα εμφανίζουν τυπική απόκλιση < 0,015

Στο διάγραμμα 9d παρατηρείται ομοιότητα στις ζυμώσεις A και B στα 19,5 °P αν και με κάποιες διαφορές. Αρχικά αν και φαίνεται καθαρά ότι και οι δυο ζυμώσεις παρουσιάζουν διφασική καμπύλη στην ζύμωση B φαίνεται να διαρκεί 3 μέρες παραπάνω αν και είχε ελαφρά πιο γρήγορο ρυθμό και στην αρχή και ότι η A διαρκεί ~2 παραπάνω μέρες από ότι η B. Οι τελικές τιμές διαφέρουν κατά ~0,15 °P με την A στο 3,4 °P και την B στο 3,23 °P. Οι τιμές του pH αλλά και το σχήμα της καμπύλης είναι όμοιες με ίδιες τελικές τιμές ~3 pH. Στην συγκεκριμένη περίπτωση οι ζυμώσεις φαίνεται ότι παρουσιάζουν επαναληψιμότητα πάλι όμως με μικρές διαφορές όπως και στα παραπάνω αποτελέσματα αλλά το προφίλ και τα χαρακτηριστικά των ζυμώσεων είναι όμοια.



Διάγραμμα 9e : Σύγκριση επαναληψιμότητας ζυμώσεων 8A και 8B με την εξέλιξη των βαθμών Plato (°P) και του pH προς τον χρόνο κατά τη ζύμωση με χρήση *L. thermotolerans* σε συνθήκες αρχικής πυκνότητας 12,5 °P, θερμοκρασία 30 °C και pitching rate 2 g/L. Τα αποτελέσματα εμφανίζουν τυπική απόκλιση < 0,015.

Τέλος στην καμπύλη 9e όπου παρουσιάζεται το πείραμα με pitching rate στα 2,0 g/L και η επανάληψη του, οι δυο ζυμώσεις πάλι δείχνουν αρκετές ομοιότητες αλλά και κάποιες μικρές διαφορές. Αρχικά φαίνεται ότι η ζύμωση A (8A) είχε μια πιο γρήγορη πτώση στις 4 μέρες και μια δεύτερη τελική στις 9 μέρες ενώ η ζύμωση B (8B) φαίνεται να έχει πτώση στις 5 μέρες και παρόμοια με την A ζύμωση πάλι μια μικρότερη στις 9 μέρες, ενώ οι τελικές τιμές τους είναι σχετικά όμοιες στα 3,4 °P για την A και 3,5 °P για την B. Ακόμα, οι τιμές του pH και οι καμπύλες είναι σχεδόν παρόμοιες καθώς και οι τελικές τιμές στα ~3,45 pH. Έτσι λοιπόν εδώ επαναλαμβάνεται το μοτίβο ότι το προφίλ των καμπυλών είναι παρόμοιο με κάποιες μικρές διαφορές οι οποίες μπορούν να θεωρηθούν αμελητέες και να εμφανίζουν επαναληψιμότητα.

Εν κατακλείδι φαίνεται ότι σε όλα τα παραπάνω διαγράμματα οι ζυμώσεις A και B είχαν παρόμοια προφίλ αλλά μικρές διαφορές είτε στους ρυθμούς ζύμωσης είτε στις τελικές τιμές κατά συνήθως ~0,1-0,2 τόσο στους βαθμούς °P αλλά και στο pH. Οι ζυμώσεις A και B μπορεί να θεωρηθεί ότι έχουν επαναληψιμότητα καθώς τα βασικά χαρακτηριστικά της ζύμωσης στην κάθε συνθήκη επαναλαμβάνονται και ακόμα αν και κάποιες ενδιάμεσες τιμές διαφέρουν. Ακόμα στο ότι οι αρχικές ζυμώσεις και οι επαναλήψεις τους αν και ήταν στον ίδιο χώρο η ρύθμιση της θερμοκρασίας ειδικά σε διαφορετικές εποχές μπορεί να είναι δύσκολο και να υπάρχουν αποκλίσεις. Τέλος τα επαναληπτικά δείγματα αν και ήταν από την ίδια παραγωγή είχαν καταψυχθεί και πιθανόν να εμφανίζουν μικρές διαφορές στην σύσταση τους από τα αρχικά όπως π.χ. σε αρχικό διαλυμένο οξυγόνο.

3.1.5 Αποτελέσματα αναλύσεων για όλες τις ζυμώσεις με *L. thermotolerans* και σχολιασμός

Ο παρακάτω πίνακας συγκεντρώνει τις μετρήσεις των δειγμάτων της δεύτερης σειράς πειραμάτων.

Πίνακας 5: Τα αποτελέσματα των αναλύσεων όλων των συνθήκων των ζυμώσεων Α και των επαναληπτικών Β. Οι μετρήσεις Alc%vol (alcohol v/v%) Or. Ext. Anton(Original extract), R. Ext.(real extract), Att. % Anton,(Attenuation) είναι αποτελέσματα από της μετρήσεις από το όργανο Alex 500 από την Anton Paar. Ενώ οι υπόλοιπες είναι μετρήσεις που αναλύονται στο κεφάλαιο 2 (πειραματική διαδικασία) : Original extract M. (Original extract Manual) = μέτρηση αρχικής πυκνότητας, , Turbidity = θολερότητα EBC, Color (EBC) = χρώμα μπύρας σε μονάδες EBC, Att.% (attenuation) Anton και Att.% M. (attenuation manual) = βαθμός ζύμωσης %.

Code-name	Alc %vol	Or.Ext. Anton (°P)	Or.Ext. M. (°P)	R. Ext. (°P)	Acidity g/L	Final Plato (°P)	pH	Turbidity(EBC)	Color (EBC)	Att. % Anton	Att. %M.
1.A-12,5p-13C-1,5g/l	5,70	12,60	12,50	3,96	1,80	2,20	4,11	0,02	14,7	82,54	82,40
2.A-12,5p-18C-1,5g/l	5,34	13,10	12,50	5,09	2,61	3,20	3,55	0,02	12,3	75,57	74,40
3.A-12,5p-24C-1,5g/l	5,22	13,08	12,50	5,25	2,97	3,30	3,50	0,02	10,5	74,77	73,60
4.A-12,5p-30C-1,5g/l	5,12	12,9	12,50	5,2	2,43	3,4	3,8	0,02	11,7	73,64	72,80
5.A-15,7p-24C-1,5g/l	7,02	16,2	15,70	5,77	6,21	3,4	3,1	0,02	10,3	79,01	78,34
6.A-19,5p-24C-1,5g/l	9,14	19,70	19,50	6,48	8,82	3,40	3,01	0,02	12,0	82,74	82,56
7.A-12,5p-24C-1g/l	5,2	13,01	12,50	5,14	2,88	3,4	3,53	0,02	10,7	73,87	72,80
8.A-12,5p-24C-2g/l	5,11	13,09	12,50	5,51	3,78	3,5	3,4	0,02	10,9	73,26	72,00
3.B-12,5p-24C-1,5g/l	5,04	12,98	12,50	5,42	4,05	3,5	3,55	0,02	15,2	73,04	72,00
4.B-12,5p-30C-1,5g/l	5,22	13,02	12,50	5,17	1,98	3,4	3,9	0,02	15,5	73,89	72,80
5.B-15,5p-24C-1,5g/l	7,26	15,98	15,50	5,21	5,67	2,8	3,1	0,02	14,8	82,48	81,94
6.B-19,5p-24C-1,5g/l	9,44	20	19,50	6,4	9,00	3,4	2,95	0,02	15,1	83,00	82,56
8.B-12,5p-24C-2g/l	5,28	13,47	12,50	5,54	3,51	3,6	3,55	0,02	15,8	73,27	71,20

Τα αποτελέσματα από το όργανο Alex500 (Anton Paar) φαίνεται να είναι σχεδόν όμοια με τις υπόλοιπες μετρήσεις με διάφορες στον βαθμό ζύμωσης κατά ~1%. Η ζύμωση Α και Β είχαν μικρές διαφορές μεταξύ τους εκτός από το χρώμα το οποίο είναι κατά ~3 EBC πιο σκούρο στις ζυμώσεις Β πιθανά λόγω οξειδώσεων. Έτσι από τα αποτελέσματα των μετρήσεων και των διάφορων αναλύσεων μπορούν να παρατηρηθούν τα εξής.

Αρχικά θα σχολιαστεί το δείγμα 3Α και η επαναληπτική ζύμωση 3Β στους 24 C που είναι τα control του πειράματος και των δυο ζυμώσεων. Φαίνεται ότι η ζύμη *L. thermotolerans* σε αυτές τις συνθήκες παράγει μπύρα με βαθμό ζύμωσης στο 72-75%, αλκοόλ κοντά στο 5 – 5,2 %vol, χαμηλά pH στο 3,5 αλλά με χαμηλές οξύτητες 3 – 4 g/l για ξινές μπύρες, και τέλος χρώμα βαθύ σκούρο χρυσό στα 10 EBC στο 3Α και ανοιχτό καστανό στα 15 EBC στην 3Β.

Για το δείγμα 1Α με την ζύμωση στους 13 °C παρατηρείται ότι είχε τον μεγαλύτερο βαθμό ζύμωσης στα 82,4 % καθώς και μικρό R.E., πολύ χαμηλή οξύτητα, σχετικά υψηλό pH για την συγκεκριμένη ζύμη, αλκοόλ πάνω από 5,5 % v/v και χρώμα στο 14,7 EBC η οποία είναι η πιο σκούρα μπύρα από την σειρά

ζυμώσεων A. Έτσι όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω αν και ο χρόνος της ζύμωσης είναι πάνω από 30 μέρες η *L. thermotolerans* έδειξε ότι μπορεί να ζυμώσει σε αυτές τις θερμοκρασίες με υψηλές αποδόσεις και να πράξει ένα διαφορετικό προϊόν με τα χαρακτηριστικά της ζύμης αλλά χωρίς τον όξινο χαρακτήρα. Για το δείγμα 2A στους 18 °C διακρίνονται τα εξής. Αρχικά παρατηρείται ότι ο ρυθμός ζύμωσης είναι ελαφρά υψηλότερος κατά ~1% από το control στους 24 C. Επίσης έχει ελαφρά μειωμένη οξύτητα, pH, Real extract και τελικό Plato. Η αλκοόλη είναι υψηλότερη κατά ~0,1. Λόγω αυτών των αποτελεσμάτων φαίνεται ότι η διαφορά στα βασικά χαρακτηριστικά της μπίρας με τη *L. thermotolerans* στους 18 με 24 °C είναι μόνο στο χρώμα υψηλότερο κατά 2 μονάδες EBC στα 12,3 από το control 3A (24 °C) που βρίσκεται στα 10,5 EBC, ενώ στα αλλά είναι σχετικά όμοια.

Τα δείγματα 4A και 4B στους 30 °C είναι σχεδόν όμοια μεταξύ τους. Έχουν ελαφρά μικρότερο βαθμό ζύμωσης στο 72,8 -73,9% από το control (3A-3B). Περιέχουν αλκοόλη παρόμοια με το control στο 5,1-5,2 %vol και χρώμα ~12-15,5 EBC. Τέλος διακρίνεται υψηλότερο pH 3,8-3,9 και ελαφρά χαμηλότερη οξύτητα 2- 2,4 g/L. Έτσι λοιπόν, φαίνεται ότι η ζύμωση στους 30 °C να μην έχει επηρεάσει μόνο το pH που πιθανά μπορεί να βοηθήσει στην παραγωγή προϊόντος με ελαφρά χαμηλότερο όξινο χαρακτήρα αλλά παρόμοια χαρακτηριστικά με την κανονική ζύμωση στο 24 °C

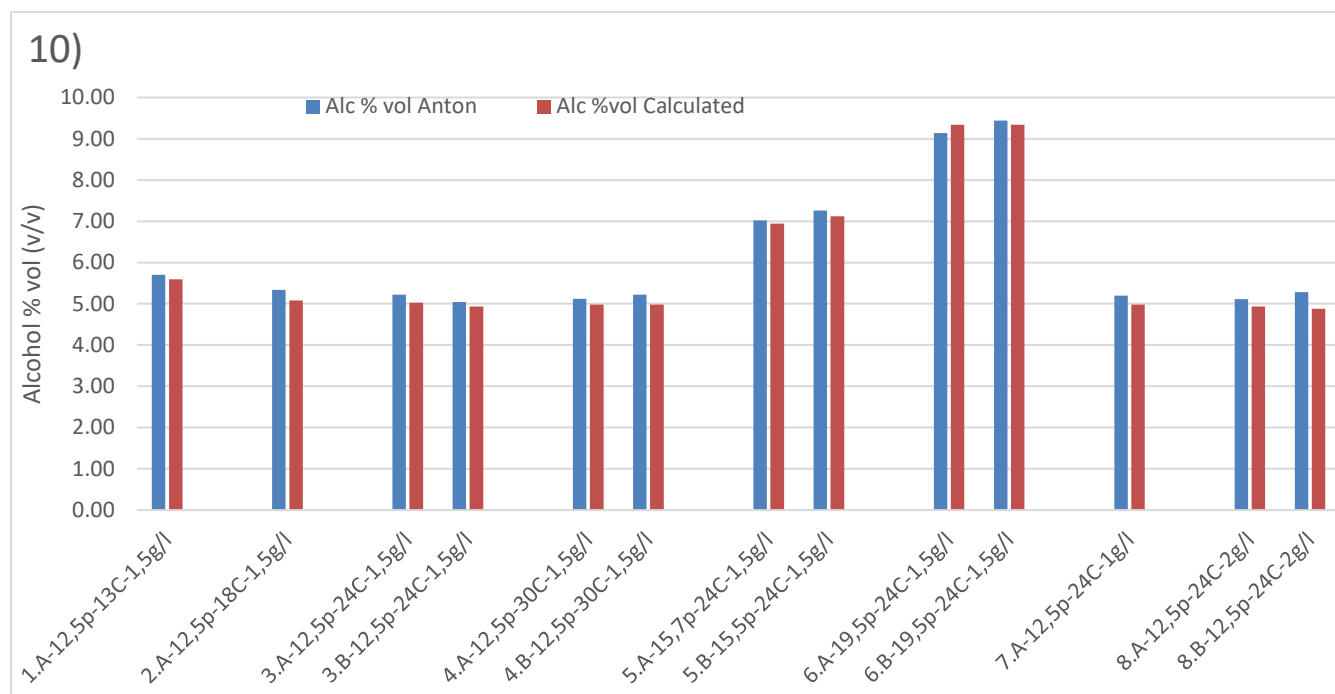
Τα δείγματα 5A και 5B με αρχική πυκνότητα στο 15,5-15,7 παρουσιάζουν αρκετές διάφορες από τις ζυμώσεις (control) στους 24 °C. Παρατηρείται ότι η παραγωγή της αλκοόλης να αυξήθηκε αρκετά με την αύξηση της αρχικής πυκνότητας όπως ήταν αναμενόμενο στο 7-7,2 %vol. Επίσης αύξησε και το real extract από ~5 που ήταν στο control και στα υπόλοιπα δείγματα (εκτός του 1A, 6A, 6B,) σε ~5,8, αλλά με υψηλότερο βαθμό ζύμωσης στα 78- 82 % που δείχνει ότι η προσθήκη γλυκόζης και η αύξηση της πυκνότητας είναι βοηθητικός παράγοντας για την ζύμη. Ακόμα, παρατηρείται χαμηλή τιμή pH στο 3,1 και υψηλότερες οξύτητες μεταξύ 5,7- 6,2 που είναι πιο κοντά σε τιμή με μια ελαφρά ξινή μπίρα. Τέλος το χρώμα είναι παρόμοιο με το Control 10-15 EBC.

Επιπροσθέτως και τα δείγματα 6A και 6B με ζύμωση στα 19,5 °P παρουσιάζουν μεγάλες διάφορες από το control (24 C). Αρχικά από όλα τα δείγματα φαίνεται ότι σε αυτά παράχθηκε η περισσότερη αλκοόλη στο 9- 9,4 % vol και βαθμός ζύμωσης μεταξύ 82,5-83%. Αλλά αυτές οι ζυμώσεις είχαν τον μεγαλύτερο αριθμό R.E. (real extract) στο 6,4-6,5 °P. Έτσι και πάλι μπορεί να θεωρηθεί ότι η υψηλή αρχική πυκνότητα και η αρχική προσθήκη γλυκόζης δεν έδρασε κατασταλτικά προς την ζύμη, αλλά τελικά άλλαξε τον χαρακτήρα του τελικού προϊόντος. Επίσης παρατηρήθηκε η χαμηλότερη pH στα ~3,0 και υψηλή οξύτητα 8,8 -9,0 g/L οπου είναι χαρακτηριστικό μιας αρκετά όξινης μπίρας. Τέλος το χρώμα ήταν παρόμοιο με την ζύμωση στους 18 °C (2A) 12-15 EBC.

Για την ζύμωση 7A με χαμηλότερη ποσότητα αρχικού εμβολίου στο 1,0 g/l δεν είναι απαραίτητος ο σχολιασμός καθώς τα αποτελέσματα των αναλύσεων είναι σχεδόν παρόμοια με το control 3A. Έτσι φαίνεται ότι αυτή η μικρότερη ποσότητα εμβολίου πιθανά να μην επηρεάζει τον χαρακτήρα του τελικού προϊόντος.

Τέλος για τα δείγματα 8A και 8B με υψηλότερη ποσότητα εμβολίου στα 2 g/L παρατηρούνται τα εξής. Αρχικά στο 8A φαίνεται ότι παράχθηκε ελαφρά μικρότερη ποσότητα αλκοόλης στο 5,1 % vol από το 3A αλλά στο 8B κατά 0,2 % v/v περισσότερη αν και ο βαθμός ζύμωσης με βάση το όργανο Alex500 είναι κατά 2% μεγαλύτερος στο 73,2% από τον υπολογιζόμενο με τις τελικές τιμές Plato (3,5 °P) στο 71,2%.

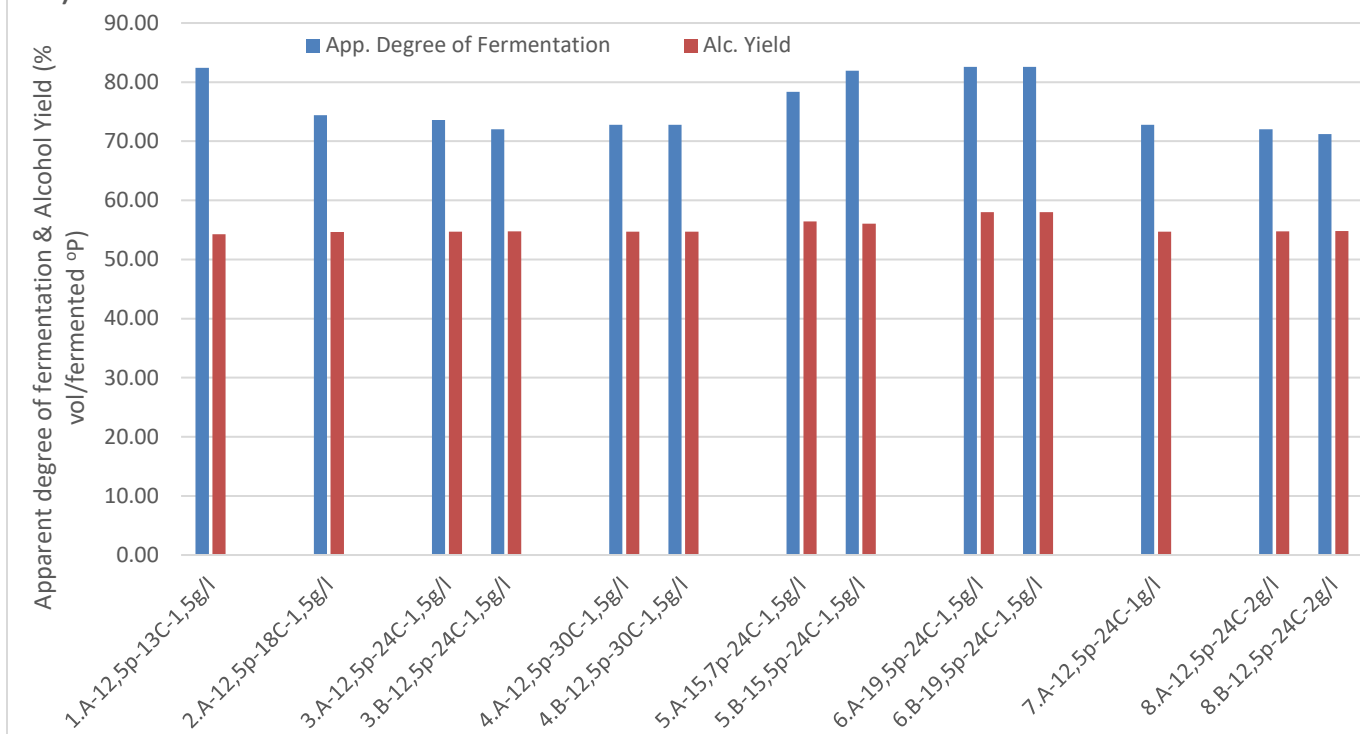
Έτσι με βάση το 8A και τον υπολογιζόμενο βαθμό ζύμωσης στο 8B φαίνεται ότι ο υψηλότερος αλκοολικός βαθμός είναι σφάλμα του οργάνου και στην πραγματικότητα είναι χαμηλότερος. Η τιμή του pH φαίνεται παρόμοια με το control αλλά η οξύτητα είναι ελαφρά υψηλότερη στο 3,5-3,8 g/L και τέλος το χρώμα είναι ελαφρά πιο σκούρο κατά ~1 μονάδα EBC στο 10,9-15,8 EBC. Έτσι λοιπόν δεν παρατηρούνται και πάλι σημαντικές διαφορές από τις αναλύσεις λόγω της υψηλότερης αρχικής ποσότητας εμβολίου κατά 0,5 g/L πάρα μόνο στην οξύτητα της μπίρας που μπορεί να είναι σημαντική λεπτομέρεια για κάποιες παράγωγες με το συγκεκριμένο στέλεχος.



Διάγραμμα 10 : Σύγκριση παραγόμενης αλκοόλης για τις ζυμώσεις σειρές A και B από το όργανο Anton paar (Alc %vol Anton) μπλε ράβδος και υπολογιζόμενης αλκοόλης (Alcohol % Vol calculated) κόκκινη ράβδος με βάση τον τύπο.

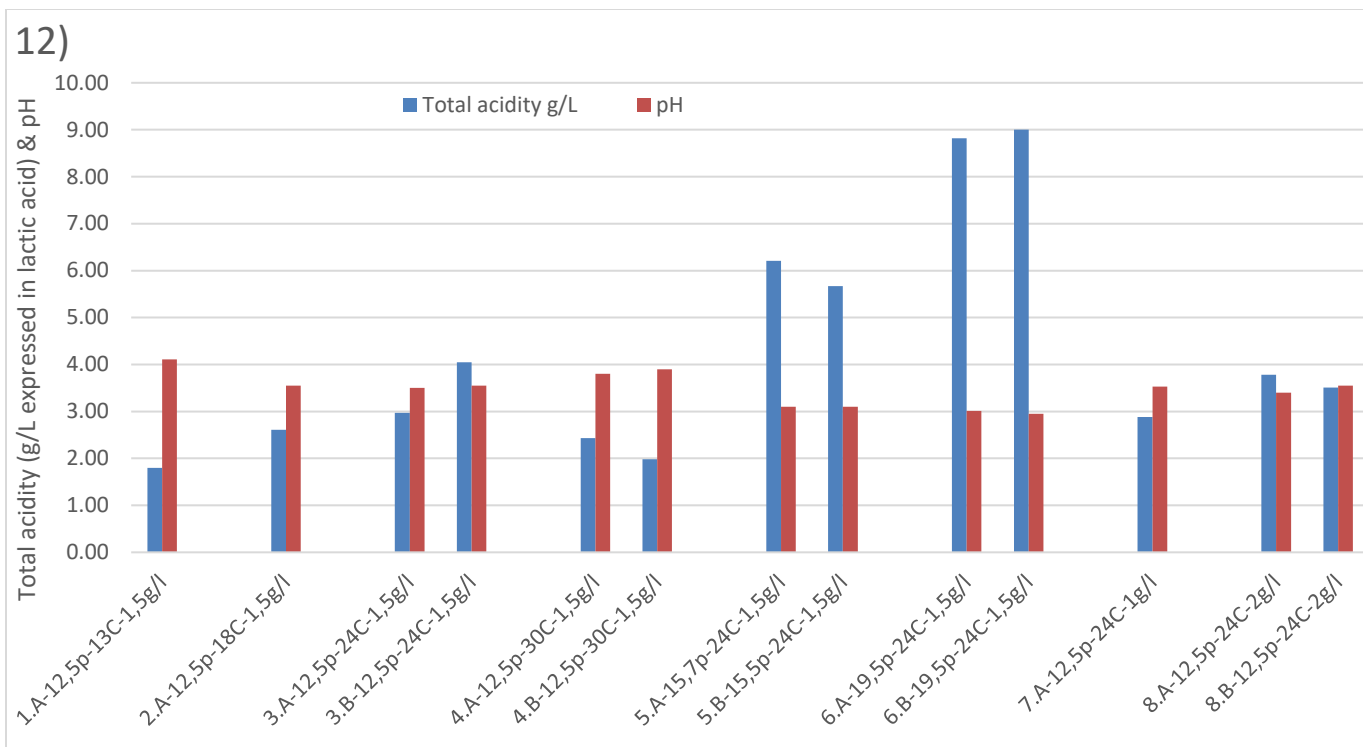
Στο Διάγραμμα 10 παρατηρείται ότι δεν υπάρχει μεγάλη απόκλιση μεταξύ της θεωρητικής τιμής της αλκοόλης σύμφωνα με τον τύπο και από τις τιμές του οργάνου (Alex500). Σε όλες τις τιμές φαίνεται ότι η υπολογιζόμενη αλκοόλη με τον τύπο είχε μικρότερες τιμές εκτός από την 6A (19,5 °P). Την μεγαλύτερη απόκλιση > 0,2 φαίνεται να την είχε στα δείγματα 2A (18 °C) και 8B (2 g/l) που για την δεύτερη είχε σχολιαστεί και παραπάνω ότι η μέτρηση με το όργανο είχε πιθανό σφάλμα.

11)



Διάγραμμα 11 : Σύγκριση φαινομενικού βαθμού ζύμωσης (Apparent degree of fermentation) μπλε ράβδος και απόδοσης αλκοόλης (Alcohol Yield %vol/ °P_{fermented} %) κόκκινη ράβδος για τις ζυμώσεις σειρές A και B. Ο φαινομενικός βαθμός ζύμωσης υπολογίστηκε με τις τιμές από τις μετρήσεις με το ψηφιακό πυκνόμετρο.

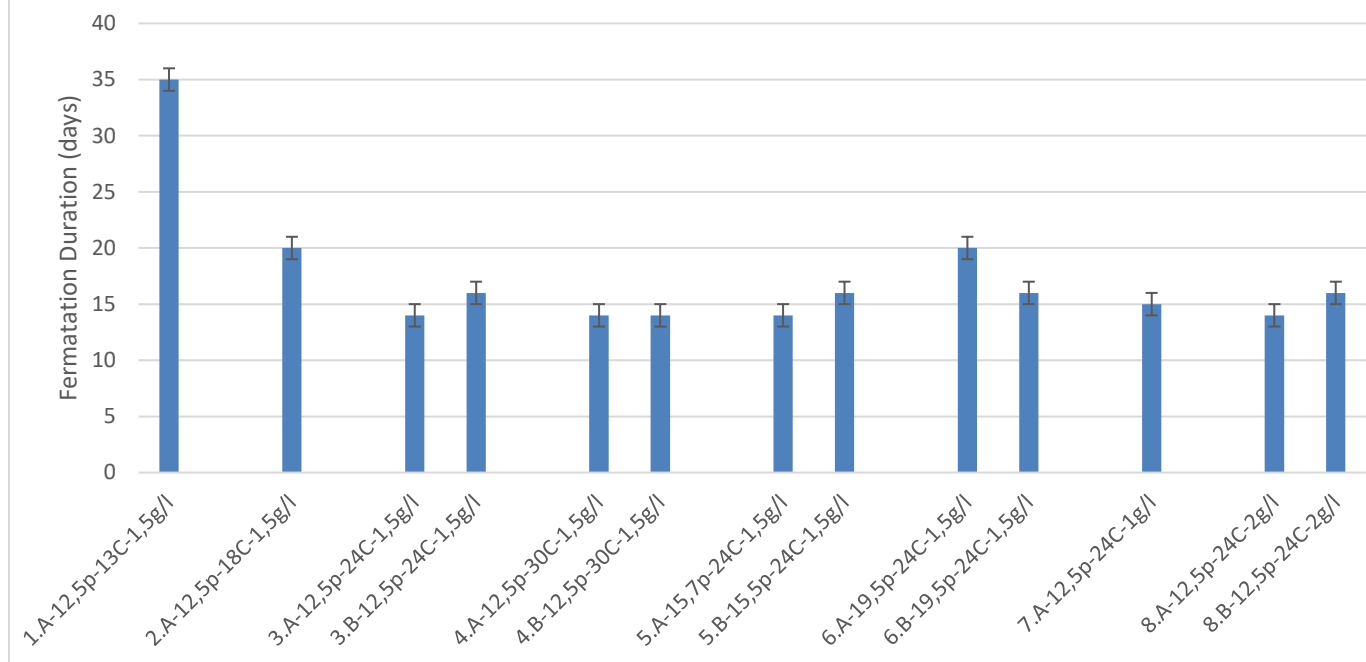
Στο διάγραμμα 11 παρατηρείται ότι τα δείγματα με αρχική πυκνότητα 12,5 είχαν παρόμοια απόδοση αλκοόλης αντίθετα με τα δείγματα με υψηλότερες αρχικές πυκνότητες που φαίνεται ότι όσο μεγαλύτερη ήταν η τιμή της αρχικής πυκνότητας τόσο υψηλότερη ήταν και η απόδοση σε αλκοόλη. Πιο συγκεκριμένα φαίνεται ότι υπάρχει μια αύξηση κατά ~7-10% στον φαινομενικό βαθμό ζύμωσης σε όλα τα δείγματα με τιμές αρχικής πυκνότητας >12,5 και αύξηση στην παραγόμενη αλκοόλη κατά ~2% παραπάνω στα δείγματα με αρχική πυκνότητα ~16 °P (5A, 5B) και ~4% στα δείγματα με 19,5 °P (6A, 6B) σε σύγκριση με αυτά με 12,5 °P. Τέλος την χαμηλότερη απόδοση σε αλκοόλη φαίνεται να έχει το δείγμα 1A (13 °C) που είναι λογικό λόγω του στρες των χαμηλών θερμοκρασιών πάρα το πολύ υψηλό βαθμό ζύμωσης που παρουσιάζει.



Διάγραμμα 12 : Σύγκριση ολικής οξύτητας (Total acidity g/l expressed in lactic acid) μπλε ράβδοι και τελικών τιμών pH κόκκινες ράβδοι για τις ζυμώσεις σειρές A και B

Στο διάγραμμα 12 διακρίνεται ότι στα ίδια δείγματα οι οξύτητες διαφέρουν περισσότερο μεταξύ τους απ' ότι διαφέρουν οι τιμές του pH. Γενικά παρατηρείται ότι όσο αυξάνεται η θερμοκρασία (13 -> 30 °C) αυξάνεται η οξύτητα και μειώνεται η τιμή του pH. Επίσης όπως σχολιάστηκε και παραπάνω όσο αυξάνεται η αρχική πυκνότητα ιδίως με γλυκόζη τόσο αυξάνεται η οξύτητα και μειώνεται η τελική τιμή του pH (5A, 5B, 6A, 6B). Τέλος στα διαφορετικά pitching rate (7A, 8A, 8B) δεν φαίνεται κάποια σημαντική διαφορά στα pH αλλά υπάρχουν κάποιες μικρές διαφορές στην οξύτητα (οι οποίες όμως δεν δείχνουν σε κάποια συγκεκριμένη τάση, ιδίως και λόγω των διαφορών στις επαναλήψεις)

13)



Διάγραμμα 13 : Σύγκριση χρόνων ζύμωσης για όλες τις σειρές ζυμώσεων A και B. Τυπική απόκλιση (+/- 1).

Στο Διάγραμμα 13 παρατηρείται ευκολά ότι σε θερμοκρασίες κάτω των 24 °C και ιδιαίτερα στους 13 °C παρατηρείται μεγάλη αύξηση του χρόνου ζύμωσης ενώ για θερμοκρασίες άνω των 24 °C και για τις υπόλοιπες περιπτώσεις δεν παρατηρείται κάποια σημαντική διαφορά.

Σαν αποτέλεσμα φαίνεται ότι την μεγαλύτερη απόδοση στην ζύμωση την είχαν τα δείγματα σε θερμοκρασία 13 °C (1A) και το δείγμα με 19,5 °P (6A, 6B) και τις χαμηλότερες με μικρή διαφορά από το Control (3A, 3B) κατά 1-2% σε υψηλότερα και χαμηλότερα pitching rate (8A, 8B, 7A). Την υψηλότερη αλκοόλη είχαν και πάλι τα δείγματα με υψηλές αρχικές πυκνότητες (°P) (5A, 5B, 6A, 6B) αλλά φαίνεται ότι παρουσίαζαν τις υψηλότερες οξύτητες καθώς και τα χαμηλότερα pH. Τέλος το πιο σκούρο χρώμα φαίνεται ότι το είχε το δείγμα στους 13 °C μην λαμβάνοντας υπόψιν τις ζυμώσεις της σειράς B λόγω πιθανής οξειδωσης.

3.2 Αποτελέσματα GC-MS και σχολιασμός

Από τα αποτελέσματα της ανάλυσης με GC-MS βρέθηκαν ~200 ενώσεις σε κάθε δείγμα 3A (12 °P), 5A (16°P), 6A (20°P). Από αυτές επιλέχθηκαν 39 με βάση παρόμοιες μελέτες στην *L. thermotolerans* (Zdaniewicz et al., 2020), (Postigo et al., 2023), (Canonico et al., 2019), (Svendsen, 2016) και με την βάση δεδομένων στις αρωματικές ενώσεις της μπύρας του ASBC (Beer Flavor Database) και παρουσιάζονται στον πίνακα 6. Από αυτές θα σχολιαστούν όσες έχουν Flavor units (concentration/threshold >1) που σημαίνει ότι είναι άνω του κατωτάτου ορίου ανίχνευσης και επηρεάζουν το άρωμα της μπύρας. Τα όρια ανιχνεύσεις επιλέχθηκαν και πάλι από το ASBC Beer Flavor Database (Th1).

Αρχικά ανιχνεύθηκε 2 φαινυλαιθανόλη (phenylethyl alcohol) και στα τρία δείγματα σε παρόμοιες ποσότητες και πολύ ανώτερες του κατωτάτου ορίου αντίληψης, η οποία δίνει αρώματα ηπία και ζεστά, με οσμή που μοιάζει με μέλι λουλουδία και τριαντάφυλλο. Που δείχνει ότι αυτή η ζύμη σε όλες τις συνθήκες θα συνθέσει αυτά τα αρωματικά τα οποία θα είναι έντονα στο τελικό προϊόν Παρομοίως βρέθηκε οξικός φαινυλαιθυλεστέρας (phenylethyl acetate) που δίνει αρώματα πολύ γλυκά, σαν μέλι, φρουτώδεις νότες κυρίως ροδάκινου και αρώματα γαρδένιας. η συγκεκριμένη ένωση ανιχνεύθηκε κυρίως στο δείγμα 3A (12 °P) και μια πολύ μικρή ποσότητα του οξικού φαινυλαιθυλεστέρα στο δείγμα 6A (19,5 °P), που σημαίνει ότι όταν η ζύμη πιθανά βρίσκεται υπό συνθήκες στρες (όπως υψηλότερες αρχικές πυκνότητες) πιθανά δεν παράγει το συγκεκριμένο αρωματικό ή αν παράγεται μετατρέπεται σε άλλο ή παρασύρεται από το διοξείδιο. Επίσης ανιχνευθήκαν, ποσότητες φουρανεόλης (Furaneol) με αρώματα καβουρδισμένης ζάχαρης και καραμέλας, η οποία επειδή βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις μπορεί να έχει και κάποια αρώματα φρούτων αλλά και βανιλίνη (vanillin), που δίνει αρώματα έντονα γλυκά, πολύ κρεμώδη και το χαρακτηριστικό άρωμα βανίλιας. Και οι δυο παραπάνω ενώσεις πιθανά δημιουργούνται κυρίως κατά την πολυτοποίηση/βρασμό όταν λαμβάνουν χώρα οι αντιδράσεις Maillard. Οι συγκεκριμένες εμφανίζονται κυρίως στο δείγμα 3A (12 °P), που δείχνει ότι η αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης πιθανά επηρέασε και αυτές τις ενώσεις ή παρασύρθηκε από το διοξείδιο. Σε παρόμοιες συγκεντρώσεις και για τρία δείγματα βρέθηκε η 4-βινυλ-γουαϊκόλη (4-vinyl guaiacol) με αρώματα βανίλιας, καπνιστού, ξύλου και βάλαμου η οποία είναι χαρακτηριστική ένωση ζύμωσης. Να σημειωθεί ότι, βρέθηκε μαλτόλη (maltol) που δίνει αρώματα καραμέλας, βύνης και ψωμιού σε όλα τα δείγματα αλλά μόνο στο δείγμα 6A (20°P) ήταν σε συγκέντρωση άνω του ορίου ανίχνευσης. Τέλος, βρέθηκε λιναλοόλη (linalool) με αρώματα ελαφριά λουλουδένιο ξυλώδες με ελαφριά εσπεριδοειδή νότα και η γερανιόλη (geraniol) με αρώματα ρόδου, γερανιού και άλλων λουλουδιών που βρίσκονται κυρίως στον λυκίσκο. Να σημειωθεί ότι η γερανιόλη βρέθηκε σε παρόμοιες ποσότητες και άνω του ορίου αντίληψης ενώ η λιναλοόλη βρέθηκε σε πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις στο 3A (12 °P) και μειώθηκε περίπου στο μισό στο 5A (16°P) και στο 1/3 της συγκέντρωσης του 3A (12 °P) στο 6A (20°P) αν και πάλι ήταν σε αρκετά υψηλή συγκέντρωση.

Τελικά φαίνεται ότι οι διαφορετικές αρχικές πυκνότητες επηρεάζουν την παραγωγή συγκεκριμένων θετικών ενώσεων στην μπύρα και ότι η *L. thermotolerans* αντιδρά διαφορετικά όσο αυξάνεται η αρχική πυκνότητα. Χαρακτηριστικό ήταν ότι στις υψηλές συγκεντρώσεις όπως στο δείγμα 6A (20°P) παρήχθησαν μικρότερες ποσότητες θετικών αρωματικών ενώσεων σε σύγκριση με τις χαμηλότερες 3A (12 °P). Πιθανά οι μικρότερες ποσότητες στα δείγματα να προκύπτουν λόγω ταχύτητας/διάρκειας ζύμωσης και έντασης/ποσότητας έκλυσης διοξειδίου του άνθρακα (εξάτμιση) ή προσρόφησης στα κύτταρα ή οξειδωσης, το οποίο πρέπει να ελεγχθεί με εξέταση παραπάνω δειγμάτων.

Πίνακας 6 : Οι συγκεντρώσεις mg/L των σημαντικότερων ενώσεων που επιλέχθηκαν από τα δείγματα 3A (12 °P), 5A (16°P), 6A (20°P). Τα όρια ανίχνευσης (threshold) επιλέχθηκαν από την βάση δεδομένων του ASBC Beer Flavor Database (Th1) (<https://www.asbcnet.org/Methods/SensoryAnalysis/pages/default.aspx>).

Compound Name	Synonym	12 °P Conc. mg/L	16 °P Conc. mg/L	20 °P Conc. mg/L	Threshold in beer Min. concentration mg/L	Flavor Units 12 °P	Flavor Units 16 °P	Flavor Units 20 °P	Description	Classification
9-Decenoic acid		0,26	0,14	0,03						Acid
Benzeneacetic acid	Phenylacetic acid	0,49	0,15	0,17	2,5	0,19	0,06	0,07	Honey, roses, sweet	Acid
Butanoic acid		0,05		0,02	1,19	0,04	0,00	0,02		Acid
Dodecanoic acid	Lauric acid	0,07	0,07	0,04	0,5	0,14	0,13	0,08	Soapy, waxy, caprilic	Acid
Heptanoic acid		0,04	0,05							Acid
Hexanoic acid	Caproic acid	0,46	0,46		8	0,06	0,06	0,00	Goaty, fatty acid	Acid
n-Decanoic acid	Capric acid	0,31	0,40	0,09	10	0,03	0,04	0,01	Waxy, tallowy, soapy	Acid
n-Hexadecanoic acid	Hexadecanoic acid	1,87	2,72	0,40						Acid
Octanoic acid	Caprylic acid	0,99	0,89		13	0,08	0,07	0,00	Caprylic, goaty, fatty acid	Acid
Pentanoic acid		0,01			4,5	0,00	0,00	0,00	Cheesy	Acid
Propanoic acid, 2-methyl-	2-Methylpropanoic acid	0,22	0,37	6,93	30	0,01	0,01	0,23	Sweaty, bitter, sour	Acid
1-Hexanol		0,02	0,03							Alcohol
1-Pentanol	n-Pentanol	10,18		18,78	50	0,20	0,00	0,38	Medicinal	Alcohol
2,7-Octadiene-1,6-diol, 2,6-dimethyl-	8-Hydroxylinalool	0,04	0,04	0,02					Honey, citrus, dill	Alcohol
2-Butanol, 1-methoxy-	Tyrosol	0,01	0,02	0,02	20	0,00	0,00	0,00	Bitter, Sour, old fruit	Alcohol
Benzeneethanol, 4-hydroxy-	Tyrosol	1,04	1,68	0,61	20	0,05	0,08	0,03	Bitter, sour, pepper	Alcohol
Benzyl alcohol		0,02	0,05	0,05	900	0,00	0,00	0,00	Almonds bitter	Alcohol
L- α -Terpineol				0,05	0,33	0,00	0,00	0,16	Pine, floral, woody	Alcohol
Phenylethyl Alcohol	2-Phenylethanol	11,23	16,43	13,72	0,04	280,68	410,65	343,00	Alcohol, flowery, roses	Alcohol
1-Butanol			0,05	0,08	450	0,00	0,00	0,00		Alcohol
Tryptophol		2,60	9,12	5,45	10	0,26	0,91	0,55	Almonds, solvent,	Alcohol
Vanillin		0,06			0,03	1,89	0,00	0,00	Vanilla, sweet	Aldehyde
Acetic acid, 2-phenylethyl ester	Phenylethyl acetate	0,31		0,05	0,2	1,57	0,00	0,26	Roses, honey	Ester
Decanoic acid, ethyl ester	Ethyl decanoate	0,03	0,12	0,04						Ester
Hexadecanoic acid, ethyl ester	Ethyl hexadecanoate		0,11	0,02						Ester
Hexanoic acid, ethyl ester	Ethyl caproate, Ethyl hexanoate	0,05	0,09	1,38	0,02				Fruity, Rum, Apple	Ester
Octadecanoic acid, ethyl ester	Ethyl stearate	0,02	0,09	0,85	2	0,01	0,04	0,42	Fatty Acid	Ester
Octanoic acid, ethyl ester	Ethyl caprylate	0,05	0,05		0,3	0,17	0,15		Apple, sweet, fruity	Ester
Ethanone, 1-(2-furanyl)-	2-Acetylfuran	0,02	0,02	0,10	80	0,00	0,00	0,00	Almonds, rubber	Furane
Furaneol	2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanon	0,23	0,07	0,10	0,16	1,47	0,44	0,65	Sweet, caramel	Furane
Cyclopentanone			0,02		200	0,00	0,00	0,00	Almond, sweet, ethyl ether	Hydrocarbon
3-Octanone		0,02	0,03	0,02					Spicy	Ketone
2-Methoxy-4-vinylphenol	4-Vinylguaiacol	0,57	0,30	0,16	0,05	11,41	6,09	3,16	Spicy, vanilla, smoke	Phenol
5-Hydroxymethylfurfural			0,16	0,06						Phenol
Maltol		0,13	0,03	0,40	0,3	0,45	0,09	1,34	Caramel, malty	Pyrazol
1-Propanol, 3-(methylthio)-	Methionol	0,30	1,02	0,72	20	0,02	0,05	0,04	Raw potato	Sulfuric
Geraniol		0,02	0,01	0,02	0,01	1,77	1,38	2,00	Floral, citrus, rose-like	Terpene
Linalool		0,07	0,04	0,03	0,0001	704,09	446,01	273,77	Citrus, floral	Terpene
4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-		0,22	0,11	0,07						Others

4. Συμπεράσματα

Με την ολοκλήρωση των πειραμάτων για το στέλεχος *L. thermotolerans* (Philly sour της Lallemand) σε διάφορες συνθήκες βγήκαν τα εξής συμπεράσματα. Από το πρώτο πείραμα με το όργανο Bioscreen C, η *L. thermotolerans* σε ζύμωση με διαφορετικά υποστρώματα σακχάρων επέδειξε ικανότητα ζύμωσης και ανάπτυξη σε όλα τα σάκχαρα (γλυκόζη, φρουκτόζη, σακχαρόζη, μαλτόζη και μείγμα τους) με μέγιστη ανάπτυξη στην γλυκόζη φρουκτόζη και σακχαρόζη, ελαφρώς μειωμένη ανάπτυξη στην μαλτόζη και στο μείγμα σακχάρων, με ελάχιστη ικανότητα ζύμωσης στην μαλτοτριόζη και καθόλου ανάπτυξη στην λακτόζη. Ακόμα έδειξε να μην επηρεάζεται ιδιαίτερα από τις διαφορετικές αρχικές τιμές pH (5.5, 5, 4.5, 4, 3.5,) εκτός από την τιμή 3 pH στην οποία έδειξε μια χαμηλότερη ανάπτυξη. Επίσης βρέθηκε ότι δεν επηρεάζεται ιδιαίτερα από τις διαφορετικές τιμές IBU (0, 25, 50, 75, 100. Σε σύγκριση με τον *S cerevisiae* η *L. thermotolerans* έδειξε ότι μπορεί να αναπτυχθεί επιτυχώς στις ίδιες συνθήκες εκτός από την μαλτοτριόζη.

Στην δεύτερη σειρά πειραμάτων η *L. thermotolerans* έδειξε ικανότητα ζύμωσης σε όλες τις διαφορετικές θερμοκρασίες 13, 18, 24 και 30 °C, με πιο αργές ζυμώσεις (35 μέρες) σε χαμηλές θερμοκρασίες (13 °C) σε σύγκριση με τον κανονικό χρόνο ζύμωσης στους 24 °C (10-12 μέρες), αλλά πιο υψηλές αποδόσεις (%vol) και βαθμό ζύμωσης σε σύγκριση με τις άλλες θερμοκρασίες. Επίσης έδειξε φυσιολογική και παρόμοια ικανότητα ζύμωσης σε όλες τις διαφορετικές αρχικές πυκνότητες 12.5, ~15.5, 19.5 °P αλλά με πιο γρήγορη (στις 2 μέρες και) σημαντική μείωση στο τελικό pH (~3.0), αύξηση του τελικού αλκοολικού βαθμού, μεγάλη αύξηση οξύτητας, πιο γρήγορες ζυμώσεις, και απώλεια ή μείωση των συγκεντρώσεων κάποιων θετικών αρωματικών (όπως βανιλίνη, λιναλοόλη, 2-φαινυλαιθανόλη, φουρανεόλη κ.α.) με την αύξηση της αρχικής πυκνότητας με τη προσθήκη γλυκόζης. Δεν υπήρξε μεγάλη διαφορά στις ζυμώσεις με διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις εμβολίου (pitching rate) 1, 1.5, 2 g/L με παρόμοια αποτελέσματα στις αποδόσεις σε αλκοόλη και ελάχιστα πιο γρήγορη ζύμωση (~1-2 μέρες) όσο αυξάνεται η ποσότητα του. Το χρώμα έδειξε να επηρεάζεται ελάχιστα από την θερμοκρασία, δηλαδή βρέθηκε κατά 2 EBC πιο σκούρο σε χαμηλότερες θερμοκρασίες ενώ η θολερότητα δεν επηρεάστηκε. Σαν οργανοληπτικές ενδείξεις φάνηκε μεγάλη ποικιλομορφία στα αρώματα ανάλογα με την κάθε συνθήκη ζύμωσης με πιο βαρύ αρωματικό χαρακτήρα στις υψηλότερες, θερμοκρασίες, συγκέντρωση εμβολίου και αρχικές πυκνότητες. Στις υψηλότερες πυκνότητες η όξινη γεύση ήταν συγκρίσιμη με ξινούς ζύθους του εμπορίου.

Φαίνεται ότι η *L. thermotolerans* που χρησιμοποιήθηκε είναι ένα στέλεχος το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην παραγωγή ξινού ζύθου και σε αρκετά μεγάλο φάσμα διαφορετικών συνθηκών ζύμωσης, με καλές αποδόσεις σε αλκοόλη και με εμφάνιση θετικών οργανοληπτικών χαρακτηριστικών. Η *L. thermotolerans* που χρησιμοποιήθηκε δείχνει ότι είναι ένα ευέλικτο στέλεχος χρήσιμο για την παραγωγή ξινών ζύθων και παρουσιάζει μεγάλη ποικιλομορφία στα αποτελέσματα της ανάλογα με την συνθήκη ζύμωσης, ικανότητα που την κάνει αρκετά επιθυμητή για πειραματισμό και δημιουργία καινούργιων προϊόντων.

Σε επόμενες μελέτες θα ήταν χρήσιμο να διερευνηθεί η σύγκριση της αύξησης της αρχικής πυκνότητας με γλυκόζη και με κανονικό γλεύκος, διαφορετικές συνθήκες ωρίμανσης και μείωση του διακετυλίου/ακεταλδεϋδης. Επίσης θα πρέπει να μελετηθεί η επίδραση του αρχικού διαλυμένου οξυγόνου του γλεύκους, της πίεσης κατά τη ζύμωση, οι απαιτήσεις σε άζωτο και η μελέτη της κινητικής

παραγωγής των οξέων. Ακόμα θα ήταν χρήσιμο η δοκιμή της σε διαφορετικά στυλ ζύθου και η σύγκριση ξινών ζύθων με άλλες ζυμώσεις και τρόπους παραγωγής, όπως με τη χρήση βακτηρίων. Τέλος σημαντικό θα είναι να γίνει ποιο αναλυτική σύγκριση των αρωματικών και οργανοληπτικών χαρακτηριστικών για όλα τα παραπάνω.

5. Βιβλιογραφία

- ASBC Methods of Analysis, online. 2021. American Society of Brewing Chemists, St. Paul, MN, American Society of Brewing Chemists. <https://www.asbcnet.org/Methods/Pages/default.aspx>
- Bamforth, C. (2003) Wort composition and beer quality, in *Brewing Yeast Fermentation Performance*, (Smart, K. Ed.) pp. 75–85, Blackwell Science, Oxford
- Banilas G, Sgouros G, Nisiotou A. Development of microsatellite markers for *Lachancea thermotolerans* typing and population structure of wine-associated isolates. *Microbiological Research*. 2016. December; 31; 193:1–10. doi: 10.1016/j.micres.2016.08.010
- Barth, R. 2013. *The chemistry of beer: The science in the suds*. John Wiley & Sons, Inc.
- Basso, R. F., Alcarde, A. R. & Barbosa, C., 2016. Could non-Saccharomyces yeasts contribute on innovative brewing fermentations. *Food Research International* V.86, 8, pp. 112-120.
- Bellut, Konstantin & Michel, Maximilian & Zarnkow, Martin & Hutzler, Mathias & Jacob, Fritz & De Schutter, David & Daenen, Luk & Lynch, Kieran & Zannini, Emanuele & Arendt, Elke. (2018). Application of Non-Saccharomyces Yeasts Isolated from Kombucha in the Production of Alcohol-Free Beer. *Fermentation*. 4. 66. 10.3390/fermentation4030066.
- Beltran, G., Rozès, N., Mas, A., & Guillamón, J. M. (2006). Effect of low-temperature fermentation on yeast nitrogen metabolism. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(6), 809–815. doi:10.1007/s11274-006-9302-6
- Beltran, Gemma & Novo, Maite & Guillamon, Jose & Mas, Albert & Rozès, Nicolas. (2008). Effect of fermentation temperature and culture media on the yeast lipid composition and wine volatile compounds. *International journal of food microbiology*. 121. 169-77. 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.030.
- Benito, Santiago. (2018). The impact of *Torulaspota delbrueckii* yeast in winemaking. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 102. 3081-3094. 10.1007/s00253-018-8849-0.
- Bokulich NA, Bamforth CW, Mills DA. 2012. Brewhouse -resident microbiota are responsible for multi -stage fermentation of American Coolship Ale. *PLoS ONE* 535 7:e35507
- Boone C. Yeast systems biology: our best shot at modeling a cell. *Genetics*. 2014. October; 198(2):435–7. doi: 10.1534/genetics.114.169128
- Bossaert S, Crauwels S, De Rouck G, Lievens B. 2019. The Power of Sour - A Review: Old Traditions, New Opportunities. *BrewingScience* 72:78 -88.
- Boulton, C., & Quain, D. (2001). *Brewing yeast and fermentation*. Oxford: Blackwell Science. 7. Ivorra, C., Pere

Brice Claire, Francisco A. Cubillos, Sylvie Dequin, Carole Camarasa ,Claudio Martínez. Adaptability of the *Saccharomyces cerevisiae* yeasts to wine fermentation conditions relies on their strong ability to consume nitrogen Published: February 12, 2018 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192383>

Bryant, Nichole. (2019). The effect of alcohol and bitterness levels on brewing yeast viability. Master of Science in Agriculture, Specialization in Food Science and Nutrition. A Thesis presented to the Faculty of California Polytechnic State University, San Luis Obispo.

Canonico Laura, Alice Agarbati, Francesca Comitini, Maurizio Ciani, *Torulaspota delbrueckii* in the brewing process: A new approach to enhance bioflavour and to reduce ethanol content, *Food Microbiology*, Volume 56, 2016, Pages 45-51, ISSN 0740-0020, <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.12.005>.

Canonico, L., Agarbati, A., Comitini, F. & Ciani, M., 2015. *Torulaspota delbrueckii* in the brewing process: A new approach to enhance bioflavour and to reduce ethanol content. *FOOD MICROBIOLOGY*, 21 12, pp. 45-51.

Canonico L, Galli E, Ciani E, Comitini F, Ciani M. Exploitation of Three Non-Conventional Yeast Species in the Brewing Process. *Microorganisms*. 2019 Jan 8;7(1):11. doi: 10.3390/microorganisms7010011. PMID: 30626108; PMCID: PMC6351989.

Christopher J. Murakami, Christopher R. Burtner, Brian K. Kennedy, Matt Kaeberlein, A Method for High-Throughput Quantitative Analysis of Yeast Chronological Life Span, *The Journals of Gerontology: Series A*, Volume 63, Issue 2, February 2008, Pages 113–121, <https://doi.org/10.1093/gerona/63.2.113>

Ciani M, Beco L, Comitini F. Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. *Int J Food Microbiol*. 2006 Apr 25; 108(2):239-45. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.11.012. Epub 2006 Feb 17. PMID: 16487611.

Ciani, M. Comitini, F. Oro, L. (2014). 'Antimicrobial activity of *Metschnikowia pulcherrima* on wine yeasts'. *Journal of Applied microbiology*,(116),pp.1209-1217.

Colomer Marc Serra , Birgitte Funch, Jochen Forster, The raise of *Brettanomyces* yeast species for beer production, *Current Opinion in Biotechnology*, Volume 56, 2019 Pages 30-35,ISSN 0958-1669,<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.07.009>.

(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166918300922>)

Comitini, F.; Gobbi, M.; Domizio, P.; Romani, C.; Lencioni, L.; Mannazzu, I.; Ciani, M. Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol*. 2011, 28, 873–882.

Contreras A., Angela & Hidalgo, Claudio & Schmidt, Simon & Henschke, P.A. & Curtin, Chris & Varela, Cristian. (2015). The application of non-*Saccharomyces* yeast in fermentations with limited aeration as a strategy for the production of wine with reduced alcohol content. *International journal of food microbiology*. 205. 7-15. 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.027.

- Crumplen, R. M., Crumplen, C. M., D'Amore, T., Goring, T. E., McKee, R. A., & Stewart, G. G. (1990). *Lactose Fermentation and the Possible Use of Whey as an Adjunct in Beer Production*. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 48(3), 95–99. doi:10.1094/asbcj-48-009
- D'Amore, Tony & Russell, Inge & Stewart, Graham. (1989). Sugar utilization by yeast during fermentation. *J. Ind. Microbiol.* 4. 315-323. 10.1007/BF01577355.
- Day, R. E., Rogers, P. J., Dawes, I. W., & Higgins, V. J. (2002). Molecular analysis of maltotriose transport and utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and environmental microbiology*, 68(11), 5326–5335. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.11.5326-5335.2002>
- Dequin S, Barre P. Mixed lactic acid–alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* expressing the *Lactobacillus casei* L (+)–LDH. *Nature Biotechnology*. 1994. February; 12(2):173–7. [PubMed] [Google Scholar]
- De Roos, J., & De Vuyst, L. (2018). Microbial acidification, alcoholization, and aroma production during spontaneous lambic beer production. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. doi:10.1002/jsfa.9291
- Drosou, Fotini & Anastasakou, Katerina & Tataridis, Panagiotis & Dourtoglou, Vassilis & Oreopoulou, Vasso. (2022). Evaluation of Commercial Strains of *Torulaspora delbrueckii* in Beer Production. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 1-10. 10.1080/03610470.2021.2025327.
- Domingues, L., Guimarães, P. M., & Oliveira, C. (2010). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for lactose/whey fermentation. *Bioengineered bugs*, 1(3), 164–171. <https://doi.org/10.4161/bbug.1.3.10619>
- Domizio, P., House, J. F., Joseph, C. M. L., Bisson, L. F., and Bamforth, C. W. (2016) *Lachancea thermotolerans* as an alternative yeast for the production of beer. *J. Inst. Brew.*, 122: 599–604. doi: 10.1002/jib.362.
- Dourtoglou, V.; Antonopoulos, A.; Dourtoglou, T.; Lalas, S. Discrimination of Varietal Wines according to Their Volatiles. *Food Chem.* 2014, 159, 181–187. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.03.032.
- Dufour, J. P., and Devreux, A. The use of amino acids analysis as a tool to control malting and brewing processes. *Eur. Brew. Conv. Monogr.* 11:227-249, 1986.
- Duina AA, Miller ME, Keeney JB. Budding yeast for budding geneticists: a primer on the *Saccharomyces cerevisiae* model system. *Genetics*. 2014;197(1):33–48. doi:10.1534/genetics.114.163188
- Dysvik, A., La Rosa, S. L., De Rouck, G., Rukke, E.-O., Westereng, B., & Wicklund, T. (2020). *Microbial dynamics in traditional and modern sour beer production*. *Applied and Environmental Microbiology*. doi:10.1128/aem.00566-20
- Edelen, C., Miller, J., and Patino, H. (1996) Effects of yeast pitch rates on fermentation performance and beer quality. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* 1, 30–32

Edgerton, J. 2005. The impact of bitterness on the viability of harvested yeast. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 63(1):28-30.

Erin S. C. O'Connor-Cox & W. M. (Mike) Ingledew (1989) Wort Nitrogenous Sources—Their Use by Brewing Yeasts: A Review, *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 47:4, 102-108, DOI: 10.1094/ASBCJ-47-0102

Ernandes, J.R., Williams, J.W., Russell, I. and Stewart, G.G. (1993), Effect Of Yeast Adaptation To Maltose Utilization On Sugar Uptake During The Fermentation Of Brewer's Wort. *Journal of the Institute of Brewing*, 99: 67-71. doi:10.1002/j.2050-0416.1993.tb01149.x

Erten, H., Tanguler, H., and Cakiroz, H. (2007) The effect of pitching rate on fermentation and flavour compounds in high gravity brewing. *J. Inst. Brew.* 113, 75–79.

Freel KC, Friedrich A, Hou J, Schacherer J. Population genomic analysis reveals highly conserved mitochondrial genomes in the yeast species *Lachancea thermotolerans*. *Genome biology and evolution*. 2014. October; 6(10):2586–94. doi: 10.1093/gbe/evu203 [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]

Gamero, A., Katz, M., Gojkovic, Z., and de Jong, C. (2015) Yeast biodiversity as a tool for flavour improvement or diversification in beer, in *Proceedings of the European Brewers Convention Congress*,

García, Margarita & Esteve-Zarzoso, Braulio & Arroyo, Teresa. (2016). Non-Saccharomyces Yeasts: Biotechnological Role for Wine Production.

García-Ríos, E., Morard, M., Parts, L. et al. The genetic architecture of low-temperature adaptation in the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics* 18, 159 (2017). <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3572-2>

Gibson, B. R., Lawrence, S. J., Leclaire, J. P. R., Powell, C. D., & Smart, K. A. (2007). Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. *FEMS Microbiology Reviews*, 31, 535–569.

Gobbi, M., Comitini, F., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., and Ciani, M. (2013) *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and sequential co-fermentation: A strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine, *Food Microbiol.* 33, 271–281.

González-Royo, E., Pascual, O., Kontoudakis, N. *et al.* Oenological consequences of sequential inoculation with non-*Saccharomyces* yeasts (*Torulasporea delbrueckii* or *Metschnikowia pulcherrima*) and *Saccharomyces cerevisiae* in base wine for sparkling wine production. *Eur Food Res Technol* 240, 999–1012 (2015). <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2404-8>.

González-Royo, E.; Pascual, O.; Kontoudakis, N.; Esteruelas, M.; Esteve-Zarzoso, B.; Mas, A.; Canals, J.M.; Zamora, F. Oenological consequences of sequential inoculation with non-*Saccharomyces* yeasts (*Torulasporea delbrueckii* or *Metschnikowia pulcherrima*) and *Saccharomyces cerevisiae* in base wine for sparkling wine production. *Eur. Food Res. Technol.* 2014, 240, 999–1012.

Hall, Michael L. (1995). Brew By the Numbers — Add Up What's in Your Beer. *Zymurgy*, Summer 1995, vol. 18, no. 2, pp. 54-61

Hazelwood, L.A., Walsh, M.C., Pronk, J.T., Daran, J.M. 2009, Tolerance to hop iso- α -acids in yeast involves vacuolar sequestration, and active transport. *Applied*

Hill Annie E. , In Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, *Brewing Microbiology*, Woodhead Publishing, 2015, Pages xiii-xxiv, ISBN 9781782423317, <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-331-7.09002X>.

Hill, A. (2015) Traditional methods of detection and identification of brewery spoilage organisms, in *Brewing Microbiology: Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising Waste*, Series in Food Science, Technology and Nutrition no. 289, Woodhead, London

Hollatz, Claudia, & Stambuk, Boris Ugarte. (2003). Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* maltose fermentation by cold temperature and CSF1. *Brazilian Journal of Microbiology*, 34(Suppl. 1), 99-101. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822003000500034>

House, Jennifer Frances. *Novel Uses of non-Saccharomyces Yeasts in Brewing* University of California, Davis ProQuest Dissertations Publishing, 2016. 10165797.

Hranilovic A, Bely M, Masneuf-Pomarede I, Jiranek V, Albertin W. The evolution of *Lachancea thermotolerans* is driven by geographical determination, anthropisation and flux between different ecosystems. *PLoS One*. 2017 Sep 14; 12(9):e0184652. doi: 10.1371/journal.pone.0184652. PMID: 28910346; PMCID: PMC5599012

Johnson, J.B.; Portman, D.; Batley, R.; Lal, P.; Bean, D.; Aldred, P.; Naiker, M. Utilisation of Defined Media towards Evaluating Brewing Ale Yeast Fermentation in Small Scale Batches. *Biol. Life Sci. Forum* 2022, 18, 3. <https://doi.org/10.3390/Foods2022-12990>

Jolly NP, Varela C, Pretorius IS. Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Research*. 2014. March; 14(2):215–37. doi: 10.1111/1567-1364.12111 [PubMed] [Google Scholar]

Jolly, N. P., Augustyn, O. P. H., & Pretorius, I. S. (2017). The Role and Use of Non-*Saccharomyces* Yeasts in Wine Production. *South African Journal of Enology & Viticulture*, 27(1). doi:10.21548/27-1-1475

Jones, M., & Pierce, J.S. (1964). Absorption Of Amino Acids From Wort By Yeasts. *Journal of The Institute of Brewing*, 70, 307-315.

Jones, M. O., and Rainbow, C. Simple methods of determining major nitrogenous compounds in worts and beers. *Am. Soc. Brew Chem. Proc.* 1966, pp. 66-70

Kapsopoulou, K., Kapaklis, A., and Spyropoulos, H. (2005) Growth and fermentation characteristics of a strain of the wine yeast *Kluyveromyces thermotolerans* isolated in Greece, *World J Microbiol Biotechnol.* 21(8-9), 1599-1602.

Kennedy, . A. I., Taidi, B., Dolan, J. L. & Hodgs, J. A., 1997. Optimisation of a Fully Defined Medium for Yeast Fermentation. *Food Technology and Biotechnology* 35(4) , pp. 261-265.

- Koivistoinen, O.M., Kuivanen, J., Barth, D. *et al.* Glycolic acid production in the engineered yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis*. *Microb Cell Fact* 12, 82 (2013). <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-82>
- Kucharczyk, K., & Tuszyński, T. (2015). *The effect of pitching rate on fermentation, maturation and flavour compounds of beer produced on an industrial scale*. *Journal of the Institute of Brewing*, 121(3), 349–355. doi:10.1002/jib.242
- Kunze Wolfgang & Manger Hans-Jürgen. *Technology brewing and malting* Technology brewing and malting Edition: 3rd international edition Publisher: VLB Berlin, Berlin, 2004
- Kurtzman (2003) In: Kurtzman C, Fell JW, Boekhout T, editors. *The Yeasts, a taxonomic study*. London, Elsevier; 2011. pp. 511–9.
- Kurtzman, C.P., Fell, J.W. 2006. Yeast systematics and phylogeny - implications of molecular identification methods for studies in ecology. In: Rosa, C.A. and Peter, G., editors. *The Yeast Handbook*. Germany: Springer-Verlag Berlin Herdelberg. p. 11-30.
- Lee, M., and Davis, D. (2000) Fermentation intensification – part III: the effect of increasing yeast biomass concentration on fermentation performance. *BRI Q.* 3, 1–4.
- Lei H, Zhao H, Yu Z, Zhao M. Effects of wort gravity and nitrogen level on fermentation performance of brewer's yeast and the formation of flavor volatiles. *Appl Biochem Biotechnol.* 2012 Mar; 166(6):1562-74. doi: 10.1007/s12010-012-9560-8. Epub 2012 Jan 27. PMID: 22281783.
- Lekkas, C & Stewart, Graham & Hill, Anne & Taidi, Behnam & Hodgson, J. (2005). The Importance of Free Amino Nitrogen in Wort and Beer. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* 42.
- Lekkas, C., Stewart, G. G., Hill, A. E., Taidi, B., & Hodgson, J. (2007). Elucidation of the role of nitrogenous wort components in yeast fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, 113, 3–8
- Liu, X., Jia, B., Sun, X., Ai, J., Wang, L., Wang, C., Huang, W. (2015). *Effect of Initial PH on Growth Characteristics and Fermentation Properties of Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Food Science*, 80(4), M800–M808. doi:10.1111/1750-3841.12813
- Logothetis, S., Nerantzis, E. T., Tataridis, P., Goulioti, A., Kannelis, A. and Walker, G. M. (2014), Alleviation of stuck wine fermentations using salt-preconditioned yeast, *J. Inst. Brew.*, 120: 174– 182. DOI: 10.1002/jib.143
- Magalhães, F., Vidgren, V., Ruohonen, L., & Gibson, B. (2016). *Maltose and maltotriose utilisation by group I strains of the hybrid lager yeast Saccharomyces pastorianus*. *FEMS Yeast Research*, 16(5), fow053. doi:10.1093/femsyr/fow053
- Michel, M., Kopecká, J., Meier-Dörnberg, T., Zarnkow, M., Jacob, F., and Hutzler, M. (2016). Screening for new brewing yeasts in the non-*Saccharomyces* sector with *Torulasporea delbrueckii* as model. *Yeast*, 33: 129– 144. doi: 10.1002/yea.3146.

- Michel, M., Meier-Dörnberg, T., Jacob, F., Methner, F.J., Wagner, R.S., and Hutzler, M. (2016). Review: Pure non-*Saccharomyces* starter cultures for beer fermentation with a focus on secondary metabolites and practical applications. *J. Inst. Brew.*, 122: 569– 587. doi: 10.1002/jib.381.
- Modrzejewska, Katarzyna. Sour beers and problems with its brewing. (2018) <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=PL2019000002>
- Mohammadi, A., Razavi, S. H., Mousavi, S. M., and Rezaei, K. (2011) A comparison between sugar consumption and ethanol production in wort by immobilized *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces ludwigii* and *Saccharomyces rouxii* on brewer's spent grain, *Braz. J. Microbiol.* 42, 605–615.
- Monk, P. R., Hook, D., and Freeman, B. M. Amino acid metabolism by yeast. *Proc. Austr. Wine Ind. Tech. Conf.* 6th, July 1986 (Adelaide). pp. 129-133.
- Mora, J., Barbas, I., Ramis, B., and Mulet, A. (1988) Yeast microflora associated with some Majorcan musts and wines. *American Journal of Enology and Viticulture.* 39, 344-346.
- Moreno-Arribas, M., and Polo, M. (2009) Yeasts and wine flavour, in *Wine chemistry and biochemistry*. Springer, New York.
- Morrison. Rogosa, Mechanism Of The Fermentation Of Lactose By Yeasts, *Journal of Biological Chemistry*, Volume 175, Issue 1, 1948, Pages 413-423, ISSN 0021-9258, [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)57271-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)57271-9).
(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925818572719>)
- Naumova ES, Serpova EV, Naumov GI. Molecular systematics of Lachancea yeasts. *Biochemistry (Moscow)*. 2007. December; 72(12):1356–62.
- Nguyen, T., and Viet Man, L. V. (2009) Using high pitching rate for improvement of yeast fermentation performance in high gravity brewing. *Food Res. Int.* 16, 547–554.
- Nissen, P., Nissen, D. & Arneborg, N., 2003. Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by a cell-cell contact-mediated mechanism.. *US National Library of Medicine National Institutes of Health Yeast.* (4), 20 March, pp. 331-341.
- Noé Arroyo-López F., Sandi Orlić, Amparo Querol, Eladio Barrio, Effects of temperature, pH and sugar concentration on the growth parameters of *Saccharomyces cerevisiae*, *S. kudriavzevii* and their interspecific hybrid, *International Journal of Food Microbiology*, Volume 131, Issues 2–3, 2009, Pages 120-127, ISSN 0168-1605, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.01.035>.
- O'Connor-Cox, E. S. C., & Ingledew, W. M. (1991). Alleviation of the effects of nitrogen limitation in high gravity worts through increased inoculation rates. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 7, 89–96
- Olivares-Marin IK, González-Hernández JC, Regalado-Gonzalez C, Madrigal-Perez LA. *Saccharomyces cerevisiae* Exponential Growth Kinetics in Batch Culture to Analyze Respiratory and

Fermentative Metabolism. J Vis Exp. 2018 Sep 30; (139):58192. doi: 10.3791/58192. PMID: 30320748; PMCID: PMC6235381.

Osburn, K., Amaral, J., Metcalf, S. R., Nickens, D. M., Rogers, C. M., Sausen, C., Bochman, M. L. (2018). Primary souring: A novel bacteria-free method for sour beer production. Food Microbiology, 70, 76–84. doi:10.1016/j.fm.2017.09.007

Pacheco A., Júlia Santos, Susana Chaves, Judite Almeida, Cecília Leão and Maria João Sousa The Emerging Role of the Yeast *Torulaspora delbrueckii* in Bread and Wine Production: Using Genetic Manipulation to Study Molecular Basis of Physiological Responses Submitted: December 8th 2011 Reviewed: April 17th 2012 Published: August 22nd 2012 DOI: 10.5772/46024

Pacheco, Andreia & Santos, Júlia & Chaves, Susana & Almeida, Judite & Sousa, Maria. (2012). The emerging role of the *Torulaspora delbrueckii* in bread and wine production: Using genetic manipulation to study molecular basis of physiological responses.. 10.5772/46024.

Padilla Beatriz, Gil José V., Manzanares Paloma. Past and Future of Non-Saccharomyces Yeasts: From Spoilage Microorganisms to Biotechnological Tools for Improving Wine Aroma Complexity JOURNAL=Frontiers in Microbiology 7, 2016, 411 DOI: 10.3389/fmicb.2016.00411 ISSN=1664-302X

Papazian, C. 2013. The complete joy of homebrewing, fourth edition: Fully revised and updated. William Morrow Paperbacks. New York City, New York

Patel, G. B., and Ingledew, W. M. Internal carbohydrates of *Saccharomyces carlsbergensis* during commercial lager brewing. J. Inst. Brew. 79:392-396, 1973

Peskova Irina, Tatiana Tanashchuk, Elena Ostroukhova, Evgenij Slastya, Svetlana Levchenko, Natalia Lutkova Prospects of using *Lachancea thermotolerans* yeast in winemaking E3S Web Conf. 247 01012 (2021) DOI: 10.1051/e3sconf/202124701012

Pickerel, A. T. W. The influence of free alpha-amino nitrogen in sorghum beer fermentations. J. Inst. Brew. 92:568-571, 1986

Pierce, J. S. The role of nitrogen in brewing. J. Inst. Brew. 93:378- 381, 1987

Postigo, V.; Esteban, S.; Arroyo, T. *Lachancea thermotolerans*, an Innovative Alternative for Sour Beer Production. *Beverages* 2023, 9, 20. <https://doi.org/10.3390/beverages9010020>

Querol A, Pérez-Torrado R, Alonso-Del-Real J, Minebois R, Stribny J, Oliveira BM, Barrio E. New Trends in the Uses of Yeasts in Oenology. *Adv Food Nutr Res.* 2018; 85:177-210. doi: 10.1016/bs.afnr.2018.03.002. Epub 2018 May 16. PMID: 29860974.

Ramírez, M.; Velázquez, R. The Yeast *Torulaspora delbrueckii*: An Interesting But Difficult-To-Use Tool for Winemaking. *Fermentation* 2018, 4, 94

Redón, M., Borrull, A., López, M., Salvadó, Z., Cordero, R., Mas, A., Guillamón, J.M. and Rozès, N. (2012), Effect of low temperature upon vitality of *Saccharomyces cerevisiae* phospholipid mutants. *Yeast*, 29: 443-452. doi:10.1002/yea.2924

Reis VR, Bassi AP, da Silva JC, Ceccato-Antonini SR. Characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts exhibiting rough colonies and pseudohyphal morphology with respect to alcoholic fermentation. *Braz J Microbiol.* 2014; 44(4):1121–1131. Published 2014 Mar 10. doi:10.1590/S1517-83822014005000020

Sakamoto, K., & Konings, W. N. (2003). Beer spoilage bacteria and hop resistance. *International Journal of Food Microbiology*, 89(2-3), 105–124. doi:10.1016/s0168-1605(03)00153-3

Sauer M, Porro D, Mattanovich D, Branduardi P. 16 years research on lactic acid production with yeast—ready for the market. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews.* 2010. January; 27(1):229–56.

Schade Babette, Gregor Jansen, Malcolm Whiteway, Karl D. Entian, and David Y. Thomas
Cold Adaptation in Budding Yeast. Published Online: 13 Oct 2004 <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-03-0167>

Spaepen, M., Vanoevelen, D., and Verachtert, H. (1978) Fatty-acids and esters produced during spontaneous fermentation of Lambic and Gueuze, *J. Inst. Brew.* 84, 278–282.

Svendsen, C.I. (2016). Investigation of *Lachancea thermotolerans* as a Novel, Single Culture Brewing Yeast. <http://www.lib.ncsu.edu/resolver/1840.20/33647>

Tataridis, P., Ks. Mourkou, A. Spaidiotis, E. Nerantzis. 2011. Comparison of cryotolerant wine yeast fermentation kinetics. 9eme Symposium International d'Œnologie de Bordeaux, 15-17 June 2011, Bordeaux, France. II.27, p.158

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.

Tanguler, Hasan. (2013). Influence of Temperatures and Fermentation Behaviour of Mixed Cultures of *Williopsis saturnus* var. *saturnus* and *Saccharomyces cerevisiae* Associated with Winemaking. *Food Science and Technology Research.* 19. 781-793. 10.3136/fstr.19.781.

Tenney, R. I. Whey as a brewing material. II. Influence of galactose on fermentation by brewery yeasts. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 38:74- 76, 1980

Toh, D. W. K., Chua, J. Y., Lu, Y., & Liu, S. Q. (2019). Evaluation of the potential of commercial non-Saccharomyces yeast strains of *Torulaspora delbrueckii* and *Lachancea thermotolerans* in beer fermentation. *International Journal of Food Science & Technology*. doi:10.1111/ijfs.14399

Torija Ma.J. , Nicolas Rozès, Montse Poblet, José Manuel Guillamón, Albert Mas, Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*, *International Journal of Food Microbiology*, Volume 80, Issue 1, 2003,Pages 47-53, ISSN 0168-1605, [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00144-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00144-7)

Torija María Jesús , Gemma Beltran, Maite Novo, Montse Poblet, José Manuel Guillamón, Albert Mas, Nicolas Rozès, Effects of fermentation temperature and *Saccharomyces* species on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine,*International Journal of Food Microbiology*,volume 85, Issues 1–2, 2003,Pages 127-136,ISSN 0168-1605,[https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00506-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00506-8).

Van Oevelen D, Spaepen M, Timmermans P, Verachtert H. 1977. Microbiological aspects of spontaneous wort fermentation in the production of lambic and gueuze. *J Inst 530 Brew* 83:356 -360

Verbelen, P., Dekoninck, T., Saerens, S., Mulders, S., Thevelein, J., and Delvaux, F. (2009) Impact of pitching rate on yeast fermentation performance and beer flavour. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82, 155–167.

Vicente J, Navascués E, Calderón F, Santos A, Marquina D, Benito S. An Integrative View of the Role of *Lachancea thermotolerans* in Wine Technology. *Foods*. 2021 Nov 21;10(11):2878. doi: 10.3390/foods10112878. PMID: 34829158; PMCID: PMC8625220

Waldir Desiderio Estela Escalante Perspectives and Uses of Non-Saccharomyces Yeasts in Fermented Beverages Submitted: May 11th 2018Reviewed: October 4th 2018Published: December 3rd 2018 DOI: 10.5772/intechopen.81868

Wang, D. & Xu, Y. & Hu, J. & Zhao, G. (2004). Fermentation Kinetics of Different Sugars by Apple Wine Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of the Institute of Brewing*. 110. 340-346. 10.1002/j.2050-0416.2004.tb00630.x.

Windholtz, S., Redon, P., Lacampagne, S., Farris, L., Lytra, G., Cameleyre, M., Masneuf-Pomarède, I. (2021). *Non-Saccharomyces yeasts as bioprotection in the composition of red wine and in the reduction of sulfur dioxide*. *LWT*, 149, 111781. doi:10.1016/j.lwt.2021.111781

Witte V, Krohn U, Emeis CC. Characterization of yeasts with high L [+]-lactic acid production: Lactic acid specific soft-agar overlay (LASSO) and TAFE-patterns. *Journal of basic microbiology*. 1989. January; 29(10):707–16.

Zdaniewicz M, Satora P, Pater A, Bogacz S. Low Lactic Acid-Producing Strain of *Lachancea thermotolerans* as a New Starter for Beer Production. *Biomolecules*. 2020 Feb 7; 10(2):256. doi: 10.3390/biom10020256. PMID: 32046171; PMCID: PMC7072388.

