

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ ΑΠΛΩΝ ΣΑΚΧΑΡΩΝ ΚΑΙ ΖΥΘΟΓΛΕΥΚΟΥΣ ΑΠΟ ΜΗ ΣΥΜΒΑΤΙΚΕΣ ΖΥΜΕΣ

Διπλωματική εργασία:
Μπέκος Νικόλαος

Επιβλέπουσα καθηγήτρια:
Ωραιπούλου Βάσω

Αθήνα 2019

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Λόγω του παγκόσμιου ανταγωνισμού και της απαίτησης των καταναλωτών για νέα και καινοτόμα προϊόντα, ο τομέας της ζυθοποιείας αξιοποιεί την έρευνα για παραγωγή νέων προϊόντων μπίρας με πολυπλοκότερο αρωματικό προφίλ. Η έρευνα στοχεύει σε στελέχη ζυμομυκήτων πέρα του *S. cerevisiae*, τους λεγόμενους Non-*Saccharomyces*, και τα μεταβολικά μονοπάτια που ακολουθούν για το μεταβολισμό των σακχάρων του ζυθογλεύκους για την παραγωγή νέων συνδυασμών αρωμάτων.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η δυνατότητα μεταβολισμού των βασικών σακχάρων της μπίρας και η μετέπειτα μεταβολική πορεία δυο στελεχών Non-*Saccharomyces* ζυμομυκήτων, *Torulasporea delbrueckii* και *Metschnikowia pulcherrima*, και δυο στελεχών του *S. cerevisiae*, S-23 (lager) και US-05 (ale) για συγκριτικούς λόγους. Αρχικά παρασκευάστηκαν θρεπτικά υποστρώματα γλυκόζης, φρουκτόζης, μαλτόζης και μίγματος των τριών σακχάρων στην αναλογία που βρίσκονται στο ζυθογλεύκος και μελετήθηκε η δυνατότητα μεταβολισμού τους από τις ζύμες. Η θερμοκρασία ζύμωσης επιλέχθηκε να είναι 13 °C, καθώς σε χαμηλότερες θερμοκρασίες ζύμωσης από τη θερμοκρασία περιβάλλοντος, διατηρούνται καλύτερα οι αρωματικές ενώσεις που παράγονται, αλλά και για να μελετηθεί η ανθεκτικότητα των ζυμών σε ψυχρό περιβάλλον. Από τα αποτελέσματα μετά το τέλος των ζυμώσεων εξήχθη το συμπέρασμα ότι και οι δυο non-*Saccharomyces* ζύμες είναι ικανές να μεταβολίσουν τα σάκχαρα και να αναπτυχθούν σε αυτό το περιβάλλον. Ως προς τους ρυθμούς ανάπτυξης, εφαρμόστηκε η λογιστική εξίσωση και υπολογίστηκε η σταθερά δυναμικού μεταφοράς k (1/h). Η *T. delbrueckii* είχε σε όλες τις περιπτώσεις τους μεγαλύτερους χρόνους ολοκλήρωσης της ζύμωσης από τις υπόλοιπες ζύμες και παρουσίασε μεγάλο εύρος στις τιμές των σταθερών της, με μέγιστη τιμή στο υπόστρωμα γλυκόζης, 0,01041 1/h, και ελάχιστη στο υπόστρωμα μαλτόζης, 0,00286 1/h. Η μεγάλη αυτή διαφορά οφείλεται στη διαφορά μεταξύ τελικών πληθυσμών στο υπόστρωμα μαλτόζης και υποστρωμάτων φρουκτόζης και γλυκόζης όπως και στη διαφορά των χρόνων ολοκλήρωσης της ζύμωσης. Η *M. pulcherrima* είχε το χαρακτηριστικό του μεγαλύτερου χρόνου λανθάνουσας φάσης, αλλά κατά την εκθετική φάση, ο ρυθμός ανάπτυξής της ήταν παρόμοιος με των στελεχών *S. cerevisiae*. Αυτό αντικατοπτρίζεται από τις σταθερές, καθώς οι τιμές των σταθερών για τις ζύμες *M. pulcherrima*, *S. cerevisiae* S-23 και US-05 κυμαίνονται μεταξύ των τιμών 0,00659 και 0,00469 1/h. Τα 2 στελέχη *S. cerevisiae* δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές ως προς την ανάπτυξή τους, εκτός από το υπόστρωμα μαλτόζης, στο οποίο η σταθερά του US-05 ίση με 0,00291 1/h, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι οι ale ζύμες είναι σχεδόν εξίσου ανθεκτικές με τις lager σε ζυμώσεις στους 13 °C. Οι τελικές τιμές της συγκέντρωσης αιθανόλης παρουσιάζουν διαφορές στα υποστρώματα μαλτόζης, με τις ζύμες *T. delbrueckii* και *S. cerevisiae* US-05 να

έχουν χαμηλότερες τελικές συγκεντρώσεις αιθανόλης, περίπου στα 33 g/L, από τις *M. pulcherrima* και *S. cerevisiae* S-23, που αυτές εμφάνισαν συγκεντρώσεις περίπου 40 g/L.

Αφού επιβεβαιώθηκε ότι τα στελέχη ζυμών είναι ικανά να ζυμώσουν στη θερμοκρασία αυτή, παρασκευάστηκε μπύρα τύπου Pale Ale και μελετήθηκε η ανάπτυξή τους στο περιβάλλον αυτό, καθώς και ο μεταβολισμός του ζυθογλεύκους. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες *T. delbrueckii*, *M. pulcherrima*, *S. cerevisiae* S-23, *S. cerevisiae* US-05 και μίγμα *T. delbrueckii* / *S. cerevisiae* US-05 αναλογίας 10:1. Η χρήση του μίγματος ζυμών έγινε για να μελετηθούν τα αρώματα που παράγονται από μικτή καλλιέργεια ζυμών. Στο τέλος της ζύμωσης έγιναν μετρήσεις στο χρώμα, την πικράδα και στο αρωματικό προφίλ της κάθε μπύρας που ζυμώθηκε από διαφορετικό στέλεχος. Σε όλες σχεδόν τις μπύρες η πικράδα βρίσκεται κάτω του ορίου της βιβλιογραφίας, με τιμές 22-23 IBU, καθώς προστέθηκε μικρότερη ποσότητα λυκίσκου. Το χρώμα των τελικών προϊόντων είχε τιμές μεταξύ 6,34 και 8,59, με τη μικρότερη τιμή, άρα και το πιο ανοιχτό χρώμα να αντιστοιχεί στον *S. cerevisiae* S-23 και τη μεγαλύτερη στην *M. pulcherrima*. Ως προς το αρωματικό προφίλ, τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αρωματικών ενώσεων εμφανίστηκαν στις μπύρες που ζυμώθηκαν από τα στελέχη *S. cerevisiae* S-23 και *T. delbrueckii*, ενώ τη μεγαλύτερη ποικιλία αρωμάτων την εμφάνισε η μικτή καλλιέργεια, κάτι που επιβεβαιώνεται και από τη βιβλιογραφία.

ABSTRACT

Due to global competition and consumer demand for new and innovative products, the brewing sector is driving research into new beer products with more sophisticated aromatic profiles. The research aims at yeast strains beyond *S. cerevisiae*, the so-called Non-*Saccharomyces*, and the metabolic pathways that follow for the metabolism of sugarcane sugars to produce new combinations of flavors.

In the present study, the metabolism of basic beer sugars and the subsequent metabolic pathway of two strains of non-*Saccharomyces* yeast, *Torulaspora delbrueckii* and *Metschnikowia pulcherrima*, was studied, as well as two strains of *S. cerevisiae*, S-23 (lager) and US-05 (ale) for comparative purposes. Initially, nutritional substrates of glucose, fructose, maltose and a mixture of those three sugars at the ratio found in the wort were prepared and their metabolism from yeasts was studied. The fermentation temperature was chosen to be 13 °C, as at lower fermentation temperatures than ambient temperature, the aromatic compounds produced are better preserved, but also to study the durability of the yeast in a cold environment. From the fermentation results, it was concluded that both non-*Saccharomyces* yeasts are able to metabolize sugars and grow in this environment. In terms of growth rates, the logistic equation was applied and the transfer potential constant k (1 / h) was calculated. *T. delbrueckii* has had in all cases the longest duration of fermentation completion than the other yeasts and exhibited a wide range of values of its constants, with a maximum value on the glucose substrate (0.01041 1/h) and a minimum on the maltose substrate (0,00286 1 / hr). This large difference is due to the difference between final cell populations on maltose substrate and fructose and glucose substrates as well as to the difference in fermentation completion times. *M. pulcherrima* has had the characteristic of longer lag phase, but during the exponential phase, its growth rate was similar to *S. cerevisiae* strains. This is reflected by the constants, since the constant values for *M. pulcherrima*, *S. cerevisiae* S-23 and US-05 are between 0.00659 and 0.00469 1/h. The two *S. cerevisiae* strains did not show significant differences in their growth, except for US-05 yeast in the maltose substrate in which the constant of the yeast was 0.00291 1/h, leading to the conclusion that ale yeasts are almost equally cold-resistant with the lager ones in fermentations at 13 °C. The final values of the ethanol concentration show differences in maltose substrates, with the *T. delbrueckii* and *S. cerevisiae* US-05 yeast strains having lower final ethanol concentrations (about 33 g/L) from *M. pulcherrima* and *S. cerevisiae* S-23, which exhibited concentrations (about 40 g/L).

After confirming that yeast strains are capable of fermenting at this temperature, a Pale Ale beer was prepared and the yeast growth was studied in this environment as well as the metabolism of the wort. In particular, cultures of *T. delbrueckii*, *M. pulcherrima*, *S. cerevisiae* S-23, *S. cerevisiae* US-05, and a 10: 1 ratio of *T. delbrueckii* / *S. cerevisiae* US-05 were used. The use of the yeast mix was made to study the aromas produced by mixed yeast cultivation. At the end of the fermentation, measurements

were made on the color, bitterness and aromatic profile of each beer fermented by a different strain. In virtually all beers, bitterness is below the limit of literature, at 22-23 IBUs, as less hops were added. The color of the finished products had values between 6.34 and 8.59 SRM, with the lowest value, and so the lighter color, corresponded to *S. cerevisiae* S-23 and the largest in *M. pulcherrima*. Regarding the aromatic profile, the highest concentrations of aromatic compounds appeared in the beers fermented by the *S. cerevisiae* S-23 and *T. delbrueckii* strains, while the larger variety of aromatic compounds was shown by the yeast mix, which is also confirmed by the literature.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε κατόπιν συνεργασίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσοβίου Πολυτεχνείου και του Τμήματος Οινολογίας και Τεχνολογίας Αποσταγμάτων του ΠΑΔΑ (πρώην ΤΕΙ Αθηνών).

Θα επιθυμούσα να ευχαριστήσω την κα Βάσω Ωραιοπούλου, καθηγήτρια στο ΕΜΠ και επιβλέπουσα καθηγήτρια της διπλωματικής εργασίας, για την εμπιστοσύνη της, καθώς μου ανέθεσε το θέμα της εργασίας. Ευχαριστώ επίσης και τη Φαίη Δρόσου, υποψήφια διδάκτορα στο ΕΜΠ για τη βοήθειά της κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας και την συγγραφή της εργασίας. Επιπλέον, από το ΠΑΔΑ, ευχαριστίες οφείλω στον κο Βασίλη Ντουρτόγλου και κο Παναγιώτη Ταταρίδη, καθηγητές στο ΠΑΔΑ για τη βοήθειά τους ως προς τη διεξαγωγή των πειραμάτων, όπως και στην κα Βούλα Αναστασοπούλου, μέλος του εργαστηριακού διδακτικού προσωπικού, για τη βοήθειά της σε τεχνικά θέματα. Επίσης ευχαριστώ την ομάδα ζυθοποίησης του ΠΑΔΑ, για τη βοήθειά τους κατά την παραγωγή του ζυθογλεύκους και τη διεργασία της εμφιάλωσης. Από το ΕΜΠ, ευχαριστίες οφείλω στη Μαρία Τσεβδού, που κάνει τη διδακτορική διατριβή της και τον κο Δημήτρη Τσιμογιάννη, μέλος του εργαστηριακού διδακτικού προσωπικού για τη βοήθειά τους στη χρήση του υγρού χρωματογράφου, στην κα Διομήδη Μάμμα, μέλος του εργαστηριακού διδακτικού προσωπικού για τη βοήθειά της κατά την πειραματική διαδικασία και για τη χρήση του αέριου χρωματογράφου και στον κο Ευάγγελο Τόπακα, καθηγητή του ΕΜΠ για τις επιπλέον υποδείξεις και διορθώσεις στην εργασία. Τέλος, ευχαριστώ και το συμφοιτητή και φίλο μου, Αλέξανδρο Δαμασκηνό για τη στήριξή του κατά τη διάρκεια της διπλωματικής εργασίας μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ – Η ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΗΣ ΜΠΥΡΑΣ	σελ. 8
Η ΜΠΥΡΑ ΚΑΙ ΟΙ ΠΡΩΤΕΣ ΥΛΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΗΣ	σελ. 8
α) Βύνη και κριθάρι	σελ. 9
β) Νερό	σελ. 10
γ) Πρόσθετα	σελ. 11
δ) Λυκίσκος	σελ. 11
ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΜΠΥΡΑΣ	σελ. 12
α) Συγκομιδή Κριθαριού	σελ. 12
β) Προεπεξεργασία (Προκαθαρισμός, Διαχωρισμός, Λείανση)	σελ. 12
γ) Αποθήκευση πρώτων υλών	σελ. 13
δ) Βυνοποίηση	σελ. 14
ε) Ζυθοποίηση	σελ. 14
i) Άλεση	σελ. 14
ii) Πολτοποίηση	σελ. 14
iii) Βρασμός	σελ. 14
iv) Φιλτράρισμα	σελ. 15
στ) Ζύμωση	σελ. 16
η) Μεταζυμωτικές ενέργειες	σελ. 17
ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΚΡΙΘΑΡΙΟΥ ΚΑΙ ΒΥΝΗΣ	σελ. 17
α) Επεξεργασία των κόκκων	σελ. 17
β) Φρύξη	σελ. 18
γ) Άλεση	σελ. 18
δ) Συστήματα πολτοποίησης	σελ. 19
ε) Συστήματα βρασμού	σελ. 20
NON-SACCHAROMYCES ΖΥΜΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΠΥΡΑΣ	σελ. 20
ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΜΠΥΡΑΣ	σελ. 26
α) Χρώμα	σελ. 26
β) Αφρός	σελ. 26
γ) Θολερότητα	σελ. 26
δ) Άρωμα και γεύση (flavor)	σελ. 27
i) Αρώματα στη μύρα	σελ. 27
ii) Τερπένια	σελ. 28
iv) Άλλοι δευτερογενείς μεταβολίτες	σελ. 29
ΜΟΝΤΕΛΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	σελ. 31
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	σελ. 33
ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ	σελ. 33

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	σελ. 34
1. ΕΝΥΔΑΤΩΣΗ ΖΥΜΩΝ	σελ. 34
2. ΜΕΤΡΗΣΗ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΚΑΙ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	σελ. 36
3. ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΡΥΟΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΖΥΜΩΝ	σελ. 37
4. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΖΥΜΩΣΗ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ ΑΠΛΩΝ ΣΑΚΧΑΡΩΝ	σελ. 37
5. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΖΥΘΟΓΛΕΥΚΟΥΣ	σελ. 38
6. ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΣ ΖΥΘΟΓΛΕΥΚΟΥΣ	σελ. 39
7. ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΛΕΥΘΕΡΟΥ ΑΖΩΤΟΥ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ (FAN) ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΝΙΝΥΔΡΙΝΗΣ	σελ. 39
8. ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΑΚΧΑΡΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΔΙΝΙΤΡΟΣΑΛΙΚΥΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ (DNS)	σελ. 41
9. ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΑΚΧΑΡΩΝ ΜΕ ΠΛΑΤΟΜΕΤΡΟ	σελ. 42
10. ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΑΚΧΑΡΩΝ ΜΕ ΥΓΡΟ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΟ	σελ. 42
11. ΜΕΤΡΗΣΗ ΧΡΩΜΑΤΟΣ ΜΠΥΡΑΣ	σελ. 42
12. ΜΕΤΡΗΣΗ ΠΙΚΡΑΔΑΣ ΜΠΥΡΑΣ	σελ. 42
13. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΜΕ ΣΤΗΛΗ VIGREUX	σελ. 43
14. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΑΕΡΙΟΥ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΟΥ	σελ. 44
15. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ ΣΤΗ ΜΠΥΡΑ ΜΕ ΑΛΚΟΟΛΟΜΕΤΡΟ	σελ. 44

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	σελ. 45
1. Έλεγχος κρυοανθεκτικότητας ζυμών	σελ. 45
2. Ζύμωση διαλυμάτων απλών σακχάρων	σελ. 46
2.1. Ανάπτυξη ζυμών σε διαλύματα απλών σακχάρων	σελ. 46
2.2. Βιωσιμότητα κυττάρων	σελ. 49
2.3. Κατανάλωση γλυκόζης και φρουκτόζης	σελ. 52
2.4. Κατανάλωση μαλτόζης	σελ. 55
2.5. Μείωση pH στα πρότυπα υποστρώματα	σελ. 57
2.6. Κατανάλωση αζώτου αμινοξέων (FAN)	σελ. 58
2.7. Παραγωγή αιθανόλης στα πρότυπα υποστρώματα	σελ. 59
2.8. Συντελεστές απόδοσης	σελ. 61
2.9. Προσαρμογή μοντέλων κινητικής ανάπτυξης & προσδιορισμός παραμέτρων	σελ. 62
2.10. Προσδιορισμός αρωματικών ενώσεων στα υποστρώματα απλών σακχάρων	σελ. 62
3. Παραγωγή Μπύρας	σελ. 73
3.1. Κατανάλωση σακχάρων	σελ. 73
3.2. Μεταβολή pH	σελ. 75
3.3. Κατανάλωση αζώτου αμινοξέων (FAN)	σελ. 76
3.4. Χρώμα και πικράδα του τελικού προϊόντος	σελ. 77
3.5. Επίδραση διαφορετικών ζυμών στη συγκέντρωση αιθανόλης στη μύρα	σελ. 78
3.6. Προσδιορισμός αρωματικών ενώσεων στη μύρα	σελ. 79

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	σελ. 84
--------------	---------

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	σελ. 86
--------------	---------

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	σελ. 89
-----------	---------

ΕΙΣΑΓΩΓΗ – Η ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΗΣ ΜΠΥΡΑΣ

Οι Σουμέριοι ήταν ο πρώτος λαός που παρασκεύασε ποτό συγγενικό της μπίρας. Η ανακάλυψη έγινε τυχαία, με την παραμονή ενός δοχείου με νερό και ψωμί από κριθάρι στην ατμόσφαιρα. Άγρια στελέχη ζυμών αναπτύχθηκαν και συντέλεσαν ζύμωση των σακχάρων του ψωμιού. Ο πολτός που σχηματίστηκε ήταν αρεστός γευστικά και αρωματικά, οπότε η διαδικασία καθιερώθηκε για την παραγωγή του. Οι Βαβυλώνιοι εξέλιξαν την διεργασία παραγωγής της μπίρας, εισάγοντας το λυκίσκο ως νέο συστατικό και καθιερώνοντας νομοθεσία για την παραγωγική διαδικασία (αναφορά στον κώδικα Χαμπουραμί).

Οι Αιγύπτιοι τη χρησιμοποιούσαν, πέρα από ποτό, επιπλέον και ως συστατικό φαρμάκων και σαν προσφορά στις θρησκευτικές τελετές τους. Ως πρώτη ύλη χρησιμοποιούσαν κριθαρένιο ψωμί, αλλά και σιτάρι και μέλι. Για την παραγωγή του ψωμιού ακολουθούσαν διαδικασία βυνοποίησης με ύγρανση, αερισμό και ξήρανση του κριθαριού. Η κατανάλωση μπίρας από τους Αιγυπτίους έγινε γνωστή και στην αρχαία Ελλάδα, μέσα από τα κείμενα του Ηρόδοτου, ο οποίος την ανέφερε ως 'κρασί από κριθάρι'.

Στο ευρωπαϊκό χώρο, η εξέλιξη της ζυθοποιίας συντελέστηκε από τα μοναστήρια. Αρχικά η παραγωγή γινόταν κατανάλωση από τους ίδιους τους μοναχούς, αλλά με την έναρξη εμπορίας της, επεκτάθηκε και η έρευνα. Σταδιακά, η μοναστηριακή ζυθοποιία Weiheinstephan έγινε πανεπιστημιακό κέντρο ερευνών για τη μπίρα.

Κατά τη βιομηχανική επανάσταση, οι ανακαλύψεις και εφευρέσεις ανέπτυξαν σε βιομηχανικό επίπεδο την παραγωγή μπίρας, όπως η ανακάλυψη της ύπαρξης των ζυμών ως υπεύθυνων της ζύμωσης από τους Pasteur, Liebig και Buchner, η επανακαλλιέργεια στελεχών ζύμης από τον Hansen, η κατασκευή της ψυκτικής μηχανής από τον Linden και η δημιουργία κλίμακας Balling και Plato για τη μέτρηση περιεκτικότητας του ζυθογλεύκου σε εκχύλισμα [Ταταρίδης, Κεχαγιά, 2010].

Η ΜΠΥΡΑ ΚΑΙ ΟΙ ΠΡΩΤΕΣ ΥΛΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΗΣ

Η μπίρα είναι οιοπνευματώδες ποτό με ευρεία κατανάλωσης παγκοσμίως και παράγεται από τη ζύμωση βύνης κριθαριού και λυκίσκου. Τα βασικά συστατικά της είναι το νερό, η βύνη κριθαριού, ο λυκίσκος και τα πρόσθετα, αμυλούχα και μη. Η ζύμωση των σακχάρων της βύνης παράγει αιθανόλη και οι ουσίες που εκχυλίζονται από το λυκίσκο κατά την προσθήκη του προσδίδουν τη χαρακτηριστική πικράδα της μπίρας.

Οι διαφορετικές ζύμες που χρησιμοποιούνται και οι συνθήκες επεξεργασίας των πρώτων υλών έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή πολλών διαφορετικών τύπων μπίρας. Ειδικά στη σύγχρονη εποχή, που η βιωσιμότητα των βιομηχανιών τροφίμων επηρεάζεται και από την καινοτομία των προϊόντων τους, η παραγωγή νέων τύπων μπίρας είναι στόχος όλων των βιομηχανιών μπίρας.

Ο πιο γνωστός και διαδεδομένος τύπος μπίρας είναι οι Lager ή βυθοζύμωτες, καθώς οι ζύμες στο τέλος της ζύμωσης συγκεντρώνονται στον πυθμένα. Στην Αγγλία συγκεκριμένα, είναι διαδεδομένος και ο τύπος μπίρας Ale ή αφροζύμωτης, με τις ζύμες να συγκεντρώνονται στην επιφάνεια κατά το τέλος της ζύμωσης [Θωμόπουλος, 1981]. Άλλοι τύποι μπίρας περιλαμβάνουν τις θολές αφροζύμωτες (Pale Ale), τις βυθοζύμωτες με ίδιο θολό χρώμα, γνωστές ως Pilsner Lager, τις απαλές αφροζύμωτες (mild ale), με λιγότερα πικρά συστατικά και πιο γλυκές από τις θολές. Υποκατηγορία των απαλών αφροζύμωτων είναι οι σκούρες (brown ale), ενώ οι ακόμη πιο σκουρόχρωμες χαρακτηρίζονται ως stout [Briggs, Hough, Stevens, Young, 1981].

Βύνη και κριθάρι

Η βύνη παράγεται από την επεξεργασία του κριθαριού. Το κριθάρι ανήκει στην οικογένεια των αγροστωδών (Graminae) , η οποία περιλαμβάνει είδη όπως σιτάρι, σίκαλη, σόργο, βρώμη και άλλα είδη που αποδίδουν κόκκους τροφίμων. Τα δημητριακά χρησιμοποιούνται σχεδόν εξ'ολοκλήρου στις αλεστικές μηχανές των ζυθοποιείων, ενώ παλαιότερα, γινόταν χρήση βύνης από μπιζέλια, φασόλια και άμυλο πατάτας.

Το κριθάρι που θα βυνοποιηθεί πρέπει να έχει ορισμένα χαρακτηριστικά. Συγκεκριμένα, πρέπει να έχει ανοιχτόχρωμο κίτρινο και γυαλιστερό χρώμα, συνδεδεμένου με ώριμο φυτό χαμηλής περιεκτικότητας υγρασίας. Το διαφορετικό χρώμα του κριθαριού είναι ένδειξη προβλημάτων κατά την ανάπτυξή του, όπως άγουροι κόκκοι (πράσινοκίτρινο χρώμα), ανάπτυξη μυκήτων (θολό γκρίζο χρώμα) ή και εξαναγκασμένη ωρίμανση, με επακόλουθη μικρή ενεργητικότητα των ενζύμων του ενδοσπερμίου (λευκό χρώμα). Το υγιές κριθάρι έχει αχυρώδη οσμή, η οποία γίνεται αντιληπτή κατά την αποθήκευσή του σε κλειστό χώρο, ενώ, αν έχουν αναπτυχθεί μύκητες, αναδίδει μυρωδιά μούχλας. Ο φλοιός του κριθαριού δρα προστατευτικά για τον καρπό. Οι ρυτιδώσεις που εμφανίζει και το πάχος του, συνδέονται με την ποιότητα του κριθαριού, καθώς επιθυμείται λεπτός φλοιός με λεπτές ρυτίδες και λεία υφή. Οι έντονες ρυτίδες στο φλοιό δείχνουν ότι και ο ίδιος έχει μεγάλο πάχος [Ταταρίδης, Κεχαγιά, 2010].

Η μεγαλύτερη διάρκεια ανάπτυξης επιτρέπει μεγαλύτερη συσσώρευση αμύλου στους κόκκους, άρα και σε περισσότερο εκχύλισμα για το ζυθοποιό. Οι αποδόσεις καλλιέργειας είναι καλύτερες όταν η περίοδος ανάπτυξης είναι υγρή και δροσερή και ακολουθείται από ηλιόλουστο και ξηρό καιρό κατά τη συγκομιδή. Έτσι οι καρποί ωριμάζουν και ξηραίνονται και μειώνονται επακόλουθα προβλήματα εμφάνισης άγουρων ή σπασμένων καρπών. Πολύ ξηρά καλοκαίρια όμως οδηγούν σε πρόωρη ωρίμανση και ανεπαρκώς γεμισμένους κόκκους με υψηλή περιεκτικότητα σε άζωτο [Briggs et al., 1981].

Στο κριθάρι υπάρχει πληθώρα ειδών βακτηρίων και μυκήτων, προερχόμενα από το περιβάλλον, τα έντομα και τα ζώα. Η μικροβιακή χλωρίδα επηρεάζεται από τον καιρό και τις πολύ βροχερές χρονιές, ενθαρρύνεται η μικροβιακή ανάπτυξη και η παθογένεση των φυτών. Το κριθάρι, μετά τη συγκομιδή, αποθηκεύεται για κάποιο χρονικό διάστημα πριν τη βυνοποίηση και οι μικροοργανισμοί συνεχίζουν να αναπτύσσονται. Παρόλο το εύρος των μικροβίων που ζουν στο κριθάρι, μόνο λίγοι μύκητες είναι επικίνδυνοι για τη μύρα, όπως τα είδη *Fusarium* , διότι παράγουν μυκοτοξίνες που δε διασπώνται ή απομακρύνονται κατά την επεξεργασία και ανιχνεύονται στο τελικό προϊόν. Η δεοξυνιβαλενόλη είναι χαρακτηριστική μυκοτοξίνη που παράγεται από τα είδη *Fusarium*. Είναι επικίνδυνη για την ανθρώπινη υγεία και μεγάλες συγκεντρώσεις της παρεμποδίζουν την ανάπτυξη της ζύμης κατά τη ζύμωση [Bokulich & Bamforth, 2013].

Γενικά οι ζυθοποιοί θέτουν προδιαγραφές για τον τύπο βύνης που χρειάζονται και οι παραγωγοί βύνης αγοράζουν κριθάρι και το κατεργάζονται για να τις πληροί όσο γίνεται. Οι παραγωγοί αναμειγνύουν βύνες ομοίων τύπων για να το επιτύχουν αυτό. Οι προδιαγραφές ορίζουν ελάχιστο εκχύλισμα θερμού νερού, εύρος χρώματος, μέγιστη περιεκτικότητα υγρασίας, επίπεδο ολικού και διαλυμένου αζώτου και διαστατική δύναμη, δηλαδή περιεχόμενα ένζυμα που διασπούν το άμυλο.

Οι μαύρες βύνες ετοιμάζονται από παχύ και ομοιόμορφο κριθάρι, με μέτριο περιεχόμενο άζωτο (1.5-1.6%), χρόνο για βλάστηση περίπου 5 ημέρες και έχοντας υποστεί ξήρανση έως υγρασίας 5%. Μετά ψήνονται σε θερμοκρασίες 220-230 °C, χωρίς να απελευθερώνονται οι

αναθυμιάσεις, αλλά προσεκτικά, καθώς στους 250 °C το κριθάρι καίγεται. Το ψημένο κριθάρι ετοιμάζεται με παρόμοιο τρόπο, με τη διαφορά ότι δε διαβρέχεται αρχικά και χρησιμοποιείται ακατέργαστο. Η ευρωπαϊκή βύνη μελανοϊδίνης (melanoidin malt/ brumalt) παρασκευάζεται από κριθάρι εμβαπτισμένο σε νερό για 8 ημέρες, το οποίο τοποθετείται μετά σε στρώση 20cm πάχους και καλυμμένο, ώστε να φτάσει μέγιστη θερμοκρασία 50 °C (έναντι του συνηθισμένου 20 °C).

Οι κρυσταλλικές βύνες ή βύνες καραμέλας χρησιμοποιούνται για τις ευχάριστες γεύσεις που προσδίδουν. Η τροποποιημένη βύνη, διαβρέχεται πριν και μετά από ελαφρά ξήρανση σε κλίβανο και ύστερα, με υγρασία περίπου 50%, τοποθετείται σε κλίβανο για θέρμανση στους 70 °C περίπου για 2h, με ελάχιστο αερισμό. Το σιγοβράσιμο που προκαλείται υδρολύει το άμυλο και το ενδόσπερμα υγροποιείται και γίνεται σιρόπι, ευνοώντας την αμυλόλυση παρά την πρωτεόλυση. Οι κόκκινες βύνες ετοιμάζονται ξηραίνοντας σε κλίβανο τροποποιημένη βύνη μέχρι υγρασίας 3-4% και έπειτα προσδίδοντάς της το χρώμα με ταχεία θέρμανση μέχρι τους 93 °C και σταδιακά μέχρι τους 138-150 °C. Το προϊόν μετά έχει γεύση που θυμίζει ζεστό μπισκότο.

Οι όξινες βύνες παράγονται με διάφορους τρόπους και χρησιμοποιούνται για μείωση pH στο βαρέλι πολτοποίησης. Η αναπτυσσόμενη βύνη ψεκάζεται και εμβαπτίζεται σε διάφορα φυσικά διαλύματα γαλακτικού οξέος. Για παράδειγμα, μπορεί να ψεκαστεί δυο φορές με γαλακτικό οξύ 10% και να εμβαπτιστεί στο ίδιο διάλυμα πριν την ξήρανση. Η βύνη chit παράγεται κυρίως στην κεντρική Ευρώπη και εβαπτίζεται μέχρι χαμηλής περιεκτικότητας σε υγρασία (40%), αναπτύσσεται για 3 ημέρες σε θερμοκρασίες κάτω των 18 °C και ξηραίνεται ήπια, σε μη τροποποιημένη μορφή. Έτσι διατηρούν περισσότερο τον ακατέργαστο χαρακτήρα. Οι βύνες για ουίσκυ παράγονται από κριθάρι με πιο μεταβλητό περιεχόμενο άζωτο. Επίσης περιέχουν μεγαλύτερη ποσότητα εκχυλίσματος, άρα μπορεί να τροποποιηθεί και έχει μέση ή μικρή περιεκτικότητα σε άζωτο. Στον κλίβανο χρησιμοποιείται τύρφη και ο καπνός της κατακάθεται στη βύνη, αυξάνοντας το φαινολικό περιεχόμενό της και δίνοντάς της χαρακτηριστική γεύση. Τα εκχυλίσματα συμβατικής βύνης παράγονται από πολτοποίηση απλής βύνης και συγκεντρώνοντας το γλυκό ζύθο υπό μειωμένη πίεση. Τα σιροποειδή εκχυλίσματα χρησιμοποιούνται στην παρασκευή γλυκών και τροφίμων [Briggs, Hough, Stevens, Young, 1981].

Νερό

Παλαιότερα, συγκεκριμένες ευρωπαϊκές πόλεις ήταν γνωστές για την υψηλή ποιότητα μύρας που προσέφεραν. Αυτό, εν μέρει, οφειλόταν στη σύνθεση του νερού, καθώς τα άλατα που περιέχει, όπως και η ολική σκληρότητα επηρεάζουν σημαντικά το τελικό προϊόν.

Η ποιότητα του νερού που χρησιμοποιείται εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Το νερό από πορώδεις αμμόλιθους φιλτράρεται καλά, σε αντίθεση με το νερό από ασβεστόλιθο με πτυχώσεις. Σε πετρώματα με ασβεστολιθική δομή, το νερό περιέχει ανθρακούχα και θειικά άλατα ασβεστίου και μαγνησίου. Η απομάκρυνση αλάτων από το νερό γίνεται με ιονεναλλαγή με χρήση ρητινών. Το άλας του επεξεργασμένου νερού μετρείται με αγωγιμόμετρο. Όσο καλύτερα απιονισμένο είναι το νερό, τόσο μεγαλύτερη ηλεκτρική αντίσταση θα έχει. Η ιονεναλλαγή μπορεί επίσης να γίνει με συνεχή τρόπο, για μέγιστη χρήση των κλινών ρητίνης.

Η ανάπτυξη των τεχνικών απομάκρυνσης αλάτων είχε ως αποτέλεσμα την καταλληλότητα χρήσης πηγών νερού που είχαν απορριφθεί παλιότερα για τη ζυθοποιία. Επιπλέον, η

προσθήκη μιγμάτων αλάτων από τους ζυθοποιούς ευνοεί την επίτευξη της σύνθεσης νερού με παρόμοια χαρακτηριστικά με αυτά των τοποθεσιών που επιθυμεί. Η περιεκτικότητα του νερού σε άλατα επιπλέον επηρεάζει τη δραστηριότητα και σταθερότητα των ενζύμων που χρησιμοποιούνται.

Το pH και η συγκέντρωση των φωσφορικών αλάτων στο ζυθογλεύκος επηρεάζονται ισχυρά από συγκεκριμένα άλατα, όπως και η ζύμωση, η ανάπτυξη και η κροκίδωση της ζύμης και η γεύση και ο αφρισμός της τελικής μπίρας. Συγκεκριμένα, τα ιόντα ασβεστίου σταθεροποιούν τις α-αμυλάσες, αυξάνουν το ολικό άζωτο στο ζυθογλεύκος, καταβυθίζουν οξαλικά άλατα και μειώνουν το χρώμα, μεταξύ άλλων. Τα θειικά ιόντα προσδίδουν πιο πικρή γεύση, τα χλωρικά περιορίζουν την κροκίδωση της ζύμης και βελτιώνουν τη σταθερότητα των κολλοειδών, ενώ τα ιόντα μαγνησίου δρουν ως συμπαραγόντες για ορισμένα ένζυμα και προσδίδουν έντονη πικράδα, εκτός αν τα ιόντα ασβεστίου βρίσκονται σε περίσσεια σε σχέση με αυτά [Briggs et al., 1981].

Πρόσθετα

Τα πρόσθετα που χρησιμοποιούνται στην παρασκευή της μπίρας διακρίνονται σε αυτά που:

- α) χρησιμοποιούνται στο δοχείο πολτοποίησης,
- β) προστίθενται στο βραστήρα,
- γ) προστίθενται στη μπίρα για υποστήριξη δευτερεύουσας ζύμωσης ή
- δ) για να της προσδώσουν γεύση.

Τα πρώτα περιλαμβάνουν ολόκληρους ακατέργαστους κόκκους, ψημένους ή νιφάδες αυτών, όπως κριθάρι, σιτάρι, σίκαλη ή Triticale (υβρίδιο μεταξύ σίκαλης και σιταριού). Επίσης μπορεί να περιέχουν μερικώς εξευγενισμένα τμήματα κόκκων, όπως αραβόσιτος, σόργο ή ρύζι, ή προμαγειρεμένες νιφάδες ρυζιού ή αραβόσιτου. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί επεξεργασμένο άμυλο από δημητριακά ή πατάτες. Τα πρόσθετα του βραστήρα, στερεά ή σιροποειδή προϊόντα, που διαλύονται ή διασπείρονται στο ζυθογλεύκος κατά το βρασμό, περιλαμβάνουν ιμβερτοποιημένα σάκχαρα, εκχυλίσματα βύνης ή σιρόπια δημητριακών. Αυτά περιέχουν σημαντικές ποσότητες αζωτούχων ενώσεων, μικροθρεπτικά συστατικά της ζύμης και άλλες ουσίες.

Βασικός λόγος χρήσης προσθέτων είναι η παροχή φθηνότερων εκχυλισμάτων από ότι οι βύνες. Άλλος λόγος χρήσης των προσθέτων είναι η μείωση των φαινολικών ενώσεων και των λιπιδίων, με αποτέλεσμα την αύξηση του χρόνου ζωής των προϊόντων. Τα αμυλούχα πρόσθετα επίσης βελτιώνουν τη σταθερότητα του τελικού προϊόντος και αραιώνουν τη βύνη, άρα και τις πρωτεΐνες που περιέχει και είναι ανεπιθύμητες.

Τα βιομηχανικά ένζυμα που χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα συμπληρώνουν τα ένζυμα της βύνης ως προς τη μετατροπή είτε της χαμηλής ποιότητας βύνης είτε άλλων προσθέτων. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν για μετατροπή ακατέργαστων δημητριακών κατά την παραγωγή σιροπιών. Τα περισσότερα βιομηχανικά ένζυμα προέρχονται από μικροοργανισμούς [Briggs, et al., 1981].

Λυκίσκος

Ο λυκίσκος είναι ένα αναρριχώμενο φυτό και καλλιεργείται κυρίως για τα θηλυκά άνθη του. Χρησιμοποιείται στη ζυθοποιία για το μεγάλο εύρος πικράδας, γεύσεων και αρωμάτων που προσφέρει στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της μπίρας. Τα αρώματα της τελικής μπίρας

εξαρτώνται κυρίως από την ποικιλία του λυκίσκου και τον τρόπο χρήσης του κατά τη ζυθοποίηση. Έτσι οι ζυθοποιοί στοχεύουν στην επιλογή των ποικιλιών λυκίσκου για την ενσωμάτωση νέων οργανοληπτικών χαρακτηριστικών στη μύρα.

Πέρα από την ενίσχυση των οργανοληπτικών της μύρας, ενώσεις που περιέχονται στο λυκίσκο παρουσιάζουν αντιμικροβιακή, αντιφλεγμονώδη και αντικαρκινική δράση. Αυτές οι δράσεις σχετίζονται με την ποικιλία του λυκίσκου, καθώς κάθε ποικιλία έχει διαφορετική σύσταση και γι' αυτό καλλιεργούνται περισσότερες από 200 ποικιλίες λυκίσκου παγκοσμίως. Οι ποικιλίες διαφέρουν ποσοτικά και ποιοτικά στο κλάσμα των αιθέριων ελαίων (που περιλαμβάνουν τερπένια, αλκοόλες, οξέα, κετόνες και αλδεΐδες) και στις μη πτητικές ρητίνες (που περιλαμβάνουν ξανθοχουμόλη και άλλες πολυφαινόλες, α- και β- οξέα) [Machado et al., 2018].

ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΜΠΥΡΑΣ

ΣΥΓΚΟΜΙΔΗ ΚΡΙΘΑΡΙΟΥ

Κατά τη συγκομιδή, τα ώριμα φυτά κόβονται, οι κόκκοι αλωνίζονται, απομακρύνονται και διατηρούνται, ενώ το άχυρο απορρίπτεται. Οτιδήποτε διαφορετικό από κόκκους κριθαριού θεωρείται ξένη ουσία και απομακρύνεται. Πέρα από πέτρες, χώμα, άλλα σιτηρά ή χόρτα, οι σπασμένοι κόκκοι, ή ο σκέτος φλοιός θεωρούνται ξένες ουσίες. Οι σπασμένοι κόκκοι απορροφούν περισσότερο νερό και δημιουργούν περιβάλλον ευνοϊκό για μόλυνση από μικροοργανισμούς, ενώ, αν έχει τραυματιστεί το φυτό, δε βλαστάνουν [Ταταρίδης & Κεχαγιά, 2010].

ΠΡΟΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ (Προκαθαρισμός, Διαχωρισμός, Λείανση)

Στο στάδιο του προκαθαρισμού γίνεται απομάκρυνση των μεγαλύτερων ακαθαρσιών. Ο προκαθαρισμός περιλαμβάνει διεργασία κοσκίνισματος με αναρρόφηση του ρεύματος των κόκκων με αέρα. Οι κόκκοι διέρχονται από κόσκινο, το οποίο συγκρατεί τις μεγάλες ακαθαρσίες. Οι κόκκοι, μετά τον προκαθαρισμό διέρχονται από μαγνητικό διαχωριστή για απομάκρυνση σιδήρου, ή γενικά μεταλλικών θραυσμάτων. Αργότερα γίνεται πιο προσεκτικός καθαρισμός, για απομάκρυνση ελαττωματικών κόκκων, ή ακαθαρσιών μεγέθους κόκκου και συνήθως γίνεται σε περισσότερα του ενός στάδια για διαφορετικής τάξης μεγέθους ακαθαρσίες. Αυτός ο τύπος καθαρισμού μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για ψύξη του κόκκου ύστερα από θερμή αποθήκευση.

Οι κόκκοι διαχωρίζονται σε βαθμίδες ανάλογα το μέγεθός τους, διότι, στην κύρια μάζα των κόκκων, η περιεκτικότητα σε άζωτο, ο ρυθμός απορρόφησης νερού, ο ρυθμός βλάστησης και τα χαρακτηριστικά της βύνης διαφοροποιούνται με το μέγεθος των κόκκων. Επειδή το κόστος διαχωρισμού και ξεχωριστής επεξεργασίας κάθε βαθμίδας είναι απαγορευτικό, απομακρύνονται και απορρίπτονται κόκκοι μικρότεροι περίπου των 2mm, όσο περίπου είναι το μέγεθος των μικρών ακαθαρσιών. Το συνολικό κλάσμα κόκκων που απορρίπτεται είναι περίπου το 20% του συνόλου. Αυτό χρησιμοποιείται ως ζωοτροφή ή, σπανιότερα, για παρασκευή τροφίμων ή ξυδιού.

Η λείανση του κριθαριού γίνεται στη σιταποθήκη αμέσως πριν την εμφύσηση. Ο βαθμός λείανσης πρέπει να ρυθμιστεί ώστε οι κόκκοι να μείνουν άθικτοι και να μην απομακρυνθεί μεγάλη ποσότητα του φλοιού. Η εμφύσηση γίνεται σε ειδικά μηχανήματα με κωνική βάση, ώστε να συγκεντρώνεται εκεί το κριθάρι. Για την αποφυγή σχηματισμού σκόνης κατά την

πτώση των κόκκων, ψεκάζονται με νερό κατά την πτώση τους. Η σκόνη κατά την επεξεργασία της βύνης απομακρύνεται είτε από συστήματα κυκλώνων, είτε παγιδεύεται σε φίλτρα και μπορεί να πωληθεί ως ζωοτροφή. Η σκόνη πρέπει να απομακρύνεται, καθώς είναι εύφλεκτη και μπορεί να αποτελέσει πηγή έκρηξης, προκαλεί μακροχρόνια αναπνευστικά προβλήματα στους εργαζόμενους και προβλήματα στην εγκατάσταση των μηχανημάτων. Ο αερισμός στις κωνικές δεξαμενές εμβάπτισης γίνεται με πεπιεσμένο αέρα από στόμια [Briggs et al., 1981].

ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΠΡΩΤΩΝ ΥΛΩΝ

Το κριθάρι ή τα μη βυνοποιημένα δημητριακά φτάνουν στο ζυθοποιείο χύμα και αποθηκεύονται σε σιταποθήκες, εκτός από τις ειδικές βύνες. Φυλάσσονται σε επίπεδα υγρασίας που αποτρέπει την αναπαραγωγή εντόμων και τη μετατροπή των προσθέτων λόγω παρουσίας νερού. Τα σιρόπια φτάνουν είτε χύμα είτε σε δοχεία. Τα χύμα σιρόπια διατηρούνται στους 50 °C σε ειδικά διαμορφωμένες δεξαμενές στα φορτηγά μεταφοράς, ώστε το ιξώδες τους να είναι χαμηλό και να μπορούν να αντληθούν στις δεξαμενές του ζυθοποιείου.

ΒΥΝΟΠΟΙΗΣΗ

Η διαδικασία της βυνοποίησης περιλαμβάνει τη συλλογή αποθεμάτων κατάλληλου κριθαριού, αποθήκευσή του, εμβάπτισή του σε νερό, βλάστηση των κόκκων και ξήρανση σε κλίβανο. Τα χαρακτηριστικά που πρέπει να έχει το κριθάρι για να είναι κατάλληλο για βυνοποίηση είναι: γρήγορη και συγχρονισμένη εκβλάστηση των κόκκων, ομοιόμορφη ενζυμική αποικοδόμηση του ενδοσπέρματος, επαρκές απόθεμα ενζύμων μετά την ξήρανση και χαμηλά επίπεδα ινωδών συστατικών και αζώτου. Ορισμένες αποκλίνουσες από το επιθυμητό ποικιλίες κριθαριού παράγουν κόκκους που μπορούν να βλαστήσουν σε υγρό καιρό, πριν τη συγκομιδή, και αποφεύγονται γενικώς. Υπάρχουν και αποκλίνουσες ποικιλίες του άλλου άκρου, που οι κόκκοι τους βλαστάνουν με δυσκολία. Αυτές θεωρούνται αδρανείς ποικιλίες και η αδράνειά τους μπορεί να ξεπεραστεί με αποθήκευση για μερικούς μήνες ή ήπια θερμική κατεργασία.

Στο στάδιο της διαβροχής το καθαρισμένο κριθάρι εμβάπτιζεται σε νερό θερμοκρασίας 10-15 °C, και απλώνεται σε στρώση πάχους 60 cm. Το νερό ανανεώνεται 2-4 φορές κατά τη διάρκεια της εμβάπτισης, που μπορεί να διαρκέσει 60 h ή περισσότερο. Όταν το κριθάρι έχει φουσκώσει περίπου 1.4 φορές το αρχικό του μέγεθος, το νερό στραγγίζεται, και ύστερα από 6-10 h οι κόκκοι στοιβάζονται σε σωρό ύψους 23-76 cm.

Η συσσώρευση θερμότητας επιταχύνει την πρόσληψη επιφανειακής υγρασίας και την έναρξη της εκβλάστησης. Ύστερα από ένα χρονικό διάστημα, οι κόκκοι απλώνονται σε αδιαπέραστο τσιμεντένιο πάτωμα σε στρώση πάχους περίπου 15 cm, σε δωμάτιο θερμοκρασίας 13-16 °C και καλό αερισμό. Δυο φορές τη μέρα οι κόκκοι αναδεύονται για εξισορρόπηση της θερμοκρασίας και αποφυγή εμπλοκής των αναπτυσσόμενων ριζών. Επιδιώκεται θερμοκρασία 13-16 °C στο τέλος αυτής της περιόδου εκβλάστησης, αν και μπορεί να φτάσει και τους 20 °C [Briggs et al., 1981]. Κατά την εκβλάστηση, ο κόκκος βλαστάνει μέχρι το ενδόσπερμα και αναπτύσσονται ένζυμα που διασπούν την αμυλόζη και την αμυλοπηκτίνη του αμύλου σε μαλτόζη. Η μαλτόζη είναι το κύριο σάκχαρο που καταναλώνεται από τις ζύμες στη ζυθοποιεία.

Όταν η αποικοδόμηση φτάσει το επιθυμητό σημείο και οι ρίζες αρχίσουν να μαραίνονται, περίπου ύστερα από 7-10 ημέρες, ο ζυθοποιός την τερματίζει με φρύξη των κόκκων σε

κλίβανο [Briggs et al., 1981]. Κατά τη φρύξη, οι κόκκοι ξηραίνονται μέχρι τελικής υγρασίας 4%. Η ξήρανση γίνεται με έκθεση των κόκκων σε θερμό ρεύμα αέρα με την τελική θερμοκρασία να διαφέρει ανάλογα το είδος της βύνης [Θωμόπουλος, 1981]. Η έντονη ξήρανση χρησιμοποιείται για παραγωγή εγχρωμης βύνης. Οι ρίζες απομακρύνονται με ειδικά μηχανήματα και πωλούνται. Μετά την ξήρανση η υγρασία των κόκκων είναι αρκετά χαμηλή, επιτρέποντας τη μακρά αποθήκευση σε σταθερή κατάσταση. Η βύνη που προκύπτει είναι εμπλουτισμένη με υδατάνθρακες, μετουσιωμένες πρωτεΐνες, διάφορες βιταμίνες Β και ανόργανα συστατικά. Επιπλέον περιέχει ένζυμα σχετικά με την αποικοδόμηση του αμύλου, εκτός αν η ξήρανση είναι αρκετά έντονη.

ΖΥΘΟΠΟΙΗΣΗ

Άλεση

Το βυνοποιημένο κριθάρι αλέθεται προσεκτικά, ώστε να μείνει άθικτος ο φλοιός, ενώ το υπόλοιπο να γίνει χονδρή σκόνη. Αυτό το άλευρο είναι πλούσιο σε άμυλο και ένζυμα που θα το αποικοδομήσουν όταν προστεθεί νερό. Στόχος της άλεσης είναι η απόκτηση μίγματος σωματιδίων κατά την πολτοποίηση σε τέτοιο μέγεθος που θα εξασφαλίσει τη μέγιστη απόδοση εκχυλίσματος. Οι διεργασίες άλεσης καθορίζονται από την κατανομή μεγέθους των κόκκων, την τροποποίηση που έχουν υποστεί, το ποσό υγρασίας, τις μεθόδους πολτοποίησης και τη μέθοδο απομάκρυνσης ζυθογλεύκους. Με την άλεση το κέλυφος χωρίζεται, για να εκτεθεί το ενδόσπερμα, το οποίο πρέπει να έχει αποδομηθεί σε βαθμό που να είναι διαπερατό από το νερό και τα ένζυμα. Τα αλευρώδη σωματίδια πρέπει να είναι όσο το δυνατόν λιγότερα, ενώ δεν πρέπει να υπάρχουν σπόροι που δεν έχουν τεμαχισθεί, όπως και το ενδόσπερμα πρέπει να είναι ομοιόμορφο σε μέγεθος [Briggs et al., 1981].

Πολτοποίηση

Κατά το στάδιο της πολτοποίησης, προστίθεται νερό ώστε να δράσουν τα ένζυμα της βύνης. Τα ένζυμα που βρίσκονται στην αλεσμένη βύνη είναι η α- και β-αμυλάση και γλυκοζιδάσες. Η β-αμυλάση δρα στους 67 °C, διασπώντας τα άκρα του αμύλου σε μαλτόζες και δεξτρίνες, ενώ η α-αμυλάση δρα στους 72 °C μαζί με τις γλυκοζιδάσες, διασπώντας τα σάκχαρα αυτά σε μικρότερου μοριακού βάρους, συγκεκριμένα σε μαλτόζη, φρουκτόζη και γλυκόζη.

Βρασμός

Το ζυθογλεύκος οδηγείται σε βράσιμο σε χάλκινο βραστήρα για να υποστεί μεγαλύτερη ενζυμική δράση, κατακρήμνιση πρωτεϊνών, αποστείρωση του ζυθογλεύκους και αλλαγές όπως η εξάτμιση νερού. Γενικά βέλτιστος χρόνος βρασμού από την άποψη της πικράδας είναι 90 min. Με το βρασμό επιτυγχάνεται η μετουσίωση και κροκίδωση όλων των ενζύμων, άρα σταθεροποίηση της σύστασης του ζυθογλεύκους, όπως και καταστροφή κυττάρων ζυμών και τυχόν βακτηρίων. Επιπλέον, εκχυλίζονται στο ζυθογλεύκος πικρικές ουσίες του λυκίσκου που ευνοούν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της μπίρας, συγκεκριμένα α-οξέα, χουμουλόνη και λουπουλόνη και σε μικρότερο βαθμό β-οξέα. Τα πικρικά οξέα έχουν μικρή διαλυτότητα στο ζυθογλεύκος, και με την αύξηση της θερμοκρασίας, μετατρέπονται στα ισομερή α- και β-οξέα, με πολύ μεγαλύτερη διαλυτότητα. Πέρα από τις πικρικές ουσίες, εκχυλίζονται και αιθέρια έλαια (τερπενικές ενώσεις), τα οποία συνεισφέρουν στο άρωμα της μπίρας. Ο

λυκίσκος επιλέγεται κυρίως με βάση την περιεκτικότητα σε πικρικές ουσίες και δευτερευόντως ως προς τη γεύση. Όταν χρησιμοποιείται ο λυκίσκος ως είναι αντί για τα εκχυλίσματά του, τα περιεχόμενα του βραστήρα μεταφέρονται σε άλλο δοχείο, στο οποίο ο χρησιμοποιημένος λυκίσκος συγκρατεί τα περισσότερα ιζήματα που σχηματίζονται. Τα ιζήματα απομακρύνονται φυγοκεντρικά. Με το βρασμό εξατμίζονται πτητικές ουσίες που συνεισφέρουν αρνητικά στη μύρα, όπως το διμεθυλοσουλφίδιο. Επίσης κατά το βρασμό καθορίζεται το χρώμα της μύρας, λόγω της καραμελοποίησης σακχάρων (αντίδραση Maillard).

Οι πρωτεΐνες, κατά το βρασμό, λόγω ανόδου της θερμοκρασίας, μετουσιώνονται και χάνουν την τριτοταγή δομή τους, ενώ καταστρέφονται και οι δεσμοί υδρογόνου με τα μόρια νερού. Έτσι απομακρύνεται το νερό ενυδάτωσης και ευνοείται η κροκίδωση που θα ακολουθήσει. Το pH του ζυθογλεύκου στο βρασμό είναι κοντά στο ισοηλεκτρικό σημείο των περισσότερων πρωτεϊνών, οπότε αυτές έχουν ελάχιστο φορτίο και είτε συσσωματώνονται μεταξύ τους και καταβυθίζονται, είτε αντιδρούν με τις πολυφαινόλες του λυκίσκου και συσσωματώνονται με αυτές. Τα σύμπλοκα πολυφαινολών-πρωτεϊνών αποτελούν το θερμό ίζημα του ζυθογλεύκου που απομακρύνεται μετά το βρασμό, καθώς καθιζάνει σε θερμοκρασία μικρότερη των 60 °C. Ο έντονος βρασμός διευκολύνει την κροκίδωση, και ένδειξη καλής απομάκρυνσης των πρωτεϊνών είναι οι συμπαγείς και μεγάλες νιφάδες συσσωματωμάτων κατά τη διάρκειά του.

Φιλτράρισμα

Μετά το βρασμό, το θερμό ίζημα πρέπει να απομακρυνθεί για να μην επηρεάσει τη σύσταση και το ιξώδες του ζυθογλεύκου. Η απομάκρυνση μπορεί να γίνει με φυσική καθίζηση, φυγοκέντρηση ή διήθηση. Η φυσική καθίζηση έχει ως μειονέκτημα το μεγάλο χρόνο καθίζησης, με επακόλουθο τον αυξημένο κίνδυνο επιμόλυνσης, λόγω μεγαλύτερης έκθεσης του ζυθογλεύκου, την απαίτηση μεγάλης επιφάνειας και την απώλεια ζυθογλεύκου λόγω απορρόφησης στο ίζημα. Η φυγοκέντρηση έχει ως πλεονέκτημα το μικρό χρόνο διαχωρισμού και μικρές απώλειες, αλλά ως μειονέκτημα το κόστος ενέργειας, εγκατάστασης καθώς και την πολυπλοκότητα της εγκατάστασης. Η φυγοκέντρηση με δοχείο Whirlpool απαιτεί επαφτομενική είσοδο του ζυθογλεύκου και διατήρηση στρωτής ροής για να μην καταστραφούν τα συσσωματώματα. Η διήθηση γίνεται με φίλτρα περλίτη ή γης διατόμων και ως μόνο μειονέκτημα έχει το κόστος της.

Το ψυχρό ίζημα σχηματίζεται με ψύξη του ζυθογλεύκου και προσθήκη αέρα. Η απομάκρυνση του ψυχρού ιζήματος μπορεί να γίνει με διήθηση, αλλά χρησιμοποιείται κυρίως η διαδικασία της επίπλευσης. Με την επίπλευση, τα σωματίδια του ιζήματος προσκολλούνται σε φυσαλίδες αέρα και να ανεβαίνουν στην επιφάνεια του ζυθογλεύκου. Το ψυχρό ίζημα δεν απομακρύνεται τελείως, καθώς συνεισφέρει στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της μύρας [Ταταρίδης & Κεχαγιά, 2010].

ΖΥΜΩΣΗ

Η προετοιμασία για τη ζύμωση γίνεται αφού το ζυθογλεύκος καθαριστεί από το λυκίσκο και ψυχθεί. Κατά την ψύξη επιπλέον πρωτεϊνικά προϊόντα και ταννίνες απομακρύνονται ως πήγμα. Συνηθίζεται να προστίθεται αέρας στο ζύθο, καθώς κατά την αρχική ανάπτυξη των ζυμών απαιτείται η ύπαρξη οξυγόνου. Η ζύμωση γίνεται με ζύμες «αφρού», οι οποίες κατά το τέλος της ζύμωσης ανεβαίνουν στην επιφάνεια του υγρού και σχηματίζουν ένα στρώμα ζύμης. Αυτές οι μύρες είναι οι τύπου *A/e* (αφροζύμωτες). Η ζύμωση σε αυτές γίνεται από τον *Saccharomyces cerevisiae*, σε θερμοκρασία 15-23 °C. Άλλοι τύποι μύρας περιλαμβάνουν ζύμες «πυθμένα», που μετά τη ζύμωση κατακρημνίζονται στον πυθμένα, και ονομάζονται *lager* (βυθοζύμωτες). Σε αυτές η ζύμωση γίνεται από τον *Saccharomyces carlsbergensis* σε θερμοκρασίες 6-12 °C.

Η ζύμη αναμιγνύεται με το ζυθογλεύκος, σε θερμοκρασία περίπου 16 °C για ζύμες αφρού και 10 °C για ζύμες πυθμένα. Για κάθε λίτρο ζυθογλεύκους χρησιμοποιούνται 1-2 g συμπιεσμένης ζύμης. Πηγή αζώτου είναι τα αμινοξέα του ζυθογλεύκους και πηγή άνθρακα και ενέργειας τα σάκχαρα γλυκόζη, φρουκτόζη, σακχαρόζη, μαλτόζη και μαλτοτριόζη. Η ζύμωση διαρκεί από 2 έως 10 ημέρες, ανάλογα τις συνθήκες. Η γεύση της μύρας εξαρτάται από την ποιότητα του ζυθογλεύκους και από το μεταβολισμό της ζύμης, με έμφαση να δίνεται στις αντιδράσεις που παράγουν αλκοόλες, αλδεΐδες, κετόνες, δικετόνες, εστέρες, μερκαπτάνες και άλλες θειώδεις ενώσεις [Briggs et al., 1981].

Για τις βυθοζύμωτες μύρες, η ζύμωση διαρκεί περίπου 10 ημέρες. 12-24 h μετά τον εμβολιασμό, γίνεται ορατή η έκλυση διοξειδίου του άνθρακα και η παραγωγή αφρού. Την 3^η ή 4^η ημέρα, οι ζύμες διανύουν την εκθετική φάση τους, με τη ζύμωση να παράγει μεγάλα ποσά θερμότητας. Αυτή η επιπλέον θερμότητα πρέπει να απάγεται, ώστε η θερμοκρασία να μην ξεπεράσει τους 12 °C. Την 5^η ή 6^η ημέρα, αρχίζει να μειώνεται ο ρυθμός της ζύμωσης και παρατηρείται καθίζηση των ζυμών. Τη 10^η ημέρα η μύρα μεταφέρεται σε δοχεία για ωρίμανση ή και μεταζύμωση, με το στάδιο αυτό να διαρκεί μέχρι και 4 μήνες.

Για τις αφροζύμωτες, η διάρκεια της ζύμωσης είναι μικρότερη, μεταξύ 2 με 5 ημέρες, λόγω της υψηλότερης θερμοκρασίας στην οποία πραγματοποιείται. Η θερμοκρασία κυμαίνεται μεταξύ 15-20 °C και η βασική διαφορά έγκειται στην παραγωγή ποτού μεγαλύτερης περιεκτικότητας αλκοόλης. Η μεγαλύτερη περιεκτικότητα αλκοόλης ευνοεί την προστασία της μύρας από ανάπτυξη ανεπιθύμητων μικροοργανισμών. Το διοξείδιο του άνθρακα που παράγεται, λόγω της καθαρότητάς του, μπορεί να συλλεχθεί και να χρησιμοποιηθεί κατά την εμφιάλωση της μύρας [Θωμόπουλος, 1981].

Η ζύμη απομακρύνεται από τη μύρα κατά το τέλος της ζύμωσης. Ένα μέρος της ζύμης αυτής χρησιμοποιείται για εμβολιασμό επόμενων ζυθογλεύκων. Αν η απομάκρυνση όμως γίνει πολύ νωρίς, μειώνεται η μετατροπή των υδατανθράκων σε αλκοόλη, γι' αυτό επιλέγονται ζύμες με τα παρακάτω κριτήρια:

α) ρυθμός και έκταση της ανάπτυξης (μικρή ή και αργή ανάπτυξη παρεμποδίζει τη ζύμωση, ενώ μεγάλη ανάπτυξη μειώνει την απόδοση της παραγωγής αιθανόλης για δεδομένη ποσότητα υδατανθράκων)

β) ρυθμός και έκταση ζύμωσης (επιθυμούνται και τα δύο υψηλά)

γ) άρωμα και γεύση της μύρας (εξαρτάται από τα μεταβολικά μονοπάτια και την παραγωγή μεταβολικών και αρωματικών προϊόντων)

δ) ικανότητα σχηματισμού στρώματος ζύμης στην κορυφή ή τον πυθμένα.

Η θερμοκρασία ζύμωσης παίζει σημαντικό ρόλο, με τις ζύμες αφρού να έχουν ικανοποιητική απόδοση σε εύρος 15-20 °C και τις ζύμες πυθμένα σε εύρος 10-15 °C [Briggs et al., 1981].

ΜΕΤΑΖΥΜΩΤΙΚΕΣ ΕΝΕΡΓΕΙΕΣ

Υπάρχει μια τάση στις νέες μονάδες παραγωγής να απομακρύνεται η ζύμη με φυγοκέντρηση. Μετά από αυτό το στάδιο ακολουθεί η ωρίμανση και η δευτερεύουσα ζύμωση. Η δευτερεύουσα ζύμωση γίνεται με προσθήκη ζυμώσιμων σακχάρων και η θερμοκρασία μειώνεται σταδιακά μέχρι τους 2 °C. Σε αυτή τη θερμοκρασία η μπίρα ωριμάζει, καθώς βελτιώνεται η γεύση της υπό την επίδραση διαφόρων αντιδράσεων. Επίσης, λόγω καθίζησης των ζυμών και πρωτεϊνών που έχουν παραμείνει, γίνεται και διαύγαση της μπίρας. Συνήθως προστίθενται και πρωτεάσες κατά το στάδιο της ωρίμανσης, για αποδόμηση πρωτεϊνών που έχουν παραμείνει. Οι πρωτεΐνες αυτές αυξάνουν τη θολερότητα της μπίρας, οπότε η τεχνική αυτή ευνοεί την επιπλέον διαύγαση της.

Τέλος, ακολουθεί το φιλτράρισμα και η συσκευασία. Κατά το φιλτράρισμα η μπίρα υπόκειται σε ένα επιπλέον στάδιο διαύγασης. Η συσκευασία γίνεται με προσοχή, ώστε να γεμίζονται τελείως τα δοχεία και να μην υπάρχει επαφή της μπίρας με τον αέρα. Το διοξείδιο του άνθρακα που συλλέχθηκε κατά το στάδιο της ζύμωσης χρησιμοποιείται για να συμπληρώσει τυχόν απώλειες στο διαλυμένο διοξείδιο κατά την εμφιάλωση. Μετά τη συσκευασία γίνεται παστερίωση στους 60 °C μέχρι 1 ώρα. Η παστερίωση όμως, παρόλη την προστασία από επιμόλυνση της μπίρας, μακροχρόνια αλλοιώνει τη γεύση της, λόγω της υψηλής θερμοκρασίας στην οποία γίνεται [Θωμόπουλος, 1981].

Είναι απαιτούμενο για τις μπίρες να παραμένουν διαυγείς για αρκετούς μήνες κατά την αποθήκευσή τους σε οποιαδήποτε θερμοκρασία στο εύρος 0-25 °C, να σχηματίζουν αφρό κατά τη μεταφορά τους στο ποτήρι και η γεύση και η περιεκτικότητα σε αέριο να μένουν σταθερές. Τα παραπάνω επιτυγχάνονται με την επιλογή κατάλληλων πρώτων υλών και συνθηκών διεργασίας. Παρόλα αυτά, γίνεται συμπληρωματική κατεργασία μετά τη ζύμωση, όπως προσθήκη πρωτεολυτικών ενζύμων, ή προσροφητικά, όπως συγκεκριμένοι τύποι silica gel, ώστε οι πρωτεΐνες ή πρόδρομες ενώσεις που προκαλούν θολερότητα να μειωθούν [Briggs et al., 1981].

ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΚΡΙΘΑΡΙΟΥ ΚΑΙ ΒΥΝΗΣ

Επεξεργασία των κόκκων

Οι κόκκοι ζυγίζονται κατά την παραλαβή, την αποστολή και σε διάφορα στάδια χειρισμού. Η μεταφορά γίνεται είτε σε μικρές παρτίδες, είτε χύμα. Οι μεταφορείς περιλαμβάνουν ελικοειδείς κοχλίες, κινούμενες ζώνες και ιμάντες. Η κατακόρυφη κίνηση επιτυγχάνεται με ανελκυστήρες κάδων. Επιπλέον, χρησιμοποιούνται πνευματικά συστήματα, με τους κόκκους να κυκλοφορούν σαν ρευστοποιημένη κλίνη σε ρεύμα αέρα. Τα πνευματικά συστήματα είναι ακριβότερα ως προς την εγκατάστασή τους, αλλά είναι ευέλικτα στη λειτουργία τους και αυτοκαθαριζόμενα.

Στην πνευματική βυνοποίηση (pneumatic malting) οι κόκκοι βλαστάνουν σε κλίνη πάχους 1 m ή παραπάνω. Η ανάδευση είναι μηχανική και η κλίνη αερίζεται με ροή αέρα ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας και κορεσμένου με υδρατμούς. Σε ιδανική περίπτωση ο αέρας εξέρχεται κορεσμένος σε υδρατμούς. Λόγω μεταφοράς και θερμότητας από τους κόκκους, ο

θερμότερος αέρας που απομακρύνεται, περιέχει περισσότερους υδρατμούς, αφυδατώνοντας τους κόκκους.

Φρύξη

Η φρύξη σε κλίβανο παράγει ένα ξηρό προϊόν, σταθερό κατά την αποθήκευση, από το οποίο οι ρίζες μπορούν να απομακρυνθούν εύκολα. Επιπλέον προσδίδει άλλο γευστικό χαρακτήρα και χρώμα στη βύνη, μειώνοντας το ενζυματικό δυναμικό της. Το χρώμα της βύνης αναπτύσσεται:

α) ελάχιστα σε χαμηλότερες θερμοκρασίες στεγνών βυνών και με μικρή ποσότητα εκχυλίσματος σε κρύο νερό και

β) πολύ σε υψηλές θερμοκρασίες υγρών βυνών, πλουσίων σε εκχυλίσματα σε κρύο νερό και σε διαλυτές αζωτούχες ενώσεις.

Αυτές οι συνθήκες ορίζουν τους τύπους συνταγών για (α) θολές, υψηλής περιεκτικότητας σε ένζυμα και (β) σκούρες, αρωματικές και χαμηλής περιεκτικότητας σε ένζυμα βύνες. Στα πλαίσια όμως της ενεργειακής οικονομίας, γίνεται προσπάθεια χρήσης βυνών κατεργασμένων σε κλίβανο σε χαμηλότερες θερμοκρασίες, καθώς και διαφορετικά καύσιμα, τα οποία διαφοροποιούν το χαρακτήρα της βύνης. Το διοξείδιο του θείου για παράδειγμα οξινίζει και αποχρωματίζει μερικώς τη βύνη, ελαχιστοποιεί το σχηματισμό νιτροζαμινών και αυξάνει το επίπεδο διαλυτότητας αζώτου.

Οι κλίβανοι έχουν εξελιχθεί λόγω απαίτησης καλύτερου ελέγχου ξήρανσης. Οι φούρνοι είναι ευκολότερα ρυθμιζόμενοι, με τον αέρα να διαβιβάζεται από υπόγειο κανάλι και να μοιράζεται ομοιόμορφα στο θάλαμο κάτω από το διάτρητο δάπεδο που βρίσκονται οι κόκκοι είτε μέσω επεξεργασμένων τούβλων ή διασκορπιστή. Οι καμινάδες έχουν αδιάβροχο κάλυμμα και είναι περιστρεφόμενες, για να αποφευχθεί η αναρροή καπνού από ρεύματα αέρα. Τα καύσιμα ελέγχονται για ύπαρξη αρσενικού και υπάρχουν διατάξεις για κατακράτηση αερίων που πιθανόν περιέχουν αρσενικό

Η διαμερισματική βυνοποίηση χρησιμοποιείται ευρέως και ποικίλλει ως προς την κατασκευή των μηχανημάτων. Αποτελούνται από ανοιχτά δοχεία με μεταλλική βάση με σχισμές. Ο αέρας διαβιβάζεται από τη βάση. Οι παράλληλες πλευρές περιλαμβάνουν εξοπλισμό για ανάδευση και ψεκασμό. Σε ορισμένα τέτοια δοχεία περιλαμβάνεται και το στάδιο της ξήρανσης, με ροή θερμού αέρα.

Άλεση

Κατά την ξηρή άλεση, υπάρχουν δυο μονάδες λειτουργίας, συγκεκριμένα μια για μείωση μεγέθους και μια για έλεγχο μεγέθους σωματιδίων μέσω κοσκίνισης. Στους σύγχρονους μύλους, οι πρώτοι κύλινδροι άλεσης παραλαμβάνουν τους κόκκους από την τροφοδοσία έτσι ώστε η θραύση να γίνει κατά μήκος των δημητριακών και το κέλυφος να μείνει άθικτο. Το λιγότερο τροποποιημένο τμήμα του ενδοσπέρματος μπορεί να μείνει προσκολλημένο στο κέλυφος, και είναι απαραίτητη η απομάκρυνσή του ύστερα την αρχική θραύση, αλλά χωρίς υπερβολική ζημιά στο κέλυφος. Το ενδόσπερμα και το έμβρυο αλέθονται όσο το δυνατόν προς δημιουργία λεπτών κόκκων, παρά αλεύρου. Αυτό προϋποθέτει προσεκτική τοποθέτηση των κυλίνδρων άλεσης ως προς τις αποστάσεις μεταξύ τους.

Στην υγρή άλεση, η τροφοδοσία βύνης γίνεται από χοάνη εξοπλισμένη με ψεκαστήρες νερού στην κορυφή της. Η βύνη, μετά τον εμποτισμό της, οδηγείται σε κυλίνδρους θραύσης και, ύστερα από τη θραύση, σε θάλαμο ανάμιξης. Στο θάλαμο ανάμιξης ψεκάζεται με νερό

κατάλληλης θερμοκρασίας. Με αντλία, η βύνη μεταφέρεται σε δοχείο πολτοποίησης. Γενικά τα τέσσερα βήματα στην υγρή άλεση είναι: εμβάπτιση βύνης στη χοάνη, αποστράγγιση νερού από τη χοάνη, άλεση και πολτοποίηση, και ξέπλυμα της χοάνης και του μύλου. Κύριο πλεονέκτημα της υγρής άλεσης είναι η απουσία κινδύνων σχετικών με σκόνη και έκρηξη λόγω ανάφλεξης, ενώ ως μειονέκτημα θεωρείται η κατά παρτίδες άλεση, ενώ στην ξηρή άλεση η διεργασία είναι συνεχής.

Συστήματα πολτοποίησης

Η πολτοποίηση της βύνης για παραλαβή ζυθογλεύκου, γίνεται με διάφορους τρόπους. Συγκεκριμένα υπάρχουν:

- α) το σύστημα πολτοποίησης με έγχυση,
- β) το σύστημα αλέσεως χωρίς προσθήκη επιπλέον νερού (decoction mashing system),
- γ) το σύστημα διπλής πολτοποίησης και
- δ) πολτοποίηση ελεγχόμενη από τη θερμοκρασία.

Το σύστημα πολτοποίησης με έγχυση περιλαμβάνει την ανάμιξη του αλεσμένου υλικού με θερμό νερό. Το νερό προστίθεται ελεγχόμενα, ώστε ο πολτός να έχει τελική θερμοκρασία περίπου 65 °C και χυλώδη υφή. Η παραγωγή γλυκού ζύθου γίνεται σε βαρέλι, το οποίο έχει βάση με εγκοπές. Η βάση αυτή δρα σαν κόσκινο. Για να ξεπλυθεί όλο το ζυθογλεύκος από τους κόκκους που δεν έχουν αποικοδομηθεί ενζυματικά, ψεκάζεται επιπλέον θερμό νερό θερμοκρασίας περίπου 80 °C στην επιφάνεια του βαρελιού, το οποίο νερό αναφέρεται ως θερμό υγρό (hot liquor) από τους ζυθοποιούς.

Το σύστημα αλέσεως χωρίς επιπλέον νερό, διαφέρει από το σύστημα έγχυσης ως προς το επίπεδο αποικοδόμησης του ενδοσπέρματος της βύνης. Το ενδόσπερμα είναι συνήθως λιγότερο αποικοδομημένο και απαιτεί μεγαλύτερη ενζυματική δράση κατά την πολτοποίηση. Αυτό επιτυγχάνεται με περαιτέρω άλεση και προσθήκη νερού χαμηλότερης θερμοκρασίας, περίπου 35 °C. Η πρωτεόλυση και η διαλυτοποίηση γίνονται σε μεγαλύτερο βαθμό. Κατά τη μετατροπή το ένα τρίτο συνήθως του πολτού βράζεται σε χάλκινο βραστήρα και επιστρέφεται στον υπόλοιπο πολτό για ανάμιξη. Η θερμοκρασία αυξάνεται έως τους 50 °C. Ύστερα, πάλι το ένα τρίτο του πολτού απομακρύνεται και βράζεται, ενώ κατά την επιστροφή του, η θερμοκρασία φτάνει τους 65 °C, επιταχύνοντας τη διάσπαση του αμύλου. Μετά από ένα τελευταίο ξεχωριστό βράσιμο πάλι ενός τρίτου του πολτού, η ενζυματική δραστηριότητα παύει στον ενιαίο πολτό, ο οποίος έχει φτάσει θερμοκρασία 75 °C. Το ζυθογλεύκος απομακρύνεται από τους κόκκους είτε με ένα τύπο δοχείου, το βαρέλι διαχωρισμού (lauter tun), είτε με φίλτρο.

Το σύστημα διπλής πολτοποίησης έχει κοινά χαρακτηριστικά με τις δυο παραπάνω μεθόδους. Χρησιμοποιείται βύνη μεγαλύτερης περιεκτικότητας σε ένζυμα, η οποία αλέθεται και αναμιγνύεται με νερό θερμοκρασίας 38° C. Μη βυνοποιημένα δημητριακά, συνήθως αραβόσιτος ή ρύζι, αναμιγνύονται με λίγη βύνη, αλέθονται και θερμαίνονται προσεκτικά στους 100 °C. Οι δυο πολτοί αναμιγνύονται ύστερα έως ότου να επιτευχθεί θερμοκρασία 70° C, ενώ σε επόμενο στάδιο διατηρείται στους 73 °C για μια ώρα περίπου. Το ζυθογλεύκος διαχωρίζεται από τους κόκκους σε βαρέλι διαχωρισμού.

Τέλος, το σύστημα ελεγχόμενης θερμοκρασιακά πολτοποίησης περιλαμβάνει θέρμανση με ατμό ή θερμό νερό υψηλής πίεσης σε συγκεκριμένη θερμοκρασία σε συγκεκριμένη χρονική στιγμή [Briggs et al., 1981].

Συστήματα Βρασμού

Ο βρασμός μπορεί να γίνει σε ανοιχτό δοχείο διπλού πυθμένα, σε δοχείο βρασμού με εξωτερικό ή εσωτερικό βραστήρα, σε κλειστό δοχείο με συμπίεση των υδρατμών και σε σύστημα υψηλής θερμοκρασίας. Η υψηλή θερμοκρασία δε συνηθίζεται πια, λόγω της κακής απομάκρυνσης των οσμηρών συστατικών και του κακού σχηματισμού κροκιδωμάτων. Βασικό μειονέκτημα στη χρήση εξωτερικού βραστήρα είναι η χρήση αντλίας, που, λόγω των δυνάμεων διάτμησης που αναπτύσσει, καταστρέφει τη δομή των συσσωματωμάτων [Ταταρίδης & Κεχαγιά, 2010].

NON-SACCHAROMYCES ΖΥΜΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΠΥΡΑΣ

Εισαγωγή

Οι ζύμες δρουν μετατρέποντας τα σάκχαρα του ζυθογλεύκου (γλυκόζη, φρουκτόζη και μαλτόζη) σε αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα, μέσω της διαδικασίας της αλκοολικής ζύμωσης. Οι ζύμες λειτουργούν υπό αναερόβιες συνθήκες, μετατρέποντας τα σάκχαρα σε πυροσταφυλικό οξύ μέσω της γλυκολιτικής οδού και αυτό μετατρέπεται ύστερα σε αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα [Querol et al., 2018].

Ως ζύμη συνήθως αναφέρονται οι ζυμομύκητες *Saccharomyces cerevisiae*, οι οποίοι μεταβολίζουν σάκχαρα είτε παρουσία είτε απουσία αέρα. Παρουσία αέρα παράγονται ως τελικά προϊόντα διοξείδιο του άνθρακα και νερό, ενώ απουσία αέρα, αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα. Στο εμπόριο, η ζύμη μπορεί να βρεθεί σε δυο μορφές, τη συμπιεσμένη και την ξηρή μορφή. Η συμπιεσμένη μορφή είναι διαθέσιμη σε κύβους. Σε κατάλληλη συσκευασία κερωμένου χαρτιού και απουσία αέρα η ζύμη διατηρείται για μερικές εβδομάδες σε θερμοκρασία 4 °C. Σε αυτό το διάστημα οι ζύμες διατηρούνται καταναλώνοντας εσωτερικά αποθέματα ενέργειας, όπως γλυκογόνο και τρεχαλόζη. Η ξηρή μορφή έχει μεγαλύτερη διάρκεια ζωής από τη συμπιεσμένη και διατηρείται σταθερή ακόμα και σε θερμοκρασία δωματίου. Η ξηρές ζύμες διακρίνονται σε ενεργές και στιγμιαίες. Οι ενεργές απαιτούν ενυδάτωση πριν τη χρήση τους ενώ οι στιγμιαίες όχι [Holtzapfle, 1983].

Οι μεγάλες εταιρείες ζυθοποιίας παρασκευάζουν και αποθηκεύουν τα δικά τους στελέχη ζυμών, καθώς και τις κύριες καλλιέργειες, παρόλη την ύπαρξη προμηθευτών καλλιέργειας ζύμης. Επιπλέον, σε ορισμένα ζυθοποιεία, γίνεται εμβολιασμός ζύμης από τη μια παρτίδα ζύμωσης στην επόμενη. Ο εμβολιασμός αυτός γίνεται για περίπου 10-15 γενιές.

Η επιδίωξη συνεχούς ελέγχου απόδοσης της ζύμωσης έχει ως αποτέλεσμα τη δοκιμή νέων τεχνικών. Για παράδειγμα, η βιωσιμότητα των κυττάρων παραδοσιακά εκτιμάται με τη χρήση της χρωστικής μπλε του μεθυλενίου. Νέες μέθοδοι έχουν προταθεί, όπως εκτίμηση επιπέδων γλυκογόνου, ATP ή στερολών μπορούν να εφαρμοστούν για εκτίμηση της ζυτικότητας, αλλά καμία δεν έχει υιοθετηθεί παγκοσμίως. Άλλοι τρόποι παρακολούθησης της ζύμωσης περιλαμβάνουν τη μέτρηση της πτώσης του ειδικού βάρους της, τη μείωση pH, το σχηματισμό αιθανόλης και τη συγκέντρωση διοξειδίου του άνθρακα. Επίσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί και κάμερα για οπτικό έλεγχο στο ζυμωτήρα [Bokulich & Bamforth, 2013].

Saccharomyces cerevisiae

Ο *Saccharomyces cerevisiae* θεωρείται κυρίαρχος μικροοργανισμός στην αλκοολική ζύμωση, λόγω της μεγαλύτερης αντοχής του σε διάφορες συνθήκες. Συγκεκριμένα, παρουσιάζει αντοχή σε χαμηλό pH, υψηλές συγκεντρώσεις διοξειδίου του θείου, αναπτύσσεται υπό συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης σακχάρων και αιθανόλης (μέχρι και 15%) και σε υψηλές θερμοκρασίες (μέχρι 37 °C). Ως προς τη θερμοκρασία, η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξής του είναι 32.3 °C, καθιερώνοντάς τον ως τη ζύμη που προσαρμόζεται και αναπτύσσεται καλύτερα σε υψηλές θερμοκρασίες.

Non-*Saccharomyces* ζύμες

Στη σημερινή εποχή παρατηρείται μια απομάκρυνση των καταναλωτών από τα συμβατικά αλκοολούχα ποτά και έλξη τους από νέα προϊόντα, χαρακτηριζόμενα είτε από νέες γεύσεις, είτε από μικρότερη περιεκτικότητα σε αλκοόλη. Ιδιαίτερα, η χαμηλότερη περιεκτικότητα σε αλκοόλη συμβαδίζει με την επίσης σύγχρονη ευαισθητοποίηση των καταναλωτών σχετικά με την κατανάλωση αλκοόλ και την οδήγηση.

Για τους παραπάνω λόγους η επιλογή στελεχών ζυμών, έχει επεκταθεί και σε ζύμες εκτός του *S. cerevisiae*, γνωστές ως non-*Saccharomyces* ή εναλλακτικές ζύμες. Παλιότερα, θεωρούνταν δευτερεύουσας σημασίας και ανεπιθύμητες, καθώς αλλοίωναν το προϊόν. Επειδή γενικά ζυμώνουν πιο αργά και έχουν μικρότερες αντοχές από τον *S. cerevisiae*, χρησιμοποιούνται στελέχη του, μαζί με επιλεγμένα στελέχη *Non-Saccharomyces* ζυμών σε μικτές καλλιέργειες. Η διαχείριση επίσης των μικτών καλλιεργειών κατά τη ζύμωση θα επιτρέψει στους παραγωγούς να ικανοποιήσουν τις ανάγκες της αγοράς σε νέες γεύσεις στα προϊόντα. Η ποικιλία των non-*Saccharomyces* ζυμών που βρίσκεται κατά την αυθόρμητη ζύμωση και στα αρχικά στάδια εξηγείται από παράγοντες όπως κλίμα, τοποθεσία, χρήση ή μη φυτοφαρμάκων και τις αγρονομικές τεχνικές [Padilla & Manzanaras, 2016].

Υπάρχει μεγάλος αριθμός ειδών non-*Saccharomyces* και η επιρροή τους στη ζύμωση είναι εμφανής κυρίως στα πρώτα στάδια. Οι non-*Saccharomyces* ζύμες μπορούν να αναστείλουν την ανάπτυξη του *S. cerevisiae* σε διαδοχικά εμβολιασμένες μικτές καλλιέργειες, καταναλώνοντας θρεπτικά συστατικά πριν τον εμβολιασμό του *S. cerevisiae*, αν αυτά δε συμπληρώνονται. Επίσης μπορεί να συμβεί και το αντίθετο, καθώς μεταβολίτες που παράγει ο *S. cerevisiae* μπορεί να περιορίσουν την ανάπτυξη των non-*Saccharomyces* ζυμών [Varela, 2016].

Παρόλη την κυρίαρχη θέση των *Saccharomyces* ζυμών, ο αρχικός πληθυσμός τους τα σταφύλια, στην περίπτωση του κρασιού, είναι πολύ χαμηλός. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης όμως, επιβιώνει κυρίως ο *S. cerevisiae*, λόγω της αύξησης των επιπέδων αιθανόλης, των αναερόβιων συνθηκών και της παραγωγής διοξειδίου του θείου, το οποίο έχει αντιμικροβιακή δράση [Querol et al., 2018]. Σε γραπτά του Louis Pasteur, επιβεβαιώνεται η παραπάνω παρατήρηση. Συγκεκριμένα, παρατήρησε 2 κυρίαρχους τύπους ζυμών, μια στην αρχή της ζύμωσης και μια σε επόμενα στάδια. Το πρώτο είδος ήταν το *Hanseniaspora uvarum* και το δεύτερο ο *S. cerevisiae* [Padilla & Manzanaras, 2016]. Το γεγονός ότι ο *S. cerevisiae* βρίσκεται σε χαμηλούς αρχικούς πληθυσμούς στα υγιή σταφύλια οφείλεται σε στελέχη ζυμών *Hanseniaspora*, τα οποία αποτελούν την πλειοψηφία της μικροχλωρίδας στην επιφάνεια των σταφυλιών. Επιπλέον, άλλα είδη non-*Saccharomyces*, όπως *Candida*,

Brettanomyces, *Pichia*, *Metschnikowia*, *Kluyveromyces* και άλλα συμπληρώνουν τη μικροχλωρίδα των σταφυλιών. Κατά τη ζύμωση, οι πληθυσμοί των παραπάνω ζυμών φτάνουν το μέγιστο των 10^6 - 10^7 κύτταρα/mL και μειώνονται όταν τα επίπεδα αιθανόλης ξεπεράσουν το 6%, λόγω της δράσης του *S. cerevisiae* [Flagfeldt et al., 2009].

Οι non-*Saccharomyces* ζύμες συνεισφέρουν κυρίως σε δευτερογενείς μεταβολίτες, επηρεάζοντας έτσι την ποιότητα του τελικού προϊόντος [Ocon et al., 2010]. Εκτός από νέα αρώματα και γεύσεις, άλλα οφέλη από τη χρήση των non-*Saccharomyces* ζυμών είναι η μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε γλυκερίνη, άρα και περισσότερη αίσθηση στο στόμα. Για εύρεση νέων στελεχών ζυμών για ζύμωση βύνης αναπτύχθηκε ένα σύστημα διαλογής των non-*Saccharomyces* ζυμών με κριτήριο την ικανότητα ζύμωσης. Τα βασικά χαρακτηριστικά που πρέπει να έχουν οι ζύμες είναι:

- η ικανότητα μεταβολισμού των σακχάρων της βύνης, δηλαδή γλυκόζης φρουκτόζης και μαλτόζης
- η ικανότητα αξιοποίησης των αμινοξέων, που διαφέρει μεταξύ ειδών αλλά και μεταξύ στελεχών
- η δυνατότητα ανάπτυξης σε περιβάλλον λυκίσκου και
- η αντοχή στην αιθανόλη και η ικανότητα παραγωγής αλκοόλης.

Ύστερα από επιλογή των κατάλληλων ζυμών, ακολουθεί η ανάπτυξη αποικιών των στελεχών, με στόχο την απόκτηση μεγάλης ποσότητας βιομάζας καλής ποιότητας, δηλαδή ζωτικότητας και βιωσιμότητας [Flagfeldt et al., 2009].

Όπως ο *S. cerevisiae*, έτσι και οι non-*Saccharomyces* ζύμες παρουσιάζουν τις 4 τυπικές φάσεις ανάπτυξης: υστέρησης, εκθετική, στάσιμη και θανάτου. Αυτό που διαφέρει είναι η διάρκεια της εκθετικής φάσης, καθώς οι non-*Saccharomyces* ζύμες αναπτύσσονται πριν τον *S. cerevisiae*, κατά τη διάρκεια των ζυμώσεων και έχουν συνήθως μικρότερες συγκεντρώσεις κατά τη στάσιμη φάση τους.

Στις ζυμώσεις ποτών, η ανάπτυξη των ζυμών υποβάλλεται σε περιορισμούς λόγω των θρεπτικών συστατικών. Η βιομάζα που λαμβάνεται αυξάνεται όσο μεγαλύτερη είναι η αρχική συγκέντρωση αζώτου στο μούστο ή στο γλεύκος (για τις περιπτώσεις κρασιού και μπύρας). Έτσι το άζωτο είναι περιοριστικό υπόστρωμα. Επιπλέον, μεταβολίτες που παράγονται, όπως η αιθανόλη και λιπαρά οξέα μέσης αλύσου, μειώνουν το ρυθμό και τελικά παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των ζυμών. Τοξίνες που παράγονται από ορισμένες ζύμες (killer toxins) κατά την εκθετική φάση τους, επίσης παρεμποδίζουν την ανάπτυξη.

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η διαφορά στις συγκεντρώσεις βιομάζας μεταξύ του *S. cerevisiae* και των non-*Saccharomyces* ζυμών οφείλεται στις μεγαλύτερες απαιτήσεις των non-*Saccharomyces* ζυμών σε ορισμένα θρεπτικά συστατικά και στη μεγαλύτερη ευαισθησία τους σε παρεμποδιστικούς παράγοντες [Nissen, et al., 2003].

Torulasporea delbrueckii

Η *T. delbrueckii* έχει τραβήξει το επιστημονικό ενδιαφέρον προσφάτως, λόγω της μεγάλης ωσμωτικής αντοχής της, της ανθεκτικότητάς της σε κατάψυξη και της ικανότητάς της να αυξάνει σε μέγεθος τη ζύμη του ψωμιού, όπως και ο *S. cerevisiae*. Άλλα χαρακτηριστικά της είναι η αποτελεσματική ζύμωση γλυκόζης και μαλτόζης και η μεγάλη παραγωγή βιομάζας σε σακχαρόζη [Alves-Araujo et al., 2007]. Παράγει επιπλέον μικρές ποσότητες από ανεπιθύμητες πτητικές ενώσεις, όπως υδρόθειο και πτητικές φαινόλες, μειώνοντας έτσι την πτητική οξύτητα. Η *T. delbrueckii* επιπλέον χρησιμοποιείται και στη ζύμωση άλλων τροφίμων,

όπως χορτάρι (silage), κακάο, ελιές και αγγούρι, και ποτών όπως τεκίλα, μηλίτη, χυμό από ζαχαροκάλαμο και κεφίρ (προϊόν ζύμωσης γάλακτος, διαφορετικό από γιαούρτι) [Albertin et al., 2014].

Στελέχη της *T. delbrueckii* χρησιμοποιούνται για την παραγωγή της γερμανικής θολής (Weiss) μπύρας, λόγω των γεύσεων μπανάνας και γαρύφαλλου που προσφέρει. Επίσης παράγει δευτερογενείς μεταβολίτες, όπως τερπένια, ανώτερες αλκοόλες και εστέρες σε μεγαλύτερες ποσότητες, δίνοντας στο προϊόν πιο φυσικές και σχετιζόμενες με αυθόρμητη ζύμωση γεύσεις [Ταταρίδης et al., 2013].

Ως προς την ανάπτυξή της σε περιβάλλον πλούσιο σε οξυγόνο, αλλά φτωχό σε γλυκόζη, παρουσιάζει παρόμοια παραγωγή βιομάζας σε σχέση με τον *S. cerevisiae*. Με τη μείωση της παροχής οξυγόνου σε επίπεδα που ο *S. cerevisiae* θα άλλαζε το μεταβολικό μονοπάτι του από 'αναπνευστικό' σε 'ζυμωτικό' η *T. delbrueckii* συντηρείται πλήρως από τις αερόβιες συνθήκες. Σε πλήρως αναερόβιες συνθήκες όμως, η *T. delbrueckii* αναπτύσσεται λιγότερο από άποψη βιομάζας από ότι ο *S. cerevisiae*.

Σε πρότυπα υποστρώματα γλυκόζης/μαλτόζης, παρατηρήθηκε παρόμοια συμπεριφορά με τον *S. cerevisiae*, με τη διαφορά ότι η *T. delbrueckii* ζύμωσε αυστηρά με προτεραιότητα τη γλυκόζη, ενώ ο *S. cerevisiae* κατανάλωνε και μαλτόζη, πριν καταναλωθεί όλη η γλυκόζη. Αυτή η διαφορά όμως στη ζύμωση, μπορεί να οδηγήσει σε καθυστερημένη παραγωγή CO₂ από την πλευρά της *T. delbrueckii*, το οποίο είναι ανεπιθύμητο. Επιπλέον, η ανασταλτική συμπεριφορά της μαλτόζης στη ζύμωση, λόγω του ότι είναι δισακχαρίτης και απαιτείται η διάσπασή του ως επιπλέον βήμα, παρατηρείται και στην *T. delbrueckii* [Alves-Araujo, 2007].

Η *T. delbrueckii* έχει την ικανότητα να μετατρέπει τα τερπενοειδή του λυκίσκου, ενισχύοντας το αρωματικό προφίλ της τελικής μπύρας. Σε πειραματική μελέτη πάνω στη χρήση της ζύμης αυτής για την παραγωγή μπύρας τύπου Weiss, αποδείχθηκε ότι η *T. delbrueckii* καταναλώνει τη μαλτόζη πιο αργά από τον *S. cerevisiae*, προσφέροντας μεγαλύτερη ένταση στα οργανοληπτικά του τελικού προϊόντος. Επίσης, η αργή κατανάλωση της μαλτόζης ευνοεί και την παραγωγή χαμηλής περιεκτικότητας σε αλκοόλ μπύρας. Πειραματικά έχει δειχθεί ότι η επιρροή της *T. delbrueckii* στην περίπτωση μικτής καλλιέργειας με τον *S. cerevisiae* US-05 είναι μεγαλύτερη σε αναλογίες εμβολιασμού 1:10 ή 1:20 [Canonico et al., 2016].

Metschnikowia pulcherrima

Η *Metschnikowia pulcherrima* διακρίνεται για την παραγωγή φαινυλαιθυλικής αλκοόλης, η οποία σχετίζεται με ευχάριστα αρώματα [Padilla & Manzanares, 2016]. Επίσης, μαζί με το είδος *Pichia*, αναφέρονται στη βιβλιογραφία ως οι πιο συνηθισμένες από τις non-*Saccharomyces* ζύμες που βρίσκονται στα σταφύλια και κατά τα πρώτα στάδια της ζύμωσης [Ocon et al., 2010].

Brettanomyces (ως είδος)

Ορισμένα στελέχη του είδους *Brettanomyces* έχουν χρησιμοποιηθεί στις αλκοολικές ζυμώσεις. Ο *Brettanomyces bruxellensis* είναι γνωστός για τα αρώματα στάβλου και την οξύτητα που προσδίδει σε μικτές καλλιέργειες των μπυρών lambic. Άλλα αρώματα που προσδίδει είναι φρουτώδη και φαινολικά, ενώ ορισμένες φορές έχουν χαρακτηριστεί και ως πικρά ή μεταλλικά. Επίσης είναι η πιο γνωστή αλλοιογόνος ζύμη στο κρασί. Ο *B. bruxellensis* παράγει αρκετούς αιθυλεστέρες και έχει τη δυνατότητα να μεταβολίσει πολύπλοκα

σάκχαρα, όπως μαλτοτετρόζη και μαλτοπεντόζη, αλλά αραιώνοντας τη γεύση της μύρας έτσι και δίνοντας ξηρή αίσθηση στο στόμα.

Ως προς τα πτητικά συστατικά, τα περισσότερα στελέχη του παράγουν μεγάλες ποσότητες από καπροϊκό αιθύλιο (αρώματα ανανά) και καπριλικό αιθύλιο (αρώματα κεριού, μπαγιάτικου). Αυτή η παραγωγή εστέρων μπορεί, ελεγχόμενη, να παράξει μύρες με πολύπλοκο αρωματικό προφίλ. Από την άλλη όμως, σε ζυμώσεις με τον *B. bruxellensis* έχουν βρεθεί πολύ μικρές ποσότητες από οξικό αμυλεστέρα, επιθυμητής ουσίας στις μύρες σιταριού (Weiss). Αυτό εξηγείται από την ικανότητά του να διασπά αυτή την ένωση. Τέλος, ως προς το χρόνο ζύμωσης, η βιβλιογραφία αναφέρει ότι ο *B. bruxellensis* ζυμώνει πολύ αργά σε σχέση με τον *S. cerevisiae* [Michel et al., 2016].

Ο *Brettanomyces anomalus*, όπως και ο *bruxellensis*, χρησιμοποιείται κατά την παραγωγή των lambic μπυρών, ενώ στη βιομηχανία αναψυκτικών θεωρείται αλλοιογόνος ζύμη. Λόγω της δράσης της β-γλυκοζιδάσης, μπορεί να υδρολύσει μονοτερπένια συνδεδεμένα με γλυκοζίτες, ελευθερώνοντάς τα ως ενεργές ουσίες που προσφέρουν στο άρωμα. Ο *B. anomalus* μπορεί να μεταβολίσει οξέα όπως το p-κουμαρικό και φερουλικό οξύ και να σχηματίσει φαινολικές αρωματικές ενώσεις, όπως η 4-βινυλγουαϊκόλη και η 4-βινυλφαινόλη.

Με μείωση του αρχικού pH του γλεύκους, για παράδειγμα με προσθήκη γαλακτικού οξέος, ευνοεί τη ζύμη αυτή στην παραγωγή ενεργών αρωματικών ουσιών. Η απόδοση της ζύμωσης, όμως, σε σχέση με την παραγωγή αιθανόλης και άλλων αρωμάτων είναι χαμηλή, λόγω του χρόνου και των υψηλών θερμοκρασιών που απαιτούνται [Michel et al., 2016].

Άλλες non-*Saccharomyces* ζύμες

Candida

Η *Candida shehatae* είναι γνωστή για την ικανότητά της να μεταβολίζει την ξυλόζη προς παραγωγή αιθανόλης. Έχει μελετηθεί κυρίως για τη ζύμωση της D-ξυλόζης και, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, παράγει αιθανόλη με υψηλή απόδοση. Επίσης ανάγει τα μονοτερπένια του λυκίσκου σε ενεργές αρωματικές ενώσεις.

Η *Candida tropicalis* χρησιμοποιείται κυρίως σε μικτές ζυμώσεις παραδοσιακών αναψυκτικών σε χώρες της Αφρικής και βρίσκεται σε πολλά ζυμωμένα τρόφιμα αυτών των περιοχών. Τα προϊόντα αυτά είναι κυρίως αυθόρμητα ζυμωμένα από την *C. tropicalis* και τα βακτήρια LAB (lactic acid bacteria). Μια παράμετρος που πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψη όταν χρησιμοποιείται αυτή η ζύμη είναι η δυνητική παθογένειά της [Michel et al., 2016].

Saccharomyces ludwigii

Ο *S. ludwigii* αδυνατεί να ζυμώσει μαλτόζη και μαλτοτριόζη, παράγοντας έτσι μύρες με χαμηλή περιεκτικότητα σε αλκοόλ, αλλά με επιθυμητές γεύσεις και αρώματα και χρησιμοποιείται συχνά λόγω αυτής της ιδιότητάς του. Χρησιμοποιείται σε ζυθοποιεία της Γερμανίας της Τσεχίας και της Ιταλίας. Άλλο χαρακτηριστικό του είναι η υψηλή αντοχή του σε περιβάλλον αιθανόλης και διοξειδίου του θείου. Οι μύρες που παράγονται με αυτή τη ζύμη φτάνουν περιεκτικότητα σε αλκοόλ περίπου 0,5% v/v [Michel et al., 2016].

Zygosaccharomyces rouxii

Χαρακτηριστικό του *Z. rouxii* είναι η κατανάλωση αιθανόλης υπό αναερόβιες συνθήκες προς παραγωγή ενεργών αρωματικών ουσιών στη μύρα. Χρησιμοποιείται για παραγωγή μύρας με χαμηλή περιεκτικότητα ή χωρίς αλκοόλη. Στη βιομηχανία τροφίμων θεωρείται γενικά αλλοιογόνος ζύμη, λόγω της μεγάλης αντοχής του σε περιβάλλον σακχάρων και αλάτων. Ως προς τους δευτερογενείς μεταβολίτες, παράγει μεγάλες ποσότητες από οξικό αιθυλεστέρα, αμυλικής και ισοαμυλικής αλκοόλης και μικρές από ανεπιθύμητα οξέα. Το εύρος όμως των ποσοτήτων επιθυμητών και ανεπιθύμητων αρωμάτων είναι μεγάλο, καθώς η βιβλιογραφία παρουσιάζει αντικρουόμενα αποτελέσματα [Michel et al., 2016].

Pichia kluyveri

Η *P. kluyveri* είναι ικανή να ζυμώνει μόνο τη γλυκόζη του γλεύκους, παράγοντας χαμηλά επίπεδα αιθανόλης, αλλά υψηλά σε επιθυμητά αρώματα. Η παραγωγή αρωμάτων οφείλεται στη μετατροπή ουσιών του λυκίσκου σε αρωματικές. Παράγει επίσης υπολογίσιμες ποσότητες πτητικών θειολών, όπως οξικό 3-μερκαπτοεξύλιο (άρωμα φρούτων του πάθους) και 3-μερκαπτοεξαν-1-όλη (άρωμα γκρέιπφρουτ). Η ταχύτητα ζύμωσής της σε ζύμωση τεκίλας ήταν υψηλή, συγκρινόμενη με τον *S. cerevisiae*. Παρόλα αυτά, η εμπορική χρήση της δεν έχει εφαρμοστεί ακόμη [Michel et al., 2016].

Αυθόρμητη ζύμωση

Η αυθόρμητη ζύμωση έγκειται στην απουσία εμβολιασμού ζύμης, περιλαμβάνει τη δράση διαφόρων μικροοργανισμών και χρησιμοποιείται στην εμπορική παραγωγή πολλών αλκοολούχων ποτών. Οι ζύμες *Saccharomyces* και non-*Saccharomyces* είναι κυρίως υπεύθυνες για αυθόρμητη ζύμωση και αναφέρονται ως αυτόχθονες ζύμες, για να ξεχωρίζονται από τις εξωγενώς προστιθέμενες.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι οι lambic βελγικές μύρες, οι οποίες ζυμώνονται από ζύμες και βακτήρια που αναπτύσσονται φυσικά στο ζυθογλεύκος. Οι μύρες αυτές, μετά την ανάπτυξη των ζυμών μεταφέρονται σε δρύινα βαρέλια και αφήνονται να ζυμωθούν μέχρι και 3 χρόνια. Τον πρώτο μήνα δρουν κυρίως τα εντεροβακτήρια και non-*Saccharomyces* ζύμες, παράγοντας ουσίες υπεύθυνες για το άρωμα της μύρας. Ύστερα, κυριαρχούν βακτήρια LAB και είδη *Saccharomyces*, για περίπου 3-4 μήνες. Από εκεί και ύστερα, αναλαμβάνει η ζύμη *Brettanomyces bruxellensis* μέχρι το τέλος της ζύμωσης. Συνήθως οι lambic ενός έτους και τριών ετών αναμιγνύονται και επαναζυμώνονται. Έτσι παράγονται επιπλέον αρώματα, λόγω την επανανάπτυξης του *Brettanomyces*. Πολλές μοναστηριακές μύρες επαναζυμώνονται στο μπουκάλι από τον *Brettanomyces* και άλλες ζύμες ή βακτήρια, προσδίδοντας μοναδικά αισθητικά προφίλ.

Άλλες μύρες που παράγονται με αυτόχθονη ζύμωση είναι οι παραδοσιακές μύρες σε όλη την Αφρική. Παράγονται από βυνοποιημένο σόργο, ή και κεχρί και παρόμοια διαδικασία ζύμωσης. Είναι θολές και με πολλά αιωρούμενα στερεά και γενικά καταναλώνονται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Η ζύμωσή τους γίνεται με επανεμβολιασμό κροκιδωμένου χυλού ζύμης από προηγούμενη παρτίδα [Bokulich & Bamforth, 2013].

ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΜΠΥΡΑΣ ΚΑΙ ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΕΣ ΟΥΣΙΕΣ

Τα βασικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της μπύρας είναι 4: χρώμα, θολερότητα, αφρός και flavor (άρωμα και γεύση). Τα στάδια επεξεργασίας των πρώτων υλών επηρεάζουν τους παραγόμενους μεταβολίτες, οι οποίοι με τη σειρά τους επηρεάζουν θετικά ή αρνητικά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της μπύρας. Ορισμένα επιθυμητά οργανοληπτικά είναι η σταθερότητα του αφρού, η απουσία θολώματος (εκτός από τις Weiss μπύρες) και η απουσία δυσάρεστων αρωμάτων.

Χρώμα

Η αντίδραση Maillard, ή μη ενζυμικό μαύρισμα, αναφέρεται σε ένα σύνολο αντιδράσεων που συμβαίνουν στα τρόφιμα κατά την θέρμανσή τους ή την παραμονή τους για μεγάλο χρονικό διάστημα και τους προσδίδουν σκούρο χρώμα. Εκτός από το χρώμα, η αντίδραση Maillard σχετίζεται και με τη γεύση και το άρωμα του ψημένου τροφίμου. Αντιδρώντα στις αντιδράσεις αυτές είναι οι αλδεϋδομάδες και κετονομάδες των αναγωγικών σακχάρων (γλυκόζη, φρουκτόζη, μαλτόζη, γαλακτόζη, λακτόζη) και οι αμινομάδες των αμινοξέων. Η αντίδραση Maillard εξαρτάται από τη θερμοκρασία και το pH του τροφίμου, καθώς η αύξησή τους επιφέρει αύξηση του ρυθμού της αντίδρασης.

Τα σάκχαρα με τις αμινομάδες αντιδρούν και παράγουν υποκατεστημένη από άζωτο γλυκοζιλαμίνη, η οποία αναδιαμορφώνεται προς σχηματισμό ARP (Amadori rearrangement product). Ύστερα από πληθώρα αντιδράσεων, παράγονται τα τελικά προϊόντα, οι μελανοΐδινες. Οι μελανοΐδινες είναι σκουρόχρωμα αζωτούχα πολυμερή και υπεύθυνα για το χρώμα που αποκτούν τα τρόφιμα [Martins et al., 2001].

Η αντίδραση Maillard παίζει ρόλο στο χρώμα της μπύρας κατά το στάδιο της φρύξης του κριθαριού. Φρύξη σε τελική θερμοκρασία 60-90 °C έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ξανθής βύνης, ενώ φρύξη σε υψηλότερη θερμοκρασία, δηλαδή στους 105 °C, παράγει σκούρα βύνη [Θωμόπουλος, 1981]. Επίσης, η αύξηση της θερμοκρασίας κατά το στάδιο του βρασμού επιδρά στο τελικό χρώμα. Όμως, οι μελανοΐδινες, παρόλο που περιέχουν άζωτο, δε μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πηγές αζώτου για τις ζύμες.

Το χρώμα της μπύρας επηρεάζεται επιπλέον και από την οξείδωση των πολυφαινολών. Η οξείδωση των πολυφαινολών γίνεται με τη βοήθεια του θερμοαντόχου ενζύμου υπεροξειδάση κατά τη διάρκεια του βρασμού προς παραγωγή ορθοκινονών. Οι ορθοκινόνες προσδίδουν έντονο κίτρινο ή κόκκινο χρώμα και συγκεκριμένη οσμή. Παρόλα αυτά καταναλώνονται ως πηγή αζώτου από τις ζύμες, άρα είναι μικρή η ποσότητά τους στο τελικό προϊόν [Lewis & Bamforth, 2013].

Θολερότητα

Η θολερότητα οφείλεται στη διασπορά και συσσωμάτωση πρωτεϊνών και φαινολικών ενώσεων, οι οποίες, παρουσία οξυγόνου, συμπλοκοποιούνται και προκαλούν το θόλωμα. Άλλες αιτίες είναι ανόργανες ουσίες που συσσωρεύονται λόγω κακής υγιεινής, ανεπαρκής απομάκρυνση των ζυμών ή σχημαριζόμενοι κρύσταλλοι οξαλικού ασβεστίου. Το οξαλικό ασβέστιο παράγεται από οξαλικό οξύ της βύνης και ιόντα ασβεστίου που υπάρχουν στο νερό ή λόγω βακτηριακής μόλυνσης.

Αφρός

Η ποιότητα του αφρού εξαρτάται από την υφή, τη σταθερότητα και την προσκολλησιμότητά του στο ποτήρι. Οι πρωτεΐνες που προέρχονται από τη βύνη, λόγω της υδροφοβικότητά τους, έχουν την τάση να παγιδεύονται στις σχηματιζόμενες φυσαλίδες κατά τον αφρισμό της μύρας και να τον σταθεροποιούν. Επιπλέον σταθεροποίηση προσφέρουν άλλες πρωτεΐνες με υδρόφοβα και υδρόφιλα τμήματα, βρισκόμενες στη διεπιφάνεια των φυσαλίδων. Τα λιπίδια, που προέρχονται από το μεταβολισμό των ζυμών και πιθανόν από τη βύνη, αποσταθεροποιούν τον αφρό, λόγω των υδρόφιλων τμημάτων τους. Τα λιπίδια παράγονται από τις ζύμες για να αντισταθμιστεί η αυξημένη ωσμωτική πίεση που δέχονται σε περιβάλλον υψηλής περιεκτικότητας σε σάκχαρα. Έτσι οι μύρες υψηλότερης περιεκτικότητας σε αλκοόλ, δηλαδή που προέρχονται από ζυθογλεύκος με περισσότερα σάκχαρα, περιέχουν λιπίδια και δε σχηματίζουν τόσο καλό αφρό [Lewis & Bamforth, 2013].

Οι μύκητες που αναπτύσσονται στη βύνη παράγουν β-γλυκανάσες και ξυλανάσες, μειώνοντας το ιξώδες του ζυθογλεύκους. Αυτό έχει ως πλεονέκτημα τη διευκόλυνση του φιλτραρίσματος του πολτού, αλλά μειονέκτημα την ποιότητα αφρού στη μύρα [Bokulich & Bamforth, 2013]. Όμως οι μυκητιακές λοιμώξεις του κριθαριού μπορούν να προκαλέσουν το φαινόμενο του πίδακα αφρού κατά το άνοιγμα ενός κουτιού μύρας. Τα υδροφοβικά πεπτίδια των μυκήτων δρουν ως πυρήνες σχηματισμού διοξειδίου του άνθρακα, δηλαδή φυσαλίδων, οι οποίες εκτονώνονται κατά το άνοιγμα του κουτιού [Briggs et al., 1981].

Άρωμα και γεύση (flavor)

Αρώματα στη μύρα

Το άρωμα και η γεύση της μύρας επηρεάζονται από όλα τα επιμέρους συστατικά της και τις διεργασίες που υφίστανται, συγκεκριμένα από την ξήρανση της βύνης, το βρασμό του ζυθογλεύκους και τη σύσταση του λυκίσκου και του νερού.

Οι αλκοόλες που περιέχονται στη μύρα είναι προϊόντα του μεταβολισμού των αμινοξέων από τις ζύμες και, πλην της αιθανόλης που υπερτερεί, προσδίδουν χαρακτηριστικά φρουτώδη αρώματα. Πιο αναλυτικά:

- η η-προπανόλη προσδίδει γλυκιά γεύση (όριο ανίχνευσης 600 mg/L)
- η αμυλική αλκοόλη (όριο ανίχνευσης 60mg/L) και η ισοβουτανόλη (100 mg/L) σχετίζονται με άρωμα διαλύτη
- Η ισοαμυλική αλκοόλη και η 2-φαινυλαιθανόλη (όρια ανίχνευσης 50-65 mg/L) δίνουν έντονα αρώματα μπανάνας και τριανταφύλλου αντίστοιχα
- η γλυκερίνη εξομαλύνει τις έντονες γεύσεις και αρώματα και
- οι αλειφατικές αλκοόλες με μέγεθος 6-10 άτομα άνθρακα προσδίδουν αμυδρά άρωμα καρύδας. [Michel et al., 2016]

Η αιθανόλη είναι το κύριο παραγόμενο συστατικό κατά τη ζύμωση. Ένα αρνητικό χαρακτηριστικό της όμως είναι η μείωση του αρώματος και της γεύσης του κρασιού και της μύρας, καθώς αυξάνει τη διαλυτότητα των αρωματικών ενώσεων και μειώνει το πτητικό κλάσμα. Επίσης, τα τελευταία χρόνια υπάρχει μια τάση ευαισθητοποίησης ως προς τα

αλκοολούχα ποτά και την επίδρασή τους στην οδήγηση, με αποτέλεσμα την αυξανόμενη απαίτηση σε ποτά με χαμηλότερη περιεκτικότητα σε αιθανόλη.

Η γλυκερόλη σχετίζεται με τη ρύθμιση της ώσμωσης και την κρυσταλλικότητα των ζυμών. Ως προς την οργανοληπτική της προσφορά, η γλυκερόλη είναι υπεύθυνη για τη γλυκύτητα, την απαλότητα και το γεμάτο σώμα, ενώ, στην περίπτωση των κρασιών, μειώνει τη στυπτικότητα τους. [Querol et al., 2018]

Στελέχη ζυμών με ενισχυμένη δράση β-γλυκοζιδάσης χρησιμοποιούνται για ενίσχυση του αρώματος ειδικών τύπων μπίρας. Οι β-γλυκοζιδάσες του *Saccharomyces* διασπούν τους γλυκοζίτες προερχόμενους από λυκίσκο, φρούτα και άλλα φυτά που χρησιμοποιούνται στη ζυθοποιία. Το εναπομένον τμήμα (aglycon) παρουσιάζει αρωματική δραστηριότητα σε αυτή τη μορφή και αντιπροσωπεύει ανεκμετάλλευτη πηγή αρώματος στη μπίρα. [Bokulich & Bamforth, 2013]

Η βακτηριακή ανάπτυξη κατά την πολτοποίηση έχει ευνοϊκές συνέπειες και η οξίνιση του πολτού με γαλακτικό οξύ από τα βακτήρια βελτιώνει τη ζύμωση, την εκχύλιση, την απόδοση αζώτου και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της μπίρας. Αυτά τα αποτελέσματα επιτυγχάνονται με προσθήκη οξέος σε πολλά ζυθοποιεία. Το μειονέκτημα της βακτηριακής ανάπτυξης είναι η υπεροξίνιση, που ευνοεί το σχηματισμό νιτροζαμινών. Η ανάπτυξη βακτηρίων τύπου *Clostridium* στον πολτό ή στο ζυθογλεύκος παράγει σε μεγάλα επίπεδα βουτυρικό οξύ, δίνοντας άρωμα τυριού στη μπίρα.

Τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια θεωρούνται αλλοιογόνα για το ζυθογλεύκος, ιδιαίτερα τα είδη *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Obesumbacterium* και *Escherichia*. Η παρουσία τους συνδέεται με την παραγωγή διμεθυλοσουλφιδίου, οργανικών οξέων, 2,3-βουτανοδιόλης και την ύπαρξη ανεπιθύμητου φυτικού αρώματος στη μπίρα. Τα εντεροβακτήρια επίσης αναστέλλουν την ανάπτυξη του *Saccharomyces*, και, ως αερόβια, είναι ανθεκτικά σε αντιμικροβιακές ουσίες σχετιζόμενες με το λυκίσκο. Η ύπαρξη εντεροβακτηρίων παλαιότερα θεωρούνταν χαρακτηριστικό ορισμένων τύπων αφροζύμωτης αγγλικής μπίρας, λόγω χαμηλότερων προδιαγραφών υγιεινής. Τα βακτήρια που παράγουν οξικό οξύ ήταν πιο προβληματικά στις παλιότερες εποχές, λόγω αδυναμίας αποφυγής της έκθεσης της μπίρας στο οξυγόνο. Ακόμα και σήμερα, βρίσκονται συχνά σε παλαιωμένες σε βαρέλια μπίρες. Δρουν οξειδώνοντας την αιθανόλη σε οξικό οξύ, άρα μετατρέποντας τη μπίρα σε ξύδι.

Τα θετικά κατά Gram βακτήρια, συγκεκριμένα αυτά που παράγουν γαλακτικό οξύ (LAB – lactic acid bacteria), επειδή σχετίζονται με τη φυτική ύλη και τον άνθρωπο, εμφανίζονται συχνά στο ζυθοποιείο. Η αλλοιογόνος δράση τους έγκειται στην οξίνιση, στο θόλωμα και την παραγωγή διακετυλίων, τα οποία δίνουν έντονο άρωμα βιομηχανικά παρασκευασμένου βουτύρου. Περιοριστικός παράγοντας θεωρείται η παρουσία πικρών ουσιών του λυκίσκου, όπως τα ισο-α-οξέα. Δρουν διαλύοντας τη διαμεμβρανική βαθμίδα πρωτονίων και μειώνοντας το pH του κυτταροπλάσματος, δυσκολεύοντας την ενζυματική δραστηριότητα και αναστέλλοντας την ανάπτυξη του κυττάρου.

Τερπένια

Τα μονοτερπενοειδή είναι οργανικές ενώσεις 10 ατόμων άνθρακα με έντονες οργανοληπτικές ιδιότητες. Τα φυτικής προέλευσης μονοτερπενοειδή παράγονται από σταφύλια και λυκίσκο. Στα σταφύλια τα τερπενοειδή υπάρχουν είτε σε ελεύθερη είτε σε γλυκοζυλιωμένη μορφή και είναι η ειδοποιός διαφορά μεταξύ των ποικιλιών των σταφυλιών.

Τα τερπενοειδή στα σταφύλια αποτελούνται από τις αλκοόλες λιναλόλη, νερόλη, γερανιόλη, α-τερπινεόλη και κιτρονελλόλη, ενώ στο λυκίσκο, άρα και στη μπίρα, έχουν ανιχνευθεί γερανιόλη και λιναλόλη. Η λιναλόλη δίνει το φυτικό άρωμα στο λυκίσκο.

Ορισμένες ζύμες όπως οι *Torulaspora delbrueckii*, *Ambrosiozyma monospora* και *Kluyveromyces lactis* μπορούν να παράξουν τερπενοειδή. Τα τερπενοειδή συσσωρεύονται ενδοκυτταρικά στις ζύμες, φαινόμενο που πιθανώς οφείλεται στην αναερόβια αναπνοή που προκαλεί συσσώρευση μεταβολιτών του μονοπατιού μεταβολισμού των στερολών. Ο *Saccharomyces cerevisiae* ανάγει τη γερανιόλη στην εναντιομερή R(+)-κιτρονελλόλη. Αυτή η αντίδραση έχει προοπτικές για εμπορική χρήση, καθώς οι εναντιομερείς μορφές τερπενοειδών έχουν διαφορετικές αισθητικές ιδιότητες.

Πειραματικές μελέτες [Varela, 2016] έδειξαν ότι οι *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii* και *K. lactis* έχουν την ικανότητα και τα ένζυμα να μετατρέπουν διάφορες μονοτερπενικές αλκοόλες με διάφορες αντιδράσεις. Επειδή αυτές οι ουσίες βρίσκονται στα σταφύλια και στο λυκίσκο, οι μετατροπή των αλκοολών αυτών επηρεάζει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του κρασιού και της μπίρας, όπως και τον τύπο και την ένταση των αρωμάτων. Γενικά, οι αντιδράσεις που καταλύονται από τις ζύμες οδηγούν στο σχηματισμό λιναλόλης και α-τερπινιόλης. Πειραματικά αποτελέσματα έδειξαν ότι μεμονωμένα στελέχη από το κάθε είδος, παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές. Για παράδειγμα, η *T. delbrueckii* παρήγαγε μόνο λιναλόλη από γερανιόλη και καθόλου κιτρονελλόλη. [King & Dickinson, 2000]

Για την παραγωγή κρασιών πλουσίων σε τερπένια, στελέχη των *T. delbrueckii* και *M. pulcherrima*, που παράγουν β-D-γλυκοζιδάση, χρησιμοποιήθηκαν με τον *S. cerevisiae*. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις α-τερπινεόλης και λιναλόλης βρέθηκαν σε κρασί που ζυμώθηκε από μικτή καλλιέργεια *S. cerevisiae/T. delbrueckii*, ενώ περισσότερη νερόλη και γερανιόλη βρέθηκαν σε πρότυπο υπόστρωμα που ζυμώθηκε από τον *S. cerevisiae*. Η *M. pulcherrima*, παρήγαγε α-τερπινεόλη, γερανιόλη και νερόλη σε μονή καλλιέργεια, αλλά σε μικτή με τον *S. cerevisiae*, παρατηρήθηκαν μικρές ποσότητες γερανιόλης και νερόλης. Αυτό οφείλεται στην ικανότητα του *S. cerevisiae* να μετατρέπει τις ενώσεις αυτές σε α-τερπινεόλη, δείχνοντας παράλληλα πως επηρεάζονται μεταξύ τους οι ζύμες στις μικτές καλλιέργειες. [Padilla & Manzanares, 2016]

Άλλοι δευτερογενείς μεταβολίτες

Το οξικό οξύ είναι υπεύθυνο για το 90% της οξύτητας των κρασιών, ενώ τα απομένοντα λιπαρά οξέα, όπως προπανοϊκό και βουτανοϊκό, βρίσκονται σε μικρές ποσότητες. Η παραγωγή τους σχετίζεται με τη βακτηριακή ανάπτυξη. Το άνω όριο αποδοχής του οξικού οξέος είναι 0,7-1,1 g/L, ενώ η βέλτιστη συγκέντρωσή του είναι μεταξύ 0,2 και 0,7 g/L. Οι και ζύμες *Hanseniaspora* και *Zygosaccharomyces*, λόγω μεγάλης παραγωγής οξικού οξέος, θεωρούνταν για αρκετό καιρό αλλοιογόνες. [Padilla, Manzanares, 2016] Τα οργανικά οξέα προσφέρουν χαρακτηριστική αφρώδη γεύση στη μπίρα και συμβάλλουν στην οξύτητα, σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις όμως δίνουν έντονα και ανεπιθύμητα αρώματα. Διακρίνονται σε πτητικά και μη πτητικά και η παραγωγή τους εξαρτάται από το είδος της χρησιμοποιούμενης ζύμης και τον τρόπο του μεταβολισμού της. Τα κύρια πτητικά οξέα είναι:

- Οξικό οξύ, που προσδίδει γεύση ξυδιού (όριο ανίχνευσης 175 mg/L)
- Καπριλικό οξύ, που προσδίδει άρωμα κατσικίσιου γάλακτος (όριο ανίχνευσης 15mg/L)
- Καπρικό οξύ, που προσδίδει λιπαρή υφή (όριο ανίχνευσης 10 mg/L) και
- Βουτανικό οξύ, που προσδίδει άρωμα βουτύρου (όριο ανίχνευσης 2 mg/L)

Ενώ τα κύρια μη πτητικά:

- Οξαλικό οξύ, που σε μεγάλη συγκέντρωση δίνει αλμυρή γεύση (όριο ανίχνευσης 500 mg/L)
- Κιτρικό οξύ, που πάνω από 400 mg/L δίνει έντονη ξινή γεύση
- Μηλικό οξύ, που προσδίδει γεύση μήλου (όριο ανίχνευσης 700 mg/L)
- Φουμαρικό οξύ (όριο ανίχνευσης 400 mg/L)
- Σουκινικό οξύ (όριο ανίχνευσης 220 mg/L)
- Γαλακτικό οξύ, που πάνω από 400 mg/L δίνει έντονη γεύση ξινού γάλακτος και
- Πυροσταφυλικό οξύ, που προσδίδει άρωμα ζωοτροφών (όριο ανίχνευσης 300 mg/L).

[KENNEDY, A. I.]

Οι ανώτερες αλκοόλες συμβάλλουν στο αρωματικό προφίλ σε συγκεντρώσεις μικρότερες των 300 mg/L, πλην της προπανόλης. Η σημασία τους έγκειται στο ότι είναι πρόδρομες ενώσεις εστέρων. Οι εστέρες με τη μεγαλύτερη αφθονία είναι οι οξικοί και οι αιθυλεστέρες των κορεσμένων λιπαρών οξέων. Οι non-Saccharomyces ζύμες, παράγουν σε μεγάλες ποσότητες εστέρες και γι' αυτό σχετίζονται με τα αρνητικά χαρακτηριστικά των υψηλών συγκεντρώσεων οξικού αιθυλεστέρα, οποίος αναφέρεται παρακάτω. [Padilla, Manzanares, 2016] Οι ανώτερες αλκοόλες προσδίδουν ανθικά, φρουτώδη ή φυτικά αρώματα, δρώντας συνεργατικά με άλλες αρωματικές ουσίες. Οι σημαντικότερες ανώτερες αλκοόλες είναι:

- προπανόλη, με γλυκό και αλκοολικό άρωμα (όριο ανίχνευσης 600 mg/L)
- ισοβουτανόλη (όριο ανίχνευσης 100 mg/L)
- αμυλική (πεντυλική) αλκοόλη (όριο ανίχνευσης 50-70 mg/L), που μαζί με την ισοβουτανόλη προσδίδουν άρωμα διαλύτη
- Ισοαμυλική αλκοόλη (όριο ανίχνευσης 50-65 mg/L), με άρωμα μπανάνας και
- 2-φαινυλαιθανόλη, (όριο ανίχνευσης 40 mg/L), με άρωμα τριανταφύλλου. [Michel et al., 2016]

Οι εστέρες, βρίσκονται σε μικρότερες συγκεντρώσεις από ότι άλλα συστατικά, αλλά η παρουσία τους προσφέρει έντονα αρώματα φρούτων. Διακρίνονται σε οξικούς εστέρες και αιθυλεστέρες μέσης αλύσου. Κύριοι οξικοί εστέρες είναι, ο ισοαμυλεστέρας (άρωμα μπανάνας) και ο ισοβουτυλεστέρας (άρωμα φρουτώδες και γλυκό), αμφότεροι με όριο ανίχνευσης 1.6 mg/L, το οξικό φαινυλαιθύλιο (3.8 mg/L) και ο οξικός αιθυλεστέρας, ο οποίος είναι ο μόνος ανεπιθύμητος, λόγω πρόσδοσης αρώματος διαλύτη. Οι αιθυλεστέρες μέσης αλύσου που παίζουν ρόλο στα αρώματα της μπύρας είναι ο εξανοϊκός και ο οκτανοϊκός αιθυλεστέρας με όρια ανίχνευσης 0.23 και 0.9 mg/L, αντίστοιχα. [Michel et al., 2016]

Οι αλδεύδες ως αρώματα είναι σημαντικές, λόγω του πολύ χαμηλού ορίου ανίχνευσής τους. Μεταξύ τους κυριαρχεί η ακεταλδεύδη, που αποτελεί το 90% της συνολικής αλδεύδης στα κρασιά, με τη συγκέντρωσή της να κυμαίνεται από 10 έως 300mg/L. Ο *S. cerevisiae* γενικά παράγει σε μεγαλύτερες ποσότητες ακεταλδεύδη σε σχέση με τις non-Saccharomyces ζύμες.

Οι πτητικές φαινόλες είναι ανεπιθύμητες ουσίες στα κρασιά και στη μπύρα. Αυτές που συναντώνται κυρίως στα λευκά κρασιά είναι οι βινυλφαινόλες, ενώ στα κόκκινα οι αιθυλφαινόλες. Παράγονται αντίστοιχα από το φερουλικό και p-κουμαρικό οξύ. Η αρνητική τους δράση έγκειται στην κάλυψη των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών στα λευκά κρασιά. [Padilla & Manzanares, 2016]

Οι γεύσεις που προέρχονται από τις φαινόλες ονομάζονται phenolic off-flavours. Οι γεύσεις αυτές οφείλονται στην αποκαρβοξυλίωση των οξέων της βύνης, συγκεκριμένα του κουμαρικού, φερουλικού και κινναμικού οξέος. Το φερουλικό οξύ μετατρέπεται σε 4-βινυλγλουαικόλη, η οποία προσδίδει γεύση σκόρδου στη μπύρα. Αν και γενικά ανεπιθύμητη,

στις γερμανικές μύρες σιταριού είναι κύριο γευστικό συστατικό. Το κουμαρικό οξύ μετατρέπεται σε 4-βινυλοφαινόλη, δίνοντας γεύση που θυμίζει διαλύτη, ενώ το κινναμικό σε 4-βινυλβενζόλιο, που η γεύση του σχετίζεται με πολυστυρένιο. [Lewis & Bamforth, 2006] Οι κυριότερες πτητικές φαινόλες είναι:

- 4-αιθυλοφαινόλη (όριο ανίχνευσης 0.9 mg/L), που προσδίδει μυρωδιά στάβλου
- 4-αιθυλογουαϊκόλη (όριο ανίχνευσης 0.13 mg/L), με χαρακτηριστικό άρωμα καπνιστού κρέατος
- 4-βινυλογουαϊκόλη (όριο ανίχνευσης 0.3 mg/L), που προσδίδει έντονη πικράδα και άρωμα γαρυφάλλου και
- 4-βινυλοφαινόλη (όριο ανίχνευσης 0.2 mg/L) που προσδίδει καπνιστό άρωμα στη μύρα. [Michel et al., 2016]

Το διοξείδιο του θείου συμβάλλει στη σταθερότητα της μύρας και δρα ως αντιοξειδωτικό σε συγκεντρώσεις μεταξύ 10-25 mg/L. Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από 25mg/L, προσδίδει θειούχες οσμές, το οποίο είναι ευνοϊκό μόνο σε ορισμένες lager μύρες.

Το υδρόθειο παράγεται από τις ζύμες στην αρχή της ζύμωσης και κατά την ωρίμανση. Ως πτητική ένωση, απομακρύνεται επαρκώς και ευνοεί σε μικρές συγκεντρώσεις τη διατήρηση φρεσκάδας της μύρας. Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις προσδίδει τη δυσάρεστη μυρωδιά σάπιου αυγού, ως αέριο της αναερόβιας χώνευσης. [Michel et al., 2016]

Η ακεταλδεΐδη και οι γειτονικές της δικετόνες (VDK) θεωρούνται ανεπιθύμητες στη μύρα, παρόλο που το μεγαλύτερο μέρος της ακεταλδεΐδης μετατρέπεται σε αιθανόλη κατά τη ζύμωση. Οι VDK συνδέονται με την ανεπιθύμητη γεύση καραμέλας και η ακεταλδεΐδη με το άρωμα γρασιδιού. Οι VDK, συγκεκριμένα οι πεντανοδιόνη και το διακετύλιο, παράγονται κατά τη ζύμωση από μη ενζυματική αποικοδόμηση μεταβολικών ενδιάμεσων του μονοπατιού σύνθεσης αμινοξέων. Οι ζύμες τα καταναλώνουν προς παραγωγή βουτανοδιόλης και πεντανοδιόλης, αλλά πολύ αργά και η κατανάλωσή τους εξαρτάται και από το επίπεδο που επιθυμεί ο παραγωγός να μειώσει τις VDK. Άλλες ανεπιθύμητες ενώσεις περιλαμβάνουν αλδεΐδες με μήκος 7-10 άτομα άνθρακα, οι οποίες επίσης έχουν πολύ χαμηλά όρια ανίχνευσης, όπως η νοναλδεΐδη με 0.018mg/L και πρόσδοση αρώματος χαρτιού και η trans-2-νοναλδεΐδη (όριο ανίχνευσης 0.00011mg/L), η οποία συνδέεται με την αποθήκευση της μύρας σε υψηλή θερμοκρασία.

Όλα τα στελέχη ζυμών για ζυθοποίηση παράγουν γλυκερόλη, VDK, αλκοόλες, εστέρες, λιπαρά οξέα μικρής αλύσου, οργανικά οξέα και θειούχες ενώσεις. [Bokulich & Bamforth, 2006]

ΜΟΝΤΕΛΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

Η γενική εξίσωση για την περιγραφή του ρυθμού ανάπτυξης ενός μικροοργανισμού είναι η ακόλουθη:

$$dx/dt = \mu \cdot x \quad (\alpha)$$

όπου μ ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης, x η συγκέντρωση των κυττάρων και t ο χρόνος ανάπτυξης. Ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης εξαρτάται από τη συγκέντρωση του υποστρώματος S , για αυτό γίνεται η παραδοχή ότι το S καθορίζει το ρυθμό της κυττάρικης ανάπτυξης. Οι εξισώσεις που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτήν την εργασία για την περιγραφή της κινητικής της ανάπτυξης, τον προσδιορισμό των παραμέτρων τους και συμφωνούν με την παραπάνω παραδοχή είναι η εξίσωση Monod και η λογιστική εξίσωση.

Η εξίσωση Monod είναι παρόμοια με την Michaelis-Menten και την Langmuir-Hinshelwood και βασίζεται στην παραδοχή ότι η κατανάλωση του υποστρώματος γίνεται από ενζυμικό σύστημα που ακολουθεί την εξίσωση Michaelis-Menten:

$$\mu = \mu_{\max} \cdot S / (K_s + S) \quad (\beta)$$

όπου μ ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης, μ_{\max} ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης όταν το S τείνει στο άπειρο, K_s σταθερά για την οποία ισχύει ότι, όταν $K_s = S$ τότε $\mu = \mu_{\max}/2$ και S συγκέντρωση υποστρώματος. Με αντικατάσταση της Monod στη γενική εξίσωση προκύπτει η παρακάτω σχέση:

$$dx/dt = x \cdot \mu_{\max} \cdot S / (K_s + S) \quad (\gamma)$$

Αντικαθιστώντας στη σχέση (γ) την παρακάτω σχέση (δ) απόδοσης κυτταρικής συγκέντρωσης $Y_{x/s}$, ως προς κατανάλωση υποστρώματος:

$$(X - X_0) / (S_0 - S) = Y_{x/s} \quad (\delta)$$

και ολοκληρώνοντας ως προς το χρόνο, προκύπτει η σχέση:

$$\left[\frac{K_s \cdot Y_{x/s} + S_0 \cdot Y_{x/s} + X_0}{Y_{x/s} \cdot S_0 + X_0} \right] \cdot \ln(X/X_0) - \left[\frac{K_s \cdot Y_{x/s}}{Y_{x/s} \cdot S_0 + X_0} \right] \cdot \ln \left[\frac{Y_{x/s} \cdot S_0 + X_0 - X}{Y_{x/s} \cdot S_0} \right] = \mu_{\max} \cdot t \quad (\epsilon)$$

Η σχέση (ϵ) περιγράφει μια σιγμοειδή καμπύλη κυτταρικής ανάπτυξης διαλείποντος έργου.

Η λογιστική εξίσωση είναι μια απλοποιημένη μορφή της εξίσωσης (ϵ) , με την παραδοχή ότι η κυτταρική ανάπτυξη παρουσιάζεται ως δυναμικό μεταφοράς:

$$dx/dt = k \cdot X \cdot (1 - X/X_{00}) \quad (\sigma\tau)$$

με X_{00} την κυτταρική συγκέντρωση σε άπειρο χρόνο, πρακτικά στο τέλος της εκθετικής φάσης της ζύμωσης και k το συντελεστή δυναμικού μεταφοράς. Με λύση της διαφορικής και λογαρίθμισή της, η $(\sigma\tau)$ μετατρέπεται στην παρακάτω μορφή:

$$\ln(X/X_0) = k \cdot t - \ln \left[\frac{(X_{00} - X)}{X_{00}} \cdot (1 - \exp(-k \cdot t)) \right] \quad (\zeta)$$

Η παραπάνω εξίσωση είναι η γραμμική μορφή της λογιστικής εξίσωσης [Shuler & Kargi, 2005]. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν οι εξισώσεις (ϵ) και (ζ) . Λόγω καλύτερης προσαρμογής των δεδομένων στην εξίσωση (ζ) , υπολογίστηκε η σταθερά δυναμικού μεταφοράς k για όλες τις ζύμες και σε όλα υποστρώματα απλών σακχάρων.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ

Στόχος της εργασίας είναι η παραγωγή μπίρας με τη χρήση των non-*Saccharomyces* ζυμών σε θερμοκρασία 13 °C και η μελέτη του τελικού προϊόντος ως προς την πορεία της ζύμωσης (κατανάλωση σακχάρων, αζώτου, παραγωγή αιθανόλης) και το αρωματικό προφίλ. Η θερμοκρασία επιλέχθηκε 13 °C καθώς σε χαμηλότερες θερμοκρασίες από του περιβάλλοντος διατηρούνται καλύτερα τα αρώματα που παράγονται κατά τη ζύμωση και για να μελετηθεί η αντοχή των ζυμών σε ψυχρό περιβάλλον. Οι ζυμομύκητες που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα είναι οι παρακάτω:

- *Metschikowia pulcherrima*, στέλεχος 346, Flavia, εταιρείας Lallemand,
- *Torulaspora delbrueckii*, στέλεχος 291, Biodiva, εταιρείας Lallemand,
- *Saccharomyces cerevisiae*, στέλεχος Saflager S-23, εταιρείας Fermentis,
- *Saccharomyces cerevisiae*, στέλεχος Safale US-05, εταιρείας Fermentis.

Επειδή η θερμοκρασία της ζύμωσης θα είναι χαμηλότερη αυτής του περιβάλλοντος, το πρώτο πείραμα που διεξήχθη ήταν η δοκιμή κρυσταλλικότητας των ζυμών που χρησιμοποιήθηκαν, δηλαδή τη δυνατότητα επιβίωσης και μεταβολισμού των σακχάρων της μπίρας σε υποστρώματα απλών σακχάρων και θερμοκρασία 13 °C.

Ύστερα από τη διεξαγωγή αυτού του πειράματος, έγινε επιλογή των ζυμών που θα χρησιμοποιηθούν στα μετέπειτα πειράματα. Παρασκευάστηκαν αρχικά υποστρώματα των σακχάρων της μπίρας (γλυκόζη, φρουκτόζη, μαλτόζη και μίγμα σακχάρων αναλογίας γλυκόζη 9% - φρουκτόζη 5% - μαλτόζη 86%), ώστε να μελετηθεί η δυνατότητα μεταβολισμού τους από τις ζύμες, η παραγόμενη ποσότητα αιθανόλης, η κατανάλωση αζώτου και το αρωματικό προφίλ. Στις ζυμώσεις των απλών σακχάρων, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις απομένοντος σακχάρου, πληθυσμού ζυμών και παραγόμενης αλκοόλης σε τακτά χρονικά διαστήματα, ώστε να προσδιορισθούν τα κινητικά δεδομένα για κάθε μικροοργανισμό. Το μίγμα σακχάρων χρησιμοποιήθηκε ως προσομοίωση της ζύμωσης του ζυθογλεύκου, καθώς περιέχει τα 3 βασικά σάκχαρα στις αναλογίες που βρίσκονται και στο γλεύκος.

Οι ίδιες ζύμες χρησιμοποιήθηκαν ύστερα στη ζύμωση ζυθογλεύκου για παραγωγή μπίρας. Για την παρασκευή του ζυθογλεύκου χρησιμοποιήθηκε βύνη τύπου Pale Ale, λόγω των ήπιων αρωμάτων της, ώστε να μην επικαλυφθούν αρώματα που θα παραχθούν από τις ζύμες. Το ζυθογλεύκος που παρασκευάστηκε μοιράστηκε σε ποσότητες για ζύμωση 4 καλλιεργείων ζυμών, συγκεκριμένα από τις:

- *Metschikowia pulcherrima*
- *Torulaspora delbrueckii*
- *Saccharomyces cerevisiae* S-23
- Μίγμα *S. cerevisiae* US-05/*T. delbrueckii* αναλογίας 1/10

Το μίγμα ζυμών χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη των αρωματικών ουσιών που παράγονται από τη δράση και των 2 ειδών ζυμών. Ο *S. cerevisiae*, ως πιο ανθεκτικός στη χαμηλή θερμοκρασία και σε περιβάλλον αιθανόλης, προστέθηκε σε μικρή ποσότητα, ώστε να ξεκινήσει η *T. delbrueckii* τη ζύμωση, προσδίδοντας τις αρωματικές της ουσίες και σταδιακά να επικρατήσει ο *S. cerevisiae*, προσδίδοντας αρώματα σε πιο ύστερο στάδιο της ζύμωσης.

Με το τέλος των ζυμώσεων γίνονται μετρήσεις στην κατανάλωση ελεύθερου αμινοξικού αζώτου, αιθανόλης, κατανάλωσης σακχάρων και εκχύλιση των αρωματικών ουσιών των μπυρών και των προτύπων διαλυμάτων.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1. ΕΝΥΔΑΤΩΣΗ ΖΥΜΩΝ

Όργανα:

Κωνικές φιάλες
Υδρόφοβο βαμβάκι
Αλουμινόχαρτο
Υδατόλουτρο
Αποστειρωμένα σιφώνια
Πιπέτες

Σε κωνική φιάλη προστίθενται 100 mL νερού βρύσης, σφραγίζεται με υδρόφοβο βαμβάκι και αλουμινόχαρτο και αποστειρώνεται για 20 min στους 120 °C. Ύστερα η φιάλη αφήνεται μέχρι να αποκτήσει θερμοκρασία περιβάλλοντος. Είναι σημαντικό να μην είναι σε μεγαλύτερη θερμοκρασία, αλλιώς οι ζύμες που θα προστεθούν, θα υποστούν θερμικό σοκ και θα καταστούν μη μεταβολικά ενεργές.

Ζυγίζεται 1 g ξηρής ζύμης από τα στελέχη που θα χρησιμοποιηθούν. Η προσθήκη της ζύμης γίνεται σε θάλαμο αποστείρωσης, κοντά σε αναμμένη λυχνία, ώστε να αποφευχθεί πιθανή μόλυνση των καλλιιεργειών.

2. ΜΕΤΡΗΣΗ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΚΑΙ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Παρασκευή διαλύματος μπλε του μεθυλενίου 0.01 % - Διαλύονται 10 mg μπλε του μεθυλενίου και 2 g tricitate de sodium dihydrate σε 10 mL απεσταγμένο νερό. Συμπληρώνεται νερό μέχρι τα 100 mL. Αν υπάρχει ήδη διάλυμα μπλε του μεθυλενίου μεγαλύτερης συγκέντρωσης, γίνονται οι απαραίτητες αραιώσεις.

Στο μικροσκόπιο χρησιμοποιείται η μεγέθυνση 40*10. Σε θάλαμο αποστείρωσης και κοντά σε λυχνία γίνεται προσεκτική ανάδευση των κωνικών, ώστε να υπάρχει ομοιόμορφη κατανομή κυττάρων. Στο πείραμα η αραιώση είναι 1 mL εμβολίου σε 1 mL απιονισμένο νερό. Από το δοκιμαστικό σωλήνα με το αραιωμένο διάλυμα ζύμης λαμβάνεται 1 mL σε άλλο δοκιμαστικό, καθώς και 1 mL διαλύματος μπλε του μεθυλενίου, με διαφορετικά σιφώνια. Γίνεται ανάμιξη, ανάδευση και ο δοκιμαστικός σωλήνας παραμένει για 10min. Έπειτα αναδεύεται πάλι και με πιπέτα μεταφέρονται 2-3 σταγόνες σε πλακίδιο Neubauer.

Το πλακίδιο καλύπτεται με καλυπτρίδα και μεταφέρεται στο μικροσκόπιο. Γίνεται μέτρηση 4 τετραγώνων διαγώνια και ενός τυχαίου. Μετρώνται τα ολικά κύτταρα σε κάθε τετράγωνο, καθώς και τα μη μεταβολικώς ενεργά (νεκρά), τα οποία είναι βαμμένα μπλε, λόγω του διαλύματος χρωστικής. Είναι απαραίτητο να μην καθυστερήσει η μέτρηση, καθώς θα αρχίσουν να βάζονται και τα ζωντανά κύτταρα. Η βιωσιμότητα υπολογίζεται από τον τύπο

$$\text{Βιωσιμότητα\%} = a/n * 100\% \quad (1)$$

Όπου a τα ζωντανά (άχρωμα) και n τα ολικά κύτταρα. Η συγκέντρωση των κυττάρων (πληθυσμός) υπολογίζεται από τον τύπο

$$C = (n/N) \cdot D \cdot D_{\text{meth}} \cdot 0,25 \cdot 10^6 \quad (2)$$

Όπου C τη συγκέντρωση σε κύτταρα/ mL, D η αραιώση του διαλύματος ζύμης, D_{meth} η αραιώση διαλύματος μπλε του μεθυλενίου (αν δεν έχει γίνει, λαμβάνεται ίση με 1), n ο ολικός αριθμός των κυττάρων και N ο αριθμός των τετραγώνων.

3. ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΡΥΟΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΖΥΜΩΝ

Στο συγκεκριμένο πείραμα έγινε δοκιμή κρυοανθεκτικότητας 6 διαφορετικών στελεχών ζυμομυκήτων. Παρασκευάστηκε θρεπτικό υλικό με άγαρ και τα 3 σάκχαρα της μπύρας (γλυκόζη, φρουκτόζη και μαλτόζη), ώστε να μελετηθεί η δυνατότητα και η ταχύτητα μεταβολισμού του κάθε σακχάρου από τις ζύμες. Το πείραμα έγινε εις διπλούν για κάθε ζύμη.

Οι ζύμες που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

Torulaspora delbrueckii, στέλεχος Prelude, εταιρεία Hansen

Torulaspora delbrueckii, στέλεχος E491, εταιρεία Lallemand

Torulaspora delbrueckii, στέλεχος 291, εταιρεία Lallemand

Metschnikowia pulcherrima, στέλεχος 346, εταιρεία Lallemand

Saccharomyces cerevisiae, στέλεχος S-23, εταιρεία Fermentis

Saccharomyces cerevisiae, στέλεχος US-05, εταιρεία Fermentis

Τα 2 στελέχη *Saccharomyces* χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες, με το στέλεχος S-23 να είναι βυθοζύμωτο (lager), ενώ το στέλεχος US-05 αφροζύμωτο (ale).

3.1. Παρασκευή θρεπτικού υλικού (άγαρ) και άγαρ 'πώματος'

Όργανα:

36 δοκιμαστικοί σωλήνες

ρΗμετρο

Ογκομετρικός κύλινδρος

Vial

Η σύνθεση του θρεπτικού υλικού για το συγκεκριμένο πείραμα είναι:

ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ	C (g/L)
Πεπτόνη	7.5
Εκχύλισμα ζύμης	4.5
Σάκχαρο (γλυκόζη/ φρουκτόζη/ μαλτόζη)	50
Άγαρ	2.5

pH	4.49
----	------

Πίνακας 1: Σύνθεση θρεπτικού υλικού [Ταταρίδης et al., 2008]

Παρασκευάζεται ποσότητα 360 mL για τους 36 δοκιμαστικούς σωλήνες. Το παραπάνω μίγμα θερμαίνεται σε λυχνία σε χαμηλή φωτιά, ώστε η θερμοκρασία του να είναι άνω των 45 °C και να μην πήξει το άγαρ, όταν προστεθεί. Προστίθενται οι ποσότητες της πεπτόνης, του άγαρος και του εκχυλίσματος βύνης με παράλληλη ανάδευση. Το μίγμα χωρίζεται στα 110 mL περίπου σε τρία ποτήρια ζέσεως και στο καθένα προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα σακχάρου, με παράλληλη ανάδευση. Ύστερα συμπληρώνεται το υπόλοιπο μίγμα μέχρι τα 120 mL και ρυθμίζεται το pH στην τιμή 4.49 με προσθήκη διαλύματος HCl 0.1 N. Τα θρεπτικά υλικά μοιράζονται στους 36 δοκιμαστικούς σωλήνες. Σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκαν 8 mL θρεπτικού υλικού. Οι σωλήνες πωματίζονται, αποστειρώνονται στους 121 °C για 20 min και φυλάσσονται στο ψυγείο, σε θερμοκρασία 13 °C .

3.2. Παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος για προκαλλιέργεια

Όργανα:

18 Vial

Μαγνήτες

Μαγνητικός αναδευτήρας

Το θρεπτικό υπόστρωμα αυτό θα χρησιμοποιηθεί ως προκαλλιέργεια των ζυμών, για να ξεπεραστεί η λανθάνουσα φάση ανάπτυξης. Η σύσταση για 1 L υποστρώματος είναι:

Σάκχαρο (γλυκόζη/ φρουκτόζη/ μαλτόζη)	50 g
K ₂ HPO ₄	1 g
KH ₂ PO ₄	1 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g
Mg ₂ SO ₄	0.2 g
Zn ₂ SO ₄	0.2 g
Εκχύλισμα ζύμης	2 g
Νερό	Μέχρι 1 L
pH	4.5

Πίνακας 2: Σύσταση θρεπτικού υποστρώματος προκαλλιέργειας [Ταταρίδης et al., 2008]

Το pH ρυθμίζεται με διάλυμα HCl 0.1 N. Μετά την προετοιμασία, τα θρεπτικά υποστρώματα αποστειρώνονται. Για την παρασκευή των προκαλλιεργειών απαιτείται αρχικός πληθυσμός κυττάρων στα υποστρώματα $6 \cdot 10^6$ κύτταρα/mL. Από τους πληθυσμούς που υπολογίστηκαν για τις ενυδατωμένες ζύμες, υπολογίζεται πόσος όγκος [mL] χρειάζεται να εμβολιαστεί στα υποστρώματα.

Οι προκαλλιέργειες αφήνονται για 12 έως 18 ώρες για να αναπτυχθούν και να πολλαπλασιαστούν οι ζύμες, πριν τη μέτρηση πληθυσμού και βιωσιμότητας σε αυτές.

3.3. Εμβολιασμός στο θρεπτικό υλικό (άγαρ) και προσθήκη άγαρος 'πώματος'

Όργανα:

Πιπέτα

Τίγες πιπέτας

Σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα πρέπει να υπάρχει αρχικός πληθυσμός προκαλλιέργειας $5 \cdot 10^6$ κύτταρα, άρα από τον τύπο (1) υπολογίζεται ο απαιτούμενος όγκος του εμβολίου από τις προκαλλιέργειες που πρέπει να προστεθεί. Μετά τον εμβολιασμό, προστίθεται και 1.5 mL από το άγαρ 'πώμα'. Είναι σημαντικό να έχουν όλοι οι σωλήνες την ίδια ποσότητα άγαρος από πάνω, ώστε να απαιτηθεί η ίδια πίεση για απομάκρυνσή του. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες πωματίζονται και φυλάσσονται στους 13 °C. Στη συνέχεια ελέγχονται οι δοκιμαστικοί σωλήνες ανά ημέρα και παρατηρείται το πότε απομακρύνεται το πώμα πάνω από το θρεπτικό υλικό. Η απομάκρυνσή του σημαίνει ότι οι ζύμες είναι μεταβολικά ενεργές σε αυτή τη θερμοκρασία, ζυμώνουν τα σάκχαρα και παράγουν CO₂, το οποίο πιέζει το πώμα προς τα πάνω. Η κρυσταλλικότητα προσδιορίζεται με βάση τις ημέρες που απαιτούνται για απομάκρυνση του πώματος.

4. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΖΥΜΩΣΗ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ ΑΠΛΩΝ ΣΑΚΧΑΡΩΝ

Όργανα:

Μαγνήτες

Μαγνητικός αναδευτήρας

Ποτήρι ζέσεως

Παρασκευάζονται 4 υποστρώματα με τα σάκχαρα που υπάρχουν στο γλεύκος (γλυκόζη, φρουκτόζη, μαλτόζη, μίγμα σακχάρων). Τα υποστρώματα αυτά εμβολιάζονται με τις ζύμες και μετρείται πληθυσμός και βιωσιμότητα των κυττάρων. Το πείραμα έγινε εις διπλούν για κάθε ζύμη.

Το θρεπτικό υλικό έχει ίδια σύσταση με το θρεπτικό υλικό της προκαλλιέργειας στο πείραμα της κρυσταλλικότητας ζυμών, εκτός της συγκέντρωσης σακχάρων, η οποία ήταν 100 g/L και 120 g/L για τα υποστρώματα γλυκόζης. Συγκεκριμένα για ποσότητα 1 L απαιτούνται:

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (g)
Σάκχαρο/ Μίγμα σακχάρων	100 (120 για τη γλυκόζη)
K ₂ HPO ₄	1
KH ₂ PO ₄	1
(NH ₄) ₂ SO ₄	2
Mg ₂ SO ₄	0,2
Zn ₂ SO ₄	0,2
Εκχύλισμα ζύμης	2
pH	4,50

Πίνακας 3: Σύσταση υποστρώματος σακχάρων για ζύμωση

Για την παρασκευή του διαλύματος, διαλύονται οι ποσότητες σε ποσότητα νερού βρύσης με παράλληλη ανάδευση και πριν τη ρύθμιση pH, συμπληρώνεται νερό μέχρι την επιθυμητή ποσότητα (εδώ μέχρι 1 L), καθώς τα άλατα ενυδατώνονται και μειώνουν τον όγκο του διαλύματος. Για την περίπτωση του μίγματος σακχάρων, οι αναλογίες των σακχάρων είναι γλυκόζη 9 %-φρουκτόζη 5 %-μαλτόζη 86 % και έτσι υπολογίζονται οι μάζες για κάθε παρασκευή διαλύματος. Μετά την πλήρη διάλυση των συστατικών το μίγμα χωρίζεται σε φιάλες αποστείρωσης (vial) και αποστειρώνεται. Κάθε φιάλη εμβολιάζεται με συγκεκριμένη ποσότητα εμβολίου. Ο όγκος του εμβολίου ζύμης για κάθε υπόστρωμα υπολογίζεται έτσι ώστε ο αρχικός πληθυσμός να είναι $6 \cdot 10^6$ κύτταρα/ mL. Οι φιάλες τοποθετούνται σε ψυγείο θερμοστατημένο στους 13 °C και λαμβάνονται δείγματα ανά τακτά χρονικά διαστήματα για τις μετρήσεις πληθυσμού κυττάρων, συγκέντρωση σακχάρων και συγκέντρωση αλκοόλης.

5. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΖΥΘΟΓΛΕΥΚΟΥΣ

Στο συγκεκριμένο πείραμα μελετήθηκαν όλα τα στάδια της παραγωγής ζυθογλεύκους, το οποίο στη συνέχεια εμβολιάστηκε με ζυμομύκητες και ζυμώθηκε έως ότου να μετατραπεί σε μύρα. Οι ποσότητες των συστατικών που χρησιμοποιήθηκαν υπολογίστηκαν για επιθυμητή ποσότητα ζυθογλεύκους 100 L.

Αρχικά ζεστάθηκε ποσότητα νερού 63 L σε θερμοκρασία 64 °C. Το νερό μεταφέρθηκε στη δεξαμενή πολτοποίησης και προστέθηκε ποσότητα βύνης τύπου Pale Ale 22 kg, και αλεσμένης σε κόκκους διαμέτρου 1,2 mm, ώστε να πολτοποιηθεί. Τα στάδια της πολτοποίησης είναι τρία:

- Στο πρώτο στάδιο, η θερμοκρασία διατηρείται σταθερή στους 67 °C για 1 h, ώστε να δράσει η β-αμυλάση,
- Στο δεύτερο στάδιο, η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72 °C και διατηρείται για 15 min, ευνοώντας τη δράση της α-αμυλάσης
- Τέλος, η θερμοκρασία αυξάνεται στους 78 °C για 5 min, για να αδρανοποιηθούν τα ένζυμα.

Παράλληλα, λαμβάνεται δείγμα ανά 20 min και ελέγχεται το pH, το οποίο πρέπει να είναι περίπου 5,5 για βέλτιστη δραστηριότητα των ενζύμων. Το pH ρυθμίζεται με προσθήκη διαλύματος H_3PO_4 . Επίσης γίνεται τακτικά τεστ ιωδίου, για να παρατηρηθεί κατά πόσο έχει διασπαστεί το άμυλο. Αν το άμυλο δεν έχει διασπαστεί, το δείγμα θα αποκτήσει σκούρα μπλε απόχρωση, αλλιώς, αν έχει διασπαστεί το άμυλο, γίνεται η μετάβαση στο τρίτο στάδιο της πολτοποίησης, που είναι η αδρανοποίηση των ενζύμων. Η πυκνότητα του βυνογλεύκους στο τέλος της πολτοποίησης ήταν 22 °P στους 25 °C.

Μετά την πολτοποίηση ακολουθεί το στάδιο της εκχύλισης/διαύγασης του γλεύκους. Κατά την εκχύλιση απομακρύνονται τα στερεά από το μίγμα, με μεταφορά του μίγματος στη δεξαμενή εκχύλισης. Η διάυγαση είναι το πλέον χρονοβόρο βήμα κατά τη ζυθοποίηση, καθώς απαιτείται να μην υπάρχουν υπολείμματα βύνης στο γλέυκος πριν το βρασμό.

Αφού το γλέυκος διαυγαστεί, προστίθεται νερό, ώστε να μειωθεί η αρχική πυκνότητα σακχάρων περίπου στα 10,5-11 °P και να μη δυσκολευτούν οι ζύμες να προσαρμοστούν στο περιβάλλον αυτό, όταν προστεθούν. Συνολικά έγινε προσθήκη νερού μέχρι τελικού όγκου 116,8 L.

Τέλος ακολουθεί το στάδιο του βρασμού. Ο βρασμός του γλεύκους γίνεται για 110 min περίπου. Στην αρχή του βρασμού προστίθενται 50 g λυκίσκου και, ύστερα από 1 h,

προστίθενται άλλα 50 g. Οι πικρικές και αρωματικές ουσίες του λυκίσκου εκχυλίζονται στο γλεύκος κατά το στάδιο του βρασμού.

Μετά το βρασμό το γλεύκος διέρχεται από εναλλάκτη θερμότητας, ώστε να ψυχθεί περίπου στους 20 °C, όπου θα γίνει και ο εμβολιασμός.

6. ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΣ ΖΥΘΟΓΛΕΥΚΟΥΣ

Όπως και στα εμβόλια για τα πρότυπα υποστρώματα, έτσι και στο εμβολιασμό ζυθογλεύκους ακολουθείται η ίδια διαδικασία. Σε κωνικές φιάλες που σφραγίζονται με υδρόφοβο βαμβάκι και αλουμινόχαρτο προστίθενται 100 mL νερό βρύσης και αποστειρώνονται. Ύστερα από την αποστείρωση αφήνονται σε υδατόλουτρο μέχρι να αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου. Αφού αποκτήσουν την επιθυμητή θερμοκρασία προστίθενται οι ποσότητες ξηρής ζύμης που απαιτούνται. Για τον εμβολιασμό του ζυθογλεύκους προστίθενται 0.575 g ξηρής ζύμης ανά λίτρο ζυθογλεύκους. Συγκεκριμένα:

Ζύμες	Μάζες (g)	Όγκος ζυθογλεύκους (L)
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	8,6259	15
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	8,6233	15
Μίγμα US-05/T.d. Αναλογίας 1/10	0,575/10,925	20

Πίνακας 4: Μάζες ξηρής ζύμης που απαιτούνται για κάθε παρτίδα ζυθογλεύκους

Αφού αφεθούν για 15 min να ενυδατωθούν οι ζύμες, προστίθεται μικρή ποσότητα (περίπου 100 mL) αποστειρωμένου ζυθογλεύκους, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η προσθήκη αυτή γίνεται για να προσαρμοστούν στο περιβάλλον του γλεύκους οι ζύμες και να βρίσκονται στην εκθετική φάση της ανάπτυξής τους όταν προστεθούν στο ολικό γλεύκος.

Η προσθήκη στο ζυθογλεύκος γίνεται όταν αυτό βρίσκεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Τα δοχεία με το ζυθογλεύκος μεταφέρονται σε χώρο θερμοστατημένο στους 13 °C. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης λαμβάνεται ανά τακτά χρονικά διαστήματα δείγμα για μέτρηση πυκνότητας σακχάρων και συγκέντρωση ελεύθερου αζώτου αμινοξέων (FAN). Το πείραμα έγινε μία φορά

7. ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΛΕΥΘΕΡΟΥ ΑΖΩΤΟΥ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ (FAN) ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΝΙΝΥΔΡΙΝΗΣ

Όργανα:

Δοκιμαστικοί σωλήνες

Πώματα

Ογκομετρικές φιάλες 50 και 100 mL

Σιφώνι πλήρωσεως 5 mL

Φασματοφωτόμετρο

Η μέθοδος της νινυδρίνης μετράει το ελεύθερο άζωτο αμινοξέων, αμμωνίας και, σε μικρότερο βαθμό, το άζωτο στα α-αμινοξέα των πρωτεϊνών. Η μικρότερη ακρίβεια της

μεθόδου για το άζωτο των α-αμινοξέων οφείλεται στην ύπαρξη του γ-αμινοβουτυρικού οξέος, το οποίο είναι παρόν στο ζυθογλεύκος και στη μύρα και δίνει έντονο χρώμα παρουσία νινυδρίνης. Αρχικά παρασκευάζονται τα διαλύματα που θα χρησιμοποιηθούν, τα οποία και αποθηκεύονται για μελλοντική χρήση:

1) Αντιδραστήριο Νινυδρίνης (100 mL) – Διαλύονται 10 g ένυδρου όξινου φωσφορικού νατρίου ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), 6 g όξινου φωσφορικού καλίου, 0.5 g νινυδρίνης και 0.3 g φρουκτόζης σε απεσταγμένο νερό και αραιώνονται μέχρι τα 100 mL. Διατηρείται 2 εβδομάδες εντός κόκκινου μπουκαλιού σε ψυχρό περιβάλλον.

2) Διάλυμα αραιώσης (1 L) – Διαλύονται 2 g ιωδικού καλίου σε 600 mL απεσταγμένου νερού και προστίθενται 400 mL διαλύματος αιθανόλης 96 %. Διατηρείται στους 5 °C.

3) Πρότυπο αποθεματικό διάλυμα γλυκίνης (100 mL) – Διαλύονται 107.2 g γλυκίνης σε απεσταγμένο νερό και αραιώνονται μέχρι 100 mL. Διατηρείται στους 0 °C.

4) Πρότυπο διάλυμα γλυκίνης (100 mL) – Αραιώνεται 1 mL του αποθεματικού διαλύματος γλυκίνης σε 100 mL απεσταγμένου νερού. Αυτό το διάλυμα έχει συγκέντρωση 2 mg αζώτου αμίνης /L.

Μεταφέρονται 2 mL του διαλύματος γλυκίνης (4) σε δοκιμαστικούς σωλήνες εις τριπλούν και 2 mL απεσταγμένου νερού σε δοκιμαστικούς σωλήνες εις τριπλούν. Αυτά τα διαλύματα θα αποτελέσουν τα δυο τυφλά στις μετρήσεις. Αραιώνεται 1 mL γλεύκος σε νερό μέχρι τα 100 ml και ύστερα μεταφέρονται 2 mL του αραιωμένου διαλύματος σε άλλους δοκιμαστικούς σωλήνες εις τριπλούν. Στην περίπτωση της μύρας, αρχικά διηθείται ποσότητα μύρας για να απομακρυνθεί το ανθρακικό οξύ, αραιώνεται 1 mL της σε 50 mL νερού και μεταφέρονται 2 mL της αραιωμένης μύρας σε δοκιμαστικούς σωλήνες εις τριπλούν. Όταν πρόκειται να γίνουν μετρήσεις σε δείγματα μύρας κατά τη ζύμωση, οι αραιώσεις στα ενδιάμεσα δείγματα μπορούν να είναι μεταξύ 1/50 και 1/100, ανάλογα το χρόνο ζύμωσης. Στο πείραμα επιλέχθηκε αραιώση 1/70.

Σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα (με γλυκίνη, γλεύκος, μύρας και νερό) προστίθεται 1 mL διαλύματος νινυδρίνης (1), και, στη συνέχεια, κάθε σωλήνας σφραγίζεται ώστε να μην υπάρξουν απώλειες από εξάτμιση. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες θερμαίνονται για 16 min σε υδατόλουτρο που βράζει και μετά ψύχονται για 20 min σε υδατόλουτρο. Ύστερα προστίθενται 5 mL διαλύματος αραιώσης (2) σε κάθε σωλήνα. Οι σωλήνες αναδεύονται και μετρείται η απορρόφησή τους στα 570 nm, με βαθμονόμηση του φασματοφωτόμετρου με το τυφλό διάλυμα. Η μέτρηση της απορρόφησης πρέπει να γίνει μέσα σε λιγότερο από 30 min μετά την προσθήκη του διαλύματος αραιώσης.

Εξάγεται ο μέσος όρος των μετρήσεων για κάθε τριάδα δοκιμαστικών σωλήνων. Το ελεύθερο άζωτο (FAN) μετρείται με τον παρακάτω τύπο:

$$\text{FAN} = 2 * \text{αραιώση} * (\text{απορρόφηση διαλύματος - τυφλό}) / (\text{απορρόφηση προτύπου διαλύματος γλυκίνης - τυφλό}) \quad (4)$$

Με την αραιώση να είναι ο όγκος διαλύματος στον οποίο αραιώθηκαν τα διαλύματα.

8. ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΑΚΧΑΡΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΔΙΝΙΤΡΟΣΑΛΙΚΥΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ (DNS)

Όργανα:

Ποτήρι ζέσεως

Μαγνήτης

Μαγνητικός αναδευτήρας

Δοκιμαστικοί σωλήνες

Πιπέτα

Tips πιπέτας

Η μέθοδος DNS είναι φωτομετρική μέθοδος και χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των υπολλειπόμενων αναγωγικών σακχάρων στα πρότυπα υποστρώματα. Τα σάκχαρα της μύρας είναι όλα αναγωγικά, οπότε μπορούν να μετρηθούν με αυτή τη μέθοδο. Διαθέτουν δηλαδή ημιακεταλικό υδροξύλιο, με το οποίο μπορούν να συμπλοκοποιηθούν με το δινιτροσαλικυλικό οξύ. Η αντίδραση αυτή γίνεται σε θερμοκρασία άνω των 70°C και δίνει στο διάλυμα χρώμα κίτρινο έως βαθύ κόκκινο, ανάλογα τη συγκέντρωση των υπολλειπόμενων σακχάρων.

8.1. Παρασκευή διαλύματος DNS

Για ποσότητα 1 L διαλύματος, απαιτούνται τα παρακάτω συστατικά:

- 16 g NaOH
- 10 g άνυδρο DNS
- 402,7 g KNaC₄H₄O₆

Σε ποτήρι ζέσεως προστίθενται 200 mL απιονισμένου και διαλύεται το NaOH υπό ανάδευση. Μετά προστίθενται άλλα 500 mL νερού, το DNS και, τέλος, το KNaC₄H₄O₆, με πολύ αργό ρυθμό και υπό ανάδευση και ελαφριά θέρμανση. Η προσθήκη του αντιδραστηρίου αυτού γίνεται με αυτόν τον τρόπο, καθώς σχηματίζει πολύ εύκολα συσσωματώματα τα οποία δε διαλύονται μετά. Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμο μπουκάλι και σε σκοτεινό χώρο.

8.2. Μέτρηση

Αρχικά, γίνονται οι απαραίτητες αραιώσεις των δειγμάτων. Σε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται 0,5 mL αραιωμένου (ή μη) δείγματος και 0,5 mL DNS. Σε άλλο δοκιμαστικό σωλήνα προστίθεται απιονισμένο νερό ίδιου όγκου αντί δείγματος και αποτελεί το τυφλό. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες μεταφέρονται σε υδατόλουτρο που βράζει για 5 min, ώστε να σχηματιστεί το σύμπλοκο μεταξύ του DNS και του σακχάρου. Μετά σε κάθε δοκιμαστικό προστίθενται 4 mL απιονισμένο νερό, για επιπλέον αραιώση και γίνεται μέτρηση στο φασματοφωτόμετρο στα 540 nm, αφού προηγηθεί μηδενισμός με το τυφλό. Για κάθε δείγμα γίνεται μέτρηση εις διπλούν.

Πριν τη μέτρηση των δειγμάτων γίνεται κατασκευή καμπύλης αναφοράς. Παρασκευάζονται διαλύματα του επιθυμητού σακχάρου (2 mg/mL) και διαδοχικών του αραιώσεων και ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω. Για κάθε δείγμα γίνεται μέτρηση εις διπλούν.

9. ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΑΚΧΑΡΩΝ ΜΕ ΠΛΑΤΟΜΕΤΡΟ

Στην περίπτωση του ζυθογλεύκου η μέτρηση των υπολλειπόμενων σακχάρων έγινε με πλατόμετρο. Το πλατόμετρο είχε διαβαθμίσεις και πίνακα διόρθωσης της πυκνότητας ως προς τη θερμοκρασία.

Περίπου 90 mL δείγματος διηθούνται για απομάκρυνση του CO₂. Βυθίζεται το πλατόμετρο και καταγράφεται η ένδειξή του, αφού διορθωθεί ως προς τη θερμοκρασία.

10. ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΑΚΧΑΡΩΝ ΜΕ ΥΓΡΟ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΟ

Στα πρότυπα διαλύματα μαλτόζης η μέτρηση με τη μέθοδο DNS δεν προτείνεται, καθώς οι ζύμες, για να καταναλώσουν τη μαλτόζη, πρέπει πρώτα να τη διασπάσουν σε γλυκόζη. Το DNS συμπλοκοποιείται και με τα 2 σάκχαρα, δίνοντας λανθασμένες μετρήσεις, ενώ επιθυμείται μόνο η μέτρηση της μαλτόζης που καταναλώθηκε. Γι' αυτό το λόγο η μέτρηση της μαλτόζης έγινε με τη χρήση υγρού χρωματογράφου. Ο υγρός χρωματογράφος αποτελούνταν από: σύστημα HPLC (HPLC system Agilent series 1100, Γερμανία), ανιχνευτή διαθλασίμετρο (Refraction Index, RI, Hewlett Packard 1047A, Ιαπωνία), αντλία (iso pump G1310A Agilent series 1100, Γερμανία), στήλη Microsorb-MV 100 NH₂ (Agilent Technologies, Γερμανία) και προ-στήλη Polaris 5 NH₂ MetaGuard (Agilent Technologies, Γερμανία) σύμφωνα με την παρακάτω μέθοδο. Στο χρωματογράφο γινόταν ένεση 8 μL δείγματος, το οποίο αρχικά είχε φιλτραριστεί με φίλτρο 0,22 μm.

Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε αποτελείται από C₂H₃N και νερό καθαρότητας για χρήση σε υγρό χρωματογράφο, σε αναλογία 70/30 και η ροή καθορίστηκε σε 1,3 mL/min, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ο διαλύτης προηγουμένως είχε υποβληθεί σε απαέρωση για 30 min, ώστε να μην υπάρχουν φυσαλίδες. Όπως και στη μέθοδο DNS, κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη και ο υπολογισμός της μαλτόζης έγινε σύμφωνα με αυτή.

11. ΜΕΤΡΗΣΗ ΧΡΩΜΑΤΟΣ ΜΠΥΡΑΣ

Γίνεται διήθηση της μπίρας για απομάκρυνση του ανθρακικού οξέος. Από τη διηθημένη μπίρα μεταφέρεται ποσότητα στην κυψελίδα του φασματοφωτόμετρου μέσω φίλτρου. Μετρείται η απορρόφηση στα 430 nm και στα 700 nm. Οι απορροφήσεις που βρίσκονται πολλαπλασιάζονται με το συντελεστή A_{1/2}=1,27, ο οποίος είναι η απορρόφηση για εμβαδό κυψελίδας μισής ίντσας. Αν η νέα απορρόφηση στα 430nm είναι μεγαλύτερη από 0.039 φορές την απορρόφηση στα 700 nm, τότε η μπίρα είναι ελεύθερη θολερότητας και το χρώμα της δίνεται από τον τύπο

$$\text{Χρώμα} = 10 * A_{1/2}(430\text{nm}) \quad (5)$$

Αλλιώς, αν δεν ισχύει η ανισότητα, τότε η μπίρα πρέπει να διηθηθεί ή να φυγοκεντρηθεί, ώστε να είναι πιο διαυγής και να ξαναγίνει η μέτρηση απορρόφησης.

12. ΜΕΤΡΗΣΗ ΠΙΚΡΑΔΑΣ ΜΠΥΡΑΣ

Σε φυγοκεντρικό σωλήνα προστίθενται 5 mL κρύας ανθρακούχας μπίρας με σιφώνι (δηλαδή χωρίς να έχει γίνει διήθηση), 0.5 mL διαλύματος HCl 3 N και 10 mL ισοοκτανίου.

Επίσης ετοιμάζεται ένα τυφλό διάλυμα με 0.5 mL διαλύματος υδροχλωρικού οξέος 3 N και 10 mL ισοοκτανίου σε άλλο φυγοκεντρικό σωλήνα. Οι σωλήνες ανακατεύονται με το χέρι δυο με τρεις φορές και ύστερα τοποθετούνται σε αναδευτήρα για 15 min και στο 80% της μέγιστης ισχύος του. Στη συνέχεια φυγοκεντρώνονται για 10 min στα 3500 rpm για διαχωρισμό των φάσεων. Με σιφώνι μεταφέρεται στην κυψελίδα του φασματοφωτόμετρου ποσότητα ισοοκτανίου από το σωλήνα με το τυφλό διάλυμα και μηδενίζεται η ένδειξη του οργάνου, σε μήκος κύματος 275 nm. Σε άλλη κυψελίδα τοποθετείται ποσότητα ισοοκτανίου από τον άλλο σωλήνα με τη μύρα και γίνεται μέτρηση απορρόφησης. Η πικράδα μετρείται σε μονάδες πικράδας, IBU, οι οποίες υπολογίζονται με τον παρακάτω τύπο:

$$IBU = A \cdot 50 \quad (6)$$

Όπου A η απορρόφηση στα 275 nm.

13. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΜΕ ΣΤΗΛΗ VIGREUX

Αρχικά γίνεται διήθηση 50 mL δείγματος μύρας για απομάκρυνση του αφρού. Σε ποτήρι ζέσεως μεταφέρονται τα 50 mL δείγματος μετά τη διήθηση μαζί με 25 mL διαιθυλαιθέρα και 25 mL πεντάνιο. Γίνεται ανάμιξη με χρήση μαγνητικού αναδευτήρα για 10 min σε ταχύτητα τέτοια ώστε να μη διακρίνονται οι δυο φάσεις που σχηματίζονται. Έπειτα το μίγμα φυγοκεντρείται στα 3500 rpm για 10 min. Στη συνέχεια, διαχωρίζεται η οργανική από την υδατική φάση και συλλέγεται η οργανική με τις πρωτεΐνες που περιέχει σε άλλο ποτήρι ζέσεως. Η υδατική υφίσταται δεύτερη φορά την ίδια διαδικασία.

Σε διαχωριστική χοάνη τοποθετείται η οργανική φάση χωρίς τις πρωτεΐνες και λίγο απεσταγμένο νερό, ώστε να είναι διακριτές οι φάσεις. Η χοάνη αναδεύεται ανοίγοντας τη βαλβίδα για εκτόνωση του CO₂ που παράγεται, με προσοχή λόγω της υψηλής πίεσης που αναπτύσσεται. Μετά η χοάνη αφήνεται, ώστε να σχηματιστούν οι δύο φάσεις. Συλλέγεται η οργανική σε καθαρό ποτήρι ζέσεως και προστίθεται Na₂SO₄, σε ποσότητα τέτοια ώστε να απομακρύνει οποιαδήποτε υπολειπόμενη υγρασία από το σύστημα (το Na₂SO₄ διογκώνεται παρουσία νερού, οπότε παρατηρείται εύκολα πόσο απαιτείται κάθε φορά). Η οργανική φάση αναδεύεται μαζί με το Na₂SO₄ και συλλέγεται στην προζυγισμένη με το καπάκι της απιοειδή φιάλη, με βοήθεια διηθητικού χαρτιού, ώστε να μη διαρρεύσει άλας ή ο μαγνήτης. Στην απιοειδή φιάλη προστίθενται 10 μL 3-οκτανόλης, ως εσωτερικό πρότυπο. Η απιοειδής φιάλη συνδέεται με τη στήλη Vigreux και γίνεται απόσταξη για περίπου 40-50 min σε θερμοκρασία 40-50 °C.

Η απιοειδής φιάλη ζυγίζεται μετά την απόσταξη του δείγματος και η διαφορά βάρους επιθυμείται να τείνει στα 100 mg. Αν δεν ισχύει αυτό, γίνεται συμπύκνωση του δείγματος με αέριο άζωτο, για να εξατμιστεί ο διαλύτης που έχει απομείνει. Τέλος, γίνεται ένεση του συμπυκνώματος στο φασματοφωτόμετρο μάζας αέριας χρωματογραφίας Hewlett-Packard 6890 Agilent Technologies 5975C VL MSD Triple-Axis detector. Ο διαχωρισμός του ουσιών γίνεται με τη βοήθεια τριχοειδούς στήλης διοξειδίου του πυριτίου HP-1 (Agilent Technologies) με διαστάσεις 30 m x 0,32 mm x 0,25 μm και φέρον αέριο He ροής 1 mL/min. Στο χρωματογράφο εισάγεται με ένεση ποσότητα 1 μL. Η θερμοκρασία της γραμμής μεταφοράς είναι 38 °C.

14. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΑΕΡΙΟΥ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΟΥ

Για τον προσδιορισμό της αιθανόλης που παρήχθηκε στα πρότυπα υποστρώματα χρησιμοποιήθηκε αέριος χρωματογράφος GC Perkin-Elmer με ανιχνευτής φλόγας ιονισμού (FID), αέριο καύσης μίγμα υδρογόνου και αέρα σε πιέσεις 15 lbs και 20 lbs αντίστοιχα. Η ένεση γινόταν χωρίς διαχωρισμό (splitless). Ο τύπος της στήλης ήταν fused silica, megabore, της εταιρείας Agilent J&W Scientific. Το δείγμα φιλτραρίστηκε με φίλτρα διαμέτρου 0,22 μm και ύστερα γινόταν ένεση 1 μL στο χρωματογράφο. Το εμβασμό της κορυφή που εμφάνιζε η αιθανόλη μετατρέπεται σε συγκέντρωση σύμφωνα με καμπύλη αναφοράς που κατασκευάστηκε.

Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το παρακάτω:

- Αρχική θερμοκρασία 50 °C και διατήρησή της για 5 min.
- Αύξηση της θερμοκρασίας με ρυθμό 10 °C/min μέχρι τους 210 °C.
- Διατήρηση της θερμοκρασίας στους 210 °C για 3 min.

15. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ ΣΤΗ ΜΠΥΡΑ ΜΕ ΑΛΚΟΟΛΟΜΕΤΡΟ

Σε ογκομετρικό κύλινδρο τοποθετούνται 100 mL μύρας, αφού προηγηθεί διήθηση για απομάκρυνση τους ανθρακικού οξέος. Η μύρα μετά μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη (κατά προτίμηση των 500 mL) για απόσταξη. Στην ογκομετρική φιάλη τοποθετούνται πυρήνες βρασμού (ή μια σταγόνα αντιαφριστικού), ώστε να μην ξεκινήσει έντονα ο βρασμός της. Σε άλλη ογκομετρική φιάλη (των 100 mL) συλλέγεται η αιθανόλη. Για αποφυγή εξάτμισης των πρώτων σταγόνων αιθανόλης, η φιάλη στην οποία θα συλλεχθεί πρέπει να περιέχει 1-2 mL νερό, στο οποίο θα διαλυθεί η αιθανόλη.

Όταν συλλεχθούν περίπου 75 mL αιθανόλης, η φιάλη της απομακρύνεται και διακόπτεται η απόσταξη. Η φιάλη με την αιθανόλη συμπληρώνεται μέχρι τα 100 mL με νερό και το διάλυμα που προκύπτει μεταφέρεται σε ογκομετρικό κύλινδρο. Στον ογκομετρικό κύλινδρο τοποθετείται το αλκοολόμετρο και αφήνεται να ισορροπήσει. Στην επιφάνεια του διαλύματος διαβάζεται η μέτρηση του αλκοολόμετρου και προσδιορίζεται η περιεκτικότητα σε αιθανόλη.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Έλεγχος κρυσταλλικότητας ζυμών

Στον πίνακα 5 φαίνονται τα αποτελέσματα της κρυσταλλικότητας των στελεχών ζυμών που χρησιμοποιήθηκαν στα υποστρώματα των 3 σακχάρων της μύρας (γλυκόζη, φρουκτόζη, μαλτόζη). Το πείραμα έγινε εις διπλούν και γι' αυτό υπάρχουν δυο σειρές μετρήσεων.

ΟΝΟΜΑ ΖΥΜΗΣ & ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ	Σειρά 1	Σειρά 2
	t (d)	t (d)
<i>Torulaspora delbrueckii</i> , Prelude/ γλυκόζη	6	6
<i>Torulaspora delbrueckii</i> , Prelude/φρουκτόζη	8	10
<i>Torulaspora delbrueckii</i> , Prelude/ μαλτόζη	28	
<i>Torulaspora delbrueckii</i> , E491/ γλυκόζη	5	10
<i>Torulaspora delbrueckii</i> , E491/ φρουκτόζη	5	
<i>Torulaspora delbrueckii</i> , E491/ μαλτόζη		30
<i>Torulaspora delbrueckii</i> 291 / γλυκόζη	14	15
<i>Torulaspora delbrueckii</i> 291 / φρουκτόζη	5	5
<i>Torulaspora delbrueckii</i> 291 / μαλτόζη	26	
<i>Metchikowia pulcherrima</i> 346 / γλυκόζη	18	
<i>Metchikowia pulcherrima</i> 346 /φρουκτόζη	5	5
<i>Metchikowia pulcherrima</i> 346 / μαλτόζη	11	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , S-23 / γλυκόζη	3	3
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , S-23 / φρουκτόζη	3	3
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , S-23 / μαλτόζη	3	3
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , US-05 / γλυκόζη	3	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , US-05 / φρουκτόζη	3	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , US-05 / μαλτόζη	3	

Πίνακας 5: Αποτελέσματα κρυσταλλικότητας των 6 στελεχών ζυμών

Παρατηρείται ότι σε όλες τις περιπτώσεις στελεχών ζυμών και υποστρωμάτων, έγινε απομάκρυνση του πύματος, δηλαδή ζύμωση των σακχάρων και παραγωγή επαρκούς ποσότητας CO₂.

Σε ορισμένες περιπτώσεις, παρατηρείται ότι η καλλιέργεια της μιας σειράς πειραμάτων δεν κατάφερε να απομακρύνει το άγαρ πύμα. Αυτό οφείλεται στο ότι το άγαρ έπρεπε να είναι σε υγρή μορφή όταν γινόταν η προσθήκη του 1 mL. Αυτό προϋποθέτει όμως να είναι σε θερμοκρασία μεγαλύτερη των 45 °C. Η θερμοκρασία αυτή είναι οριακά θανατηφόρα για τις ζύμες και αυτός είναι ο λόγος που δεν παρατηρείται απομάκρυνση του πύματος και στις 2 σειρές του πειράματος.

Ο *S. cerevisiae* S-23 αποδείχθηκε ο πιο ανθεκτικός μικροοργανισμός, ως προς τη θερμοκρασία, καθώς το άγαρ πύμα απομακρύνθηκε σε όλες τις περιπτώσεις, αλλά και μέσα σε 3 d. Ομοίως ο US-05 κατάφερε να ζυμώσει τα 3 σάκχαρα, τουλάχιστον στη μια σειρά μετρήσεων.

Η *M. pulcherrima* απομακρύνει το πύμα από τα υποστρώματα φρουκτόζης και μαλτόζης αρκετά νωρίτερα από το υπόστρωμα γλυκόζης. Αυτό μάλλον οφείλεται στο πρόβλημα της υψηλής θερμοκρασίας του άγαρος, στο υπόστρωμα της γλυκόζης, καθώς δεν είναι δυνατόν

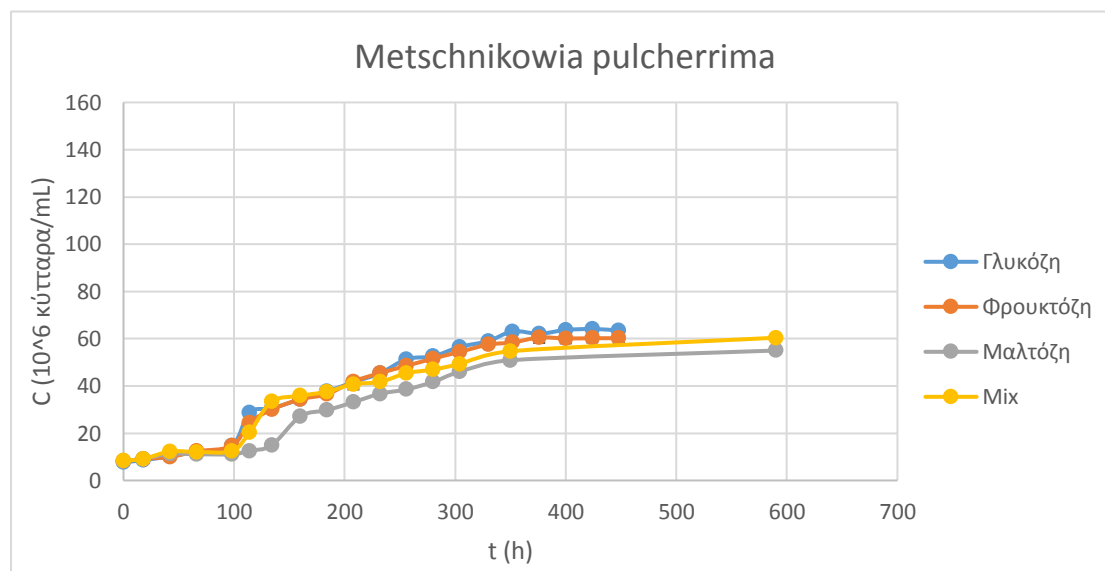
η μαλτόζη, ως δισακχαρίτης, να μεταβολίζεται γρηγορότερα από το μονοσακχαρίτη γλυκόζη. Η υψηλή θερμοκρασία του άγαρος θανάτωσε τα περισσότερα κύτταρα, αλλά τα εναπομείναντα κατανάλωσαν τη γλυκόζη, παράγοντας την απαραίτητη ποσότητα CO₂ για απομάκρυνση του πύματος. Για τον ίδιο λόγο καθώς στη δεύτερη σειρά πειράματος δεν παρατηρείται απομάκρυνση πύματος και το στέλεχος *T. delbrueckii* 291 χρειάστηκε περισσότερες ημέρες από τα άλλα δυο για την απομάκρυνση πύματος στη γλυκόζη.

Η *T. delbrueckii* παρουσίασε γενικά τους μεγαλύτερους χρόνους απομάκρυνσης του πύματος στα υποστρώματα μαλτόζης. Αυτό οφείλεται στη μεγάλη περίοδος προσαρμογής που απαιτούσαν τα κύτταρα, όπως θα δειχθεί και στα παρακάτω διαγράμματα. Για τη συνέχεια της μελέτης επιλέχθηκε το στέλεχος 291, διότι παρουσίασε το μικρότερο χρόνο απόμάκρυνσης πύματος από τα τρία στελέχη στο θρεπτικό υλικό μαλτόζης, καθώς και η μαλτόζη είναι το κύριο σάκχαρο του ζυθογλεύκου.

2. Ζύμωση διαλυμάτων απλών σακχάρων

2.1. Ανάπτυξη ζυμών σε διαλύματα απλών σακχάρων

Στα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των ζυμώσεων των σακχάρων γλυκόζης, φρουκτόζης, μαλτόζης και μίγματος σακχάρων, ως προς τον πληθυσμό και τη βιωσιμότητα των ζυμών. Τα πειράματα έγιναν εις διπλούν και στα διαγράμματα απεικονίζεται ο μέσος όρος των μετρήσεων.

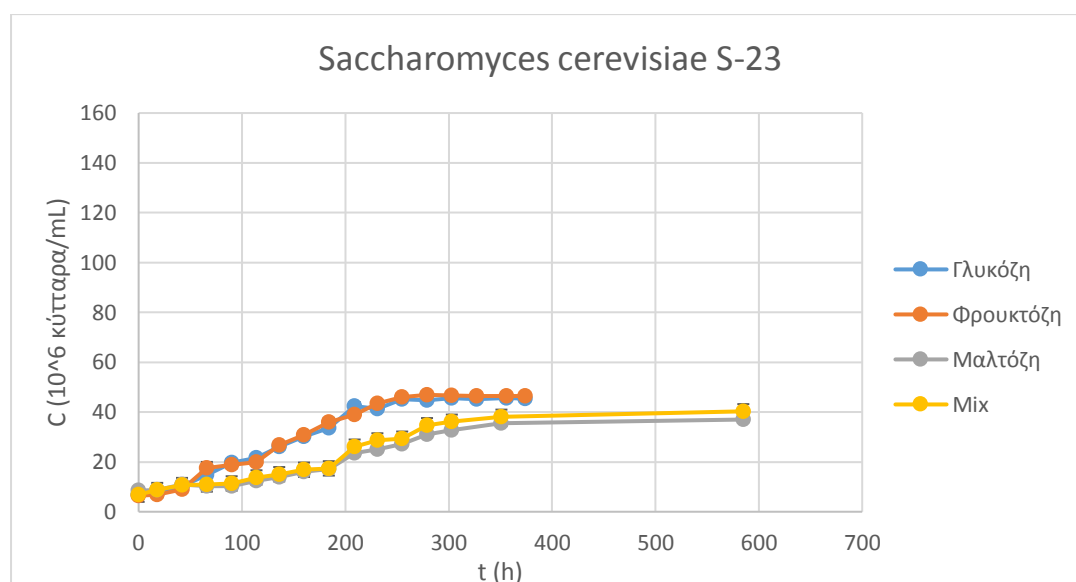


Διάγραμμα 1: Καμπύλες ανάπτυξης της *M. pulcherrima* στα 4 υποστρώματα σακχάρων

Η *M. pulcherrima* γενικά παρουσίασε μεγαλύτερους χρόνους προσαρμογής από τις υπόλοιπες ζύμες. Στα υποστρώματα γλυκόζης, φρουκτόζης και μίγματος, παρατηρείται ότι ο πληθυσμός μέχρι τις 100 h περίπου έχει αυξηθεί λίγο πάνω από τα $10 \cdot 10^6$ κύτταρα/mL, με αρχικό πληθυσμό μεταξύ $6-8 \cdot 10^6$ κύτταρα/mL. Στη μαλτόζη παρατηρείται μια μικρή καθυστέρηση, καθώς τα κύτταρα πρέπει να διασπάσουν το δισακχαρίτη αρχικά σε γλυκόζη και μετά να τον μεταβολίσουν. Αυτό το εμπόδιο, μαζί με τη χαμηλότερη θερμοκρασία ζύμωσης, στους 13 °C, φτάνει τη φάση προσαρμογής περίπου στις 130 h.

Στη συνέχεια ο πληθυσμός αυξάνεται απότομα στα περίπου $30 \cdot 10^6$ κύτταρα/mL και στις 4 περιπτώσεις και, ύστερα η ανάπτυξη σταθεροποιείται μέχρι περίπου τις 350 h. Μετά από αυτό το σημείο επέρχεται η στάσιμη φάση. Οι τελικοί πληθυσμοί δείχνουν σε ποιο υποστρώμα προσαρμόστηκαν καλύτερα οι ζύμες, καθώς παρατηρείται ότι στη μαλτόζη ο τελικός πληθυσμός ήταν $55 \cdot 10^6$ κύτταρα/mL, ενώ στα άλλα 3 υποστρώματα, τα οποία περιείχαν και απλά σάκχαρα, οι τελικοί πληθυσμοί κυμαίνονται μεταξύ 60 και $63 \cdot 10^6$ κύτταρα/mL.

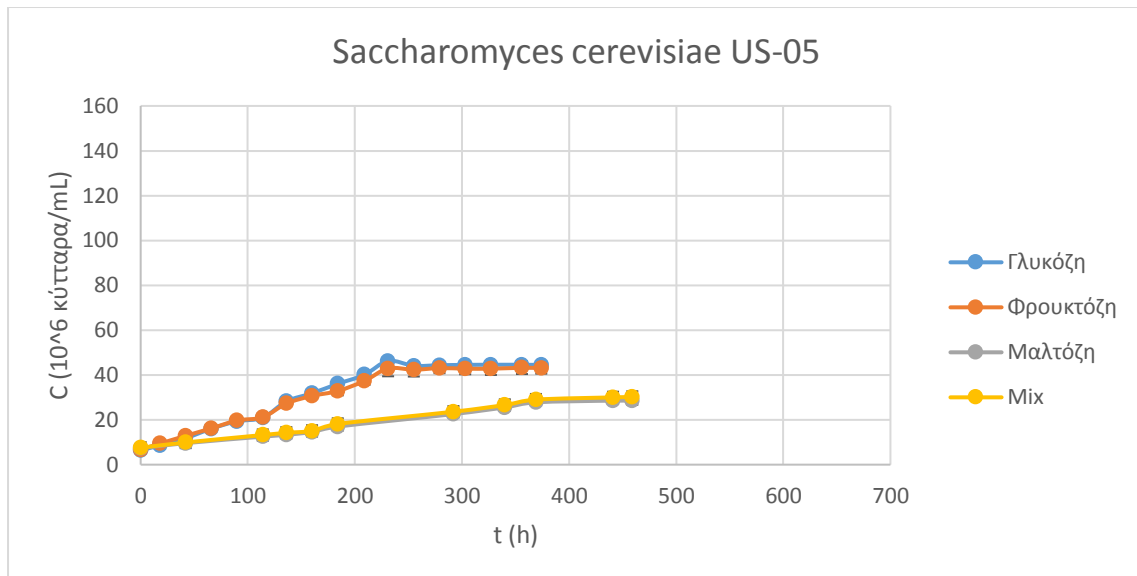
Στις περιπτώσεις της μαλτόζης και του μίγματος σακχάρων η ζύμωση διήρκησε περισσότερο, καθώς υπήρχε το επιπλέον εμπόδιο της διάσπασης της μαλτόζης στην ανάπτυξη των κυττάρων.



Διάγραμμα 2: Καμπύλες ανάπτυξης του *S. cerevisiae* S-23 στα 4 υποστρώματα σακχάρων

Ο *S. cerevisiae* S-23 (lager) στα υποστρώματα γλυκόζης και φρουκτόζης αναπτύχθηκε με παρόμοιο τρόπο ως προς τις φάσεις προσαρμογής, ανάπτυξης και στάσιμης. Η φάση προσαρμογής είναι αμελητέα, διότι η ανάπτυξή του στα υποστρώματα είναι εξ' αρχής σχετικά σταθερή. Στις 250 h περίπου εισήλθε στη στάσιμη φάση, όπως φαίνεται στο διάγραμμα.

Στις περιπτώσεις της μαλτόζης και του μίγματος σακχάρων, η ανάπτυξή του είναι σαφώς πιο αργή, αλλά με αμελητέα φάση προσαρμογής, όπως και στη γλυκόζη και τη φρουκτόζη. Οι τελικοί πληθυσμοί είναι μικρότεροι στα υποστρώματα μαλτόζης και μίγματος σακχάρων.

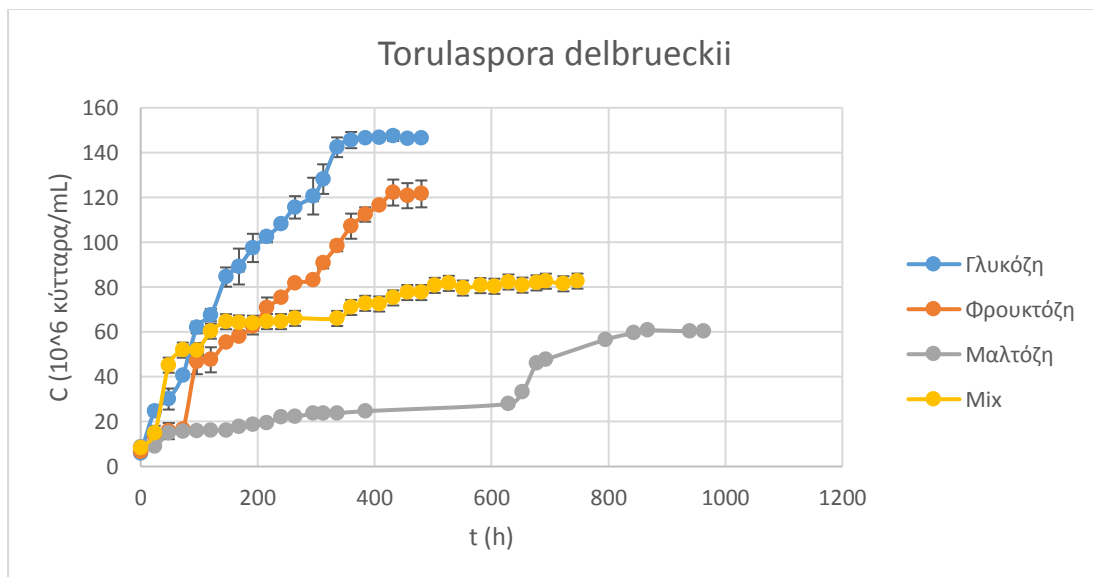


Διάγραμμα 3: Καμπύλες ανάπτυξης του *S. cerevisiae* US-05 στα 4 υποστρώματα σακχάρων

Ο *S. cerevisiae* US-05 (ale) παρουσιάζει και αυτός αμελητέα φάση προσαρμογής στα υποστρώματα γλυκόζης και φρουκτόζης. Η στάσιμη φάση παρατηρείται στις 250 h, όπως και στην περίπτωση του S-23.

Παρόλο που οι ale ζύμες θεωρούνται λιγότερο κρυσανθεκτικές από τις lager, στα υποστρώματα γλυκόζης και φρουκτόζης κατάφεραν και τα δυο είδη να ζυμώσουν τα σάκχαρα και να φτάσουν σε κοντινούς τελικούς πληθυσμούς.

Στα υποστρώματα μαλτόζης και μίγματος η ανάπτυξη είναι σαφώς πιο αργή και με αρκετά μικρότερο τελικό πληθυσμό. Η φάση προσαρμογής είναι αμελητέα και εδώ, καθώς ο πληθυσμός αυξάνεται σχεδόν σταθερά μέχρι το τέλος της ζύμωσης. Στην περίπτωση του μίγματος ο πληθυσμός είναι ελάχιστα μεγαλύτερος από αυτόν του υποστρώματος μαλτόζης, καθώς τα μικρά ποσοστά φρουκτόζης και η γλυκόζη στο μίγμα που υπήρχαν εξ'αρχής βοήθησαν στην περαιτέρω ανάπτυξη των ζυμών.



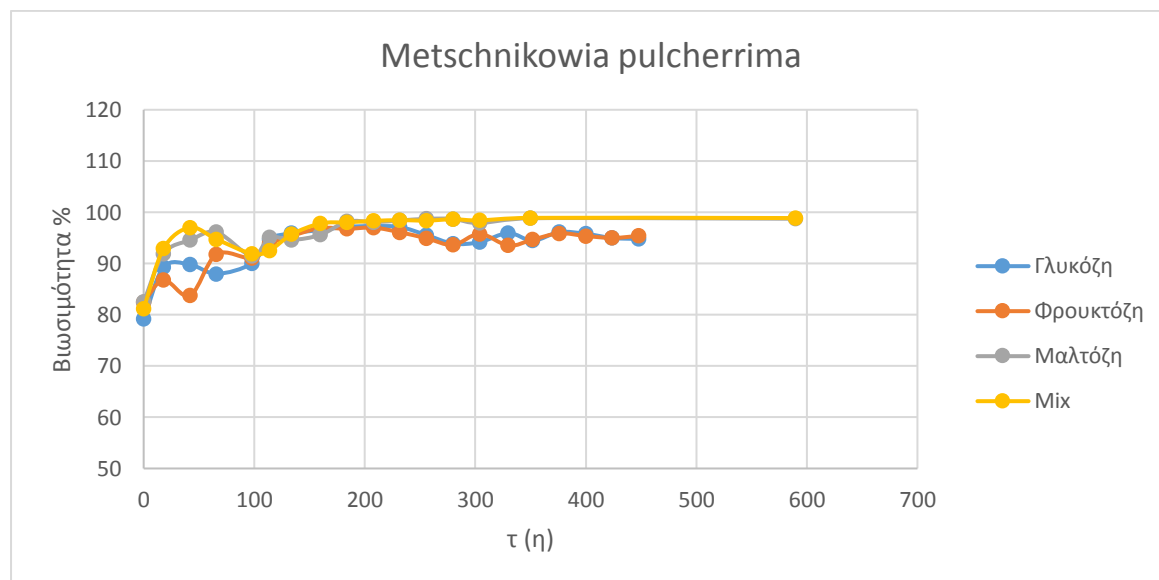
Διάγραμμα 4: Καμπύλες ανάπτυξης της *T. delbrueckii* στα 4 υποστρώματα σακχάρων

Η *T. delbrueckii* παρουσίασε μεγαλύτερη ποικιλία γενικά ως προς τα στάδια ανάπτυξής της. Στην περίπτωση της γλυκόζης, εισέρχεται σχεδόν αμέσως στη φάση ανάπτυξης και αναπτύσσεται μέχρι τις 370 h περίπου, ενώ μετά εισέρχεται στη στάσιμη φάση, με τελικό πληθυσμό περίπου $145 \cdot 10^6$ κύτταρα/mL. Στην περίπτωση της φρουκτόζης παρατηρείται μια φάση προσαρμογής 50 h, ενώ κατά τη στάσιμη φάση, ο τελικός πληθυσμός είναι αρκετά μικρότερος, στα $120 \cdot 10^6$ κύτταρα/mL. Ο λόγος είναι ότι η *T. delbrueckii* σχημάτιζε μεγάλα συσσωματώματα στο υπόστρωμα φρουκτόζης, που οδηγεί το συμπέρασμα ότι το περιβάλλον αυτό δεν ήταν το κατάλληλο για την ανάπτυξή της.

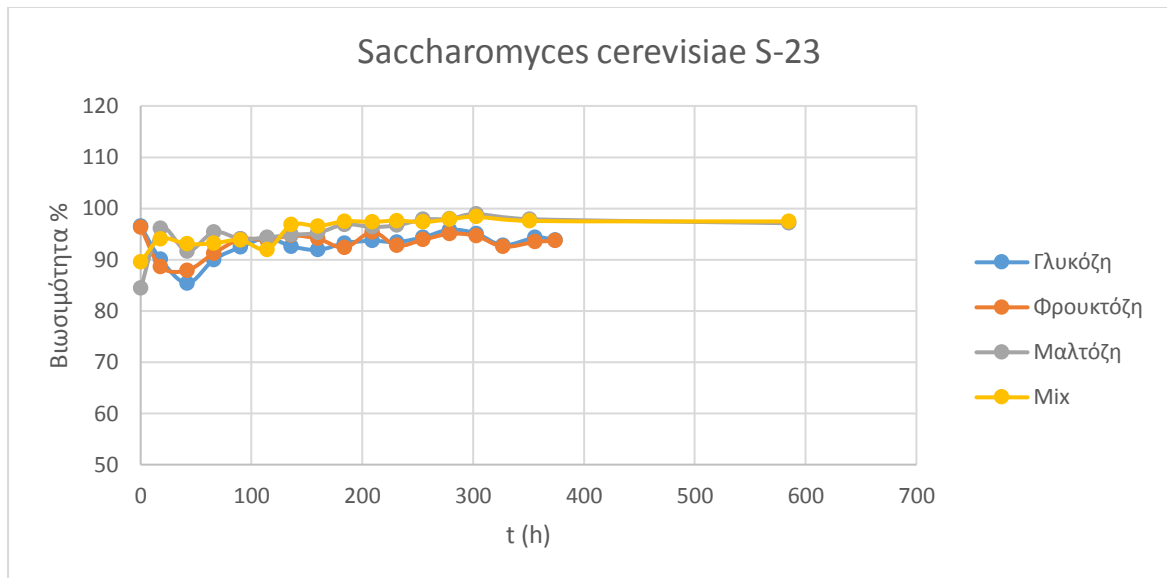
Στο υπόστρωμα μαλτόζης παρατηρείται μια μεγάλη καθυστέρηση στην προσαρμογή των ζυμών και δυο φάσεις ανάπτυξης. Μέχρι τις 650 h περίπου ο πληθυσμός έχει φτάσει τα $30 \cdot 10^6$ κύτταρα με πολύ αργό ρυθμό, ενώ μετά τις 650 h, που οι ζύμες προσαρμόζονται στο περιβάλλον τους, αναπτύσσονται μέχρι τα $60 \cdot 10^6$ κύτταρα μέσα σε περίπου 200 h.

Ως προς το μίγμα σακχάρων, η ζύμωση καθυστερεί λιγότερο. Μέσα στις πρώτες 120 h ο πληθυσμός έχει φτάσει τα $60 \cdot 10^6$ κύτταρα/mL, καθώς μέχρι τότε καταναλώθηκαν κυρίως οι ποσότητες γλυκόζης και φρουκτόζης. Από εκεί και έπειτα η ανάπτυξη των κυττάρων είναι πολύ αργή, με τελικό πληθυσμό $81 \cdot 10^6$ κύτταρα/mL, δηλαδή αύξηση κατά $20 \cdot 10^6$ περίπου κύτταρα σε διάστημα 26 ημερών.

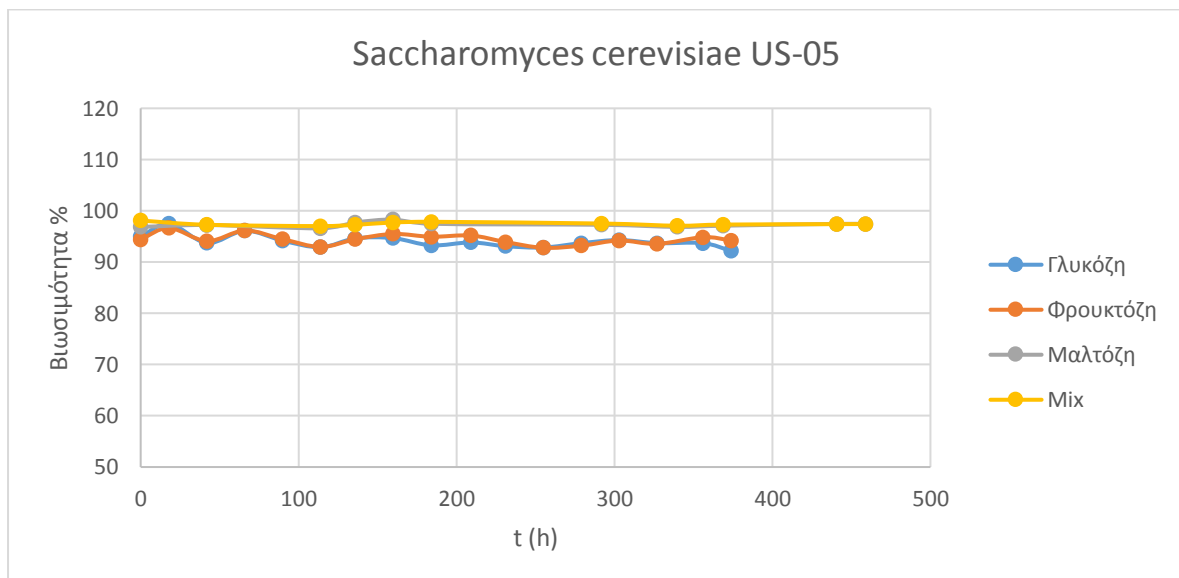
2.2 Βιωσιμότητα κυττάρων



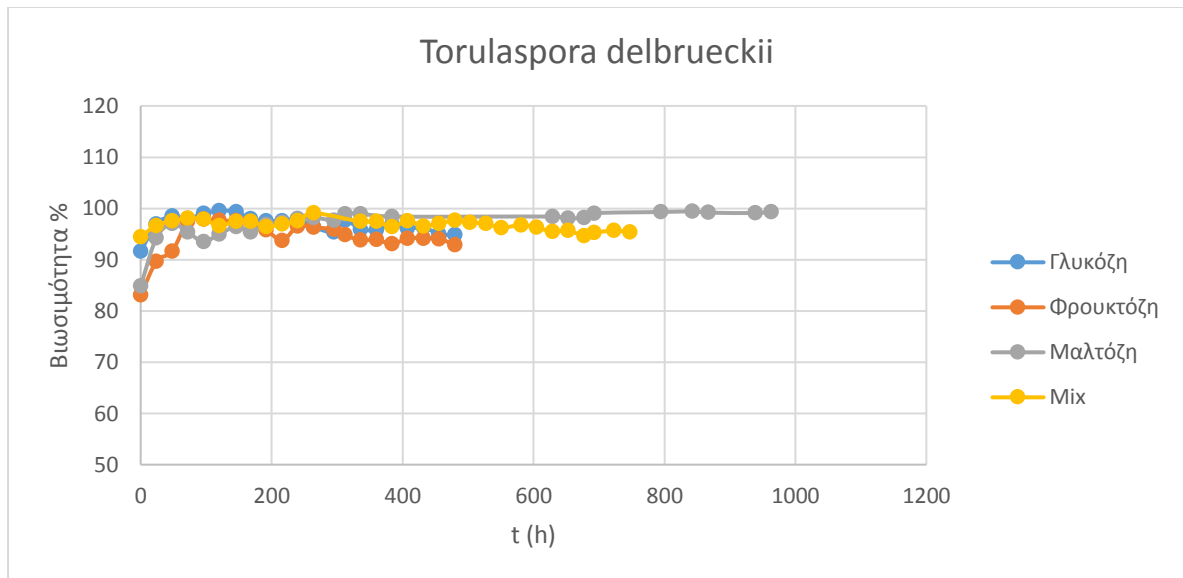
Διάγραμμα 5: Καμπύλες βιωσιμότητας της *M. pulcherrima* στα 4 υποστρώματα σακχάρων



Διάγραμμα 6: Καμπύλες βιωσιμότητας του *S. cerevisiae* S-23 στα 4 υποστρώματα σακχάρων



Διάγραμμα 7: Καμπύλες βιωσιμότητας του *S. cerevisiae* US-05 στα 4 υποστρώματα σακχάρων



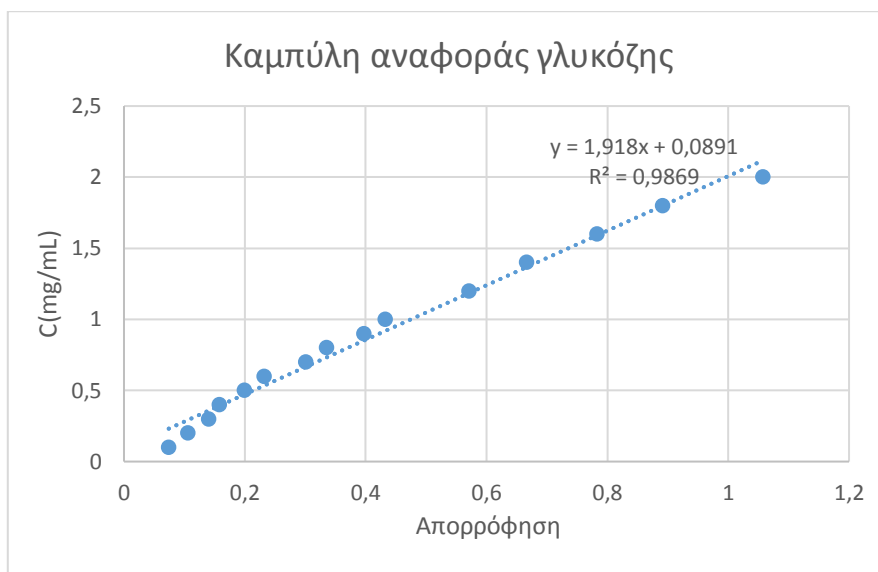
Διάγραμμα 6: Καμπύλες βιωσιμότητας της *T. delbrueckii* στα 4 υποστρώματα σακχάρων

Ως προς τη βιωσιμότητα των κυττάρων, δεν παρατηρούνται μεγάλες διαφορές στα διαγράμματα. Η αρχικές βιωσιμότητες κυμαίνονται από 80-95%, ενώ οι τελικές είναι σταθερά πάνω από 90%, γεγονός που πιστοποιεί ότι ο εμβολιασμός των υποστρωμάτων ήταν σχεδόν εξ ολοκλήρου με ζώντα κύτταρα.

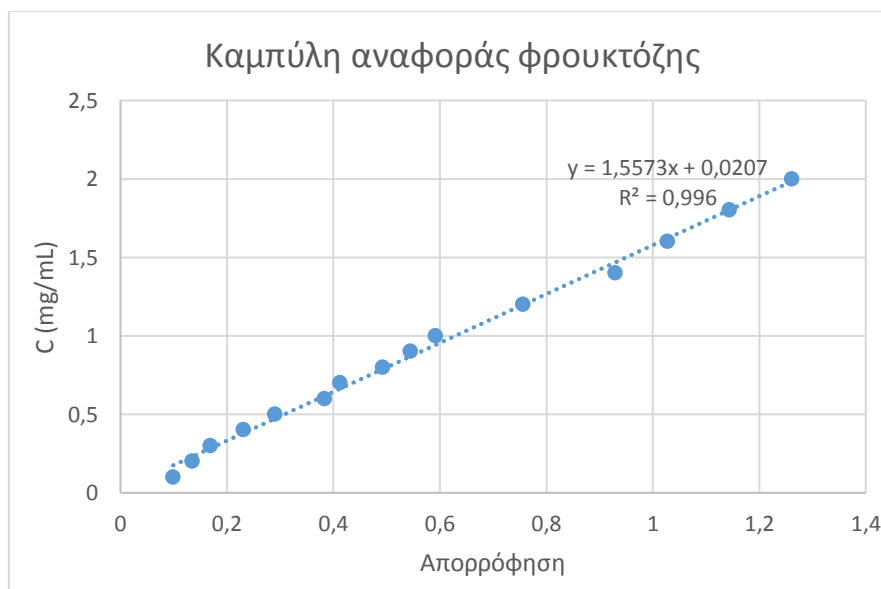
Στις περιπτώσεις των *M. pulcherrima* και *T. delbrueckii* (στο υπόστρωμα φρουκτόζης μόνο) παρατηρείται μια μικρή διακύμανση τις πρώτες μέρες της ζύμωσης. Η *T. delbrueckii*, ξεκινά από χαμηλότερη βιωσιμότητα από ότι στα άλλα υποστρώματα, αλλά κατά τη διάρκεια της λανθάνουσας φάσης της, αυξάνεται στα επίπεδα και των υπόλοιπων υποστρωμάτων. Η *M. pulcherrima*, όπως αναφέρθηκε είχε γενικά μεγαλύτερες φάσεις προσαρμογής, το οποίο σημαίνει ότι η αρχική βιωσιμότητα των κυττάρων διατηρήθηκε μέχρι τις 100h, στις οποίες ξεκινά και η φάση ανάπτυξης.

2.3 Κατανάλωση γλυκόζης και φρουκτόζης

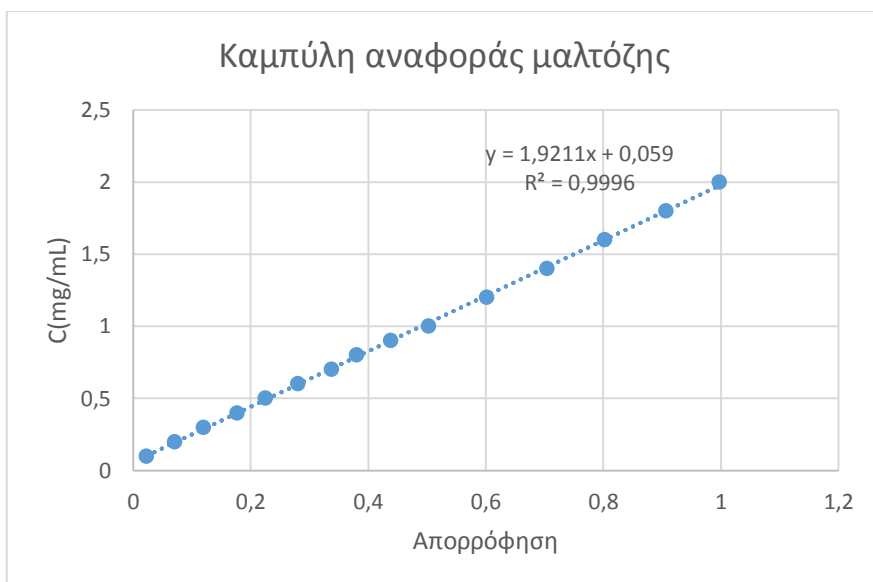
Στα διαγράμματα 7-9 παρουσιάζονται οι καμπύλες αναφοράς που παρασκευάστηκαν για τα 3 σάκχαρα που χρησιμοποιήθηκαν στα πρότυπα υποστρώματα.



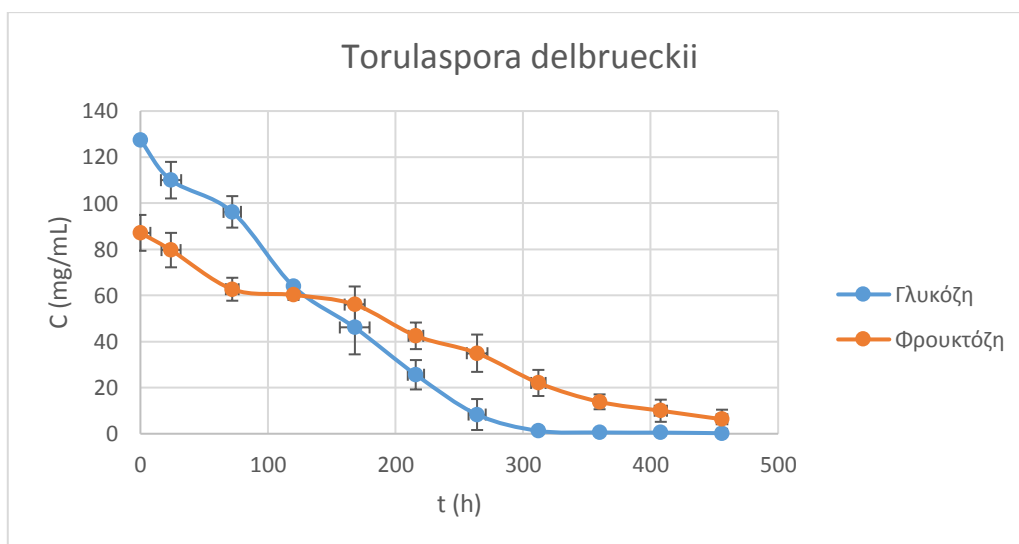
Διάγραμμα 7: Καμπύλη αναφοράς γλυκόζης για τη μέθοδο DNS



Διάγραμμα 8: Καμπύλη αναφοράς φρουκτόζης για τη μέθοδο DNS



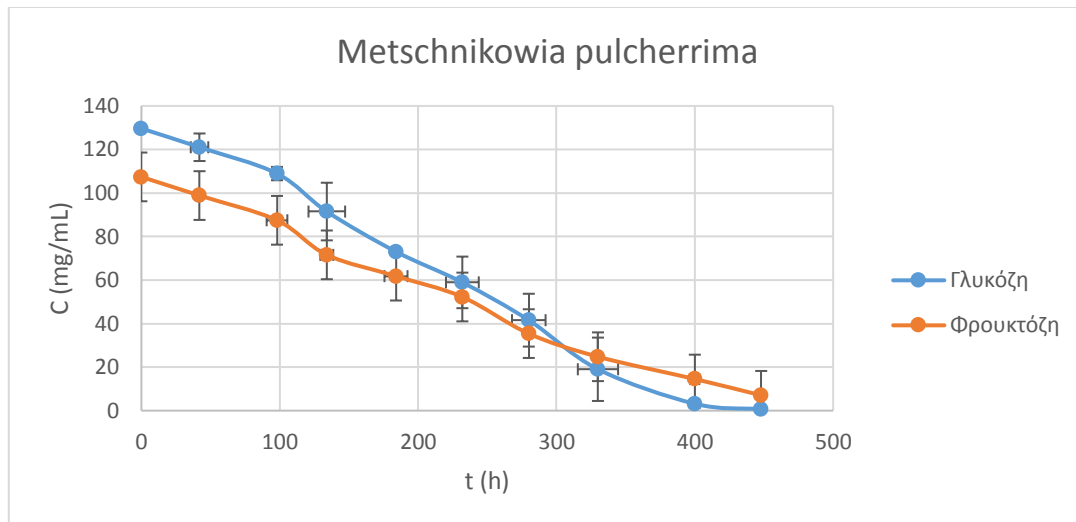
Διάγραμμα 9: Καμπύλη αναφοράς μαλτόζης για τη μέθοδο DNS



Διάγραμμα 10: Καμπύλη κατανάλωσης γλυκόζης και φρουκτόζης από την *T. delbrueckii*

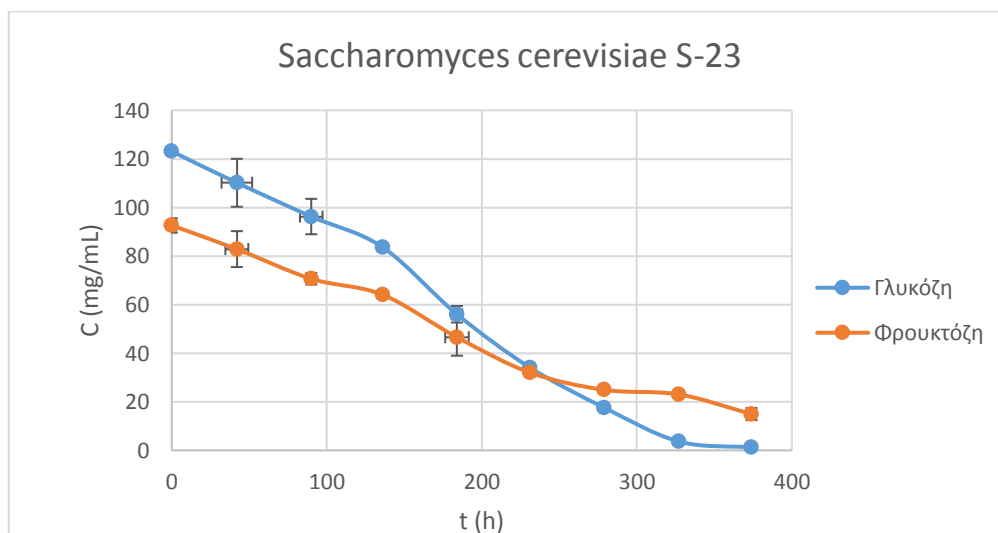
Η *T. delbrueckii* μεταβόλισε χωρίς πρόβλημα τα σάκχαρα και στις 2 περιπτώσεις. Στο υπόστρωμα γλυκόζης τα σάκχαρα καταναλώθηκαν γρηγορότερα απ'ότι στο υπόστρωμα φρουκτόζης.

Στην περίπτωση της φρουκτόζης, παρόλο που σχηματίζονται συσσωματώματα, η ζύμωση και η κατανάλωση των σακχάρων γίνεται κανονικά, αν και υπάρχουν υπολειπόμενα σάκχαρα, όπως φαίνεται στο διάγραμμα 10.

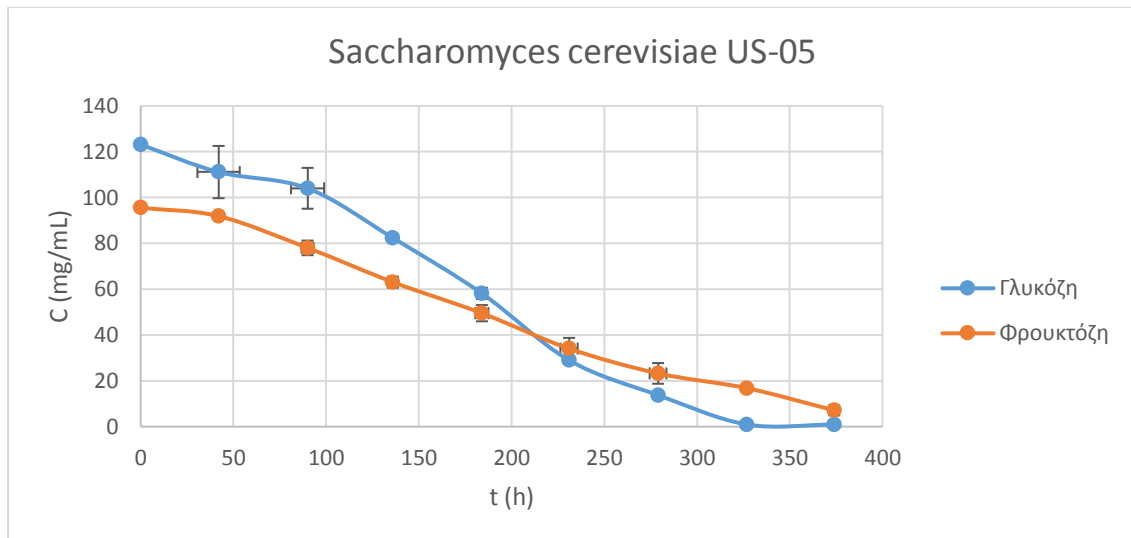


Διάγραμμα 11: Καμπύλη κατανάλωσης γλυκόζης και φρουκτόζης από την *M. pulcherrima*

Παρόμοια εικόνα δίνει και η *M. pulcherrima*, με τα σάκχαρα να καταναλώνονται στο σύνολό τους στο υπόστρωμα γλυκόζης και ταχύτερα από τη φρουκτόζη, ενώ μένουν υπολειματικά στο υπόστρωμα φρουκτόζης.



Διάγραμμα 12: Καμπύλη κατανάλωσης γλυκόζης και φρουκτόζης από τον *S. cerevisiae S-23*

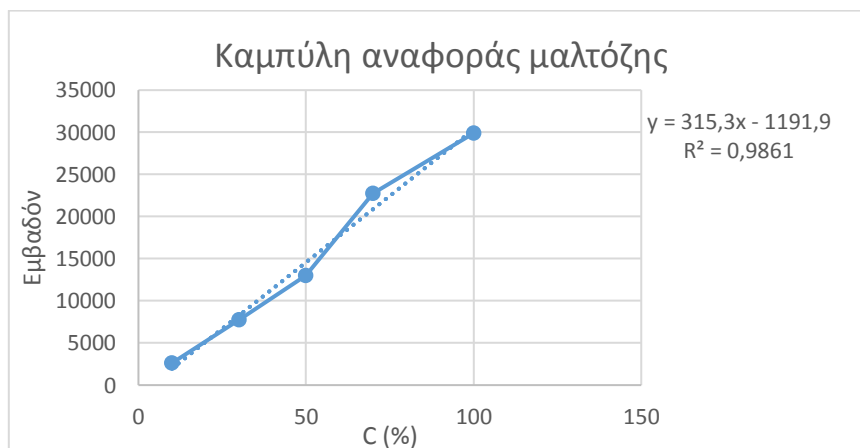


Διάγραμμα 13: Καμπύλη κατανάλωσης γλυκόζης και φρουκτόζης από τον *S. cerevisiae* US-05

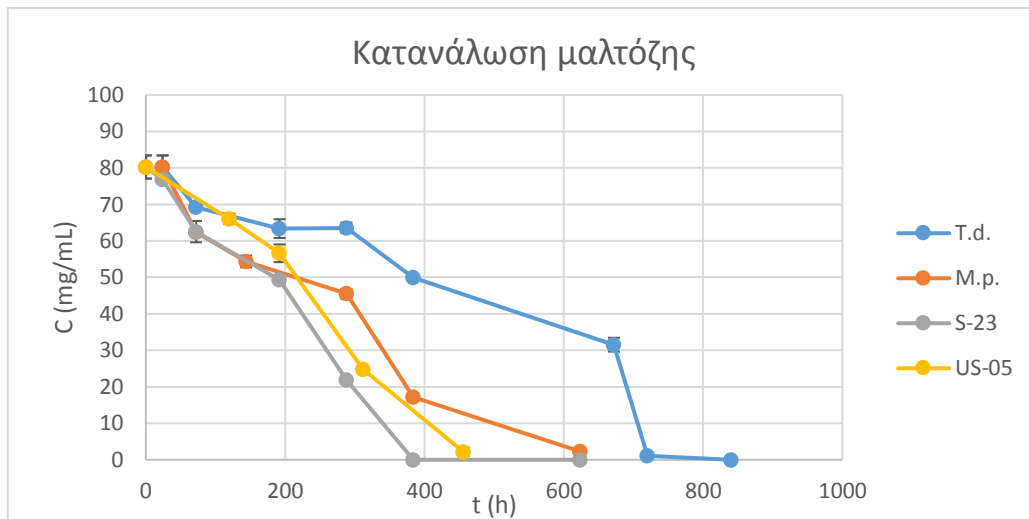
Παρόμοια εικόνα δίνουν και τα δυο στελέχη *S. cerevisiae*, το οποίο οδηγεί στο συμπέρασμα, ότι, παρόλο που οι ale ζύμες είναι λιγότερο κρυσταλλικές από τις lager, και χρησιμοποιούνται σε ζυμώσεις θερμοκρασιών 15-23 °C, δεν έχουν πρόβλημα και στις ζυμώσεις στους 13 °C.

2.4 Κατανάλωση μαλτόζης

Στα υποστρώματα μαλτόζης, η κατανάλωσή της γίνεται πρώτα με διάσπασή της σε μόρια γλυκόζης από τις μαλτάσες των ζυμών και ακολουθεί ο μεταβολισμός της γλυκόζης. Η μέθοδος DNS δείχνει μόνο την κατανάλωση των αναγωγικών σακχάρων, χωρίς να γίνεται διάκριση ποια είναι, οπότε καθίσταται δύσκολη η μελέτη της κατανάλωσης κάθε σακχάρου ξεχωριστά. Για το λόγο αυτό η κατανάλωση της μαλτόζης προσδιορίστηκε με τη μέθοδο HPLC. Όπως και στη μέθοδο DNS, παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα μαλτόζης ώστε να κατασκευαστεί η καμπύλη αναφοράς. Παρόλα αυτά μετρήσεις στα υποστρώματα μίγματος σακχάρων δεν έγιναν, καθώς και αυτή η μέθοδος δε μπορεί να μετρήσει ταυτόχρονα την κατανάλωση των 3 σακχάρων.



Διάγραμμα 14: Καμπύλη αναφοράς μαλτόζης για τη μέτρηση κατανάλωσης σακχάρων με υγρή χρωματογραφία



Διάγραμμα 15: Καμπύλες κατανάλωσης μαλτόζης από τις 4 διαφορετικές ζύμες

Ως προς την κατανάλωση της μαλτόζης, η *T. delbrueckii* παρουσίασε το μεγαλύτερο χρόνο ζύμωσης. Μέχρι τις 300 h έχουν καταναλωθεί περίπου 15 g/L μαλτόζης, ενώ στη συνέχεια η κατανάλωσή της γίνεται με μεγαλύτερο ρυθμό, καθώς έχουν προσαρμοστεί πλήρως οι ζύμες.

Τα δυο στελέχη *S. cerevisiae* τελειώνουν τη ζύμωση γρηγορότερα, ως πιο ανθεκτικά σε χαμηλές θερμοκρασίες. Η μικρή απόσταση των μεταξύ τους καμπυλών, επιβεβαιώνει ότι οι ale ζύμες, που στην περίπτωση αυτή είναι το στέλεχος US-05, είναι λιγότερο κρυοανθεκτικές από τις lager, δηλαδή τον S-23.

Η *M. pulcherrima* ξεκίνησε αμέσως την κατανάλωση της μαλτόζης με ρυθμό συγκρίσιμο του S-23, παρόλα αυτά στη συνέχεια παρουσίασε μια κάμψη, όπως φαίνεται και στην καμπύλη κατανάλωσης.

2.5 Μείωση pH στα υποστρώματα απλών σακχάρων

Ζύμη/Υπόστρωμα	Αρχικό pH	Τελικό pH	STD τελικού pH
T.d. Γλυκόζη	4,5	3,01	0
T.d. Φρουκτόζη	4,5	3,04	0,03
T.d. Μαλτόζη	4,51	3,285	0,025
T.d. mix	4,49	2,78	0,03
M.p. Γλυκόζη	4,51	3,015	0,035
M.p. Φρουκτόζη	4,51	2,935	0,065
M.p. Μαλτόζη	4,51	3,09	0,02
M.p. mix	4,52	3,025	0,035
S-23 Γλυκόζη	4,47	3,095	0,135
S-23 Φρουκτόζη	4,47	2,755	0,005
S-23 Μαλτόζη	4,51	2,89	0,02
S-23 mix	4,52	2,845	0,055
US-05 Γλυκόζη	4,47	3,1	0,01
US-05 Φρουκτόζη	4,47	3,045	0,025
US-05 Μαλτόζη	4,51	3,22	0,005
US-05 mix	4,52	3,15	0,03

Πίνακας 6: Τιμές αρχικού pH, τελικού pH των υποστρωμάτων και τυπική απόκλιση μεταξύ των πειραμάτων

Οι τελικές τιμές pH βρίσκονται γύρω από την τιμή 3, πιο συγκεκριμένα μεταξύ 2,78 και 3,22. Η πτώση του pH είναι αναμενόμενη και σε αυτά τα επίπεδα είναι άλλη μια ένδειξη ότι η ζύμωση επιτεύχθηκε στη θερμοκρασία των 13°C. Ο λόγος που παρατίθεται μόνο η τυπική απόκλιση στα τελικά pH είναι ότι στα αρχικά δεν υπήρχε απόκλιση, διότι το υπόστρωμα προερχόταν από την ίδια παρτίδα.

2.6 Κατανάλωση αζώτου αμινοξέων (FAN)

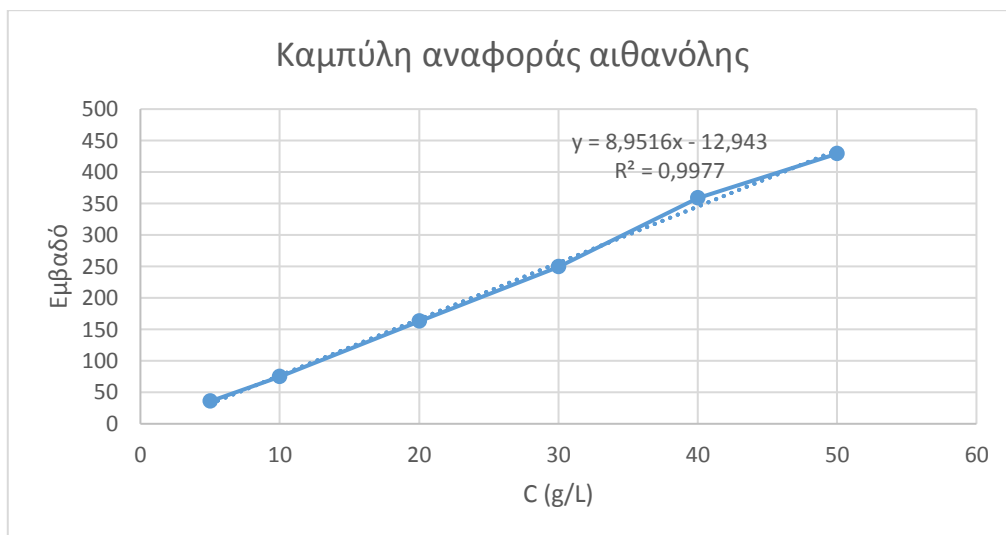
Μικροοργανισμός	Υπόστρωμα	Αρχικό FAN (mg/L)	Τελικό FAN (mg/L)	Συνολική κατανάλωση FAN	STD Κατανάλωσης FAN
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	Γλυκόζη	184,56	134,46	50,10	3,718
	Φρουκτόζη	184,56	124,73	59,83	3,685
	Μαλτόζη	184,56	110,96	73,61	0,266
	Mix	184,56	129,35	55,21	0,730
<i>Saccharomyces cerevisiae S-23</i>	Γλυκόζη	184,56	118,79	65,77	9,097
	Φρουκτόζη	184,56	114,71	69,85	2,158
	Μαλτόζη	184,56	110,52	74,04	3,818
	Mix	184,56	96,38	88,18	1,228
<i>Saccharomyces cerevisiae US-05</i>	Γλυκόζη	184,56	127,86	56,71	4,216
	Φρουκτόζη	184,56	125,76	58,80	4,648
	Μαλτόζη	184,56	118,69	65,87	0,896
	Mix	184,56	109,40	75,17	0,432
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Γλυκόζη	184,56	119,82	64,74	6,474
	Φρουκτόζη	184,56	117,60	66,97	0,996
	Μαλτόζη	184,56	112,12	72,44	1,228
	Mix	184,56	102,22	82,34	1,228

Πίνακας 7: Κατανάλωση FAN από τις ζύμες σε κάθε διαφορετικό υπόστρωμα

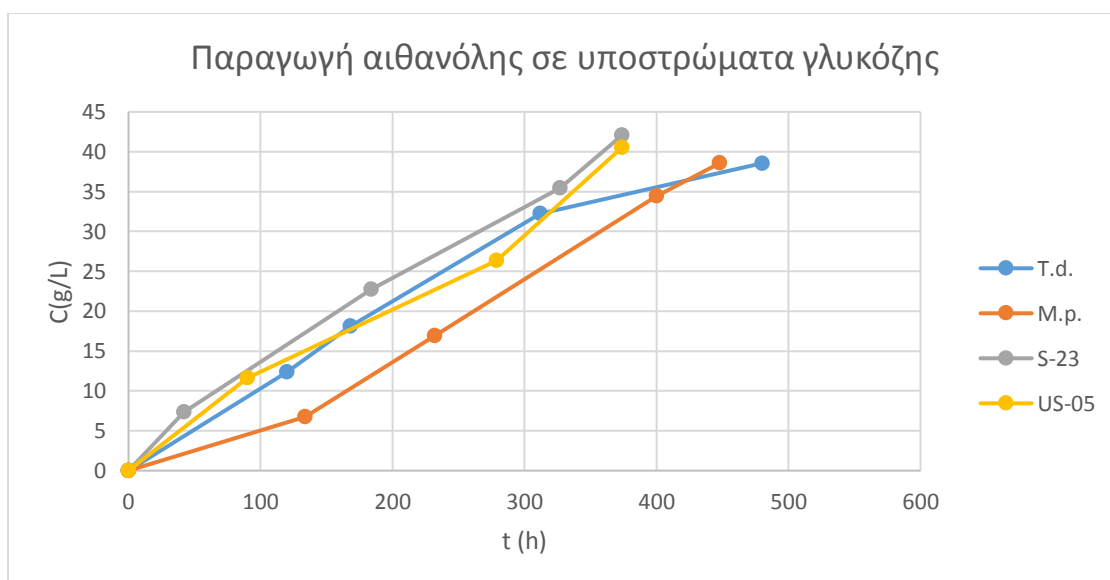
Από τον πίνακα 7 φαίνεται ότι μεγαλύτερη κατανάλωση αζώτου αμινοξέων κατά μέσο όρο παρουσιάζει ο S-23, ενώ μικρότερη η *T. delbrueckii*. Γενικά παρατηρείται ότι η μεγαλύτερη κατανάλωση αζώτου έγινε στα υποστρώματα μαλτόζης από την *T. delbrueckii*, ενώ οι υπόλοιπες ζύμες κατανάλωσαν την περισσότερη ποσότητα αζώτου στο υπόστρωμα μίγματος σακχάρων. Αυτό οφείλεται στο ότι οι ζύμες δε μπορούν να μεταβολίσουν απευθείας τη μαλτόζη, αλλά πρέπει να τη διασπάσουν πρώτα. Αυτή η δυσκολία που αντιμετωπίζουν αντικατοπτρίζεται στη μεγαλύτερη κατανάλωση στην πηγή αζώτου, δηλαδή στο ελεύθερο άζωτο αμινοξέων.

2.7 Παραγωγή αιθανόλης στα πρότυπα υποστρώματα

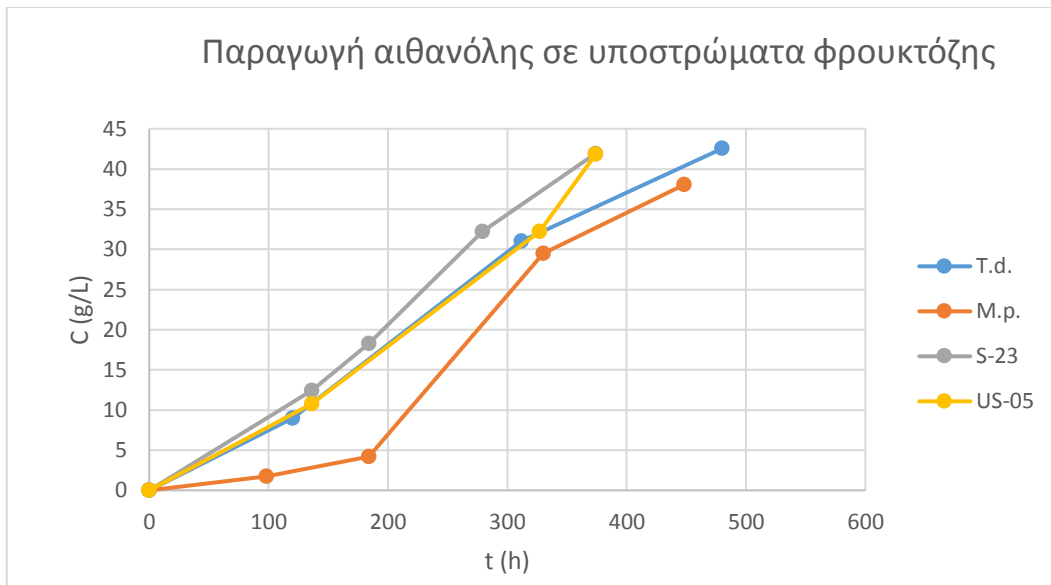
Οι μετρήσεις παραγωγής αιθανόλης πραγματοποιήθηκαν με βοήθεια αέριου χρωματογράφου. Αρχικά κατασκευάστηκε η καμπύλη αναφοράς και στη συνέχεια επιλέχθηκαν δείγματα για τη μέτρηση της αιθανόλης σε αυτά. Οι μετρήσεις έγιναν στα υποστρώματα γλυκόζης, φρουκτόζης και μαλτόζης.



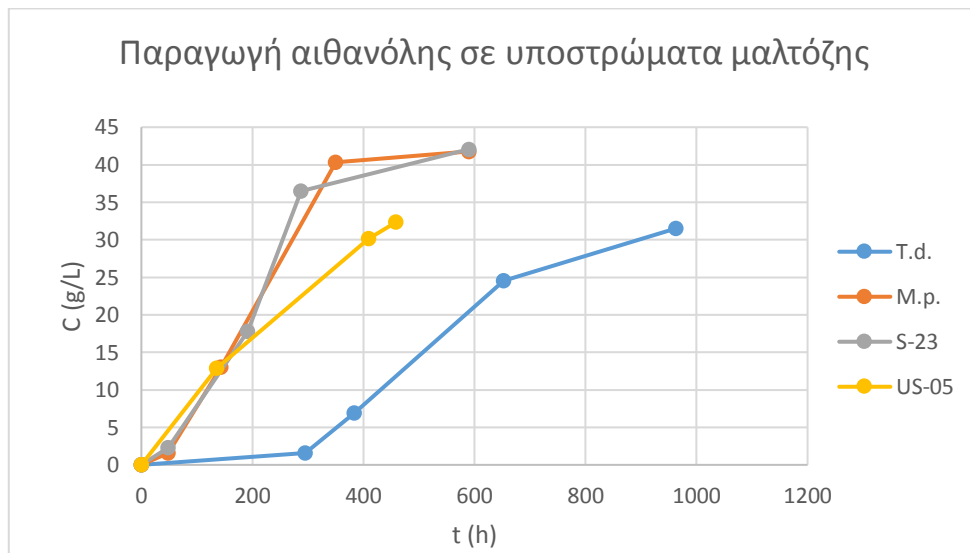
Διάγραμμα 15: Καμπύλη αναφοράς παραγωγής αιθανόλης



Διάγραμμα 16: Καμπύλες παραγωγής αιθανόλης στα 4 υποστρώματα γλυκόζης



Διάγραμμα 16: Καμπύλες παραγωγής αιθανόλης στα 4 υποστρώματα φρουκτόζης



Διάγραμμα 16: Καμπύλες παραγωγής αιθανόλης στα 4 υποστρώματα μαλτόζης

Από το διάγραμμα παραγωγής αιθανόλης σε υποστρώματα γλυκόζης, παρατηρείται ότι και τα 4 στελέχη ζυμών παράγουν αιθανόλη με παρόμοιους ρυθμούς, ενώ οι τελικές τιμές κυμαίνονται γύρω από τα περίπου 40 g/L, με τα δυο στελέχη *S. cerevisiae* να υπερτερούν από τα non-*Saccharomyces* στελέχη.

Στην περίπτωση των υποστρωμάτων φρουκτόζης παρουσιάζεται παρόμοια εικόνα, με την *M. pulcherrima* να καθυστερεί στην παραγωγή αιθανόλης έναντι των άλλων στελεχών.

Στα υποστρώματα μαλτόζης, η *T. delbrueckii* παρουσιάζει τη μικρότερη συγκέντρωση αιθανόλης, έναντι των άλλων στελεχών ζυμών. Επίσης ο US-05 παρουσιάζει χαμηλότερα

επίπεδα αιθανόλης στη μαλτόζη έναντι των άλλων υποστρωμάτων (περίπου 30 g/L έναντι των 40 g/L στα υποστρώματα γλυκόζης και φρουκτόζης). Αυτό οφείλεται και στον χαμηλό πληθυσμό που εμφάνισε σε αυτά τα υποστρώματα. Αντιθέτως, η *M. pulcherrima* και ο S-23 παρουσίασαν παρόμοιο ρυθμό παραγωγής αιθανόλης και σχεδόν ίδια τελική συγκέντρωση.

2.8 Συντελεστές απόδοσης

Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται οι συντελεστές απόδοσης Υχ/s και Υρ/s για όλες τις ζύμες που χρησιμοποιήθηκαν και σε όλα τα υποστρώματα εκτός του μίγματος σακχάρων, στο οποίο δεν ήταν εφικτή η μέτρηση κατανάλωσης σακχάρων.

ΑΠΟΔΟΣΗ Υχ/s (10 ⁶ κύτταρα/g σακχάρου)						
ΣΑΚΧΑΡΑ	ΓΛΥΚΟΖΗ	STD	ΦΡΟΥΚΤΟΖΗ	STD	ΜΑΛΤΟΖΗ	STD
ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ						
<i>M. pulcherrima</i>	0,433	0,003	0,519	0,011	0,583	0,012
<i>S. cerevisiae</i> S-23	0,317	0,001	0,481	0,004	0,356	0,022
<i>S. cerevisiae</i> US-05	0,311	0,005	0,386	0,009	0,271	0,012
<i>T. delbrueckii</i>	1,105	0,004	1,419	0,258	0,644	0,026

Πίνακας 8: Συντελεστές απόδοσης Υχ/s στα υποστρώματα και τις καλλιέργειες ζυμών

ΑΠΟΔΟΣΗ Υρ/s (g αιθανόλης/g σακχάρου)						
ΣΑΚΧΑΡΑ	ΓΛΥΚΟΖΗ	STD	ΦΡΟΥΚΤΟΖΗ	STD	ΜΑΛΤΟΖΗ	STD
ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ						
<i>M. pulcherrima</i>	0,299	0,000	0,379	0,008	0,521	0,000
<i>S. cerevisiae</i> S-23	0,345	0,000	0,540	0,038	0,524	0,000
<i>S. cerevisiae</i> US-05	0,332	0,000	0,473	0,012	0,414	0,000
<i>T. delbrueckii</i>	0,303	0,002	0,526	0,064	0,393	0,000

Πίνακας 9: Συντελεστές απόδοσης Υρ/s στα υποστρώματα και τις καλλιέργειες ζυμών

Στον πρώτο πίνακα παρατηρείται ότι τη μεγαλύτερη τιμή γενικά απόδοσης την είχε η *T. delbrueckii* καθώς παρουσίαζε σε όλα τα διαγράμματα τους μεγαλύτερους πληθυσμούς. Ο συντελεστής απόδοσης στη μαλτόζη είναι πολύ μικρότερος από τους συντελεστές σε φρουκτόζη και γλυκόζη, καθώς οι ζύμες καθυστερούσαν πολύ να προσαρμοστούν στο περιβάλλον μαλτόζης και οι τελικοί πληθυσμοί ήταν πολύ χαμηλότεροι.

Αντίθετα, η *M. pulcherrima* έχει το μεγαλύτερο συντελεστή απόδοσης στα υποστρώματα μαλτόζης με τιμή 0,583 10⁶ κύτταρα/g μαλτόζης. Τα δυο στελέχη *S. cerevisiae* παρουσιάζουν τους μεγαλύτερους συντελεστές στα υποστρώματα φρουκτόζης.

Ως προς την παραγωγή αιθανόλης, τους μεγαλύτερους συντελεστές εμφανίζει ο S-23, το οποίο είναι λογικό, κρίνοντας από την ανθεκτικότητά των στελεχών *S. cerevisiae* σε περιβάλλον αιθανόλης. Οι δυο non-*Saccharomyces* ζύμες παρήγαγαν συγκρίσιμη ποσότητα

αιθανόλης. Συγκεκριμένα, η *T. delbrueckii* εμφάνισε μεγαλύτερο συντελεστή στη φρουκτόζη ενώ η *M. pulcherrima* στη μαλτόζη, με συντελεστή σχεδόν ίδιο με του S-23.

2.9 Προσαρμογή μοντέλων κινητικής ανάπτυξης & προσδιορισμός παραμέτρων

Στον πίνακα 10 παρατίθενται τιμές της σταθεράς k της λογιστικής εξίσωσης για κάθε ζύμη και σε κάθε υπόστρωμα απλών σακχάρων. Λόγω της καλύτερης προσαρμογής των δεδομένων στη λογιστική εξίσωση, επιλέχθηκε αυτή έναντι της αναλυτικής εξίσωσης Monod (εξίσωση ε). Η σταθερά k έχει μονάδες μέτρησης $1/h$.

ΣΑΚΧΑΡΑ	ΓΛΥΚΟΖΗ	ΦΡΟΥΚΤΟΖΗ	ΜΑΛΤΟΖΗ
ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ			
<i>M. pulcherrima</i>	0,00529	0,00502	0,00469
<i>S. cerevisae</i> S-23	0,00548	0,00581	0,00659
<i>S. cerevisae</i> US-05	0,00565	0,00531	0,00291
<i>T. delbrueckii</i>	0,01041	0,00878	0,00286

Πίνακας 10: Σταθερές δυναμικού μεταφοράς k ($1/h$) για όλες τις ζύμες στα υποστρώματα απλών σακχάρων

Οι δυο non-*Saccharomyces* ζύμες παρουσίασαν τις μεγαλύτερες τιμές k στα υποστρώματα γλυκόζης, ενώ τις μικρότερες στα υποστρώματα μαλτόζης. Ειδικά η *T. delbrueckii* εμφάνισε περίπου τρεις φορές μικρότερο k στο υπόστρωμα μαλτόζης από ότι στα άλλα δυο απλά σάκχαρα, καθώς ο τελικός πληθυσμός στο υπόστρωμα μαλτόζης ήταν περίπου ο μισός από ότι στα άλλα δυο υποστρώματα και ο χρόνος ζύμωσης πολύ μεγαλύτερος. Στην *M. pulcherrima* οι τιμές των σταθερών έχουν μικρότερη διαφορά μεταξύ τους.

Παρόμοια εικόνα έχει και ο US-05, με την τιμή της σταθεράς στα υποστρώματα μαλτόζης να είναι αρκετά μικρότερη από ότι στα άλλα δυο σάκχαρα. Ο S-23, όμως παρουσιάζει την αντίστροφη εικόνα, δηλαδή το μεγαλύτερο k στα υποστρώματα μαλτόζης και το μικρότερο στα υποστρώματα γλυκόζης, αλλά με μικρές διαφορές στις τιμές.

2.10 Προσδιορισμός αρωματικών ενώσεων στα υποστρώματα απλών σακχάρων

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των αρωματικών ενώσεων που παρήχθησαν στα υποστρώματα, προστέθηκε ποσότητα 10 μ L 3-οκτανόλης, ως εσωτερικό πρότυπο. Οι ενώσεις χωρίστηκαν σε πίνακες ανάλογα το είδος τους, συγκεκριμένα σε αλκοόλες/θειόλες, άλλες οργανικές ενώσεις, οξέα και εστέρες.

Στα υποστρώματα μίγματος σακχάρων της *T. delbrueckii*, η ανάλυση των αρωματικών έγινε σε διαφορετικό χρωματογράφο από ότι τα υπόλοιπα, για τεχνικούς λόγους. Επειδή όμως η βάση δεδομένων του ήταν διαφορετική, και, επιπλέον, δεν εμφάνιζε κορυφή για την 3-οκτανόλη, ήταν αδύνατος ο προσδιορισμός των ενώσεων σε αυτά τα υποστρώματα.

ΟΥΣΙΕΣ (mg/L)	MP	US-05	S-23	TD
isopentyl alcohol	0,626	0,953	0,743	10,341
active amyl alcohol	0,360	0,232	0,036	4,483
diisopropylcarbinol				0,056
benzyl alcohol		0,014	0,019	
2-butyn-1-ol 4-methoxy-				0,018
phenylethyl alcohol	1,022	1,255	0,956	9,101
1-heptanol 6-methyl-				0,003
2-isopropyl-5-methyl-a-heptanol	0,010			
tyrosol			0,039	
phenol,3-tert-butyl-4-methoxy-	0,005			
2-butyl-1-octanol	0,035			0,034
2-hexyl-1-octanol	0,029	0,007		0,011
2-hexyl-1-decanol		0,007		0,019
2-hexadecanol			0,006	
2-methyl-hexadecanol			0,039	
12-methyl-E,E-2,13-octadecadien-1-ol	0,079	0,034		
ΘΕΙΟΛΕΣ				
tert-hexadecanethiol		0,026	0,006	0,076

Πίνακας 11: Αλκοόλες και θειόλες σε υποστρώματα γλυκόζης (mg/L)

Από τον πίνακα 11 παρατηρείται ότι παρήχθηκε μεγάλη ποικιλία αλκοολών, με κυρίαρχες να είναι οι: ισοπεντυλική (αρώματα μπανάνας και ούισκι), ενεργή αμυλική (αλκοολούχο άρωμα) και φαινυλαιθυλική αλκοόλη (τριαντάφυλλο), που παρήχθησαν από όλες τις ζύμες [Burdock, 2016]. Τη μεγαλύτερη ποσότητα σε αυτές τις αλκοόλες την παρήγαγε η *T. delbrueckii*. Επίσης, όλες οι ζύμες εκτός της *M. pulcherrima* εμφάνισαν τη δεκαεξανθειόλη σε μικρές συγκεντρώσεις, μια θειόλη που παρουσιάζει λιπαρό άρωμα [Laseka et al., 2016].

ΟΥΣΙΕΣ (mg/L)	MP	US-05	S-23	TD
isopentyl alcohol	1,053	1,602	0,931	1,000
active amyl alcohol	0,249	0,555	0,360	0,227
diisopropylmethanol				0,004
4-pentenol				0,007
methionol				0,010
phenylethyl alcohol	1,316	1,809	0,771	1,755
1,2-hexadecanediol	0,020			
2-hexadecanol	0,058			
2-methoxy-4-vinylphenol		0,352		
benzyl alcohol			0,011	0,013
6-methyl-1-heptanol			0,006	
2-butyl-1-octanol			0,007	0,010
2-hexadecanol			0,088	
tryptophol				0,026

2-hexyl-1-octanol				0,011
2-pentadecanol				0,019
2-hexyl-1-decanol				0,018
2-hexadecanol				1,677
ΘΕΙΟΛΕΣ				
tert-hexadecanethiol	0,106			0,008

Πίνακας 12: Αλκοόλες και θειόλες σε υποστρώματα φρουκτόζης (mg/L)

Στα υποστρώματα φρουκτόζης παράγονται από όλες τις ζύμες οι αλκοόλες ισοπεντυλική, ενεργή αμυλική και φαινυλαιθυλική, ενώ οι περισσότερες από τις υπόλοιπες αλκοόλες παράγονται σε ανιχνεύσιμα επίπεδα από από την *T. delbrueckii*. Χαρακτηριστικό είναι η παραγωγή μεγάλης ποσότητας 2-δεκαεξανόλης από την *T. delbrueckii*, σε συγκέντρωση 1,67 mg/L. Η δεκαεξανθειόλη εδώ, παράγεται σε ανιχνεύσιμα επίπεδα από τις 2 non-*Saccharomyces* ζύμες.

ΟΥΣΙΕΣ (mg/L)	MP	US-05	S-23	TD
isopentyl alcohol	1,080	6,747	1,487	2,09
active amyl alcohol	0,322	2,732	0,479	1,28
isohehexyl alcohol		0,013		
2-methyl 1-heptanol			0,006	
4-methyl-2-propyl 1-pentanol			0,001	
furfuryl alcohol				0,026
phenylethyl alcohol	1,208	16,161	1,216	6,183
2-hexadecanol	0,067			
2-ethyl 1-hexanol		0,023		0,011
2-butyl-1-octanol			0,006	
5-methyl 2-heptanol			0,004	
2-methyl-1-decanol			0,013	0,228
2-undecanol			0,011	
ΘΕΙΟΛΕΣ				
tert-hexadecanethiol	0,042			0,052

Πίνακας 13: Αλκοόλες και θειόλες σε υποστρώματα μαλτόζης (mg/L)

Παρόμοια εικόνα παρατηρείται και στα υποστρώματα μαλτόζης, με τις ποσότητες ενεργής αμυλικής και φαινυλαιθυλικής αλκοόλης να βρίσκονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από ότι στα υποστρώματα γλυκόζης και φρουκτόζης. Στην περίπτωση των υποστρωμάτων μαλτόζης, τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε αυτές τις αλκοόλες, όπως και στην ισοπεντυλική, παρουσιάζει ο US-05. Οι υπόλοιπες αλκοόλες παράγονται σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις, 3 και 4 τάξεων μεγέθους κάτω από τις προαναφερθείσες. Τη μεγαλύτερη ποικιλία την παρουσιάζουν η *T. delbrueckii* και ο S-23.

ΟΥΣΙΕΣ (mg/L)	MP	US-05	S-23
isopentyl alcohol	1,019	7,146	0,928
active amyl alcohol	0,292	2,21	0,337
4-methyl 1-hexanol		0,015	
3-hexanol 2,2-dimethyl-		0,016	
diisopropylcarbinol			0,005
phenylethyl alcohol	1,251	8,033	1,313
6-methyl-1-heptanol	0,005		
2-butyl-1-octanol	0,003		0,014
tryptophol	0,088	0,128	
2-hexyl-1-octanol	0,007		0,052
2-hexyl-1-decanol	0,006		0,011
2-hexadecanol	0,054		0,029
2-ethyl- 1-hexanol		0,030	
3,5-dimethyl-2-octanol			0,004
2-undecanol			0,007
2-propyl-1-heptanol			0,003
2-isopropyl-5-methyl-1-heptanol			0,021
nonadecanol			0,008
2-methyl 1-hexadecanol			0,027
ΘΕΙΟΛΕΣ			
tert-hexadecanethiol	0,022		0,009

Πίνακας 14: Αλκοόλες και θειόλες σε υποστρώματα μίγματος σακχάρων (mg/L)

Στα μικτά υποστρώματα, οι αλκοόλες ισοπεντυλική, ενεργή αμυλική και φαινυλαιθυλική βρίσκονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στα υποστρώματα που ζυμώθηκαν από τον US-05. Τη μεγαλύτερη ποικιλία όμως αλκοολών την παρήγαγε ο S-23, σε ανιχνεύσιμες συγκεντρώσεις.

ΟΥΣΙΕΣ (mg/L)	MP	US-05	S-23	TD
isopropyl disulfide	0,005		0,012	0,106
3,3-diphenyl-5-methyl-3H-pyrazole	0,006			
4-hydroxy-3-hexanone			0,001	
acetophenone			0,002	

Πίνακας 15: Άλλες οργανικές ενώσεις σε υποστρώματα γλυκόζης (mg/L)

Στα υποστρώματα γλυκόζης παρήχθησαν σε χαμηλή συγκέντρωση λίγες οργανικές ενώσεις, με κυρίαρχο το ισοπροπυλοδισουλφίδιο, το οποίο δεν παράχθηκε σε ανιχνεύσιμη συγκέντρωση στα υποστρώματα που ζύμωσε ο US-05. Το ισοπροπυλοδισουλφίδιο δίνει αρώματα κρεμμυδιού, και τροπικών φρούτων [FEMA]. Γενικά οι ενώσεις του θείου χαρακτηρίζονται ως ανεπιθύμητες αρωματικές ουσίες (off-flavours). Στην περίπτωση του S-23 παρήχθησαν 2 κετόνες σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση, με την ακετοφαινόνη να προσδίδει

γλυκά και πικάντικα αρώματα [Larranaga et al., 2016]. Η 4-υδροξυ-3-εξανόνη χρησιμοποιείται ως ενισχυτικό γεύσης [EU Food Improvement Agents].

ΟΥΣΙΕΣ (mg/L)	MP	US-05	S-23	TD
isopropyl disulfide		0,016		
4-acetoxy-3-methoxystyrene		0,012		
disulfide di-tert-dodecyl		0,030		
ethyl 2-methylbutyl ketone	0,007			

Πίνακας 16: Άλλες οργανικές ενώσεις σε υποστρώματα φρουκτόζης (mg/L)

Στα υποστρώματα φρουκτόζης παρήχθησαν οργανικές ενώσεις σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Ο S-23 και η *T. delbrueckii* δεν παρήγαγαν σε ανιχνεύσιμες ποσότητες καμία από τις παραπάνω ενώσεις.

ΟΥΣΙΕΣ (mg/L)	MP	US-05	S-23	TD
isopropyl disulfide		0,090		
disulfide di-tert-dodecyl			0,016	
toluene				0,028
disulfide isopropyl propyl				0,070
oxybenzone				0,225

Πίνακας 17: Άλλες οργανικές ενώσεις σε υποστρώματα μαλτόζης (mg/L)

Σε χαμηλές συγκεντρώσεις βρέθηκαν οι λοιπές οργανικές ενώσεις και στα υποστρώματα μαλτόζης. Η *T. delbrueckii* παρήγαγε οξυβενζόνη σε μεγαλύτερη ποσότητα από ότι τις υπόλοιπες ενώσεις. Η *M. pulcherrima* δεν παρήγαγε τις παραπάνω ενώσεις σε ανιχνεύσιμες ποσότητες.

ΟΥΣΙΕΣ (mg/L)	MP	US-05	S-23
isopropyl disulfide		0,112	

Πίνακας 18: Άλλες οργανικές ενώσεις σε υποστρώματα μίγματος σακχάρων (mg/L)

Στα μικτά υποστρώματα βρέθηκε σε ανιχνεύσιμη ποσότητα μόνο το ισοπροπυλοσουλφίδιο και στα υποστρώματα που ζυμώθηκαν από τον US-05.

ΟΥΣΙΕΣ (mg/L)	MP	US-05	S-23	TD
caproic acid	0,096	0,141		0,024
isobutyric acid		0,028	0,006	0,012
butyric acid		0,027	0,038	0,125
isovaleric acid		0,023	0,031	0,048
active valeric acid		0,019	0,041	0,211

α-methylcaproic acid				0,032
caprylic acid	0,239	0,254	0,154	0,010
capric acid	0,036		0,042	0,017
9-decenoic acid			0,034	
lauric acid			0,006	
myristic acid			0,048	
cis-10-nonadecenoic acid	0,064			
oleic acid			0,107	
stearic acid			0,083	

Πίνακας 19: Οξέα σε υποστρώματα γλυκόζης (mg/L)

Στα υποστρώματα γλυκόζης, τα κυριότερα οξέα που παρήχθησαν είναι τα: καπρικό (αρώματα λιπαρά, πικρά και εσπεριδοειδών), καπριλικό (λιπαρό, σαπούνι), καπροϊκό (γαλακτοκομικά προϊόντα, μανιτάρι), βουτυρικό (κεράσι, ανανάς, ροκφόρ), ισοβουτυρικό (φράουλα), ισοβαλερικό (τυρί, λιπαρό), και ενεργό βαλερικό οξύ (πικρό, όξινο). Επίσης παράγονται σε μικρότερες συγκεντρώσεις και άλλα οξέα, με τη μεγαλύτερη ποικιλία σε ανιχνεύσιμες ποσότητες να την έχει ο S-23.

ΟΥΣΙΕΣ (mg/L)	MP	US-05	S-23	TD
isovaleric acid	0,004	0,022		0,009
active valeric acid		0,002		0,021
α-methyl caproic acid	0,004	0,023		
caproic acid	0,111	0,123	0,061	0,011
caprylic acid	0,209	0,403	0,133	0,024
capric acid	0,060	0,001		0,013
hydroxy pivalic acid		0,012		
isobutyric acid		0,003		0,004
butyric acid		0,003		
valeric acid				0,027
caproleic acid		0,001		
oleic acid			0,051	

Πίνακας 20: Οξέα σε υποστρώματα φρουκτόζης (mg/L)

Στα υποστρώματα φρουκτόζης, παρατηρείται ότι τα περισσότερα οξέα σε ανιχνεύσιμες ποσότητες έχουν παραχθεί από τον US-05, ενώ τα οξέα ισοβαλερικό, καπρικό, καπροϊκό και καπριλικό, έχουν παραχθεί από τις περισσότερες ζύμες, πλην του S-23 για τα καπρικό και ισοβαλερικό.

ΟΥΣΙΕΣ (mg/L)	MP	US-05	S-23	TD
caprylic acid	0,022			
isovaleric acid	0,006	0,206	0,014	0,089
active valeric acid		0,146	0,022	0,188
α -methylcaproic acid	0,007	0,203		
caproic acid	0,068	0,387	0,072	0,804
isobutyric acid		0,064		0,098
butyric acid		0,136		0,241
undecanoic acid		0,015		
caprylic acid	0,217	0,856	0,310	1,539
capric acid	0,032		0,055	0,378
myristic acid			0,146	
palmitoleic acid			0,121	
palmitic acid			1,648	
stearic acid			0,341	

Πίνακας 21: Οξέα σε υποστρώματα μαλτόζης (mg/L)

Στα υποστρώματα μαλτόζης, οι ζύμες παρουσίασαν γενικά μια μεγαλύτερη ποικιλία σε παραγωγή οξέων, με τη μεγαλύτερη ποικιλία να την έχουν οι δυο *S. cerevisiae*. Ειδικά ο S-23 παρήγαγε μεγάλη συγκέντρωση, συγκεκριμένα 1,648 mg/mL, σε παλμιτικό οξύ, καθώς και μυριστικό οξύ, τα οποία προσδίδουν άρωμα κεριού.

ΟΥΣΙΕΣ (mg/L)	MP	US-05	S-23
butyric acid	0,005	0,089	0,004
active valeric acid		0,119	0,033
isovaleric acid	0,006	0,198	0,019
α -methylcaproic acid	0,007		
caproic acid	0,070	0,260	0,069
isocaproic acid		0,018	
caprylic acid	0,182	0,760	1,313
capric acid	0,029		0,023
caproic acid			0,015
palmitic acid			0,052

Πίνακας 22: Οξέα σε υποστρώματα μίγματος σακχάρων (mg/L)

Στο μίγμα σακχάρων εμφανίζονται σε ανιχνεύσιμες συγκεντρώσεις κυρίως τα οξέα βουτυρικό, ισοβαλερικό, καπροϊκό και καπριλικό και στις 3 ζύμες. Ο S-23 πάλι παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ποικιλία παραγόμενων οξέων σε ανιχνεύσιμες ποσότητες.

ΟΥΣΙΕΣ (mg/L)	MP	US-05	S-23	TD
ethyl butyrate	0,002			0,026
isopentyl alcohol, acetate	0,017	0,017	0,019	
ethyl caprylate	0,057	0,083	0,123	0,046
acetic acid, 2-phenylethyl ester	0,009		0,024	0,102
capric acid, ethyl ester	0,014	0,020	0,018	0,031
hexyl octyl ether	0,010			
ethyl icosanoate	0,014			
sulfurous acid, hexyl pentadecyl ester	0,007			
sulfurous acid 2-ethylhexyl hexyl ester				0,003
acetic acid, decyl ester		0,001		
2-octyl benzoate		0,006		
ethyl 9-decenoate		0,012		
lauric acid ethyl ester		0,007	0,015	
9-hexadecenoic acid ethyl ester		0,012		
adipic acid, dioctyl ester		0,067		
acetic acid butyl acetate	0,001		0,001	
4-decenoic acid, ethyl ester, (E)-			0,003	
adipic acid dioctyl ester			0,048	
heptanoic acid docosyl ester			0,037	
succinic acid diethyl ester				0,010
octanoic acid phenylethyl ester				0,057
propanoic acid 2-phenylethyl ester				0,007
1H-indole-3-ethanol acetate				0,277

Πίνακας 23: Εστέρες σε υποστρώματα γλυκόζης (mg/L)

Σε όλα τα υποστρώματα παρήχθηκε μια πληθώρα εστέρων, με κυριότερους τους οξικό ισοπεντυλεστέρα (αρώματα φρούτων), καπριλικό αιθυλεστέρα (βερίκοκο, αχλάδι, μπανάνα), καπρικό αιθυλεστέρα (κερί) και οξικό φαινυλαιθυλεστέρα (μήλο, μέλι). Όλες οι ζύμες στα υποστρώματα γλυκόζης εμφάνισαν αρκετούς διαφορετικούς εστέρες, πέρα από τους προαναφερθέντες.

ΟΥΣΙΕΣ (mg/L)	MP	US-05	S-23	TD
ethyl butyrate	0,003	0,005		
isopentyl alcohol, acetate	0,026	0,025	0,037	
ethyl caprylate	0,074	0,162	0,048	0,013
acetic acid, 2-phenylethyl ester	0,013	0,0004	0,012	0,013
ethyl 9-decenoate	0,005	0,001	0,004	0,005
capric acid, ethyl ester	0,028	0,001	0,012	0,075
sulfurous acid, hexyl octyl ester	0,008	0,0003		
sulfurous acid, hexyl pentadecyl ester		0,031		0,008
sulfurous acid, hexyl undecyl ester				0,002
lauric acid, ethyl ester	0,010			0,016
palmitic acid, ethyl ester	0,037			
formic acid heptyl ester		0,0004		
sulfurous acid, 2-ethylhexyl isohexyl ester		0,010		
palmitic acid ethyl ester		0,027		
propionic acid phenylethyl ester				0,010
pentanoic acid, 5-hydroxy-, 2,4,-di-tert-butylphenyl esters	0,009			
isopropyl myristate				0,006
1H-indole-3-ethanol acetate				0,201
9-hexadecenoic acid ethyl ester				0,012
palmitic acid ethyl ester				0,019
isopropyl palmitate				0,008

Πίνακας 24: Εστέρες σε υποστρώματα φρουκτόζης (mg/L)

Στα υποστρώματα φρουκτόζης η *T. delbrueckii* και οι US-05 εμφάνισαν ποιοτικά τους περισσότερους εστέρες. Ο US-05 εμφάνισε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (ίχνη) σε οξικό φαινυλαιθυλεστέρα, καθώς και σε θειικό εξυλ-οκτυλεστέρα και φορμικό επτυλεστέρα.

ΟΥΣΙΕΣ (mg/L)	MP	US-05	S-23	TD
isopentyl alcohol, acetate	0,021	0,087	0,036	0,474
ethyl caproate	0,015			
ethyl caprylate	0,024	0,529	0,047	0,424
acetic acid, phenylethyl ester	0,010	0,045	0,016	0,217
capric acid ethyl ester	0,026		0,022	0,108
lauric acid ethyl ester	0,019			
stearic acid, ethyl ester	0,197			
myristic acid, isopropyl ester	0,007			
myristic acid ethyl ester				0,086
palmitic acid, ethyl ester	0,183			1,069
isopropyl palmitate				0,484
butyric acid ethyl ester		0,036		0,022
ethyl 9-decenoate		0,017		0,052
heptanoic acid 2-methyl-, methyl ester		0,012		
sulfurous acid hexyl pentadecyl ester		0,048	0,020	0,805
sulfurous acid nonyl 2-propyl ester				0,105
4-decenoic acid ethyl ester (E)-			0,008	
linalyl anthranilate			0,021	
1H-indole-3-ethanol acetate				2,231
E-11-hexadecenoic acid ethyl ester				0,086
9,12-octadecadienoic acid ethyl ester				0,453

Πίνακας 25: Εστέρες σε υποστρώματα μαλτόζης (mg/L)

Στα υποστρώματα μαλτόζης, οι δυο non-*Saccharomyces* ζύμες παρουσίασαν τους περισσότερους εστέρες. Επιπλέον, η *T. delbrueckii* εμφάνισε σε μεγάλες συγκεντρώσεις παλμιτικό αιθυλεστέρα (φρουτώδες, γαλακτώδες άρωμα), θειικό εξυλ-δεκαπεντυλεστέρα και 1H-indole-3-ethanol acetate. Για τους 2 τελευταίους εστέρες δε βρέθηκαν δεδομένα ως προς το άρωμα που προσδίδουν.

ΟΥΣΙΕΣ (mg/L)	MP	US-05	S-23
isopentyl alcohol acetate	0,046	0,100	0,060
ethyl caprylate	0,040	0,525	0,034
ethyl caproate			0,008
acetic acid, phenylethyl ester	0,012		0,015
ethyl 9-decenoate	0,006		
ethyl 4-decenoate			0,002
capric acid ethyl ester			0,024
capric acid ethyl ester	0,066		
lauric acid ethyl ester	0,028		
myristic acid, isopropyl ester	0,003		0,012
ethyl 9-hexadecenoate	0,014		
palmitic acid, isopropyl ester	0,005		
butyric acid ethyl ester		0,034	
octanoic acid 2-phenylethyl ester		0,026	
E-buten-1-yl 2-methylbutanoate		0,009	
malonic acid decyl isobutyl ester		0,020	
sulfurous acid hexyl pentadecyl ester		0,067	
acetoxyacetic acid nonyl ester			0,003
sulfurous acid nonyl pentyl ester			0,002
sulfurous acid dodecyl hexyl ester			0,005
nerolidyl propionate			0,035
benzyl oleate			0,015
palmitic acid ethyl ester			0,207
geranyl isovalerate			0,020

Πίνακας 26: Εστέρες σε υλοστρώματα μίγματος σακχάρων (mg/L)

Στα μικτά υποστρώματα, οι κυριότεροι εστέρες που εμφανίστηκαν σε υπολογίσιμες ποσότητες είναι ο οξικός ισοπεντυλεστέρας και ο καπριλικός αιθυλεστέρας. Και οι 3 ζύμες εμφάνισαν αρκετούς επιπλέον εστέρες, με τους περισσότερους να εμφανίζονται μόνο σε μια ζύμη.

Συνολικά, στα υποστρώματα γλυκόζης τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στις κυρίαρχες αλκοόλες (φαινυλαιθυλική, ενεργή αμυλική και ισοπεντυλική), όπως και σε οξέα τις εμφάνισε η *T. delbrueckii*, όπως και στους εστέρες σε επίπεδο ποικιλίας. Ως προς τους εστέρες, οι ζύμες εμφάνισαν μέγιστες συγκεντρώσεις σε διαφορετικές ενώσεις ανάλογα το υπόστρωμα. Τις μικρότερες συγκεντρώσεις λοιπών οργανικών ενώσεων, εκ των οποίων οι περισσότεροι προσφέρουν ανεπιθύμητα αρώματα, τις εμφάνισε ο US-05.

Στα υποστρώματα φρουκτόζης, τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε αλκοόλες και οξέα τις εμφάνισε ο US-05 ενώ τις μικρότερες συγκεντρώσεις σε άλλες οργανικές ενώσεις τις εμφάνισαν η *T. delbrueckii* και ο S-23. Ως προς τους εστέρες, η μεγαλύτερη ποικιλία σε ενώσεις παρήχθησε από την *T. delbrueckii*.

Στα υποστρώματα μαλτόζης τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε αλκοόλη τις εμφάνισε ο US-05, ενώ σε οξέα η *T. delbrueckii*, όπως και σε εστέρες, σε ποικιλία. Η *M. Pulcherrima* είχε τις μικρότερες συγκεντρώσεις σε άλλες οργανικές ενώσεις.

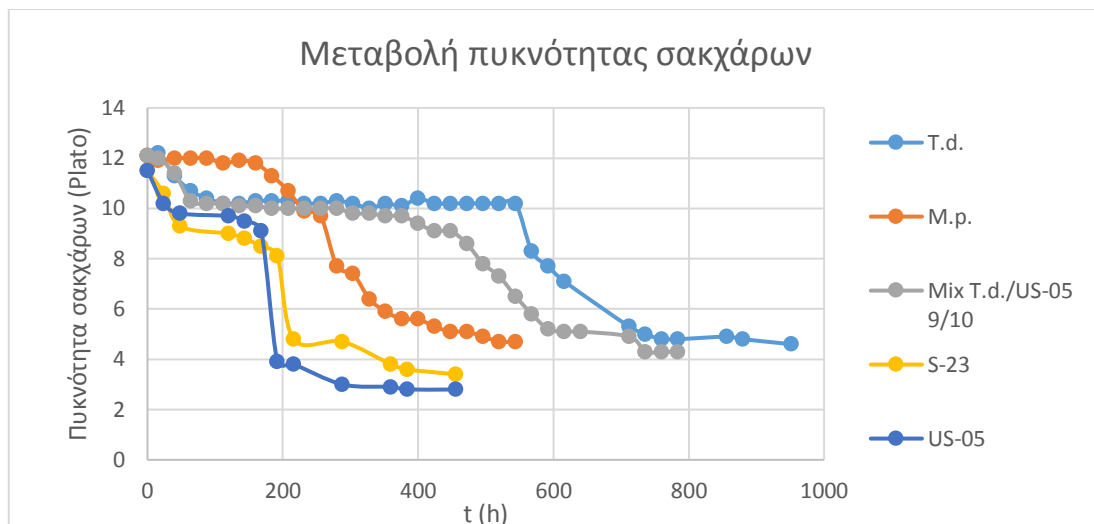
Στα μικτά υποστρώματα, λόγω έλλειψης δεδομένων για την *T. delbrueckii*, η σύγκριση γίνεται μεταξύ των υπόλοιπων ζυμών. Τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε αλκοόλες και οξέα εμφάνισε ο US-05, ενώ τις μικρότερες συγκεντρώσεις σε άλλες οργανικές ενώσεις η *M. pulcherrima*.

Ως γενικό συμπέρασμα, οι non-*Saccharomyces* ζύμες είναι ικανές να παράξουν μια πληθώρα αρωματικών ενώσεων, με την *T. delbrueckii* να κυριαρχεί ως προς τα αρώματα φρούτων και τριαντάφυλλου. Η *M. pulcherrima*, αν και εμφάνισε μικρότερη ποικιλία αρωμάτων από την *T. delbrueckii*, είχε τις μικρότερες συγκεντρώσεις σε επίπεδο λοιπών οργανικών ενώσεων, πολλές από τις οποίες γενικά προσδίδουν ανεπιθύμητα αρώματα, εκτός αυτών που προέρχονται από το λυκίσκο.

3 Παραγωγή Μπύρας

3.1 Κατανάλωση σακχάρων

Η αρχική πυκνότητα του γλεύκους ήταν 12,1 °P, ενώ το αρχικό pH 5,2. Η ιδανική τιμή πυκνότητας σακχάρων είναι περίπου 11 °P. Η απόκλιση οφείλεται στο ότι η μείωση της πυκνότητας του ζυθογλεύκους κατά την παραγωγή του γίνεται με προσθήκη νερού. Επιπλέον προσθήκη νερού στο συγκεκριμένο ζυθογλεύκος πιθανόν να μείωνε περισσότερο από το επιθυμητό την τιμή της πυκνότητας. Η ρύθμιση του pH γινόταν με προσθήκη ορθοφωσφορικού οξέος κατά την παρασκευή του ζυθογλεύκους. Η απόκλιση του pH από την ιδανική για τις ζύμες τιμή 4,5, όπως και η διαφορετική σύσταση του γλεύκους από τα υποστρώματα απλών σακχάρων, αποτέλεσε ακόμα ένα εμπόδιο στην ανάπτυξη των ζυμών, χωρίς όμως να αποτρέψει τη διεργασία της ζύμωσης.



Διάγραμμα 15: Καμπύλες μεταβολής της πυκνότητας σακχάρων στο ζυθογλεύκος κατά τη διάρκεια της ζύμωσης από τις διαφορετικές καλλιέργειες ζυμών

Από το διάγραμμα 15 φαίνεται ότι η *M. pulcherrima* τελείωσε πρώτη τη ζύμωση με τελική πυκνότητα 4,7 °P από τις non-*Saccharomyces*, ενώ συνολικά ο US-05. Η φάση προσαρμογής είναι μεγαλύτερη στην περίπτωση της μύρας, κάτι που ισχύει για όλες τις περιπτώσεις ζυμών, καθώς το περιβάλλον δεν περιλαμβάνει όλα τα θρεπτικά συστατικά στις αναλογίες που υπάρχουν στα θρεπτικά υποστρώματα. Στην *M.pulcherrima* είναι 180 h περίπου, ενώ μετά η πυκνότητα πέφτει μέχρι τα 6 °P σε διάστημα περίπου μιας εβδομάδας και στη συνέχεια, η μείωση συνεχίζεται με μειούμενο ρυθμό μέχρι τις 540 h.

Η *T. delbrueckii*, όπως και στο υπόστρωμα μίγματος σακχάρων, προσαρμόζεται σχεδόν αμέσως, καθώς μέσα σε λιγότερο από 100 h η πυκνότητα σακχάρων έχει μειωθεί κατά 2 βαθμούς, αλλά μετά παραμένει σταθερή ως τις 570 h. Η αρχική μείωση οφείλεται στην κατανάλωση γλυκόζης και φρουκτόζης του γλεύκους, ενώ η ύστερα ξεκινά η φάση της 2^{ης} προσαρμογής και διάσπασης της μαλτόζης. Μετά τις 570 h, η πτώση της πυκνότητας είναι απότομη, διότι σε 150 h περίπου πέφτει στα 5 °P, όπου και σταδιακά σταθεροποιείται στην τιμή 4,6 στις 950 h.

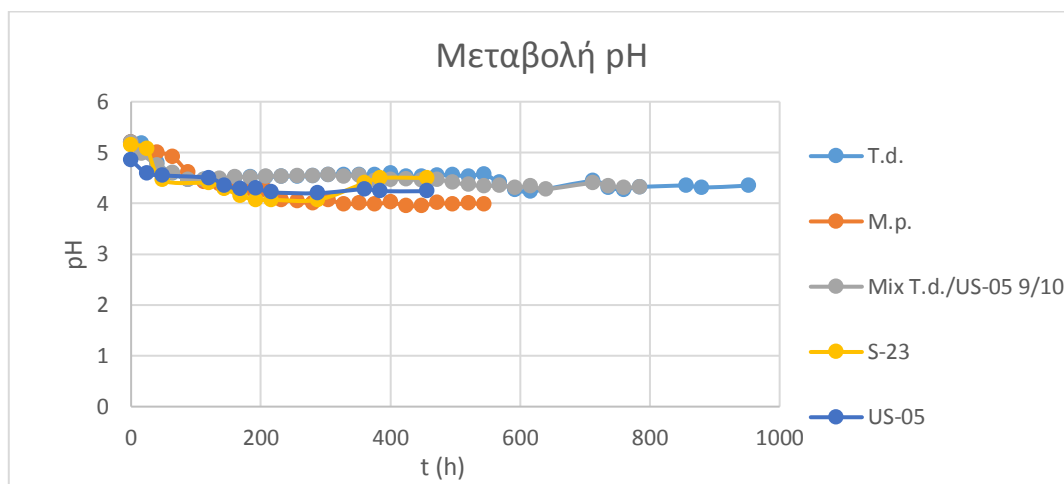
Το μίγμα *T.d./US-05* αποτελείται από 9 μέρη *T. delbrueckii* και ένα μέρος *US-05*. Συγκεκριμένα, στην μάζα ξηρής ζύμης 11,5 g που χρησιμοποιήθηκε, τα 10,925 g ήταν η μάζα της *T. delbrueckii* και η υπόλοιπη του *S. cerevisiae* *US-05*. Στη μικτή καλλιέργεια συμπεραίνεται ότι επικρατεί ο *S. cerevisiae* στη ζύμωση, παρόλο που βρίσκεται σε μικρότερο αρχικό πληθυσμό. Η κυριαρχία του *US-05* φαίνεται από το γεγονός ότι, όντας σε πολύ μικρότερη ποσότητα από την *T. delbrueckii*, μείωσε την πυκνότητα σακχάρων γρηγορότερα από την αντίστοιχη καθαρή καλλιέργεια.

Ο *S. cerevisiae* *S-23* ξεκινά από διαφορετική πυκνότητα σακχάρων και pH (11,5 ° και 5,15 αντίστοιχα), καθώς το γλεύκος που προορίστηκε γι' αυτόν ήταν επόμενου γύρου πειραμάτων και όχι το ίδιο με των προηγούμενων ζυμών. Ως ζύμη lager, προσαρμόζεται αμέσως στο περιβάλλον του και μέσα στις πρώτες 48 h έχει μειώσει την πυκνότητα στα 9,3 °P. Μετά από μια περίοδο προσαρμογής 3 d, κατά τις οποίες η πυκνότητα μειώνεται με αργούς ρυθμούς, ακολουθεί μια πολύ απότομη πτώση 3 °P περίπου, στις 210 h περίπου και ύστερα σταθερή μείωση μέχρι την τελική τιμή των 3,4 °P. Ως ζύμη του είδους *cerevisiae*, τελείωσε τη ζύμωση και γρηγορότερα και με μεγαλύτερη κατανάλωση σακχάρων.

Ο *S. cerevisiae* *US-05*, όπως και ο *S-23*, ξεκινά κι αυτός από αρχική πυκνότητα σακχάρων 11,5 °P και ακολουθεί παρόμοια πορεία με τον *S-23*. Παρατηρείται ότι, στις 210 h περίπου, η

πτώση στην πυκνότητα σακχάρων είναι όμοια με του S-23, ενώ η συνολική κατανάλωση είναι λίγο μεγαλύτερη από τον S-23. Οι δυο *S. cerevisiae* παρουσίασαν γενικά μεγαλύτερη κατανάλωση σακχάρων, καθώς προσαρμόστηκαν γρηγορότερα, αλλά και επειδή η πυκνότητα του γλεύκους ήταν ελαφρώς μικρότερη από το γλεύκος των υπόλοιπων καλλιιεργειών, άρα και πιο ευνοϊκές οι συνθήκες για να προσαρμοστούν στο περιβάλλον αυτό.

3.2 Μεταβολή pH



Διάγραμμα 16: Καμπύλες μεταβολής pH κατά τη διάρκεια της ζύμωσης από τις διαφορετικές καλλιέργειες ζυμών

Από το διάγραμμα 16 παρατηρείται ότι στις περισσότερες περιπτώσεις το pH μειώθηκε περίπου στο 4,4 περίπου, πλην της μπίρας με καλλιέργεια *M. pulcherrima*, η οποία εμφάνισε τελικό pH 4. Η αρχική τιμή pH στις περιπτώσεις των *T. delbrueckii*, *M. pulcherrima* και μικτής καλλιέργειας ήταν 5,2, ενώ στην περίπτωση των δυο *S. cerevisiae* 5,15, καθώς ζύμωσαν διαφορετικό γλεύκος.

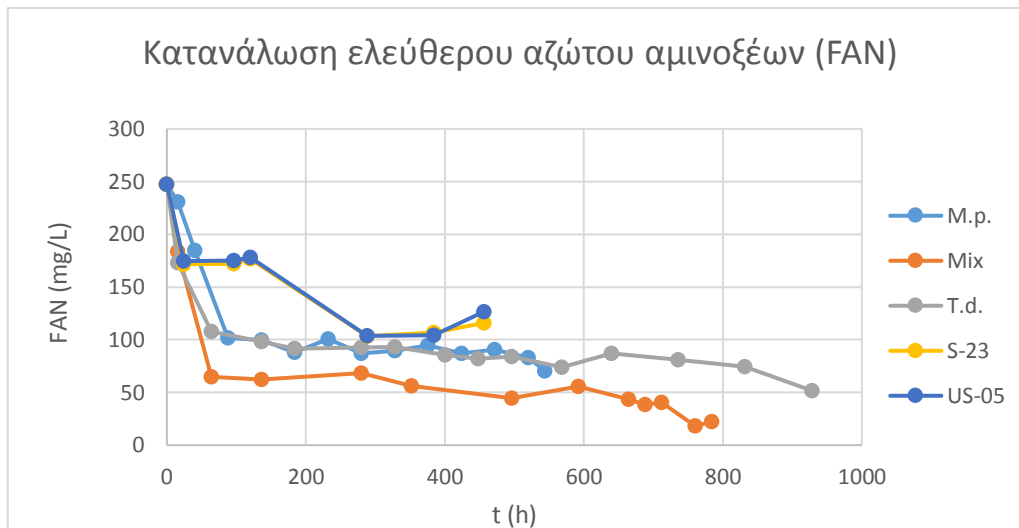
Το ζυθογλεύκος που ζυμώθηκε από την *T. delbrueckii* παρουσίασε ίδια σχεδόν τελική τιμή pH στην καθαρή και στη μικτή καλλιέργεια, με διαφορά 0,03 βαθμών.

Ο S-23 παρατηρείται ότι προσαρμόζεται γρηγορότερα από τις άλλες ζύμες, καθώς από την 3^η ημέρα το pH μειώνεται απότομα κατά μισό βαθμό.

Ο US-05 παρουσίασε συνολική πτώση 0,6 βαθμών pH. Η πτώση του pH είναι ομαλή, όπως και στις υπόλοιπες ζύμες. Στις 200 h περίπου σταθεροποιείται γύρω από την τιμή 4,24.

Γενικά το pH παρουσίασε πτώση, δηλαδή επιθυμητό αποτέλεσμα, καθώς σε χαμηλότερο pH υπάρχει μεγαλύτερη δυσκολία το τελικό προϊόν να υποστεί βακτηριακή επιμόλυνση. Η μείωση οφείλεται στην παραγωγή των οξέων ισοβαλερικό, ενεργό βαλερικό, καπρικό, καπριλικό, και καπροϊκό, για τα οποία θα γίνει λόγος παρακάτω.

3.3 Κατανάλωση αζώτου αμινοξέων (FAN)



Διάγραμμα 17: Κατανάλωση ελεύθερου αζώτου αμινοξέων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης από τις διαφορετικές καλλιέργειες ζυμών

Το αρχικό γλεύκος το οποίο ζύμωσαν διαφορετικές ζύμες είχε αρχική τιμή αμμωνιακού αζώτου (FAN) 247 mg/L. Από το διάγραμμα 17 φαίνεται ότι τη μεγαλύτερη κατανάλωση FAN είχε η μικτή καλλιέργεια. Από τις πρώτες 70 h η συγκέντρωση του αμμωνιακού αζώτου παρουσιάζει μια μεγάλη πτώση περίπου 180 mg/L και διατηρείται περίπου σταθερή μέχρι τις 600 h. Έπειτα εμφανίζει μια δεύτερη πτώση μέχρι την τελική τιμή των 22,13 mg/L. Ο λόγος που η μικτή καλλιέργεια εμφανίζει τη δεύτερη καμπύλη κατανάλωσης είναι ότι, επειδή ο US-05 κυριάρχησε στη ζύμωση όταν το περιβάλλον είχε συγκέντρωση αιθανόλης που απέτρεπε την περαιτέρω ανάπτυξη της *T. delbrueckii*, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία και κατανάλωσε επιπλέον άζωτο. Αυτό συμβαίνει στις 600 h περίπου και επιβεβαιώνεται από το διάγραμμα μεταβολής της πυκνότητας σακχάρων, στο οποίο η πτώση της πυκνότητας επιβραδύνεται σε εκείνο το σημείο, δηλαδή η *T. delbrueckii* σταματά τη ζύμωση και συνεχίζει μόνο ο US-05 μέχρι τέλους.

Οι *M. pulcherrima* και *T. delbrueckii* παρουσιάζουν παρόμοια εικόνα ως προς την κατανάλωση του αζώτου. Στις 64 και 88 h αντίστοιχα, η συγκέντρωση FAN βρίσκεται στα 100 mg/L. Ακολουθεί ήπια πτώση με την *M. pulcherrima* να έχει τελική τιμή FAN 70,5 mg/L και την *T. delbrueckii* 51,8 mg/L.

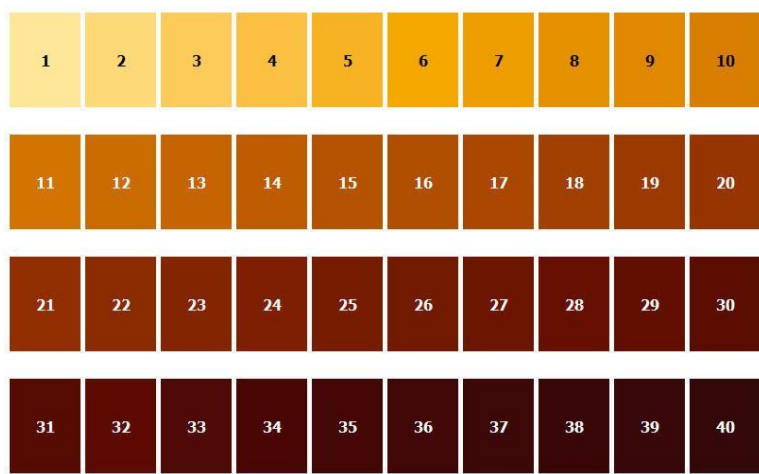
Οι δυο *S. cerevisiae* παρουσιάζουν τη μικρότερη κατανάλωση αμμωνιακού αζώτου, με τελική τιμή περίπου στα 100 mg/L. Αυτό οφείλεται στη μικρότερη ανάγκη των *S. cerevisiae* στελεχών σε πηγή αζώτου καθώς προσαρμόστηκαν στο περιβάλλον ευκολότερα.

3.4 Χρώμα και πικράδα του τελικού προϊόντος

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα σε μετρήσεις χρώματος και πικράδας στις μύρες.

ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ	ΧΡΩΜΑ (SRM)	ΠΙΚΡΑΔΑ (IBU)
<i>Metchikowia pulcherrima</i>	8,59	22,8
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S-23	6,34	22,8
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> US-05	6,37	22,1
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	8,12	23,45
Μίγμα US-05/T.d. Αναλογίας 1/10	7,61	31,15

Πίνακας 27 – Αποτελέσματα χρώματος και πικράδας στις μύρες



Εικόνα 1: Διάγραμμα χρώματος της μεθόδου αναφοράς προτύπου (SRM)

Ως προς το χρώμα, παρατηρείται ότι η *M. pulcherrima* παρουσιάζει τη μεγαλύτερη τιμή, άρα και έχει το πιο σκούρο χρώμα από τις υπόλοιπες μύρες, σύμφωνα με την εικόνα. Ακολουθεί η *T. delbrueckii*, ύστερα η μικτή καλλιέργεια και τέλος οι δυο *S. cerevisiae*. Συμπεραίνεται ότι τα στελέχη *S. cerevisiae* προσδίδουν πιο ανοιχτό χρώμα στις μύρες, καθώς οι δυο *S. cerevisiae* παρουσιάζουν τη χαμηλότερη τιμή, αλλά και η μικτή καλλιέργεια, που περιέχει μια ζύμη *S. cerevisiae*, είναι πιο ανοιχτόχρωμη από την αντίστοιχη με την καθαρή καλλιέργεια *T. delbrueckii*. Συνολικά, όλες οι μύρες είχαν τιμές χρώματος συμβατές με τη βιβλιογραφία, η

οποία καθορίζει τα όρια για τις American Pale Ale μπύρες μεταξύ των τιμών 5 και 10 [Blake et al., 2015].

Τη μεγαλύτερη τιμή πικράδα την εμφάνισε η μπύρας της μικτής καλλιέργειας, με τιμή 31,15 IBU. Οι υπόλοιπες μπύρες παρουσίασαν τιμές μεταξύ 22-23. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οι τιμές πικράδας για τις American Pale Ale κυμαίνονται μεταξύ 30-50 IBU [Blake et al., 2015]. Στο συγκεκριμένο πείραμα, μόνο η μικτή καλλιέργεια βρίσκεται εντός ορίων και οι γενικά χαμηλές τιμές πικράδας οφείλονται στην προσθήκη μικρής ποσότητας λυκίσκου, ώστε να μην επικαλύψουν οι αρωματικές του ενώσεις τις αρωματικές που παράγουν οι ζύμες.

3.5 Επίδραση διαφορετικών ζυμών στη συγκέντρωση αιθανόλης στη μπύρα

Στον πίνακα 28 παρατίθενται οι συγκεντρώσεις αλκοόλης σε όλες τις μπύρες.

ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΖΥΜΩΝ	C % (v/v)
<i>T. delbrueckii</i>	3,9
<i>M. pulcherrima</i>	4
Mix <i>T.delbrueckii</i> / <i>S. cerevisiae</i> US-05	4,7
<i>S. cerevisiae</i> US-05	3,8
<i>S. cerevisiae</i> S-23	4,8

Πίνακας 28: Συγκεντρώσεις αλκοόλης στις μπύρες

Από τον πίνακα παρατηρείται ότι τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε αλκοόλη την έχουν οι μπύρες που παρήχθησαν από τον S-23 και τη μικτή καλλιέργεια. Συμπεραίνεται ότι τα lager στελέχη *S. cerevisiae* παρουσιάζουν αντοχή σε χαμηλή θερμοκρασία και σε υψηλότερες συγκεντρώσεις αιθανόλη.

Ως προς τον US-05, παρατηρείται ότι η καθαρή καλλιέργεια έδωσε προϊόν με χαμηλότερη περιεκτικότητα σε αιθανόλη από ότι η μικτή. Αυτό οφείλεται στο ότι στη μικτή καλλιέργεια, η ζύμωση ξεκινά κυρίως από την *T. delbrueckii*, η οποία βρίσκεται και σε μεγαλύτερο αρχικό πληθυσμό. Έτσι μειώνει την αρχική πυκνότητα των σακχάρων, δημιουργώντας ένα ευνοϊκότερο περιβάλλον για την περαιτέρω ανάπτυξη και παραγωγή αιθανόλη από τον US-05. Αντίθετα, στην καθαρή καλλιέργεια, η αρχική πυκνότητα σακχάρων του γλεύκους αποτελεί ένα επιπλέον εμπόδιο που πρέπει να υπερβούν οι ζύμες.

Οι δυο non-*Saccharomyces* ζύμες εμφάνισαν χαμηλότερη περιεκτικότητα σε αλκοόλη από τον S-23. Αυτό είναι αναμενόμενο, καθώς γενικά οι non-*Saccharomyces* ζύμες έχουν μικρότερη αντοχή σε περιβάλλον αλκοόλης. Επιπλέον είναι ένας από τους λόγους που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή μπύρας, διότι μια από τις απαιτήσεις των καταναλωτών είναι αλκοολούχα ποτά με χαμηλή περιεκτικότητα σε αλκοόλ.

3.6 Προσδιορισμός αρωματικών ενώσεων στη μύρα

Στους παρακάτω πίνακες παρατίθενται οι αρωματικές ουσίες που παράχθηκαν από τις μύρες. Όπως και στα υποστρώματα, έγινε διαχωρισμός των ουσιών σε αλκοόλες/θειόλες, άλλες οργανικές ενώσεις, οξέα και εστέρες.

ΟΥΣΙΕΣ (mg/L)	MP	MIX	TD	S-23	US-05
phenylethyl alcohol	1,776	0,236	9,809	16,434	0,604
p-vinylguaiacol	0,368	0,086	0,469		0,005
tryptophol	0,043	0,096	0,085	1,930	0,329
1-hexadecanol,2-methyl-	0,004	0,003		0,028	0,008
2-methyl-Z,Z-3,13-octadecadienol	0,004				
isopentyl alcohol		0,394	3,332	5,531	
active amyl alcohol		0,061	1,687	3,258	
furfuryl alcohol		0,007			
1-propanol, 3-(methylthio)-		0,026			
isopinocarveol		0,001		0,011	
tyrosol		0,045			0,007
2-hexadecanol		0,006		0,241	0,003
2-propylheptanol			0,009		
γ-methylmercaptopropyl alcohol			0,066		
2-hexenol 2-ethyl-			0,008		0,003
2-ethyl-1-hexanol				0,037	
5,7,-dodecadiyn-1,12-diol			0,019		
ΘΕΙΟΛΕΣ					
tert-hexadecanethiol	0,006			0,171	0,003

Πίνακας 29: Αλκοόλες και θειόλες στις μύρες που ζυμώθηκαν από τις καλλιέργειες ζυμών (mg/L)

Από τον πίνακα παρατηρείται ότι στο γλεύκος πριν τη ζύμωση, υπήρχε η δεκαεξανθειόλη, η οποία προσδίδει λιπαρό άρωμα. Η συγκέντρωσή της μειώθηκε σε όλες τις περιπτώσεις καλλιέργειας και ειδικά στη μικτή και την καθαρή καλλιέργεια *T. delbrueckii* μειώθηκε σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα. Ως προς τις αλκοόλες γενικά, σε όλες τις μύρες παράχθηκε φαινυλαιθυλική αλκοόλη (άρωμα τριανταφύλλου) και τρυπτοφόλη (άρωματα αμυγδάλων και φρούτων), με τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις να τις έχει ο S-23. Επίσης στις περισσότερες μύρες παράχθηκε p-βινυλγουαϊακόλη (άρωματα κάρι, μπαχαρικών και γαρύφαλλου), 2-μεθυλ-δεκαεξανόλη (δε βρέθηκαν δεδομένα) και ισοπεντυλική και ενεργή αμυλική αλκοόλη. Τη μεγαλύτερη ποικιλία των παραγόμενων αλκοολών την παρουσιάζει η μύρα της μικτής καλλιέργειας.

ΟΥΣΙΕΣ (mg/L)	MP	MIX	TD	S-23	US-05
disulfide isopropyl propyl	0,006	0,012	0,068	0,083	0,008
isovanillin					
disulfide di-tert-dodecyl					
l-gala-l-ido-octose	0,004				
isohumulone	0,041			0,237	0,005
humulone					0,001
rhodopin	0,024				0,028
2H-pyran-tetrahydro-2-(12-pentadecyloxy)-		0,020			
3-acetyl-1H-pyrroline		0,007			
caryophellene				0,024	0,002
2-dodecen-1-yl(-)succinic anhydride				0,087	
ethyl isoamyl ketone	0,007				
γ-n-heptylbutyrolactone	0,003	0,005	0,030		
2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone		0,002			
coumaran		0,021			
isoshyobunone				0,036	0,003
1-(2,2-dimethylcyclohexyl)ethanone				0,016	
oxybenzone					0,005

Πίνακας 30: Άλλες οργανικές ενώσεις στις μύρες που ζυμώθηκαν από τις καλλιέργειες ζυμών (mg/L)

Σε όλες τις μύρες βρέθηκε ισοπροπυλ-προπυλικό δισουλφίδιο, το οποίο χαρακτηρίζεται ως ανεπιθύμητη αρωματική ένωση [TGSC Information System], αν και η συγκέντρωσή του ήταν μικρότερη από ότι στο αρχικό γλεύκος. Γενικά παράχθηκαν ενώσεις από την προσθήκη λυκίσκου, όπως χουμουλόνη, ισοχουμουλόνη και καρυοφυλλίνη, σε μικρές συγκεντρώσεις, καθώς προστέθηκε μικρή ποσότητα λυκίσκου στο αρχικό γλεύκος. Στην περίπτωση της *T. delbrueckii*, στην καθαρή και στη μικτή καλλιέργεια, δεν παρήχθησαν αυτές οι ενώσεις σε ανιχνεύσιμα επίπεδα, κάτι που επιβεβαιώνεται από τη βιβλιογραφία, καθώς η *T. delbrueckii* μετατρέπει τις ενώσεις του λυκίσκου [Canonico et al., 2016].

ΟΥΣΙΕΣ (mg/L)	MP	MIX	TD	S-23	US-05
isovaleric acid	0,009	0,011	0,059	0,091	0,005
active valeric acid				0,077	0,002
caprylic acid	0,291	0,024	1,093	0,831	0,028
capric acid	0,044	0,039	0,383	0,073	0,015

caproic acid		0,008		0,291	
dehydro-cohumulinic acid	0,078			8,397	
isobutyric acid		0,00001	0,059		
butyric acid		0,012			
butyric acid, 2-methyl-		0,001			
malonic acid, phenyl-		0,006			
a-methylcaproic acid			0,072	0,075	
nonanoic acid					0,003
stearic acid					0,004

Πίνακας 31: Οξέα στις μπίρες που ζυμώθηκαν από τις καλλιέργειες ζυμών (mg/L)

Ως προς τα οξέα, η εικόνα που παρατηρείται είναι ότι τα κυρίαρχα οξέα, που εμφανίζονται σε όλες τις μπίρες, είναι το καπρικό, το καπριλικό και το ισοβαλερικό. Ως προς το καπρικό και το καπριλικό, οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις τους βρέθηκαν στη μπίρα που ζυμώθηκε από την *T. delbrueckii*. Το ενεργό βαλερικό οξύ βρέθηκε σε ανιχνεύσιμες ποσότητες στις δυο μπίρες που ζυμώθηκαν από τα στελέχη *S. cerevisiae*. Στον S-23 συγκεκριμένα, βρέθηκε σε μεγάλη συγκέντρωση δεϋδρο-κοχουμουλινικό οξύ, ένωση που προέρχεται από το λυκίσκο [Tyngan et al., 1989].

ΟΥΣΙΕΣ (mg/L)	MP	MIX	TD	S-23	US-05
palmitic acid ethyl ester	0,020		0,049	0,160	0,009
oleic acid 3-(octadecyloxy)propyl ester					
isopentyl alcohol, acetate	0,009	0,029	0,151	0,149	0,002
ethyl caproate	0,030		0,253	0,049	
ethyl caprylate	0,018	0,046	0,121	0,297	0,005
acetic acid, 2-phenylethyl ester	0,017	0,040	0,181	0,226	
capric acid, ethyl ester	0,009	0,004	0,144	0,067	
lauric acid, ethyl ester	0,007		0,032		
9-octadecen-12-ynoic acid, methyl ester	0,006				
isopropyl myristate	0,005	0,036			
geranyl isovalerate	0,009		0,035		0,020
stearic acid, ethyl ester	0,025				
1-butanol, 2-methyl-, acetate		0,004			
benzeneacetic acid, 2-tetradecyl ester		0,002			
2,5-octadecadiynoic acid, methyl ester		0,003			
1H-Indole-3-ethanol, acetate		0,027			

7-methyl-Z-tetradecen-1-ol acetate		0,213			0,270
nitrous acid butyl ester			0,040		
allyl 2-ethyl butyrate			0,027	0,025	
active amyl acetate			0,010		
2-phenylethyl caproate			0,020		
octanoic acid phenethyl ester			0,071		
4-capric acid ethyl ester (E)				0,031	
ethyl iso-allocholate				0,504	0,077
9-hexadecenoic acid, 9-octadecenyl ester (Z,Z)-				0,112	
benzyl oleate					0,001
valeric acid, phenethyl acetate					0,002
ethyl 9-hexadecenoate					0,004
10-octadecenoic acid, methyl ester					0,002

Πίνακας 32: Εστέρες στις μύρες που ζυμώθηκαν από τις καλλιέργειες ζυμών (mg/L)

Οι κύριοι εστέρες που εμφανίζονται στην πλειονότητα των μυρών είναι ο παλμιτικός αιθυλεστέρας (κερί) , ο οποίος υπάρχει και στο γλεύκος, ο οξικός ισοπεντυλεστέρας (φρούτα), ο καπρικός αιθυλεστέρας (κερί), ο καπριλικός αιθυλεστέρας (βερίκοκο, αχλάδι, μπανάνα) και ο οξικός φαινυλαιθυλεστέρας (μήλο, μέλι). Αξίζει να αναφερθεί και ο εστέρας ethyl-isoallocholate, ο οποίος εμφανίζεται στις μύρες που ζυμώθηκαν από τα στελέχη *S. cerevisiae* και ειδικά από τον S-23 σε μεγάλη συγκέντρωση συγκριτικά με τους υπόλοιπους εστέρες (0,504 mg/L). Ο εστέρας αυτός προσδίδει άρωμα σκόρδου [Koca et al., 2016].

Συνολικά, οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των κυριότερων αρωματικών ενώσεων εμφανίζονται στις μύρες που ζυμώθηκαν από τα στελέχη *S. cerevisiae* S-23 και *T. delbrueckii*. Ως προς τις αλκοόλες, ο S-23 είχε τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε φαινυλαιθυλική, ενεργή αμυλική αλκοόλη και τρυπτοφόλη και η *T. delbrueckii* σε p-βινυλγουαϊακόλη. Ως προς τις άλλες οργανικές ενώσεις, πλην των ουσιών του λυκίσκου, τις μικρότερες γενικά συγκεντρώσεις εμφανίζουν οι μύρες που ζυμώθηκαν από τις ζύμες *M. pulcherrima* και *S. cerevisiae* US-05. Ο λόγος που αναφέρονται σε αυτή την κατηγορία οι μικρότερες συγκεντρώσεις οφείλεται στα πιθανά αρνητικά αρώματα που προσδίδουν γενικά οι άλλες οργανικές ενώσεις, πλην αυτών του λυκίσκου, στις μύρες. Ως προς τα οξέα, στον S-23 βρέθηκε περισσότερο δεϋδροκοχουμουλινικό και βαλερικό οξύ και στην *T. delbrueckii* καπρικό και καπριλικό οξύ. Τέλος ως προς τους εστέρες, η *T. delbrueckii* εμφάνισε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε ισοπεντυλικό φαινυλαιθυλεστέρας, καπριλικό αιθυλεστέρας και καπρικό αιθυλεστέρας, ενώ ο S-23 εμφάνισε στον καπριλικό αιθυλεστέρας μεγαλύτερη συγκέντρωση.

Ως προς το γενικό αρωματικό προφίλ, οι non-*Saccharomyces* συνέβαλαν στην πολυπλοκότητα των αρωμάτων στα τελικά προϊόντα, με την *T. delbrueckii* να προσδίδει περισσότερα αρώματα από την *M. pulcherrima*. Πιο συγκεκριμένα, τα κυρίαρχα αρώματα ήταν αυτά των φρούτων, λόγω των αλκοολών φαινυλαιθυλικής, ισοαμυλικής και τρυπτοφόλης και των αιθυλεστέρων φαινυλαιθυλικού και καπριλικού, όπως και γαλακτοκομικών προϊόντων, λόγω των περισσότερων οξέων που παράχθησαν. Η ζύμωση

στους 13 °C έδειξε το πώς διατηρούνται καλύτερα οι παραγόμενες αρωματικές ενώσεις, καθώς παράχθησαν περισσότερες ενώσεις από ότι σε ζυμώσεις που έγιναν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Συγκεκριμένα σε παρόμοια μελέτη στην οποία η θερμοκρασία ζύμωσης ήταν 20-24 °C, παράχθησαν λιγότερες ενώσεις σε όλες τις ομάδες ενώσεων [Αναστασάκου, 2016]. Το κύριο μειονέκτημα της ζύμωσης σε χαμηλές θερμοκρασίες είναι ότι θα διατηρούνται καλύτερα όλα τα αρώματα, ακόμα και τα ανεπιθύμητα.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Αρχικά συμπεραίνεται οι non-*Saccharomyces* ζύμες που χρησιμοποιήθηκαν, *T. delbrueckii* και *M. pulcherrima* είναι ικανές να ζυμώσουν και τα τρία απλά σάκχαρα του γλεύκους, δηλαδή διαθέτουν το ένζυμο μαλτάση για διάσπαση της μαλτόζης. Επίσης είναι ικανές να επιβιώσουν και να αναπτυχθούν καταναλώνοντας τα σάκχαρα στη θερμοκρασία των 13 °C.

Η ζύμωση των απλών σακχάρων έδειξε ότι υπάρχουν διαφορές ως προς τους χρόνους για ολοκλήρωση της ζύμωσης όπως και στους τελικούς πληθυσμούς, κάτι που αντικατοπτρίζεται από τις σταθερές δυναμικού μεταφοράς της λογιστική εξίσωσης για την κάθε ζύμη στα τρία διαφορετικά υποστρώματα. Συγκεκριμένα, οι τιμές των σταθερών για τις ζύμες *M. pulcherrima*, *S. cerevisiae* S-23 και US-05 κυμαίνονται μεταξύ των τιμών 0,00659 και 0,00469 1/h, πλην του US-05 στο υπόστρωμα μαλτόζης, ο οποίος έχει τιμή της σταθεράς k ίση με 0,00291 1/h. Αυτή η χαμηλότερη τιμή οφείλεται στο μικρότερο τελικό πληθυσμό που παρουσίασε από ότι στα υποστρώματα γλυκόζης και φρουκτόζης. Η *T. delbrueckii* παρουσίασε μεγάλο εύρος στις τιμές των σταθερών δυναμικού μεταφοράς της, με μέγιστη τιμή στο υπόστρωμα γλυκόζης, συγκεκριμένα 0,01041 1/h, και ελάχιστη στο υπόστρωμα μαλτόζης, 0,00286 1/h. Η μεγάλη αυτή διαφορά οφείλεται στη διαφορά μεταξύ τελικών πληθυσμών στο υπόστρωμα μαλτόζης και υποστρωμάτων φρουκτόζης και γλυκόζης όπως και στη διαφορά των χρόνων ολοκλήρωσης της ζύμωσης.

Ως προς την κατανάλωση ελεύθερου αζώτου αμινοξέων, οι non-*Saccharomyces* απαιτήσαν μεγαλύτερη ποσότητα αζώτου από ότι τα στελέχη *S. cerevisiae* στα υποστρώματα μαλτόζης και μίγματος σακχάρων. Αυτό οφείλεται στην πρόσθετη δυσκολία μεταβολισμού της μαλτόζης, λόγω της οποίας οι ζύμες βασίστηκαν περισσότερο στην πηγή αζώτου μέχρι να ξεκινήσει η διάσπαση της μαλτόζης. Οι τελικές τιμές της αιθανόλης παρουσιάζουν διαφορές στα υποστρώματα μαλτόζης, με τις ζύμες *T. delbrueckii* και *S. cerevisiae* US-05 να έχουν χαμηλότερες τελικές συγκεντρώσεις αιθανόλης από τις *M. pulcherrima* και *S. cerevisiae* S-23. Αυτό, σε συνδυασμό με τα αμελητέα υπολειμματικά σάκχαρα στα υποστρώματα μαλτόζης υποδεικνύει ότι η πηγή άνθρακα που καταναλώθηκε, χρησιμοποιήθηκε περισσότερο για παραγωγή βιομάζας παρά αιθανόλης στις περιπτώσεις των *T. delbrueckii* και *S. cerevisiae* US-05.

Στην ζύμωση του ζυθογλεύκους, η *M. pulcherrima* παρουσίασε μικρή απόκλιση ως προς το χρόνο ζύμωσης από τα στελέχη *S. cerevisiae*, σε αντίθεση με την *T. delbrueckii* σε καθαρή και μικτή καλλιέργεια. Η τελική πυκνότητα σακχάρων διαφέρει μεταξύ των καλλιεργειών ζυμών, με τις non-*Saccharomyces* να αφήνουν περισσότερα υπολειμματικά σάκχαρα από τις συμβατικές ζύμες. Επίσης επιβεβαιώνεται η εξάρτηση από την πηγή αζώτου από τις non-*Saccharomyces* ζύμες, καθώς η κατανάλωση αζώτου αμινοξέων είναι μεγαλύτερη σε αυτές.

Ως προς τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τελικών προϊόντων, συμπεραίνεται ότι οι ζύμες *S. cerevisiae* προσδίδουν πιο ανοιχτό χρώμα στη μύρα από τις non-*Saccharomyces*, ενώ στην πικράδα συμβάλλει ο λυκίσκος, διότι σε όλες σχεδόν τις μύρες η πικράδα βρίσκεται κάτω του ορίου της βιβλιογραφίας, με τιμές 22-23 IBU. Η συμβολή του λυκίσκου φαίνεται από το ότι η προσθήκη μικρής ποσότητάς του στο αρχικό γλεύκος είχε ως αποτέλεσμα τις χαμηλές τιμές πικράδας στις μύρες. Η τελική περιεκτικότητα σε αιθανόλη ήταν χαμηλότερη στις καθαρές καλλιέργειες των non-*Saccharomyces* ζυμών, το οποίο είναι αναμενόμενο και επιθυμητό για τα τελικά προϊόντα, καθώς οι σύγχρονες απαιτήσεις των καταναλωτών είναι αλκοολούχα ποτά με χαμηλή περιεκτικότητα σε αλκοόλ. Ως προς το γενικό αρωματικό προφίλ, οι non-*Saccharomyces* συνέβαλαν στην πολυπλοκότητα των αρωμάτων στα τελικά προϊόντα, με την *T. delbrueckii* να προσδίδει περισσότερα αρώματα

από την *M. pulcherrima*. Πιο συγκεκριμένα, τα κυρίαρχα αρώματα ήταν αυτά των φρούτων, λόγω των αλκοολών φαινυλαιθυλικής, ισοαμυλικής και τρυπτοφόλης και των αιθυλεστέρων φαινυλαιθυλικού και καπριλικού, όπως και γαλακτοκομικών προϊόντων, λόγω των περισσότερων οξέων που παράχθησαν.

Συμπεραίνεται τελικά ότι οι non-*Saccharomyces* ζύμες που χρησιμοποιήθηκαν είναι ικανές να ζυμώσουν τα σάκχαρα του γλεύκους στη θερμοκρασία των 13 °C όπως και να προσφέρουν πολυπλοκο αρωματικό προφίλ. Ως μελλοντική έρευνα προτείνεται η μελέτη της ανάπτυξης όπως και μελέτη των αρωμάτων που προσφέρουν non-*Saccharomyces* ζύμες, υπεύθυνες για την αυθόρμητη ζύμωση, όπως ζύμες τους γένους *Brettanomyces*. Αυτές οι ζύμες γενικά θεωρούνται αλλοιγόνες σε άλλα προϊόντα, αλλά στη ζυθοποιεία χρησιμοποιούνται για την παραγωγή των lambic μπυρών. Άλλες ζύμες που αξίζουν να μελετηθούν είναι οι *Candida shehatae*, καθώς είναι ικανές να μετατρέψουν τις τερπενικές ουσίες του λυκίσκου σε αρωματικές ενώσεις, όπως και ο *Zygosaccharomyces rouxii*, λόγω των αμφιλεγόμενων συμπερασμάτων της βιβλιογραφίας.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Αναστασάκου Α., *Μελέτη παραγωγής μπύρας με χρήση ζυμών non-Saccharomyces*, διπλωματική εργασία, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, 2016
- Θωμόπουλος, Χ., *Τεχνολογία Γεωργικών Βιομηχανιών*, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις ΕΜΠ, 1981
- Ταταρίδης, Π., Κανέλλης, Α., Λογοθέτης, Σ., Νεραντζής, Η., “Use of non-Saccharomyces *Torulaspora delbrueckii* yeast strains in winemaking and brewing”, *Jour. Nat. Sci, Matica Srpska Novi Sad* 124, 2013, 415-426
- Ταταρίδης, Π., Κεχαγιά, Δ., 2010. Εργαστήριο Βυνοποίησης-Ζυθοποίησης, Κριθάρι – Χαρακτηριστικά – Σύσταση – Ποιοτικός έλεγχος, Αθήνα: Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής
- Ταταρίδης, Π., Κεχαγιά, Δ., 2010. Εργαστήριο Βυνοποίησης-Ζυθοποίησης, *Λυκίσκος – Βρασμός – Θερμό και Ψυχρό Θόλωμα*, Αθήνα: Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, 160-188
- Ταταρίδης, Π., Κεχαγιά, Δ., 2010. Εργαστήριο Βυνοποίησης-Ζυθοποίησης, *Ιστορική ανασκόπηση εξέλιξης μπύρας – Παραγωγικά στάδια*, Αθήνα: Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, 1-20
- Ταταρίδης, Π., Μούρκου, Ξ., Σπαϊδιώτης, Α., Νεραντζής, Ε., “Preliminary study on wine fermentation kinetics with “cryotolerant” yeast”, *2nd International Junior Researchers’ Meeting*, 2008
- Albertin, W., Chasseriaud, L., Comte, G., Pnfili, A., Delcamp, A., Salin, F., Marullo, P., Bely, M., “Winemaking and bioprocesses strongly shaped the genetic diversity of the ubiquitous yeast *Torulaspora delbrueckii*”, *PLOS ONE* 9, 2014
- Alves-Araujo, C., Pacheco, A., Almeida, M. J., Spencer-Martins, I., Leao, C., Sousa, M. J., “Sugar utilization patterns and respire-fermentative metabolism in the baker’s yeast *Torulaspora delbrueckii*”, *Microbiology* 153, 2007, 898-904
- Blake, D., Feltus, A. Fitzpatrick, T., Linsner, M., Zainasheff, J., Beechum, D., Belanger, C., Dibbs, H., Hayes, A., Jankowski, B., Korty, A., Nadeau, L., Scott, W. S., Smith, R., Strong, L., Symons, P., Tonsmeire, M., Winnie, M., Wheeler, T., “2015 Style Guidelines” *Beer Judge Certification Program*, 2015
- Bokulich, N. A. ,Bamforth, C. W., “The Microbiology of Malting and Brewing,” *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 77, no. 2, pp. 157–172, 2013.
- Briggs, D. E., Hough, J. S., Stevens, R., Young, T. W., *Malting and brewing science, Volume 1: Malt and sweet wort*, 2nd ed., London: Chapman & Hall, 1981
- Canonica, L., Agarbati, A., Comitini, F., Ciani, M., “*Torulaspora delbrueckii* in the brewing process: A new approach to enhance bioflavour and to reduce ethanol content”, *Food Microbiology* 56, 2016, 45-51.

EU Food Improvement Agents

Flavor and Extract Manufacturers Association (FEMA)

Flagfeldt, Dongmei Bai, Verena Siewers, Le Huang, and Jens Nielsen. 2009. "Characterization of Chromosomal Integration Sites for Heterologous Gene Expression in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Yeast (Chichester, England)* 26(10): 545–51.

Hernandez-Orte, P. et al. 2008. "The Development of Varietal Aroma from Non-Floral Grapes by Yeasts of Different Genera." *Food Chemistry* 107(3): 1064-77

KENNEDY, A. I., 1997. Fully Defined Medium for Yeast Fermentation. *Food technol. Biotechnol.* 35 (4) , pp. 261-265.

King, Andrew, and J Richard Dickinson. 2000. "Biotransformation of Monoterpene Alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspota Delbrueckii* and *Kluyveromyces Lactis*." *Yeast* 16(6): 499–506.

Koca, I., Karadeniz, B. and Tekguler, B. (2016). Aroma components of green körmən (*Allium scorodoprasum* L. spp. *rotundum*) and garlic (*Allium sativum*) plants. *Acta Hort.* 1143, 291-296 DOI: 10.17660/ActaHortic.2016.1143.40
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2016.1143.40>

Larranaga, M.D., Lewis, R.J. Sr., Lewis, R.A., *Hawley's Condensed Chemical Dictionary* 16th Edition. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ 2016., p. 11

Lewis, M. J. & Bamforth, C. W., 2006. *ESSAYS IN BREWING SCIENCE*. 1 επιμ. Davis, California, USA: Springer

M. T. Holtzapple, "Introduction 0001," pp. 207–214, 1983

Machado, J. C., Faria, M. A., Ferreira, I. M. P. L. V. O., Páscoa, R. N. M. J. , Lopes, J. A., "Varietal discrimination of hop pellets by near and mid infrared spectroscopy," *Talanta*, vol. 180, no. December 2017, pp. 69–75, 2018.

Michel, M., Meier-Dornberg, T., Jacob, F., Methner, F.J., Wagner, R. S., Hutzler, M., 2016. Review: Pure non-*Saccharomyces* starter cultures for beer fermentation with a focus on secondary metabolites and practical applications. *Journal of the Institute of Brewing* 122, 159, pp. 569-587.

N. A. Bokulich and C. W. Bamforth, "The Microbiology of Malting and Brewing," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 77, no. 2, pp. 157–172, 2013.

Nissen, P., Nielsen, D., Arneborg, N., "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", *Yeast* 20, 2003, 331-341

Ocon, E., Gutierrez, A. R., Garijo, P., Tenorio, C., Lopez, I., Lopez, R., Santamaria, P., "Quantitative and qualitative analysis of non-Saccharomyces yeasts in spontaneous alcoholic fermentations", *Eur Food Res Technol* 230, 2010, 885-891

Ola Lasekan, Rihana Hosnas, Siew Ng, Mee Lin, Shakirah Azeez, Li Teoh, Somayeh Gholivand & Rafiat Shittu (2016) Identification of aromatic compounds and their sensory characteristics in cassava flakes and "garri" (*Manihot esculenta Crantz*), *CyTA - Journal of Food*, 14:1, 154-161, DOI: 10.1080/19476337.2015.1074944

Padilla, B., V. Gil, J., Manzanares, P., "Past and future of non-saccharomyces yeasts: From spoilage microorganisms to biotechnological tools for improving wine aroma complexity", *Frontiers in Microbiology* 411(7), 2016

Querol et al., *New Trends in the Uses of Yeasts in Oenology*, 1st ed. Elsevier Inc., 2018.

S. Martins, S. I. F. S. Martins, and W. M. F. Jongen, "A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 11, pp. 364–373, 2001.

Shuler, L. M., Kargi, F., *Μηχανική βιοδιεργασιών – Βασικές έννοιες*, Πανεπιστημιακές εκδόσεις ΕΜΠ, Αθήνα, 2005

TGSC Information System

Tynan, T., J., *Synthesis and characterization of hop derived compounds and their application in quantitative high performance liquid chromatography*, M. Sc. Dissertation, National Institute for Higher Education, Dublin, 1989

Varela, C. (2016). The impact of non-Saccharomyces yeasts in the production of alcoholic beverages. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(23), 9861–9874.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΓΛΥΚΟΖΗ			
Χρόνος (h)	Πληθυσμός (10 ⁶ κύτταρα/mL)	C σακχάρου (mg/mL)	C αιθανόλης (mg/mL)
0	5,95	127,434	0,000
24	24,75	110,013	
48	30,1		
72	40,65	96,255	
96	62		
120	67,55	63,924	12,359
146	84,5		
168	89,2	46,110	18,112
192	97,5		
216	102,4	25,594	
240	108,1		
264	115,6	8,339	
295	120,6		
312	128,2	1,275	32,244
336	142,4		
360	145,6	0,555	
384	146,4		
408	146,8	0,498	
432	147,4		
456	146,2	0,244	38,559
480	146,55		

Πίνακας Π-1: Συγκεντρωτικός πίνακας της *T. delbrueckii* ως προς τον πληθυσμό, την κατανάλωση σακχάρων και της παραγωγής αιθανόλης στα υποστρώματα γλυκόζης

ΦΡΟΥΚΤΟΖΗ			
Χρόνος (h)	Πληθυσμός (10 ⁶ κύτταρα/mL)	C σακχάρου (mg/mL)	C αιθανόλης (mg/mL)
0	6,55	79,358	0
24	13,4	79,669	
48	15,8		
72	16,55	62,694	
96	46,8		
120	47,6	60,219	8,961
146	55,3		
168	57,9	56,030	
192	62,45		

216	70,7	42,482	
240	75,2		
264	81,7	34,937	
295	83,15		
312	90,7	22,039	31,014
336	98,4		
360	107,2	13,850	
384	112,4		
408	116,4	9,983	
432	122,2		
456	120,8	6,288	42,541
480	121,6		

Πίνακας Π-2: : Συγκεντρωτικός πίνακας της *T. delbrueckii* ως προς τον πληθυσμό, την κατανάλωση σακχάρων και της παραγωγής αιθανόλης στα υποστρώματα φρουκτόζης

ΜΑΛΤΟΖΗ			
Χρόνος (h)	Πληθυσμός (10 ⁶ κύτταρα/mL)	C σακχάρου (mg/mL)	C αιθανόλης (mg/mL)
0	8,65	80,24516334	0,000
24	9	69,28195369	
48	14,85		
72	15,5	63,36679353	
96	15,9		
120	16,05		
146	16,15		
168	17,7		
192	18,65	63,58896289	
216	19,4		
240	22,1		
264	22,25		
295	23,6	49,89026324	1,556
312	23,8		
336	23,8		
384	24,7	31,54963527	6,899
629	27,9		
653	33,1		
677	46	1,026006977	24,545
693	47,7		
795	56,6	0	
843	59,5		
867	60,7		

939	60,3	0	31,509
963	60,3		

Πίνακας Π-3: Συγκεντρωτικός πίνακας της *T. delbrueckii* ως προς τον πληθυσμό, την κατανάλωση σακχάρων και της παραγωγής αιθανόλης στα υποστρώματα μαλτόζης

ΓΛΥΚΟΖΗ			
Χρόνος (h)	Πληθυσμός (10 ⁶ κύτταρα/mL)	C σακχάρου (mg/mL)	C αιθανόλης (mg/mL)
0	7,6	129,639	0,000
18	8,65		
42	10,15	121,008	
66	12,2		
98	14,6	108,925	
114	28,75		
134	30,5	91,471	6,732
160	34,35		
184	37,65	73,019	
208	41,65		
232	45,35	58,922	16,919
256	51,35		
280	52,55	41,564	
304	56,51		
330	59	19,003	
352	63,1		
376	62,1		
400	63,7	3,154	34,456
424	64,1		
448	63,5	0,637	38,579

Πίνακας Π-4: Συγκεντρωτικός πίνακας της *M. pulcherrima* ως προς τον πληθυσμό, την κατανάλωση σακχάρων και της παραγωγής αιθανόλης στα υποστρώματα γλυκόζης

ΦΡΟΥΚΤΟΖΗ			
Χρόνος (h)	Πληθυσμός (10 ⁶ κύτταρα/mL)	C σακχάρου (mg/mL)	C αιθανόλης (mg/mL)
0	8,1	107,389	0,000
18	9,15		
42	9,95	98,824	
66	12,35		
98	14,6	87,456	1,733
114	24,4		
134	30	71,571	

160	34,4		
184	36,5	61,792	4,196
208	41,9		
232	45,45	52,215	
256	48,5		
280	51,6	35,396	
304	54,4		
330	57,5	24,768	29,495
352	58,4		
376	60,5		
400	60,1	14,530	
424	60,2		
448	60,2	7,036	38,030

Πίνακας Π-5: Συγκεντρωτικός πίνακας της *M. pulcherrima* ως προς τον πληθυσμό, την κατανάλωση σακχάρων και της παραγωγής αιθανόλης στα υποστρώματα φρουκτόζης

ΜΑΛΤΟΖΗ			
Χρόνος (h)	Πληθυσμός (10 ⁶ κύτταρα/mL)	C σακχάρου (mg/mL)	C αιθανόλης (mg/mL)
0	8,25	80,245	0,000
18	9,15	62,287	
42	11,3		
66	11,1	54,357	1,617
98	11,1		
114	12,55		
134	14,9	45,471	13,024
160	27,15		
184	29,75		
208	33,15		
232	36,7		
256	38,55		
280	41,7	17,125	
304	46		
350	50,9	2,266	40,352
590	55	0,000	41,768

Πίνακας Π-6: Συγκεντρωτικός πίνακας της *M. pulcherrima* ως προς τον πληθυσμό, την κατανάλωση σακχάρων και της παραγωγής αιθανόλης στα υποστρώματα μαλτόζης

ΓΛΥΚΟΖΗ			
Χρόνος (h)	Πληθυσμός (10 ⁶ κύτταρα/mL)	C σακχάρου (mg/mL)	C αιθανόλης (mg/mL)

0	6,8	123,118	0,000
18	7,25		
42	10,2	110,172	7,356
66	14,85		
90	19,7	96,266	
114	21,6		
136	26,15	83,664	
160	30,1		
184	33,65	56,045	22,737
209	42,35		
231	41,3	34,132	
255	45,25		
279	44,8	17,589	
303	45,5		
327	45,05	3,672	35,429
356	45,65		
374	45,45	1,207	42,083

Πίνακας Π-7: Συγκεντρωτικός πίνακας του *S. cerevisiae* S-23 ως προς τον πληθυσμό, την κατανάλωση σακχάρων και της παραγωγής αιθανόλης στα υποστρώματα γλυκόζης

ΦΡΟΥΚΤΟΖΗ			
Χρόνος (h)	Πληθυσμός (10 ⁶ κύτταρα/mL)	C σακχάρου (mg/mL)	C αιθανόλης (mg/mL)
0	6,45	92,595	0,000
18	6,95		
42	8,9	82,862	
66	17,55		
90	18,9	70,637	
114	19,95		
136	26,75	64,089	12,439
160	30,9		
184	35,9	46,570	18,237
209	39,05		
231	43,35	32,048	
255	46,05		
279	46,9	24,923	32,232
303	46,65		
327	46,45	23,053	
356	46,4		
374	46,4	14,962	41,927

Πίνακας Π-8: Συγκεντρωτικός πίνακας του *S. cerevisiae* S-23 ως προς τον πληθυσμό, την κατανάλωση σακχάρων και της παραγωγής αιθανόλης στα υποστρώματα φρουκτόζης

ΜΑΛΤΟΖΗ			
Χρόνος (h)	Πληθυσμός (10 ⁶ κύτταρα/mL)	C σακχάρου (mg/mL)	C αιθανόλης (mg/mL)
0	8,45	80,245	0,000
18	8,7	76,799	2,294
42	11		
66	10,2		
90	10,25	62,531	
114	12,45		
136	13,8		
160	15,95		
184	17,15	49,355	17,821
209	23,45		
231	24,95		
255	27,1		
279	31	21,868	36,454
303	32,8		
351	35,45	0	
585	37	0	42,065

Πίνακας Π-9: Συγκεντρωτικός πίνακας του *S. cerevisiae* S-23 ως προς τον πληθυσμό, την κατανάλωση σακχάρων και της παραγωγής αιθανόλης στα υποστρώματα μαλτόζης

ΓΛΥΚΟΖΗ			
Χρόνος (h)	Πληθυσμός (10 ⁶ κύτταρα/mL)	C σακχάρου (mg/mL)	C αιθανόλης (mg/mL)
0	6,4	123,118	0,000
18	8,6		
42	11,8	111,131	
66	16,05		
90	19,35	104,034	11,634
114	20,95		
136	28,2	82,369	
160	31,85		
184	36,05	58,155	
209	40,1		
231	46,25	29,001	
255	44,1		
279	44,35	13,753	26,323
303	44,5		
327	44,55	0,939	

356	44,55		
374	44,45	0,944	40,551

Πίνακας Π-10: Συγκεντρωτικός πίνακας του *S. cerevisiae* US-05 ως προς τον πληθυσμό, την κατανάλωση σακχάρων και της παραγωγής αιθανόλης στα υποστρώματα γλυκόζης

ΦΡΟΥΚΤΟΖΗ			
Χρόνος (h)	Πληθυσμός (10 ⁶ κύτταρα/mL)	C σακχάρου (mg/mL)	C αιθανόλης (mg/mL)
0	6,7	95,554	0,000
18	9,4		
42	12,85	91,894	
66	16,2		
90	19,7	78,034	
114	21,15		
136	27,25	63,077	10,783
160	30,65		
184	32,85	49,529	
209	37,35		
231	42,9	34,073	
255	42,35		
279	43,05	23,249	
303	42,8		
327	42,8	16,769	32,200
356	43,2		
374	43,05	7,121	41,812

Πίνακας Π-11: Συγκεντρωτικός πίνακας του *S. cerevisiae* US-05 ως προς τον πληθυσμό, την κατανάλωση σακχάρων και της παραγωγής αιθανόλης στα υποστρώματα φρουκτόζης

ΜΑΛΤΟΖΗ			
Χρόνος (h)	Πληθυσμός (10 ⁶ κύτταρα/mL)	C σακχάρου (mg/mL)	C αιθανόλης (mg/mL)
0	7,35	80,2451633	0,0000
42	9,6		
114	12,5		
136	13,3	64,6190929	12,9206
160	14,6		
184	17	59,0234697	
292	22,55		
340	25,55	25,3292103	

369	27,8		
441	28,55		
459	28,5	2,16603235	32,3483

Πίνακας Π-12: Συγκεντρωτικός πίνακας του *S. cerevisiae* US-05 ως προς τον πληθυσμό, την κατανάλωση σακχάρων και της παραγωγής αιθανόλης στα υποστρώματα μαλτόζης

Χρόνος (h)	ΓΛΥΚΟΖΗ			
	Πληθυσμός (10 ⁶ κύτταρα/mL)	STD Πληθυσμού	Βιωσιμότητα (% κύτταρα)	STD βιωσιμότητας
0	7,6	0,3	79,14	2,3
18	8,65	0,25	89,275	2,025
42	10,15	0,95	89,78	0,46
66	12,2	0,6	87,98	2,65
98	14,6	0,7	90,035	1,605
114	28,75	0,35	94,735	0,565
134	30,5	0,5	95,91	0,97
160	34,35	0,25	96,53	0,42
184	37,65	0,95	97,145	1,075
208	41,65	0,85	97,305	1,305
232	45,35	0,35	97,11	0,08
256	51,35	0,85	95,545	0,465
280	52,55	0,35	93,88	0,67
304	56,51	0,49	94,18	0,12
330	59	0,6	95,935	0,195
352	63,1	0,1	94,46	0,15
376	62,1	0,7	96,125	0,185
400	63,7	0,3	95,795	0,595
424	64,1	0,1	94,975	1,135
448	63,5	0,3	94,79	0,97

Πίνακας Π-13: Πληθυσμοί και %βιωσιμότητα κυττάρων της *M. pulcherrima* στα υποστρώματα γλυκόζης

	ΦΡΟΥΚΤΟΖΗ			

Χρόνος (h)	Πληθυσμός (10 ⁶ κύτταρα/mL)	STD Πληθυσμού	Βιωσιμότητα (% κύτταρα)	STD βιωσιμότητας
0	8,1	0,2	82,46	3,41
18	9,15	0,25	86,78	3,6
42	9,95	0,85	83,74	2,66
66	12,35	0,05	91,82	0,03
98	14,6	0,3	91,035	0,605
114	24,4	1	93,82	0,96
134	30	0,7	95,38	1,77
160	34,4	0,2	96,915	1,075
184	36,5	0,1	96,775	1,075
208	41,9	0,5	96,995	0,415
232	45,45	0,35	96,09	0,07
256	48,5	0,4	94,91	0,04
280	51,6	1,2	93,635	0,985
304	54,4	0	95,785	1,015
330	57,5	0,5	93,5	0,25
352	58,4	0,8	94,665	0,695
376	60,5	2,3	95,885	0,155
400	60,1	2,1	95,37	1,21
424	60,2	1,8	94,985	0,995
448	60,2	2	95,39	0,6

Πίνακας Π-14: Πληθυσμοί και %βιωσιμότητα κυττάρων της *M. pulcherrima* στα υποστρώματα φρουκτόζης

ΜΑΛΤΟΖΗ				
Χρόνος (h)	Πληθυσμός (10 ⁶ κύτταρα/mL)	STD Πληθυσμού	Βιωσιμότητα (% κύτταρα)	STD βιωσιμότητας
0	8,25	0,15	82,5	1,5
18	9,15	0,35	91,93	1,21
42	11,3	0,1	94,55	1,25
66	11,1	0,1	96,11	1,28
98	11,1	0,1	91,45	2,57
114	12,55	0,15	95,075	0,415
134	14,9	0,1	94,605	0,265
160	27,15	0,25	95,595	0,545
184	29,75	0,55	98,185	0,195

208	33,15	0,65	98,075	0,185
232	36,7	0,6	98,395	0,025
256	38,55	0,25	98,72	0,01
280	41,7	0,5	98,695	0,135
304	46	0,4	97,87	0,43
350	50,9	0	98,83	0
590	55	0,9	98,74	0,02

Πίνακας Π-15: Πληθυσμοί και %βιωσιμότητα κυττάρων της *M. pulcherrima* στα υποστρώματα μαλτόζης

MIX				
Χρόνος (h)	Πληθυσμός (10 ⁶ κύτταρα/mL)	STD Πληθυσμού	Βιωσιμότητα (% κύτταρα)	STD βιωσιμότητας
0	8,4	0	81,16	0,39
18	9,15	0,15	92,915	0,835
42	12,25	0,05	97,015	0,185
66	12,1	0,2	94,72	2,48
98	12,45	0,05	91,89	1,34
114	20,3	1,1	92,555	1,105
134	33,35	0,15	95,695	0,295
160	35,85	0,25	97,815	0,015
184	37,55	0,55	98,04	0,66
208	40,75	2,25	98,315	0,145
232	41,7	1,1	98,465	0,075
256	45,4	0,6	98,37	0,29
280	46,95	0,55	98,635	0,295
304	49,3	0,5	98,405	0,015
350	54,7	0,7	98,91	0,01
590	60,4	0,18	98,87	0,18

Πίνακας Π-16: Πληθυσμοί και %βιωσιμότητα κυττάρων της *M. pulcherrima* στα υποστρώματα μίγματος σακχάρων

	ΓΛΥΚΟΖΗ			
Χρόνος (h)	Πληθυσμός (10 ⁶ κύτταρα/mL)	STD Πληθυσμού	Βιωσιμότητα (% κύτταρα)	STD βιωσιμότητας
0	6,8	0,2	96,55	1,96
18	7,25	0,35	90,045	0,435
42	10,2	1,9	85,43	2,43
66	14,85	0,35	89,99	1,03
90	19,7	1,5	92,425	0,965
114	21,6	1,5	94,24	1,61
136	26,15	0,95	92,615	1,065
160	30,1	0,4	91,9	0,52
184	33,65	0,05	93,22	0,91
209	42,35	1,65	93,685	1,635
231	41,3	0,2	93,44	0,03
255	45,25	0,25	94,375	0,365
279	44,8	0,3	95,835	0,485
303	45,5	0,3	95,09	0,53
327	45,05	0,15	92,81	1,36
356	45,65	0,05	94,3	0,74
374	45,45	0,15	93,85	1,11

Πίνακας Π-17: Πληθυσμοί και %βιωσιμότητα κυττάρων του *S. cerevisiae* S-23 στα υποστρώματα γλυκόζης

Saccharomyces cerevisiae, στέλεχος Saflager S-23, εταιρείας Fermentis	ΦΡΟΥΚΤΟΖΗ			
Χρόνος (h)	Πληθυσμός (10 ⁶ κύτταρα/mL)	STD Πληθυσμού	Βιωσιμότητα (% κύτταρα)	STD βιωσιμότητας
0	6,45	0,05	96,33	2,13
18	6,95	0,35	88,655	1,755
42	8,9	0,8	87,92	2,08
66	17,55	2,45	91,235	1,975
90	18,9	1,5	93,975	0,425
114	19,95	1,15	93,84	0,77
136	26,75	0,05	94,705	0,995
160	30,9	1,2	94,1	0,79
184	35,9	1,8	92,35	0,1

209	39,05	0,75	95,39	1,08
231	43,35	0,25	92,73	0,16
255	46,05	0,85	93,895	0,465
279	46,9	0,1	95,035	0,085
303	46,65	0,25	94,625	0,125
327	46,45	0,15	92,53	0,48
356	46,4	0	93,465	0,815
374	46,4	0,3	93,665	1,345

Πίνακας Π-18: Πληθυσμοί και %βιωσιμότητα κυττάρων του *S. cerevisiae* S-23 στα υποστρώματα φρουκτόζης

ΜΑΛΤΟΖΗ				
Χρόνος (h)	Πληθυσμός (10 ⁶ κύτταρα/mL)	STD Πληθυσμού	Βιωσιμότητα (% κύτταρα)	STD βιωσιμότητας
0	8,45	0,25	84,485	1,655
18	8,7	0	96,12	0,55
42	11	0	91,655	1,565
66	10,2	0,1	95,355	1,845
90	10,25	0,05	94,06	1,27
114	12,45	0,05	94,32	0,34
136	13,8	0,1	94,85	0,95
160	15,95	0,15	95,235	0,525
184	17,15	0,25	96,885	0,315
209	23,45	1,15	96,385	0,845
231	24,95	0,85	96,695	0,295
255	27,1	0,5	97,83	0,69
279	31	0,4	97,95	0,13
303	32,8	0,8	98,945	0,175
351	35,45	1,05	97,9	0,45
585	37	0,9	97,11	0,07

Πίνακας Π-19: Πληθυσμοί και %βιωσιμότητα κυττάρων του *S. cerevisiae* S-23 στα υποστρώματα μαλτόζης

MIX	

Χρόνος (h)	Πληθυσμός (10 ⁶ κύτταρα/mL)	STD Πληθυσμού	Βιωσιμότητα (% κύτταρα)	STD βιωσιμότητας
0	6,85	0,05	89,54	0,07
18	8,7	0	94,075	1,525
42	10,7	0	93,04	0
66	10,95	0,05	93,205	0,765
90	11,35	0,05	93,82	1,14
114	13,75	0,05	91,995	1,205
136	15,05	0,15	96,785	0,035
160	16,85	0,55	96,56	0,11
184	17,4	0,6	97,485	0,185
209	26,1	0,6	97,375	0,785
231	28,6	0	97,615	0,335
255	29,3	0,3	97,345	0,295
279	34,7	0,5	97,88	0,17
303	36,1	0	98,37	0
351	38,1	0,1	97,56	0,12
585	40,3	0,1	97,46	0,35

Πίνακας Π-20: Πληθυσμοί και %βιωσιμότητα κυττάρων του *S. cerevisiae* S-23 στα υποστρώματα μίγματος σακχάρων

ΓΛΥΚΟΖΗ				
Χρόνος (h)	Πληθυσμός (10 ⁶ κύτταρα/mL)	STD Πληθυσμού	Βιωσιμότητα (% κύτταρα)	STD βιωσιμότητας
0	6,4	0,5	94,98	1,74
18	8,6	1,3	97,465	0,135
42	11,8	0,5	93,72	1,24
66	16,05	0,45	96,115	0,185
90	19,35	0,35	94,17	0,36
114	20,95	0,15	92,9	0,46
136	28,2	0,5	94,625	0,405
160	31,85	0,45	94,67	0,77
184	36,05	1,25	93,255	1,835
209	40,1	1	93,83	0,84
231	46,25	0,15	93,105	0,695
255	44,1	1,3	92,845	0,195
279	44,35	0,95	93,69	0,86
303	44,5	0,8	94,3	0,7
327	44,55	1,05	93,69	0,06

356	44,55	1,45	93,7	0,95
374	44,45	1,05	92,16	0,51

Πίνακας Π-21: Πληθυσμοί και %βιωσιμότητα κυττάρων του *S. cerevisiae* US-05 στα υποστρώματα γλυκόζης

Χρόνος (h)	ΦΡΟΥΚΤΟΖΗ			
	Πληθυσμός (10 ⁶ κύτταρα/mL)	STD Πληθυσμού	Βιωσιμότητα (% κύτταρα)	STD βιωσιμότητας
0	6,7	0,2	94,415	1,175
18	9,4	0,5	96,65	0,95
42	12,85	0,55	94,095	1,615
66	16,2	0,6	96,15	0,15
90	19,7	0,7	94,465	0,065
114	21,15	0,35	92,955	0,515
136	27,25	0,45	94,46	0,24
160	30,65	0,75	95,485	0,045
184	32,85	1,95	94,94	0,15
209	37,35	1,75	95,185	0,515
231	42,9	3,5	93,915	0,115
255	42,35	3,05	92,78	0,13
279	43,05	2,25	93,205	0,375
303	42,8	2,5	94,21	0,61
327	42,8	2,8	93,545	0,085
356	43,2	2,8	94,855	0,205
374	43,05	2,45	94,215	1,545

Πίνακας Π-22: Πληθυσμοί και %βιωσιμότητα κυττάρων του *S. cerevisiae* US-05 στα υποστρώματα φρουκτόζης

Χρόνος (h)	ΜΑΛΤΟΖΗ			
	Πληθυσμός (10 ⁶ κύτταρα/mL)	STD Πληθυσμού	Βιωσιμότητα (% κύτταρα)	STD βιωσιμότητας
0	7,35	0,05	96,85	0,45
42	9,6	0,4	97,23	0,22
114	12,5	0,8	96,59	0,16
136	13,3	1	97,73	0,11

160	14,6	0,6	98,295	0,295
184	17	1,8	97,47	0,59
292	22,55	0,95	97,27	0,47
340	25,55	1,15	96,855	0,355
369	27,8	0,8	97,1	0,02
441	28,55	1,55	97,455	0,015
459	28,5	1,8	97,44	0,35

Πίνακας Π-23: Πληθυσμοί και %βιωσιμότητα κυττάρων του *S. cerevisiae* US-05 στα υποστρώματα μαλτόζης

MIX				
Χρόνος (h)	Πληθυσμός (10 ⁶ κύτταρα/mL)	STD Πληθυσμού	Βιωσιμότητα (% κύτταρα)	STD βιωσιμότητας
0	7,5	0,1	98,1	0
42	9,9	0,1	97,28	0,04
114	13,2	0,1	97,02	0,81
136	14,2	0,1	97,265	0,685
160	15,05	0,15	97,735	0,295
184	18,15	0,65	97,86	0,45
292	23,6	0,1	97,52	0,01
340	26,6	0,1	97,085	0,015
369	29	0,4	97,32	0,29
441	30	0,1	97,4	0,01
459	30,2	0,1	97,42	0,01

Πίνακας Π-24: Πληθυσμοί και %βιωσιμότητα κυττάρων του *S. cerevisiae* US-05 στα υποστρώματα μίγματος σακχάρων

ΓΛΥΚΟΖΗ				
Χρόνος (h)	Πληθυσμός (10 ⁶ κύτταρα/mL)	STD Πληθυσμού	Βιωσιμότητα (% κύτταρα)	STD βιωσιμότητας
0	5,95	0,35	91,65	1,65
24	24,75	2,05	96,92	2,215
48	30,1	4,7	98,47	0,395

72	40,65	1,65	97,96	0,035
96	62	2,6	99,05	0,64
120	67,55	2,75	99,55	0,315
146	84,5	4,3	99,36	0,025
168	89,2	8	97,97	0,965
192	97,5	6,3	97,61	1,315
216	102,4	2,4	97,55	0,87
240	108,1	1,5	98,01	1,275
264	115,6	5	96,38	1,195
295	120,6	8,2	95,39	1,51
312	128,2	6,6	97,69	0,565
336	142,4	4,4	95,95	0,38
360	145,6	3,6	95,81	0,66
384	146,4	0,8	96,85	0,74
408	146,8	0,4	96,07	0,01
432	147,4	2,2	96,34	0,8
456	146,2	0,2	94,94	0,615
480	146,55	1,35	94,85	0,435

Πίνακας Π-25: Πληθυσμοί και %βιωσιμότητα κυττάρων της *T. delbrueckii* στα υποστρώματα γλυκόζης

Χρόνος (h)	ΦΡΟΥΚΤΟΖΗ			
	Πληθυσμός (10 ⁶ κύτταρα/mL)	STD Πληθυσμού	Βιωσιμότητα (% κύτταρα)	STD βιωσιμότητας
0	6,55	1,35	83,08	1,825
24	13,4	2,6	89,64	3,93
48	15,8	3,6	91,61	2,56
72	16,55	1,25	97,43	1,795
96	46,8	5,6	97,91	0,965
120	47,6	5,6	97,65	0,325
146	55,3	0	97,53	0,17
168	57,9	0,7	97,31	2,01
192	62,45	3,55	95,81	0,43
216	70,7	4,7	93,77	0,015
240	75,2	1,4	96,54	0,065
264	81,7	0,1	96,35	0,345
295	83,15	0,35	95,86	0

312	90,7	2,3	94,83	1,265
336	98,4	2,4	93,78	1,465
360	107,2	5,6	93,93	0,855
384	112,4	3,2	93,06	0,43
408	116,4	0,8	94,18	0,265
432	122,2	5,8	94,18	0,61
456	120,8	5,6	94,07	0,26
480	121,6	6	92,85	0,385

Πίνακας Π-26: Πληθυσμοί και %βιωσιμότητα κυττάρων της *T. delbrueckii* στα υποστρώματα φρουκτόζης

ΜΑΛΤΟΖΗ				
Χρόνος (h)	Πληθυσμός (10 ⁶ κύτταρα/mL)	STD Πληθυσμού	Βιωσιμότητα (% κύτταρα)	STD βιωσιμότητας
0	8,65	0,05	84,865	2,005
24	9	0,3	94,255	0,315
48	14,85	1,05	97,065	0,115
72	15,5	0,6	95,355	1,055
96	15,9	0,3	93,52	0,66
120	16,05	0,35	94,99	0,74
146	16,15	0,35	96,445	0,045
168	17,7	0,5	95,41	0,38
192	18,65	0,65	96,875	0,105
216	19,4	0,7	97,22	0,83
240	22,1	0,2	98,01	0,2
264	22,25	0,15	98,235	0,425
295	23,6	0,3	97,72	0,23
312	23,8	0,1	98,96	0,2
336	23,8	0,1	98,96	0,2
384	24,7	0,2	98,41	0,38
629	27,9	0,3	98,41	0,19
653	33,1	0,1	98,075	0,135
677	46	0,8	98,19	0,28
693	47,7	0,3	99,065	0,095
795	56,6	0,2	99,3	0,17
843	59,5	0,3	99,42	0,08
867	60,7	0,1	99,18	0
939	60,3	0,1	99,095	0,085
963	60,3	0,1	99,34	0,16

Πίνακας Π-27: Πληθυσμοί και %βιωσιμότητα κυττάρων της *T. delbrueckii* στα υποστρώματα μαλτόζης

	MIX			
Χρόνος (h)	Πληθυσμός (10 ⁶ κύτταρα/mL)	STD Πληθυσμού	Βιωσιμότητα (% κύτταρα)	STD βιωσιμότητας
0	8,25	0,75	94,47	1,685
24	14,8	0,8	96,68	1,435
48	45,2	1,5	97,52	0,185
72	51,9	8,4	98,08	0,19
96	51,75	10,35	97,91	0,04
120	60,35	7,05	96,67	0,455
146	64,6	3,3	97,49	0,495
168	64,05	2,65	97,49	0,18
192	63,9	3	96,45	0,09
216	64,65	2,85	96,99	0,02
240	64,65	2,95	97,55	0,83
264	66,1	2,4	99,10	0,03
336	66,05	2,65	97,44	0,255
360	70,95	0,75	97,46	0,095
384	72,8	2,4	96,38	1,035
408	72,5	2,7	97,59	0,175
432	75,2	2	96,53	0,21
456	77,6	4,6	97,09	1,29
480	77,6	4,6	97,63	0,235
503	80,8	3,2	97,25	0,48
527	81,7	3,7	97,02	0,25
551	79,6	3,2	96,24	0,26
581	80,7	2,7	96,77	0,24
605	80,4	3,4	96,29	0,035
629	82,3	3,1	95,49	0,39
653	80,9	0,5	95,65	0,545
677	81,9	1,5	94,69	0,345
693	82,65	1,15	95,28	0,82
723	81,5	0,3	95,66	0,125
747	82,7	1,5	95,39	0,14

Πίνακας Π-28: Πληθυσμοί και %βιωσιμότητα κυττάρων της *T. delbrueckii* στα υποστρώματα μίγματος σακχάρων

T.d. ΓΛΥΚΟΖΗ			
Χρόνος (h)	Αραίωση	C(mg/mL) δείγματος	STD
0	0,005	127,43	1,0549
24	0,01	110,01	7,935725
72	0,02	96,26	6,832875
120	0,02	63,92	0,058845
168	0,02	46,11	11,66493
216	0,05	25,59	6,376915
264	0,05	8,34	6,715094
312	0,10	1,27	0,6804985
360	0,50	0,56	0,0067565
408	1,00	0,50	0,058499
456	1,00	0,24	0

Πίνακας Π-29: Συγκέντρωση γλυκόζης της *T. delbrueckii* κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

M.p. ΓΛΥΚΟΖΗ			
Χρόνος (h)	Αραίωση	C(mg/mL) δείγματος	STD
0	0,005	129,64	0
42	0,005	121,01	6,3294
98	0,005	108,93	3,0688
134	0,005	91,47	13,2342
184	0,01	73,02	0,04795
232	0,01	58,92	11,84365
280	0,01	41,56	12,13135
330	0,01	19,00	14,553705
400	0,1	3,15	1,84128
448	0,1	0,64	0

Πίνακας Π-30: Συγκέντρωση γλυκόζης της *M. pulcherrima* κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

S-23 ΓΛΥΚΟΖΗ			
Χρόνος (h)	Αραίωση	C(mg/mL) δείγματος	STD
0	0,005	123,12	0
42	0,005	110,17	9,8777
90	0,005	96,27	7,2884
136	0,01	83,66	1,67825

184	0,01	56,04	3,40445
231	0,01	34,13	1,5344
279	0,01	17,59	0,04795
327	0,1	3,67	0,00959
374	0,1	1,21	0,05754

Πίνακας Π-31: Συγκέντρωση γλυκόζης του *S. cerevisiae* S-23 κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

US-05 ΓΛΥΚΟΖΗ			
Χρόνος (h)	Αραίωση	C(mg/mL) δείγματος	STD
0	0,005	123,12	0
42	0,005	111,13	11,4121
90	0,005	104,03	8,9187
136	0,01	82,37	1,7262
184	0,01	58,15	2,44545
231	0,01	29,00	1,29465
279	0,01	13,75	0,52745
327	0,1	0,94	0,04795
374	0,1	0,94	0,052745

Πίνακας Π-32: Συγκέντρωση γλυκόζης του *S. cerevisiae* US-05 κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

T.d. ΦΡΟΥΚΤΟΖΗ			
Χρόνος (h)	Αραίωση	C(mg/mL) δείγματος	STD
0	0,005	87,14	7,7865
24	0,005	79,67	7,47504
72	0,005	62,69	4,98336
120	0,01	60,22	2,164043
168	0,01	56,03	7,864365
216	0,01	42,48	5,76201
264	0,02	34,94	8,089871
312	0,02	22,04	5,664679
360	0,1	13,85	3,224927
408	0,1	9,98	4,808164
456	0,1	6,29	4,150205

Πίνακας Π-33: Συγκέντρωση φρουκτόζης της *T. delbrueckii* κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

Μ.ρ. ΦΡΟΥΚΤΟΖΗ			
Χρόνος (h)	Αραίωση	C(mg/mL) δείγματος	STD
0	0,005	107,39	0
42	0,005	98,82	1,86876
98	0,005	87,46	7,47504
134	0,005	71,57	4,6719
184	0,01	61,79	8,331555
232	0,01	52,22	2,80314
280	0,01	35,40	1,012245
330	0,01	24,77	1,674098
400	0,1	14,53	3,235291
448	0,1	7,04	2,016704

Πίνακας Π-34: Συγκέντρωση φρουκτόζης της *M. pulcherrima* κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

S-23 ΦΡΟΥΚΤΟΖΗ			
Χρόνος (h)	Αραίωση	C(mg/mL) δείγματος	STD
0	0,005	92,59	2,95887
42	0,005	82,86	7,397175
90	0,005	70,64	2,33595
136	0,01	64,09	0,661852
184	0,01	46,57	7,591838
231	0,01	32,05	1,635165
279	0,01	24,92	0,350393
327	0,1	23,05	0,700785
374	0,1	14,96	2,476107

Πίνακας Π-35: Συγκέντρωση φρουκτόζης του *S. cerevisiae* S-23 κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

US-05 ΦΡΟΥΚΤΟΖΗ			
Χρόνος (h)	Αραίωση	C(mg/mL) δείγματος	STD
0	0,005	95,55	0
42	0,005	91,89	0,700785
90	0,005	78,03	3,192465
136	0,01	63,08	2,374883

184	0,01	49,53	3,542858
231	0,01	34,07	4,6719
279	0,01	23,25	4,51617
327	0,1	16,77	1,2692
374	0,1	7,12	2,164647

Πίνακας Π-36: Συγκέντρωση φρουκτόζης του *S. cerevisiae* US-05 κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

T.d.		
Χρόνος (h)	C (mg/mL)	STD
0	80,245163	3,170948
24	69,281954	0,252141
72	63,366794	2,561846
192	63,588963	1,428798
288	49,890263	0,29464
384	31,549635	1,902632
672	1,026007	0,238186
720	0	0
840	0	0

Πίνακας Π-37: Συγκέντρωση μαλτόζης της *T. delbrueckii* κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

M.p.		
Χρόνος (h)	C (mg/mL)	STD
0	80,245163	3,170948
24	62,287345	0,680622
72	54,356803	1,620679
144	45,471297	1,359023
288	17,124643	1,035839
384	2,2659372	0,345544
624	0	0

Πίνακας Π-38: Συγκέντρωση μαλτόζης της *M. pulcherrima* κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

S-23		
Χρόνος (h)	C (mg/mL)	STD
0	80,245163	3,170948
24	76,799239	0,873454
72	62,531874	2,92071
192	49,3549	1,138915

288	21,868062	0,831589
384	0	0
624	0	0

Πίνακας Π-39: Συγκέντρωση μαλτόζης του *S. cerevisiae* S-23 κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

US-05		
Χρόνος (h)	C (mg/mL)	STD
0	80,245163	3,170948
120	66,030447	1,411354
192	56,600381	2,423089
312	24,777672	0,551538
456	2,1660324	1,171741

Πίνακας Π-40: Συγκέντρωση μαλτόζης του *S. cerevisiae* US-05 κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

Χρόνος (h)	pH	Plato	FAN (mg/L)
0	5,2	12,1	247,2362
16	5,18	12,2	173,262
40	4,8	11,3	
64	4,59	10,7	107,8075
88	4,47	10,4	
112	4,47	10,2	
136	4,45	10,2	98,39572
160	4,51	10,3	
184	4,52	10,3	91,76471
208	4,52	10,3	
232	4,53	10,2	
256	4,53	10,2	
280	4,54	10,3	92,40642
304	4,56	10,2	
328	4,56	10	93,26203
352	4,56	10,2	
376	4,56	10,1	
400	4,59	10,4	85,7754
424	4,53	10,2	
448	4,53	10,2	82,13904
472	4,55	10,2	
496	4,56	10,2	83,85027
520	4,53	10,2	

544	4,57	10,2	
568	4,41	8,3	73,79679
592	4,27	7,7	
616	4,23	7,1	86,99465
712	4,44	5,3	
736	4,31	5	81,00535
760	4,27	4,8	
784	4,32	4,8	
856	4,35	4,9	74,65241
880	4,31	4,8	
952	4,35	4,6	51,76471

Πίνακας Π-41: Συγκεντρωτικός πίνακας μετρήσεων pH, πυκνότητας σακχάρων και FAN στο γλεύκος που ζυμώθηκε από την *T. delbrueckii*

Χρόνος (h)	pH	Plato	FAN (mg/L)
0	5,2	12,1	247,24
16	5,01	11,9	230,86
40	5	12	184,76
64	4,92	12	
88	4,61	12	101,49
112	4,42	11,8	
136	4,38	11,9	99,63
160	4,35	11,8	
184	4,29	11,3	87,96
208	4,26	10,7	
232	4,07	9,9	100,74
256	4,04	9,7	
280	4	7,7	87,17
304	4,07	7,4	
328	3,98	6,4	89,78
352	4	5,9	
376	3,98	5,6	94,72
400	4,02	5,6	
424	3,95	5,3	86,91
448	3,95	5,1	
472	4,01	5,1	90,71
496	3,98	4,9	
520	4	4,7	82,90
544	3,98	4,7	70,45

Πίνακας Π-42: Συγκεντρωτικός πίνακας μετρήσεων pH, πυκνότητας σακχάρων και FAN στο γλεύκος που ζυμώθηκε από την *M. pulcherrima*

Χρόνος (h)	pH	Plato	FAN (mg/mL)
0	5,2	12,1	247,24
16	4,98	12	183,61
40	4,75	11,4	
64	4,6	10,3	64,92
88	4,47	10,2	
112	4,46	10,2	
136	4,49	10,1	62,30
160	4,52	10,1	
184	4,51	10	
208	4,53	10	
232	4,53	10	
256	4,54	10	
280	4,54	10	68,20
304	4,56	9,8	
328	4,53	9,8	
352	4,55	9,7	56,00
376	4,44	9,7	
400	4,47	9,4	
424	4,48	9,1	
448	4,45	9,1	
472	4,47	8,6	
496	4,41	7,8	44,75
520	4,37	7,3	
544	4,34	6,5	
568	4,35	5,8	
592	4,31	5,2	55,57
616	4,34	5,1	43,77
640	4,28	5,1	38,69
712	4,4	4,9	40,33
736	4,34	4,3	
760	4,31	4,3	18,20
784	4,32	4,3	22,13

Πίνακας Π-43: Συγκεντρωτικός πίνακας μετρήσεων pH, πυκνότητας σακχάρων και FAN στο γλεύκος που ζυμώθηκε από τη μικτή καλλιέργεια

Χρόνος (h)	pH	Plato	FAN (mg/mL)
0	5,15	11,5	247,236
24	5,07	10,6	171,651
48	4,46	9,3	171,963

120	4,4	9	176,791
144	4,29	8,8	
168	4,15	8,5	
192	4,07	8,1	
216	4,07	4,8	
288	4,07	4,7	103,427
360	4,4	3,8	
384	4,5	3,6	106,542
456	4,5	3,4	115,966

Πίνακας Π-44: Συγκεντρωτικός πίνακας μετρήσεων pH, πυκνότητας σακχάρων και FAN στο γλεύκος που ζυμώθηκε από τον *S. cerevisiae* S-23

Χρόνος (h)	pH	Plato	FAN (mg/mL)
0	4,85	11,5	247,236
24	4,59	10,2	174,455
48	4,55	9,8	174,922
120	4,5	9,7	178,349
144	4,35	9,5	
168	4,29	9,1	
192	4,3	3,9	
216	4,22	3,8	
288	4,2	3	103,660
360	4,28	2,9	
384	4,24	2,8	104,206
456	4,24	2,8	126,636

Πίνακας Π-44: Συγκεντρωτικός πίνακας μετρήσεων pH, πυκνότητας σακχάρων και FAN στο γλεύκος που ζυμώθηκε από τον *S. cerevisiae* US-05