

ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ NON-SACCHAROMYCES ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΩΝ ΣΕ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΑΠΛΩΝ ΣΑΚΧΑΡΩΝ ΤΟΥ ΖΥΘΟΓΛΕΥΚΟΥΣ**Φ. Δρόσου^{1,2}, Ν. Μπέκος¹, Π. Ταταρίδης², Β. Ντουρτόγλου², Β. Ωραιοπούλου^{1*}**¹Σχολή Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ, Αθήνα, Ελλάδα²Τμήμα Επιστημών Οίνου, Αμπέλου και Ποτών ΠΑΔΑ, Αθήνα, Ελλάδα

(*faihdr@hotmail.com)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

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

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η δυνατότητα μεταβολισμού των βασικών σακχάρων του ζυθογλεύκου, η κατανάλωση σακχάρων και η παραγωγή αιθανόλης και μεταβολιτών, δύο στελεχών non-*Saccharomyces* ζυμομυκήτων, συγκεκριμένα των *Torulaspora delbrueckii* και *Metschnikowia pulcherrima*, και δύο στελεχών του *S. cerevisiae*, S-23 (lager) και US-05 (ale) για συγκριτικούς λόγους. 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 των ζυμώσεων εξήχθη το συμπέρασμα ότι και οι 2 non-*Saccharomyces* ζύμες είναι ικανές να μεταβολίσουν τα σάκχαρα και να αναπτυχθούν σε αυτό το περιβάλλον. Ως προς τους ρυθμούς ανάπτυξης, η *T. delbrueckii* είχε σε όλες τις περιπτώσεις τον χαμηλότερο ρυθμό ανάπτυξης, και ειδικά στα υποστρώματα μαλτόζης χρειαζόταν σχεδόν διπλάσιο χρόνο για να ολοκληρώσει τη ζύμωση, σε σχέση με τα άλλα στελέχη ζυμών. 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*. Τα 2 στελέχη *S. cerevisiae* δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους, ως προς την ανάπτυξη, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι οι ale ζύμες είναι σχεδόν εξίσου ανθεκτικές με τις lager σε ζυμώσεις στους 13 °C.

Επί πλέον τα αποτελέσματα έδειξαν ότι και οι δύο ζύμες κατανάλωσαν τα σάκχαρα, αφήνοντας ορισμένα υπολειπόμενα σάκχαρα στην περίπτωση των υποστρωμάτων φρουκτόζης, ενώ η παραγόμενη αιθανόλη ανήλθε σε συγκέντρωση περίπου 40 g/L, εκτός από το υπόστρωμα μαλτόζης με καλλιέργεια την *Torulaspora delbrueckii*, στο οποίο η συγκέντρωση ήταν 31 g/L. Όσον αφορά στα παραγόμενα αρωματικά συστατικά παρατηρήθηκε μεγαλύτερη ποικιλία αρωμάτων από την *T. delbrueckii* και τον *S. cerevisiae* S-23.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι Σουμέριοι ήταν ο πρώτος λαός που παρασκεύασε ποτό συγγενικό της μπίρας. Οι Αιγύπτιοι τη χρησιμοποιούσαν, πέρα από ποτό, επιπλέον και ως συστατικό φαρμάκων και σαν προσφορά στις θρησκευτικές τελετές τους. Κατά τη βιομηχανική επανάσταση, η ανακάλυψη της ύπαρξης των ζυμών ως υπεύθυνων της ζύμωσης οδήγησε στην παραγωγή μπίρας σε βιομηχανικό επίπεδο. Η

μπύρα είναι οινοπνευματώδες 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 μπύρας. 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. Ο *Saccharomyces cerevisiae* θεωρείται κυρίαρχος μικροοργανισμός στην αλκοολική ζύμωση, λόγω της μεγαλύτερης αντοχής του σε διάφορες συνθήκες.

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. Για τους παραπάνω λόγους η επιλογή στελεχών ζυμών, έχει επεκταθεί και σε ζύμες εκτός του *S. cerevisiae*, γνωστές ως non-*Saccharomyces*. Οι non-*Saccharomyces* ζύμες συνεισφέρουν κυρίως σε δευτερογενείς μεταβολίτες, επηρεάζοντας έτσι την ποιότητα του τελικού προϊόντος, καθώς και σε μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε γλυκερίνη στο τελικό προϊόν, άρα σε μεγαλύτερη αίσθηση στο στόμα ^[1, 2]. Για τη χρήση τέτοιων εναλλακτικών ζυμών προταρχική απαίτηση είναι η ικανότητά τους να ζυμώσουν τα σάκχαρα του ζυθογλεύκου ^[3].

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της ικανότητας ανάπτυξης και ζύμωσης (κατανάλωση σακχάρων, παραγωγή αιθανόλης) επιλεγμένων non-*Saccharomyces* ζυμών σε απλά σάκχαρα που βρίσκονται στο ζυθογλεύκος, καθώς και ο προσδιορισμός του αρωματικού προφίλ των τελικών προϊόντων. 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. Για σύγκριση των αποτελεσμάτων, χρησιμοποιήθηκαν δύο γνωστά στελέχη *Saccharomyces cerevisiae* στις ίδιες συνθήκες

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κατόπιν δοκιμής κρουστικότητα των ζυμών, δηλαδή εκτίμησης της δυνατότητας επιβίωσης και μεταβολισμού απλών σακχάρων του ζυθογλεύκου σε θερμοκρασία 13 °C, έγινε επιλογή των κατωτέρω ζυμών:

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

Παρασκευάστηκαν υποστρώματα των σακχάρων του ζυθογλεύκου, συγκεκριμένα γλυκόζης, φρουκτόζης, μαλτόζης, και μίγμα σακχάρων στην αναλογία που βρίσκονται στο ζυθογλεύκος (γλυκόζη 9 % - φρουκτόζη 5 % - μαλτόζη 86 %), με θρεπτικά συστατικά όπως φαίνονται στον Πίνακα 1. Το μίγμα σακχάρων χρησιμοποιήθηκε ως προσομοίωση της ζύμωσης του ζυθογλεύκου. Τα υποστρώματα εμβολιάστηκαν με τις ζύμες σε αρχικό πληθυσμό $6 \cdot 10^6$ κύτταρα/ mL και τοποθετήθηκαν σε ψυγείο θερμοστατημένο στους 13 °C. Σε τακτά χρονικά διαστήματα λαμβάνονταν δείγματα και πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις απομένοντος σακχάρου, πληθυσμού ζυμών και παραγόμενης αλκοόλης, ώστε να προσδιορισθούν τα κινητικά δεδομένα για κάθε μικροοργανισμό. Μετά το τέλος των ζυμώσεων γίνονται μετρήσεις στην κατανάλωση ελεύθερου αμινοξικού αζώτου, αιθανόλης, και εκχύλιση των αρωματικών ουσιών. Τα πειράματα έγιναν εις διπλούν για κάθε ζύμη.

Για τη μέτρηση συγκέντρωσης σακχάρων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS) ^[4] για τα υποστρώματα γλυκόζης και φρουκτόζης και η μέθοδος υγρής χρωματογραφίας (HPLC) ^[5] για το υπόστρωμα της μαλτόζης. Η βιωσιμότητα των κυττάρων μετρήθηκε με αρίθμηση στο μικροσκόπιο. Το ελεύθερο άζωτο αμινοξέων (FAN) μετρήθηκε με τη φασματοφωτομετρική μέθοδο της νινυδρίνης (FAN) ^[6] και η αιθανόλη με τη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας (GC) ^[7]. Για τον προσδιορισμό των αρωματικών ουσιών έγινε εκχύλιση με στήλη Vigreux και ανάλυση με χρήση αέριου χρωματογράφου και φασματοφωτόμετρου μάζας (GC-MS) ^[5].

Οι κινητικές εξισώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων είναι η αναλυτική σχέση Monod και η λογιστική εξίσωση:

$$\ln(X/X_0) = kt - (1 - e^{-kt})\ln[(X_\infty - X)/X_\infty]$$

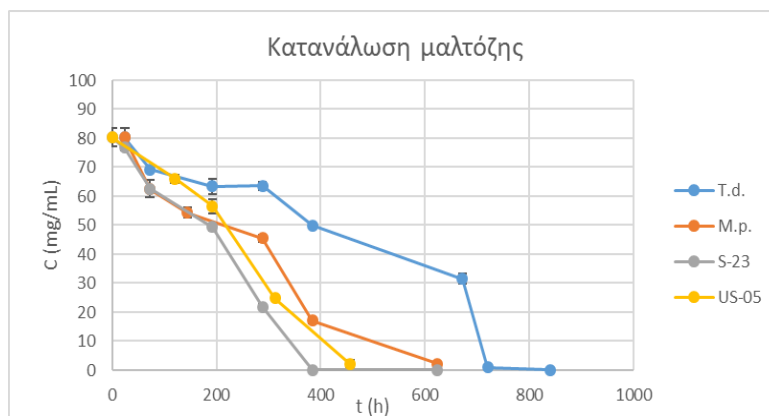
όπου X είναι η συγκέντρωση των κυττάρων, X_0 η αρχική συγκέντρωση των κυττάρων, X_∞ η συγκέντρωση των κυττάρων σε άπειρο χρόνο (πρακτικά στο τέλος της ζύμωσης), t ο χρόνος και k ο συντελεστής δυναμικού μεταφοράς.

Πίνακας 1. Σύσταση υποστρώματος σακχάρων για ζύμωση.

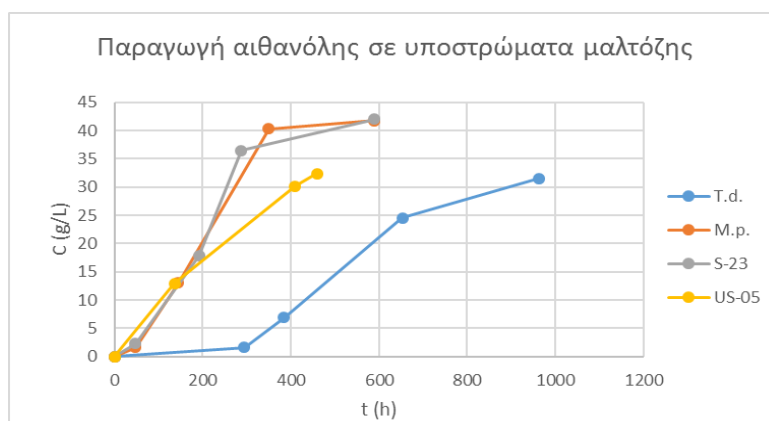
ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (g)
Σάκχαρο/ Μίγμα σακχάρων	100 (120 για τη γλυκόζη)
K ₂ HPO ₄	1
KH ₂ PO ₄	1
(NH ₄) ₂ SO ₄	2
Mg ₂ SO ₄	0,2
Zn ₂ SO ₄	0,2
Εκχύλισμα ζύμης	2
pH	4,5
Νερό	1L

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

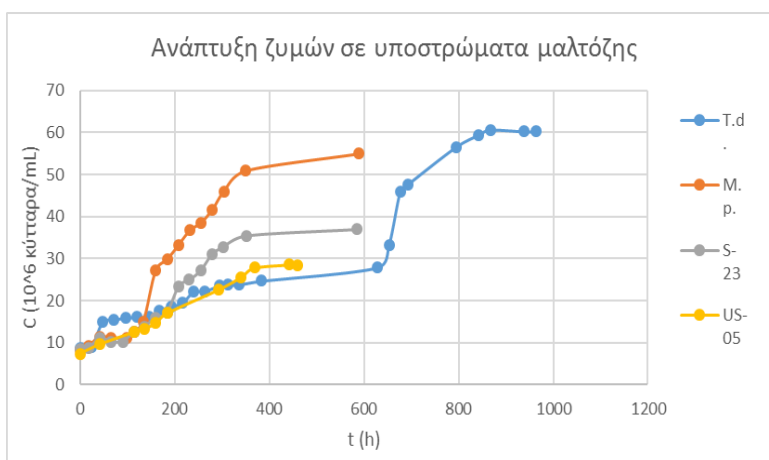
Η δοκιμή κρουοανθεκτικότητας έδειξε ότι όλα τα στελέχη ζυμών είναι ικανά να επιβιώσουν και να αναπτυχθούν στη θερμοκρασία των 13 °C. Ως προς την κατανάλωση των σακχάρων, όλες οι ζύμες αναπτύχθηκαν ταχύτερα σε περιβάλλον γλυκόζης και φρουκτόζης, ακολουθούμενες από το μίγμα και τη μαλτόζη. Στα Σχήματα 1,2 και 3 παρατίθενται η κατανάλωση της μαλτόζης, η παραγωγή της αιθανόλης και η ανάπτυξη των ζυμών στα υποστρώματα μαλτόζης. Στην κατανάλωση της μαλτόζης, όπως φαίνεται στο Σχήμα 1 παρατηρείται μια αρχική φάση καθυστέρησης στην *M. pulcherrima* και κυρίως στην *T. delbrueckii*, ενώ η κατανάλωση από τις δύο συμβατικές ζύμες έγινε με σταθερό ρυθμό. Στο Σχήμα 2 παρατηρείται ένα παρόμοιος ρυθμός παραγωγής αιθανόλης, εκτός από την *T. delbrueckii*, η οποία παρουσιάζει μια μεγάλη φάση προσαρμογής, όπως και στην κατανάλωση μαλτόζης. Στο Σχήμα 3, παρατηρείται ότι η *T. delbrueckii* εμφάνισε μια βραδεία και μια ταχεία φάση ανάπτυξης, σε αντίθεση με τις υπόλοιπα στελέχη ζυμών.



Σχήμα 1. Καμπύλες κατανάλωσης μαλτόζης από τις 4 διαφορετικές ζύμες



Σχήμα 2. Καμπύλες παραγωγής αιθανόλης στα 4 υποστρώματα μαλτόζης



Σχήμα 3. Καμπύλες ανάπτυξης των ζυμών στα υποστρώματα μαλτόζης

Στα πειραματικά αποτελέσματα της ανάπτυξης των ζυμών προσαρμόστηκε καλύτερα η λογιστική εξίσωση από την αναλυτική σχέση Monod και οι σταθερές του δυναμικού μεταφοράς που προσδιορίστηκαν για όλα τα σάκχαρα παρουσιάζονται στον Πίνακα 2. Στον ίδιο Πίνακα παρουσιάζονται και οι συντελεστές απόδοσης σε αιθανόλη ως προς την ποσότητα του καταναλισκόμενου σακχάρου. Οι δυο non-*Saccharomyces* ζύμες παρουσίασαν τις μεγαλύτερες τιμές k στα υποστρώματα γλυκόζης, ενώ τις μικρότερες στα υποστρώματα μαλτόζης. Η *T. delbrueckii* εμφάνισε περίπου τρεις φορές μικρότερο k στο υπόστρωμα μαλτόζης από ότι στα άλλα δυο σάκχαρα, καθώς ο τελικός πληθυσμός στο υπόστρωμα μαλτόζης ήταν περίπου ο μισός από ότι στα άλλα δυο υποστρώματα και ο χρόνος ζύμωσης μεγαλύτερος. Στην *M. pulcherrima* οι τιμές των σταθερών έχουν μικρότερη διαφορά μεταξύ τους.

Παρόμοια εικόνα με την *T. delbrueckii* 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 το μεγαλύτερο k στα υποστρώματα μαλτόζης και το μικρότερο στα υποστρώματα γλυκόζης, αλλά με μικρές διαφορές στις τιμές.

Πίνακας 2. Σταθερές δυναμικού μεταφοράς k (h^{-1}) και συντελεστές απόδοσης Y (g αιθανόλης/g σακχάρου) για όλες τις ζύμες στα υποστρώματα απλών σακχάρων

ΣΑΚΧΑΡΑ ΖΥΜΕΣ	ΓΛΥΚΟΖΗ		ΦΡΟΥΚΤΟΖΗ		ΜΑΛΤΟΖΗ	
	k	Y	k	Y	k	Y
<i>M. pulcherrima</i>	0,00529	0,299	0,00502	0,379	0,00469	0,521
<i>S. cerevisiae</i> S-23	0,00548	0,345	0,00581	0,54	0,00659	0,524
<i>S. cerevisiae</i> US-05	0,00565	0,332	0,00531	0,473	0,00291	0,414
<i>T. delbrueckii</i>	0,01041	0,303	0,00878	0,526	0,00286	0,393

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 σημαντική ποσότητα αιθανόλης. Συγκεκριμένα, η *M. pulcherrima* εμφάνισε συντελεστή απόδοσης ίδιο με του S-23 στη μαλτόζη, ενώ χαμηλότερη ήταν η απόδοσή της στα άλλα σάκχαρα. Η *T. delbrueckii* εμφάνισε μεγάλο συντελεστή απόδοσης στη φρουκτόζη, ενώ οι συντελεστές απόδοσης σε μαλτόζη και γλυκόζη ήταν χαμηλοί και πλησίαζαν τον US-05.

Όσον αφορά την κατανάλωση αζώτου αμινοξέων η *T. delbrueckii* παρουσίασε μικρότερη κατά μέσο όρο, το οποίο συμβαδίζει με τη βραδεία ανάπτυξή της. Γενικά παρατηρείται ότι η μεγαλύτερη κατανάλωση αζώτου έγινε στα υποστρώματα μαλτόζης και μίγματος σακχάρων, επειδή οι ζύμες δε μπορούν να μεταβολίσουν απευθείας τη μαλτόζη, αλλά πρέπει να τη διασπάσουν πρώτα.

Οι non-*Saccharomyces* ζύμες είναι ικανές να παράξουν μια πληθώρα αρωματικών ενώσεων, με την *T. delbrueckii* να κυριαρχεί ως προς τα αρώματα φρούτων (οξικός ισοπεντυλεστέρας, οξικός φαινυλαιθυλεστέρας, καπριλικός αιθυλεστέρας, ισοαμυλικής αλκοόλης και τρυπτοφόλης) και τριαντάφυλλου (φαινυλαιθυλική αλκοόλη). Η *M. pulcherrima* εμφάνισε μικρότερη ποικιλία αρωμάτων από την *T. delbrueckii* και είχε τις μικρότερες συγκεντρώσεις σε επίπεδο λοιπών οργανικών ενώσεων (ισοπροπυλοδισουλφίδιο - αρώματα κρεμμυδιού και τροπικών φρούτων, ακετοφαινόνη - γλυκά και πικάντικα αρώματα) πολλές από τις οποίες γενικά προσδίδουν ανεπιθύμητα αρώματα, εκτός αυτών που προέρχονται από το λυκίσκο.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

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

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.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] B. Padilla, J. V. Gil, P. Manzanares. *Frontiers in Microbiology* 7 (2016) 411.
- [2] D. Bai Flagfeldt, V. Siewers, L. Huang, J. Nielsen. *Yeast* 26(2009) 545–51.
- [3] F. Drosou, K. Anastasakou, P. Tataridis, V. Oreopoulou, V. Dourtoglou. 6th International Young Scientists Symposium on Malting, Brewing and Distilling. 12-14 September 2018, Trier, Germany.
- [4] Βιοτεχνολογία και Περιβάλλον: Εργαστηριακές ασκήσεις, Ε.Μ.Π. (2017)
- [5] Ν. Μπέκος. Διπλωματική εργασία, Ε.Μ.Π. (2019).
- [6] ASBC Methods of Analysis, online. Wort Method 12. Free Amino Nitrogen (International Method) a.Ninhydrin method Approved 1975, rev. 2010. American Society of Brewing Chemists, St. Paul, MN, U.S.A. doi: <http://dx.doi.org/10.1094/ASBCMOA-Wort-12>
- [7] D. Mamma, P. Christakopoulos, D. Koullas, D. Kekos, B. J. Macris, E. Koukios. *Biomass and Bioenergy* 8(1995) 99-103.