



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Τμήμα Επιστημών Οίνου, Αμπέλου και

Ποτών

**«Μελέτη της εξέλιξης των αρωματικών ενώσεων σε ζύθους  
με υψηλή περιεκτικότητα σακχάρων»**



Πτυχιακή εργασία: Κάρκουλα Σοφία – Μαρίνα

Επιβλέπουσα καθηγήτρια : Δρόσου Φωτεινή

Αθήνα, 2021

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ**

ΔΡΟΣΟΥ ΦΩΤΕΙΝΗ: Ακαδημαϊκή Υπότροφος

ΝΤΟΥΡΤΟΓΛΟΥ ΓΕΩΡΓΙΟΣ: Ακαδημαϊκός υπότροφος

ΝΤΟΥΡΤΟΓΛΟΥ ΕΥΘΑΛΙΑ: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Οργανική Χημεία & Ενζυμολογία. Διευθύντρια Τομέα Χημείας και Τεχνολογίας Οίνου, Ζύθου και Ποτών

## Δήλωση Συγγραφέα Πτυχιακής Εργασίας

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Κάρκουλα Σοφία – Μαρίνα του Παναγιώτη, με αριθμό μητρώου 141143 φοιτήτρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστημών Οίνου, Αμπέλου και Ποτών, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

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

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

Η δηλούσα

Κάρκουλα Σοφία – Μαρίνα



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Απόρροια της αυξημένης ζήτησης του κοινού για ζύθους με ιδιαίτερο αρωματικό προφίλ αποτελεί η αυξημένη παραγωγή καινοτόμων προϊόντων στον τομέα της ζυθοποιίας. Έχει παρατηρηθεί, ως συνέπεια, το αυξανόμενο ενδιαφέρον των ζυθοποιών σε ζύμες μη συμβατικές, όπως είναι οι non-*Saccharomyces*, με στόχο την δημιουργία νέων αρωμάτων και γεύσεων.

Στην παρούσα πτυχιακή μελετήθηκαν οι αρωματικές ενώσεις που σχηματίστηκαν σε ζύθους με υψηλή περιεκτικότητα σακχάρων που παρήχθησαν με διαφορετικές non-*Saccharomyces* ζύμες καθώς και η εξέλιξη αυτών με την πάροδο του χρόνου. Πραγματοποιήθηκε ανάλυση δειγμάτων από τους τρεις διαφορετικούς αυτούς ζύθους, δύο εκ των οποίων ζυμώθηκαν από non-*Saccharomyces* και συγκεκριμένα με στελέχη *Torulaspora delbrueckii* και *Metschnikowia Pulcherrima* και συγκρίθηκαν με τον *Saccharomyces cerevisiae*. Το ζυθογλεύκος ήταν το ίδιο και για τους τρεις ζύθους (American Pale Ale με αρχική πυκνότητα 15 °P και θερμοκρασία ζύμωσης τους 13 °C) ώστε να μελετηθεί η ικανότητα ζύμωσης του από τις παραπάνω ζύμες. Τα δείγματα που πάρθηκαν ήταν σε τέσσερις διαφορετικούς χρόνους ωρίμανσης, στο τέλος της ζύμωσης, μετά από 6 μήνες παραμονής τους στη φιάλη, μετά από 1 χρόνο και τέλος μετά από 2 χρόνια ωρίμανσης.

Ειδικότερα η μελέτη επικεντρώνεται σε ζύθους με υψηλή περιεκτικότητα σακχάρων στους οποίους η επιλογή του κατάλληλου στελέχους ζύμης είναι πολύ σημαντική καθώς μπορούν να δημιουργηθούν προβλήματα τόσο κατά τη διάρκεια της ζύμωσης (ωσμωτικό στρες), όσο και κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης στη φιάλη.

Οι αρωματικές ενώσεις παραγόμενες από τον *Saccharomyces cerevisiae* παρουσίασαν αύξηση στη συγκέντρωσή τους κατά τον 6<sup>ο</sup> μήνα ωρίμανσης, λόγω της αυτόλυσης των ζυμών. Λόγω των εστεροποιήσεων που έλαβαν χώρα, παρατηρήθηκε αύξηση στις συγκεντρώσεις των εστέρων κατά τον 1<sup>ο</sup> χρόνο μετά την εμφιάλωση. Ωστόσο, μετά το πέρας των 2 ετών, εξαιτίας της υδρόλυσης των εστέρων, που έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ανώτερων αλκοολών και οξέων, παρατηρήθηκε μείωση στις συγκεντρώσεις τους.

Από τις *Non-Saccharomyces* ζύμες που μελετήθηκαν, η *Metschnikowia pulcherrima* εμφάνισε τις μεγαλύτερες τιμές στους 6 μήνες ωρίμανσης, με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις να ανιχνεύονται στη φαινυλαιθυλική αλκοόλη, την ισοαμυλική και της ενεργή αμυλική αλκοόλη. Τα οξέα ανιχνεύθηκαν σε χαμηλές συγκεντρώσεις με εξαίρεση το εξανοϊκό, το οκτανοϊκό και το δεκανοϊκό οξύ, ενώ οι εστέρες των προαναφερθέντων οξέων παρουσίασαν υψηλές τιμές με ορισμένες από αυτές να ξεπερνούν και το κατώφλι αντίληψης. Και για τις τρεις ζύμες όλες οι ενώσεις ανιχνεύθηκαν είτε σε ίχνη είτε καθόλου μετά το πέρας των 2 ετών.

Συμπερασματικά, η *Metschnikowia pulcherrima* παρουσίασε έντονο αρωματικό προφίλ στους ζύθους που παρήγαγε ακόμα και μετά τον 1 χρόνο, καθιστώντας την ικανή για χρήση στη βιομηχανία του ζύθου. Ωστόσο, οι ζύθοι με υψηλή περιεκτικότητα σακχάρων απαιτούν περισσότερο χρόνο για να ωριμάσουν και να ολοκληρωθεί το αρωματικό τους προφίλ, ιδιαίτερα όταν η ζύμωση τους πραγματοποιείται σε χαμηλότερη θερμοκρασία από το σύνηθες.

## ABSTRACT

As a result of the increased public demand for beers with particularly aromatic profile is the increased production of innovative products in the brewing sector. It has been observed, the growing interest of brewers in non conventional pastries, such as non-*Saccharomyces*, with the aim of creating new aromas and flavors.

This thesis consists of the study of the aromatic compounds that were produced by a variety of non-*Saccharomyces* yeasts in high gravity beers, and their evolution in the course of time. The production of American Pale ale beer, was conducted in three different batches, two of which were fermented with Non-*Saccharomyces* yeasts. The selected strains were *Torulaspora delbrueckii* and *Metschnikowia Pulcherrima*, and compared to the beer fermented by *Saccharomyces cerevisiae*. The original gravity of the beer was 15 °P and the fermentation temperature was 13 °C. Samples were collected in four different time periods: at the end of the fermentation, six months after bottling, one year, and, finally, after two years of storage.

In particular, the study focuses on high gravity beers on which the selection of the appropriate yeast strain is very important as problems can arise both during fermentation (osmotic stress) and during its maturation in the bottle.

In general, the aromatic compounds of *Saccharomyces cerevisiae* showed an increase in their concentration during the 6<sup>th</sup> month of aging, a feature which is found due to autolysis of the yeasts. Due to esterification, an increase in the ester's concentration was observed during the first year of maturation. However, after 2 years, due to the hydrolysis of esters, which results in the production of higher alcohols and acids, a decrease in their concentrations was observed.

From the studied non-*Saccharomyces* yeasts, *Metschnikowia pulcherrima* showed the highest values after six months of maturation, with the maximum concentrations exhibited by phenylethyl alcohol, isoamyl and active alcohol. The acids were detected at low concentrations with the exception of hexanoic, octanoic and decanoic acid, while the esters of the aforementioned acids showed high values as some of them exceeding the perception threshold. All the volatile compounds by all yeast strains were either detected in traces or not at all after 2 years.

In conclusion, *Metschnikowia pulcherrima* showed a strong aromatic profile in the produced beers after 1 year of maturation, necessitating this yeast strain in the brewing industry. Last but not least, it should be noted that beers with high sugar concentration require more time to mature and complete their aromatic profile, especially when fermented in lower temperature than usual.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	3
ABSTRACT .....	5
<b>ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ .....</b>	<b>8</b>
<b>ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ .....</b>	<b>8</b>
<b>ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ .....</b>	<b>9</b>
ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	11
ΜΕΡΟΣ Α΄: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	13
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 <sup>ο</sup> : Προέλευση αρωματικών από τα συστατικά του ζύθου .....	13
1.1 Λυκίσκος .....	13
1.3 Ζύμες .....	18
1.3.1 Ζύμες <i>Saccharomyces</i> .....	19
1.3.2 Ζύμες <i>Non-Saccharomyces</i> .....	21
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 <sup>ο</sup> : Είδη <i>Non-Saccharomyces</i> .....	22
2.1 <i>Dekkera/Brettanomyces</i> .....	22
2.2 <i>Metschnikowia pulcherrima</i> .....	24
2.3 <i>Torulaspota delbrueckii</i> .....	26
2.4 <i>Wickerhamomyces anomalus</i> .....	27
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 <sup>ο</sup> : Θετικά και αρνητικά κατά Gram βακτήρια .....	28
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 <sup>ο</sup> : Ζύμωση και δευτερογενείς μεταβολίτες .....	29
4.1. Ανώτερες αλκοόλες .....	31
4.2. Εστέρες .....	32
4.3. Φαινόλες .....	33
4.4. Καρβονυλικές ενώσεις .....	34
4.4.1. Ακεταλδεΰδη .....	34
4.4.2. Γειτονικές δικετόνες – διακετύλιο – 2,3 πεντανοδιόνη .....	35
4.5. Οργανικά οξέα .....	36
4.6. Θειούχες ενώσεις .....	37
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 <sup>ο</sup> : Εξέλιξη του ζύθου κατά την αποθήκευσή του .....	39
5.1. Αλλαγές στη γεύση και στο άρωμα .....	41
5.2. Αλλαγές στις ανώτερες αλκοόλες .....	42
5.3. Αλλαγές στις καρβονυλικές ενώσεις .....	43
5.4. Αλλαγές στους εστέρες .....	44
5.5. Αλλαγές στις θειούχες ενώσεις .....	45
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 <sup>ο</sup> : Ζύθοι με υψηλή πυκνότητα .....	46



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 <sup>ο</sup> : Σκοπός και σχέδιο εργασιών .....	48
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 <sup>ο</sup> : ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ.....	49
2.1 Όργανα και αντιδραστήρια.....	49
2.2 Παρασκευή ζυθογλεύκους.....	51
2.3 Εμβολιασμός ζυθογλεύκους .....	52
2.4 Ανάλυση αρωματικών .....	53
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 <sup>ο</sup> : Παρουσίαση αποτελεσμάτων και σχολιασμός .....	55
3.1 Σύγκριση δειγμάτων ανά ζύμωση κατά την διάρκεια δύο ετών.....	69
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 <sup>ο</sup> : Συμπεράσματα .....	76
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	78
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ .....	81

## ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Η ανατομία και η σύσταση των λυκίσκων που βρίσκονται σε μορφή κώνου. Πληροφορίες για την συγκέντρωση των ενώσεων που περιέχονται (Lafontaine & Shellhammer, 2019) .....	15
Εικόνα 2: Η πορεία των φαινολικών ενώσεων κατά την διάρκεια του βρασμού και της ζυθοποίησης (R. Ambra et al., 2021). .....	18
Εικόνα 3: Τα κύτταρα του <i>Brettanomyces</i> όπως φαίνονται στο μικροσκόπιο σε κλίμακα 10 μ (Callego et al., 2017). .....	23
Εικόνα 4: Τα κύτταρα της <i>Metschnikowia pulcherrima</i> όπως φαίνονται από το μικροσκόπιο σε κλίμακα 10 μm (Morata et al., 2019). .....	25
Εικόνα 5: Τα κύτταρα της <i>Torulaspora delbrueckii</i> όπως φαίνονται στο μικροσκόπιο σε κλίμακα 10 μm (Callego et al., 2017).....	26
Εικόνα 6: Κύριοι μεταβολικοί οδοί με τους οποίους οι ζύμες ζυθοποίησης συνθέτουν ανώτερες αλκοόλες, εστέρες, ενώσεις του θείου, ακεταλδεύδες, γειτονικές δικετόνες και αιθανόλη (Graham G. Stewart, 2017). .....	30
Εικόνα 7: Αλλαγές στο προφίλ του ζύθου κατά την αποθήκευσή του (Vanderhaegen et al., 2006).....	45

## ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Ο ρόλος των μη συμβατικών ζυμών στην παραγωγή καινοτόμων ζύθων (Carrese et al., 2018). .....	27
Πίνακας 2: Επίδραση των συνθηκών κατά την ζυθοποίηση στους εστέρες και στις ανώτερες αλκοόλες .....	37
Πίνακας 3: Συγκριτικός πίνακας των αλκοολών που παράχθηκαν κατά την πρώτη εβδομάδα .....	81
Πίνακας 4: Συγκριτικός πίνακας των οξέων που παράχθηκαν στον κάθε ζύθο κατά την πρώτη εβδομάδα .....	81

Πίνακας 5: Συγκριτικός πίνακας των εστέρων που παράχθηκαν στον ζύθο κατά την πρώτη εβδομάδα .....	82
Πίνακας 6: Συγκριτικός πίνακας των αλκοολών που παράχθηκαν στον ζύθο μετά από 6 μήνες .....	82
Πίνακας 7: Συγκριτικός πίνακας των οξέων που παράχθηκαν στον ζύθο μετά από 6 μήνες..	83
Πίνακας 8: Συγκριτικός πίνακας των εστέρων που παράχθηκαν στον ζύθο μετά από 6 μήνες .....	83
Πίνακας 9: Συγκριτικός πίνακας των αλκοολών που παράχθηκαν στον ζύθο μετά από 1 χρόνο .....	84
Πίνακας 10: Συγκριτικός πίνακας των οξέων που παράχθηκαν στον ζύθο μετά από 1 χρόνο	84
Πίνακας 11: Συγκριτικός πίνακας των εστέρων που παράχθηκαν στον ζύθο μετά από 1 χρόνο .....	84
Πίνακας 12: Συγκριτικός πίνακας των αλκοολών που παράχθηκαν στον ζύθο μετά από 2 χρόνια .....	85
Πίνακας 13: Συγκριτικός πίνακας των οξέων που παράχθηκαν στον ζύθο μετά από 2 χρόνια .....	86
Πίνακας 14: Συγκριτικός πίνακας των εστέρων που παράχθηκαν στον ζύθο μετά από 2 χρόνια .....	86

## **ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ**

Διάγραμμα 1: Συγκριτικό διάγραμμα ανώτερων αλκοολών που παράχθηκαν στον κάθε ζύθο μετά από μία εβδομάδα ωρίμανσης.....	56
Διάγραμμα 2: Συγκριτικό διάγραμμα οξέων που παράχθηκαν στον κάθε ζύθο μετά από μία εβδομάδα ωρίμανσης.....	57
Διάγραμμα 3: Συγκριτικό διάγραμμα εστέρων που παράχθηκαν στον κάθε ζύθο μετά από μία εβδομάδα ωρίμανσης.....	58
Διάγραμμα 4: Συγκριτικό διάγραμμα ανώτερων αλκοολών που παράχθηκαν στον κάθε ζύθο μετά από 6 μήνες ωρίμανσης.....	59
Διάγραμμα 5: Συγκριτικό διάγραμμα οξέων που παράχθηκαν στον κάθε ζύθο μετά από 6 μήνες ωρίμανσης.....	60
Διάγραμμα 6: Συγκριτικό διάγραμμα εστέρων που παράχθηκαν στον κάθε ζύθο μετά από 6 μήνες ωρίμανσης.....	61
Διάγραμμα 7: Συγκριτικό διάγραμμα ανώτερων αλκοολών που παράχθηκαν στον κάθε ζύθο μετά από 1 χρόνο ωρίμανσης .....	62
Διάγραμμα 8: Συγκριτικό διάγραμμα οξέων που παράχθηκαν στον κάθε ζύθο μετά από 1 χρόνο ωρίμανσης.....	63
Διάγραμμα 9: Συγκριτικό διάγραμμα εστέρων που παράχθηκαν στον κάθε ζύθο μετά από 1 χρόνο ωρίμανσης.....	64
Διάγραμμα 10: Συγκριτικό διάγραμμα ανώτερων αλκοολών που παράχθηκαν στον κάθε ζύθο μετά από 2 χρόνια ωρίμανσης.....	65
Διάγραμμα 11 : Συγκριτικό διάγραμμα οξέων που παράχθηκαν στον κάθε ζύθο μετά από 2 χρόνια ωρίμανσης.....	66
Διάγραμμα 12: Συγκριτικό διάγραμμα εστέρων που παράχθηκαν στον κάθε ζύθο μετά από 2 χρόνια ωρίμανσης.....	67

Διάγραμμα 13: Συγκριτικό διάγραμμα των ανώτερων αλκοολών που παράχθηκαν στον ζύθο από την ζύμωση με <i>S. cerevisiae</i> στους 13°C κατά την ωρίμανσή του.....	69
Διάγραμμα 14: Συγκριτικό διάγραμμα των ανώτερων αλκοολών που παράχθηκαν στον ζύθο από την ζύμωση με <i>T. delbrueckii</i> στους 13°C κατά την ωρίμανσή του.....	69
Διάγραμμα 15: Συγκριτικό διάγραμμα των ανώτερων αλκοολών που παράχθηκαν στον ζύθο από την ζύμωση με <i>M. pulcherrima</i> στους 13°C κατά την ωρίμανσή του.....	70
Διάγραμμα 16: Συγκριτικό διάγραμμα των οξέων που παράχθηκαν στον ζύθο από την ζύμωση με <i>S. cerevisiae</i> στους 13°C κατά την ωρίμανσή του.....	71
Διάγραμμα 17: Συγκριτικό διάγραμμα των οξέων που παράχθηκαν στον ζύθο από την ζύμωση με <i>T. delbrueckii</i> στους 13°C κατά την ωρίμανσή του.....	71
Διάγραμμα 18: Συγκριτικό διάγραμμα των οξέων που παράχθηκαν στον ζύθο από την ζύμωση με <i>M. pulcherrima</i> στους 13°C κατά την ωρίμανσή του.....	72
Διάγραμμα 19: Συγκριτικό διάγραμμα των εστέρων που παράχθηκαν στον ζύθο από την ζύμωση με <i>S. cerevisiae</i> στους 13°C κατά την ωρίμανσή του.....	73
Διάγραμμα 20: Συγκριτικό διάγραμμα των εστέρων που παράχθηκαν στον ζύθο από την ζύμωση με <i>T. delbrueckii</i> στους 13°C κατά την ωρίμανσή του.....	73
Διάγραμμα 21: Συγκριτικό διάγραμμα των εστέρων που παράχθηκαν στον ζύθο από την ζύμωση με <i>M. pulcherrima</i> στους 13°C κατά την ωρίμανσή του.....	74

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η λέξη μπίρα προέρχεται από την ιταλική λέξη birra, η οποία έχει ρίζες από το λατινικό ρήμα bibere (πίνω), ενώ η ελληνική λέξη ζύθος σχετίζεται με το ρήμα ζέω (βράζω).

Οι πρώτες αναφορές για την παραγωγή ζύθου ξεκίνησαν περίπου το 3.000 π.Χ. στην περιοχή της Μεσοποταμίας και της Αρχαίας Αιγύπτου, με την ανακάλυψή της να γίνεται τυχαία αφού παρατηρήθηκε ότι η ζύμωση των σακχάρων άρτου που είχε παραμείνει σε δοχείο με νερό, από άγρια στελέχη της ατμόσφαιρας πρόσδιδε πολτό με ικανοποιητική γεύση. Σήμερα ο ζύθος είναι αναπόσπαστο κομμάτι για την ανθρωπότητα, καθώς η μεγάλη ζήτησή της δημιούργησε ανταγωνισμό και ανάγκη για βελτίωση της ποιότητάς της, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη τόσο μεγάλων πολυεθνικών όσο και μικρών ζυθοποιείων. Στη χώρα μας για παράδειγμα, ο αριθμός των ζυθοποιείων πλέον ξεπερνά τα πενήντα ενώ πριν λίγα μόλις χρόνια δεν ήταν ούτε δέκα.

Τα βασικά συστατικά για την παραγωγή του είναι η βύνη, ο λυκίσκος, το νερό και η ζύμη, η οποία φαίνεται να προσδίδει σημαντικές αλλαγές στον αρωματικό χαρακτήρα του ζύθου. Αυτό εξηγείται καθώς η μαγιά είναι ικανή μεταβολίζοντας τα σάκχαρα του γλεύκους εκτός από αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα παράγει και πολλά αρωματικά συστατικά, οπότε ανάλογα το στέλεχος της δημιουργούνται και διαφορετικά αρώματα.

Είναι δυνατό να διακρίνουμε τρεις βασικές κατηγορίες του ζύθου ανάλογα με το είδος ζύμης που επιλέχθηκε για την παραγωγή του και αυτές είναι οι αφροζύμωτες, οι βυθοζύμωτες και οι μύρες με αυθόρμητες ζυμώσεις. Ειδικότερα, οι αφροζύμωτες ζυμώνονται σε θερμοκρασία 15-23 °C από τον μύκητα *S. cerevisiae*, ενώ οι βυθοζύμωτες σε χαμηλότερες θερμοκρασίες 6-12 °C από τον μύκητα *Saccharomyces carlsbergensis*. Όσον αφορά τους ζύθους που προέρχονται από αυθόρμητη ζύμωση, υπεύθυνοι για την ζύμωσή της είναι οι μικροοργανισμοί του περιβάλλοντος.

Στην παρούσα εργασία, θα εξετάσουμε την εξέλιξη των αρωματικών ενώσεων στο χρόνο ανάμεσα σε ένα συμβατικό μύκητα *Saccharomyces cerevisiae* και σε δυο μη συμβατικούς που έχουν μελετηθεί στην παραγωγή οίνου, τους *Torulaspora delbrueckii* και *Metschnikowia Pulcherrima*. Ο σκοπός της μελέτης ήταν η ανάλυση

των ποιοτικών και αρωματικών χαρακτηριστικών των παραγόμενων ζύθων που ζυμώθηκαν σε υψηλή περιεκτικότητα σακχάρων από τον κάθε ζυμομύκητα από την στιγμή που εμφιαλώθηκαν μέχρι και τα 2 χρόνια παλαίωσής της στη φιάλη.

## ΜΕΡΟΣ Α': ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup>: Προέλευση αρωματικών από τα συστατικά του ζύθου

Ο ζύθος περιέχει 800 γνωστές ενώσεις οι περισσότερες των οποίων είναι πτητικές και ο αριθμός αυτός αυξάνεται με την βελτίωση των μεθόδων ανίχνευσής τους. Ένα ποσοστό των ενώσεων αυτών προέρχεται από τις πρώτες ύλες-βύνη-λυκίσκο, ενώ ο μεγαλύτερος αριθμός τους βιοσυντίθεται κατά τα στάδια της ζύμωσης και της ωρίμανσης. Ο οργανοληπτικός χαρακτήρας του ζύθου καθορίζεται από την συγκέντρωση των ενώσεων αυτών καθώς και από την αλληλεπίδραση τους με τις άλλες ενώσεις (συνεργητικότητα και ανταγωνιστικότητα) (Ταταρίδης & Κεχαγιά, 2010).

#### 1.1 Λυκίσκος

Ο λυκίσκος που χρησιμοποιείται στην ζυθοποίηση προδίδει στο ζύθο τόσο το ξεχωριστό του άρωμα, όσο και την πικρή του γεύση. Υπάρχουν πολλές ποικιλίες λυκίσκου, ωστόσο μπορούμε να τις κατατάξουμε σε δύο κατηγορίες :

- A) σε εκείνες που χρησιμοποιούνται για το άρωμα και
- B) σε εκείνες για την πικράδα (Lewis & Bamforth, 2006).

Στην ζυθοποίηση με τον όρο λυκίσκο δεν εννοούμε το φυτό αλλά τους κώνους του φυτού. Η λουπουλίνη, ουσία που εκκρίνεται από τα βράκτια φύλλα των κώνων, είναι κίτρινη, αρωματική και κολλώδης. Οι αδένες της περιέχουν μαλακές και σκληρές ρητίνες, τα έλαια του λυκίσκου και τις πολυφαινόλες. Η μαλακή ρητίνη περιλαμβάνει α-οξέα και β-οξέα, τα οποία συνεισφέρουν στην πικράδα της μύρας. Σε περίπτωση οξειδωσης, μετατρέπονται σε σκληρές ρητίνες, οι οποίες θεωρούνταν μηδενικής δυναμικής στην ζυθοποίηση, σύμφωνα όμως με τελευταίες μελέτες έχουν την δυνατότητα να συνεισφέρουν, δίνοντας μια ευχάριστη πικράδα στο ζύθο.

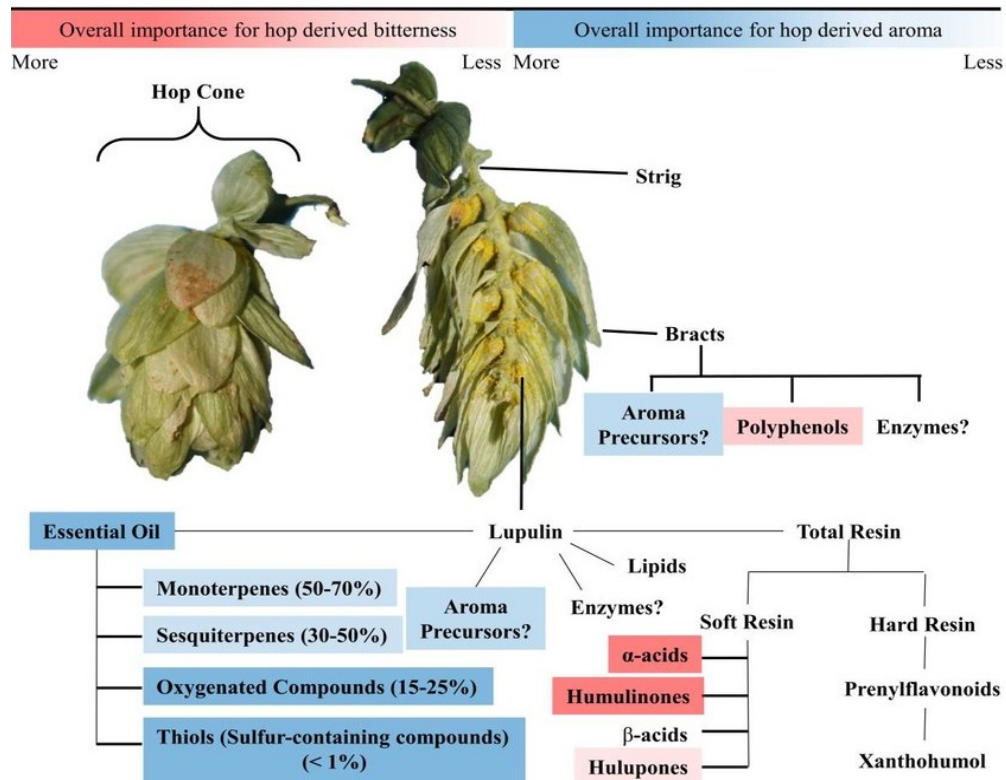
Τα αιθέρια έλαια ή αλλιώς έλαια του λυκίσκου συμβάλλουν σε μεγάλο βαθμό στην γεύση και στο άρωμα της μύρας και αποτελούν έως και 4% του κώνου. Περιέχουν 50-80% υδρογονάνθρακες, 20-50% οξειδωμένους υδρογονάνθρακες και λιγότερο από 1% θειούχες ενώσεις. Τα πρώτα είναι πολύ πτητικά, όχι τόσο διαλυτά και γίνονται αντιληπτά στην μύρα μόνο όταν προστίθενται στο τέλος του βρασμού ή κατά την διάρκεια της ζύμωσης, το λεγόμενο dry hopping, δηλαδή η προσθήκη του λυκίσκου σε μετέπειτα στάδια της παραγωγής με σκοπό την διατήρηση της γεύσης και του

αρώματος που προέρχονται από τα έλαια του λυκίσκου, χωρίς να αυξάνεται σημαντικά η πικράδα. Όσο αργότερα προστίθεται ο λυκίσκος στην παραγωγή, τόσο λιγότερα α-οξέα διαλύονται και τόσο περισσότερα β-οξέα και πτητικά αιθέρια έλαια παραμένουν στην μύρα, ενώ αντίθετα με τον λυκίσκο κατά τον βρασμό που δίνει φρουτώδεις γεύσεις, ο λυκίσκος του dry hopping δίνει περισσότερα αρώματα χορταριού και βοτάνων. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται στις περισσότερες μύρες τύπου Pale Ale (Stam Hieronymus, 2012).

Οι θειούχες ενώσεις αποτελούν ένα μικρό μέρος των ελαίων και έχουν πολύ χαμηλό κατώφλι αντίληψης. Ωστόσο η επίδραση τους στην μύρα μπορεί να είναι και θετική και αρνητική. Αποτελούνται από τερπενικές πτητικές ενώσεις μη οξυγονούχες (π.χ. μυρσένιο, καρυοφιλένιο) και οξυγονούχες (π.χ. λιναλοόλη, γερανιόλη). Το μυρσένιο δεν δίνει επιθυμητά χαρακτηριστικά, έχει οσμή που θυμίζει χορτάρι, ρητίνη, φρέσκο λυκίσκο και σε υψηλές συγκεντρώσεις μυρίζει σαν απορρυπαντικό. Αντίθετα, η λιναλοόλη, η γερανιόλη και οι υπόλοιπες ουσίες που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία, προσδίδουν ελκυστικά αρώματα σε μικρές συγκεντρώσεις και είναι κρίσιμες για την γεύση και το άρωμά. Πιο συγκεκριμένα:

- η λιναλόλη δίνει αρώματα λεβάντας και έχει όριο αντίχνευσης 5 µg/L
- η α-τερπενιόλη που δίνει αρώματα πασχαλιάς και έχει όριο αντίχνευσης 2 mg/L
- η β-κιτρονελόλη που δίνει αρώματα λεμονιού και έχει όριο αντίχνευσης 8 µg/L
- Η γερανιόλη που δίνει αρώματα τριαντάφυλλου και έχει όριο αντίχνευσης 6 µg/L
- Η Νερόλη ,που δίνει αρώματα εσπεριδοειδών και τριαντάφυλλου και όριο αντίχνευσης 0.5 mg/L (Michel et al, 2016).

Κατά τον βρασμό του ζυθογλεύκουσ πραγματοποιείται η ισομερίωση των α και β οξέων στα ισομερή τους τα οποία και αποτελούν την κύρια πηγή πικράδας. Συγκεκριμένα τα ίσο-α-οξέα φαίνεται να είναι 4 φορές περισσότερο πιο πίκρα από τα α-οξέα και πολύ πιο διαλυτά. Επίσης έχουν την ικανότητα να σταθεροποιούν τον αφρό της μύρας και να αναστέλλουν την ανάπτυξη των βακτηρίων.



Εικόνα 1: Η ανατομία και η σύσταση των λυκίσκων που βρίσκονται σε μορφή κώνου. Πληροφορίες για την συγκέντρωση των ενώσεων που περιέχονται (Lafontaine & Shellhammer, 2019)



## 1.2 Βύνη

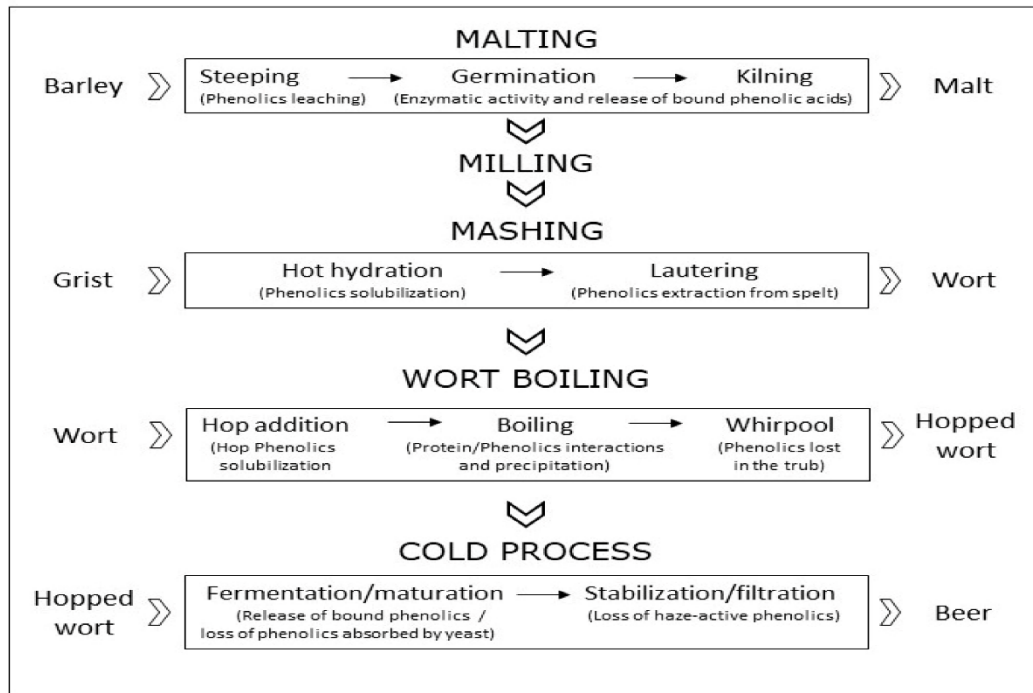
Το κριθάρι αποτελεί την κατεξοχήν πρώτη ύλη που χρησιμοποιείται στο μεγαλύτερο ποσοστό παραγωγής ζύθου παγκοσμίως. Το πιο σημαντικό χαρακτηριστικό του, θεωρείται η μικρή ποσότητα πρωτεΐνης που περιέχει σε αναλογία με το άμυλο. Κάποια συστατικά του κριθαριού χρησιμεύουν για την παραγωγή αιθανόλης, όπως είναι το άμυλο, ενώ άλλα συνεισφέρουν στην γεύση. Επίσης, πολλά από αυτά έχουν αρνητική επίδραση στο τελικό προϊόν. Για παράδειγμα, η χρήση κριθαριών με υψηλές ποσότητες β-γλυκανίων στην ζυθοποίηση δίνει ζυθογλεύκος με υψηλό ιξώδες (Bokulich & Bamforth, 2013).

Παρατηρώντας από την αρχή τα στάδια γίνεται αντιληπτό ότι η συμβολή του κριθαριού στη παραγωγή της μπίρας αναπτύσσεται και εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη διαδικασία της βυνοποίησης. Για να μετατραπεί το κριθάρι σε βύνη είναι απαραίτητο να προηγηθούν κάποιες διαδικασίες. Αρχικά, η διαβροχή κατά την οποία το κριθάρι δέχεται νερό και διογκώνεται κατά το ένα τρίτο του όγκου του και ο αερισμός του, έτσι ώστε να προετοιμαστεί για το επόμενο στάδιο, την βλάστηση. Σε αυτό το στάδιο, το έμβρυο αναπτύσσει ρίζες και μαζί με τον βλαστό του αναπτύσσονται και αρχίζει η δράση των σημαντικών ενζύμων, που είναι απαραίτητα για το στάδιο της πολτοποίησης. Έπειτα, οι κόκκοι ξηραίνονται σε κλίβανο με ζεστό αέρα, όπου και καθορίζονται οι ιδιότητες της βύνης που τελικώς προκύπτει καθώς σχηματίζονται χαρακτηριστικές αρωματικές και χρωστικές ουσίες με αντιδράσεις Maillard (Codern, 2013). Οι αντιδράσεις Maillard είναι μια σειρά διαδοχικών διεργασιών που συμβαίνουν κατά την θερμική κατεργασία και έχει σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση επιθυμητών χαρακτηριστικών χρώματος, γεύσης και αρώματος. Στις αντιδράσεις αυτές συμμετέχουν αμινοξέα, πεπτίδια και πρωτεΐνες με αποτέλεσμα τη δημιουργία σκουρόχρωμων προϊόντων, γνωστών και ως μελανοΐδινες. Ως συστατικό, η βύνη περιέχει σακχαρίτες, πρωτεΐνες, άζωτο και ένζυμα που διευκολύνουν την ζύμωση αλλά μπορούν επίσης να επηρεάσουν την γεύση και το άρωμα την παραγόμενης μπίρας. Για παράδειγμα περίσσεια σακχάρων, που δεν έχουν υποστεί πλήρη ζύμωση οδηγούν σε γλυκιά μπίρα και μεγάλες ποσότητες αζώτου οδηγούν σε υψηλότερα επίπεδα 2,3-βουτανοδιόνης και διακετυλίου που δίνουν στην μπίρα αρώματα και γεύσεις βουτύρου. Για να δώσουν χρώμα στη μπίρα, οι ζυθοποιοί χρησιμοποιούν ειδικές βύνες.

Επίσης, διάφορες λακτόνες έχουν βρεθεί στον ζύθο, οι οποίες προέρχονται είτε από την βύνη, είτε από τον λυκίσκο, μεταξύ των οποίων η γ-λακτόνη και η γ-δεκαλακτόνη είναι οι πιο διακεκριμένες. Αν και βρίσκονται κάτω από το κατώφλι αντίληψης μπορούν να παίξουν σημαντικό ρόλο στο φρουτώδη χαρακτήρα χάρη στην αλληλεπίδραση με άλλες ενώσεις. Η ουίσκι λακτόνη προσδίδει και άρωμα καρύδας σε μπύρες Lambic που έχουν παλαιωθεί σε δρύινα βαρέλια (Ferreira & Guido, 2018).

### 1.3 Ζύμες

Η παραγωγή των περισσότερων αρωματικών ενώσεων εξαρτάται αυστηρά από το στέλεχος της ζύμης που επιλέγεται για την ζύμωση. Αυτό κάνει την επιλογή του κατάλληλου στελέχους μια ιδιαίτερα σημαντική διαδικασία τόσο για την βελτίωση του αρωματικού προφίλ μετά τον εμβολιασμό, όσο και για καινοτόμα αρώματα με χρήση non-*Saccharomyces* ζυμών κατά την ωρίμανση του ζύθου στη φιάλη (A. Capece, 2018).



Εικόνα 2: Η πορεία των φαινολικών ενώσεων κατά την διάρκεια του βρασμού και της ζυθοποίησης (R. Ambra et al., 2021).

Στην φάση της πολτοποίησης, μετά από την αρχική μείωση, η συνολική ποσότητα φαινολικών αυξάνεται 3 με 5 φορές. Έπειτα, τα φαινολικά συνεχίζουν να αυξάνονται σε όλη τη διάρκεια της πολτοποίησης και της προσθήκης λυκίσκου, ωστόσο υπάρχει απότομη μείωση κατά τον βρασμό, το whirlpool, την ζύμωση, την ωρίμανση, την σταθεροποίηση, το φιλτράρισμα, γι' αυτό και κατά την διάρκεια ολόκληρης της ζυθοποίησης περίπου το 60% των φαινολικών της βύνης χάνεται (R. Ambra et al., 2021).

### 1.3.1 Ζύμες *Saccharomyces*

Τα αρωματικά προφίλ της μύρας μπορούν να αποδοθούν κυρίως στις βιοχημικές δραστηριότητες κατά τη διάρκεια της ζύμωσης εντός του κυττάρου της ζύμης, στο οποίο τα σάκχαρα του ζυθογλεύκου μετατρέπονται σε αιθανόλη και πτητικές ενώσεις, ενδιάμεσες δηλαδή ενώσεις και υποπροϊόντα του μεταβολισμού της ζύμης. Αυτές οι αρωματικές ενώσεις διαφέρουν από τις αρωματικές ενώσεις που υπάρχουν στη βύνη και στο λυκίσκο και έχουν σημαντικό αντίκτυπο στο άρωμα και την γεύση της μύρας. Η πιο γνωστή ζύμη ζυθοποιίας ανήκει στο γένος *Saccharomyces*, λόγω ότι διαθέτει κάποια σημαντικά χαρακτηριστικά για την διαδικασία ζυθοποίησης, όπως η παραγωγή υψηλών ποσοτήτων αιθανόλης, ο μεταβολισμός των σακχάρων χρησιμοποιώντας την μεταβολική οδό, που βασίζεται στο φαινόμενο Crabtree και την αντοχή του σε ακραίες συνθήκες όπως για παράδειγμα παρουσία αιθανόλης. (A. Carece, 2018).

Παραδοσιακά, οι ζύμες μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες: τις ζύμες ale και lager ή αλλιώς τις αφροζύμωτες και τις βυθοζύμωτες αντίστοιχα. Αρχικά, αυτά τα στελέχη ταξινομήθηκαν με βάση τις ιδιότητες κροκίδωσής τους. Στο τέλος της ζύμωσης, οι ζύμες ale έχουν την τάση να ανεβαίνουν στην επιφάνεια του ζυμωμένου ζυθογλεύκου, ενώ οι ζύμες lager από την άλλη καθιζάνουν στον πυθμένα του ζυμωτήρα. Άλλο ένα χαρακτηριστικό που τους διαφοροποιεί είναι η θερμοκρασία στην οποία ζυμώνουν και αναπτύσσονται, που για τις ale κυμαίνονται μεταξύ 14 °C και 25 °C, ενώ για τις lager 4 °C με 12 °C (Callego, Carmen & Morata, 2017).

Τα δύο βασικά συστατικά που επηρεάζουν την απόδοση της ζύμης είναι οι υδατάνθρακες και οι αζωτούχες ενώσεις. Τα στελέχη των ζυμών έχουν την ικανότητα να χρησιμοποιήσουν μεγάλο αριθμό υδατανθράκων (γλυκόζη, σακχαρόζη, φρουκτόζη, μαλτόζη, μαλτοτριόζη) και κάτι που ισχύει αποκλειστικά για τις ζύμες lager είναι ότι μπορούν να ζυμώσουν τη μελιβιόζη. Όσον αφορά στις ενώσεις αζώτου, εξαρτώνται από την βύνη, καθώς αποτελείται από αμινοξέα, ιόντα αμμωνίου και κάποια διπεπτίδια-τριπεπτίδια. Ωστόσο η ύπαρξη ελεύθερου αζώτου αμινοξέων (Free Amino Nitrogen) στο ζυθογλεύκο επηρεάζει τις ανώτερες αλκοόλες, τους εστέρες, τις γειτονικές δικετόνες και το υδρόθειο καθώς ο σχηματισμός τους εξαρτάται από τον μεταβολισμό των αμινοξέων. Αν και οι αφροζύμες χρησιμοποιούνται για την παραγωγή μύρας με πολλά διαφορετικά χαρακτηριστικά μεταξύ τους, όπως για

παράδειγμα στις ale, stout, και porter, τα στελέχη ανήκουν κυρίως στο είδος *Saccharomyces cerevisiae*.

Η ζύμη lager είναι ένας πιο σύνθετος ζυμομύκητας από ότι η ale, το οποίο έχει προκύψει ενδεχομένως από τον υβριδισμό του *S. cerevisiae* με *S. bayanus*. Οι ζύμες lager διαθέτουν το ένζυμο που διασπά τους δύο γλυκοζιτικούς δεσμούς μεταξύ των μονοσακχαριτών. Αντίθετα, η ζύμη ale δεν διαθέτει αυτό το ένζυμο (Boculich and Bamforth, 2013).

### 1.3.2 Ζύμες Non-*Saccharomyces*

Στις ημέρες μας ο τομέας της ζυθοποιίας αντιμετωπίζει μια αυξανόμενη ζήτηση για καινοτόμα προϊόντα, όπως η χρήση αυτόχθονων καλλιιεργειών εκκίνησης, οι αυθόρμητες ζυμώσεις ή η εκκίνηση με ζύμες non-*Saccharomyces*, τα οποία οδηγούν στην παραγωγή ξεχωριστών και ασυνήθιστων προϊόντων. Η προσπάθεια επικράτησης προϊόντων με πιο πολύπλοκα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά οδήγησε στην αναζήτηση μη συμβατικών ζυμομυκήτων. Γενικά, οι non-*Saccharomyces* ζύμες χαρακτηρίζονται από χαμηλές αποδόσεις, είναι πιο ευαίσθητες στο στρες αιθανόλης και σχετίζονται με θολώματα ή φαινολικές αρωματικές οσμές, ωστόσο είναι ικανές να προσδώσουν ξεχωριστό άρωμα και γεύση.

Επιπλέον οι μη συμβατικές ζύμες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή ζύθων με χαμηλή ή και καθόλου αλκοόλη. Καθώς αυτές οι ζύμες έχουν γενικά χαμηλότερη απόδοση σε παραγωγή αιθανόλης συγκριτικά με τον *S. cerevisiae*, δεν χρησιμοποιούνται τόσο ως καθαρές καλλιέργειες εκκίνησης αλλά σε διαδοχικές ζυμώσεις με *Saccharomyces cerevisiae*.

Η χρήση αυτών των ζυμών στην παραγωγή μπορεί σε ορισμένες περιπτώσεις να απαιτεί σημαντικές αλλαγές στις συνθήκες ζύμωσης, όπως η παροχή οξυγόνου. Στην ζύμωση με συμβατικές ζύμες, το γλεύκος αερίζεται πριν ή κατά την διάρκεια της προσθήκης για να ενισχύσει την αρχική ανάπτυξη του πληθυσμού της ζύμης. Έπειτα η ζύμωση συνεχίζει χωρίς επιπλέον οξυγόνο. Αντίθετα, όταν χρησιμοποιούνται μη συμβατικές ζύμες το οξυγόνο είναι απαραίτητο για την ενίσχυση και ολοκλήρωση της ζύμωσης σε χαμηλά επίπεδα. Στην περίπτωση συνδυασμού καλλιέργειας *Saccharomyces cerevisiae* και μη συμβατικών ζυμών, αυτή η εξάρτηση από το οξυγόνο μπορεί να επηρεάσει θετικά τον έλεγχο και την ανάπτυξη των μη συμβατικών, εξασφαλίζοντας έτσι την επιτυχή ολοκλήρωση της ζύμωσης.

Τα στελέχη non-*Saccharomyces* μπορούν να παρέχουν διαφορετικά χαρακτηριστικά αρώματος και γεύσης που έχουν ως αποτέλεσμα νέα στυλ μύρας. Η χρήση μη συμβατικών ζυμών, μπορεί να περιγραφεί ως η σύνθεση και ο μετασχηματισμός των αρωματικών ενώσεων με βιολογικές μεθόδους. Αυτό ικανοποιεί τις ανάγκες των σύγχρονων καταναλωτών που όλο και περισσότερο αναζητούν διαφορετικά και βελτιωμένα προφίλ μύρας με εξελιγμένα αρώματα χωρίς χημικά (A. Caprese, 2018).

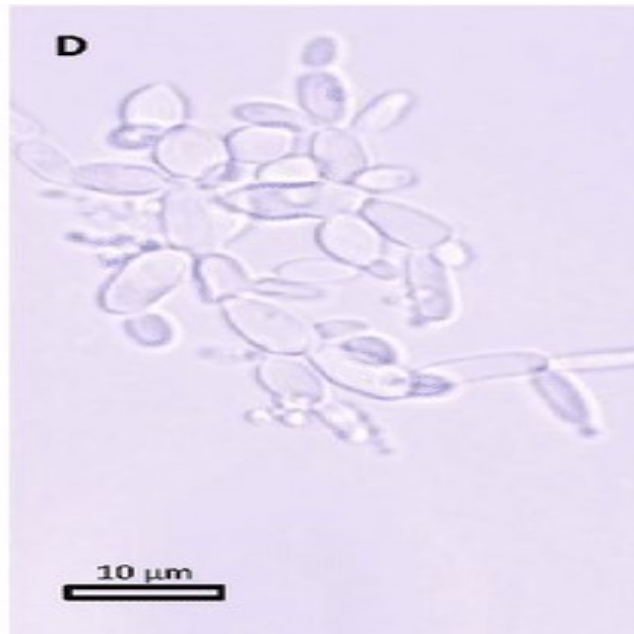
## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup>: Είδη *Non-Saccharomyces*

### 2.1 *Dekkera/Brettanomyces*

Το είδος *Dekkera/Brettanomyces* είναι οι πιο διαδεδομένες μη συμβατικές ζύμες που εμπλέκονται κυρίως στην παραγωγή των Lambic, gueuze και sour ale ζύθων. Οι συγκεκριμένοι ζυμομύκητες παίρνουν μέρος στην ωρίμανση έως και δέκα μήνες και εμφανίζουν μεγαλύτερη γενετική ποικιλομορφία σε σχέση με τους *Saccharomyces*, ιδιαίτερα σε χαμηλό οξυγόνο και υψηλή περιεκτικότητα σακχάρων (Crabtree effect). Η διαφορά είναι στο φαινόμενο Cluster, που σε αυτή την περίπτωση, οι οργανισμοί έχουν μεγάλη ικανότητα περάτωσης της ζύμωσης παρουσία οξυγόνου μειώνοντας τον μεταβολισμό της γλυκόζης (φάση υστέρησης) υπό αναερόβιες συνθήκες. Ακόμα σε μικρές ποσότητες οξυγόνου ενθαρρύνουν την αποτελεσματικότητα της ζύμωσης και παράγουν μικρές ποσότητες οξικού οξέος.

Ένα άλλο ενδιαφέρον χαρακτηριστικό του ζυμομύκητα *Brettanomyces* είναι η παραγωγή β-γλυκοζιδάσης, ένα ένζυμο υπεύθυνο για την υδρόλυση των γλυκοζιτικών μονοτερπενίων που υπάρχουν και στον λυκίσκο και στο ξύλο βαρελιών που χρησιμοποιούνται για ωρίμανση. Στην πραγματικότητα θα μπορούσε να αυξήσει ή να τροποποιήσει το άρωμα του λυκίσκου επειδή πολλά από τα μονοτερπένια που ελευθερώνονται όπως η λιναλόλη είναι οι βασικές ουσίες του αρώματος του λυκίσκου (Capece et al., 2018). Οι χρόνοι ζύμωσης είναι μεγαλύτεροι απ'ότι με *Saccharomyces* και η ιδανική θερμοκρασία κυμαίνεται στους 20 °C. Ωστόσο, λαμβάνοντας υπόψη αυτούς τους δύο παράγοντες, η απόδοση της είναι χαμηλή. Ορισμένα στελέχη όπως ο *Brettanomyces bruxellensis* παρουσιάζουν υψηλή ανοχή στην αιθανόλη (σε συγκεντρώσεις έως και 15% ) και μπορούν να ζυμώσουν μέρος από τα κύρια σάκχαρα του γλεύκους. Τα τελευταία χρόνια ένας μεγάλος αριθμός ερευνών έδειξε ότι η χρήση αυτών των ζυμών σε ελεγχόμενες ζυμώσεις, τόσο σε καθαρές καλλιέργειες, όσο και σε συνεμβολιασμό με *Saccharomyces cerevisiae* προσδίδει ιδιαίτερα χαρακτηριστικά, ως συνέπεια της παραγωγής φαινολικών αρωμάτων. Στελέχη όπως ο *Brettanomyces anomalus* μπορεί να μεταβολίσει ορισμένα από τα οξέα που υπάρχουν στο ζυθογλεύκος όπως το κουμαρικό και φερουλικό οξύ και να σχηματίσουν φαινολικές ενώσεις όπως η 4-βινυλγουαιακόλη και η 4-βινυλ-φαινόλη. Από την άλλη, βρέθηκε ότι τα στελέχη *Dekkera/Brettanomyces* παράγουν υψηλές ποσότητες αιθυλεστέρων όπως ο οξικός, ο

γαλακτικός και ο καπρυλικός οι οποίοι με την προϋπόθεση ότι βρίσκονται σε φυσιολογικά επίπεδα δίνουν φρουτώδη και ανθικό χαρακτήρα, ενισχύοντας και την πολυπλοκότητα του ζύθου. Σε υψηλές ποσότητες δίνουν ανεπιθύμητες οσμές βουτύρου, φαρμάκου και διαλύτη. Τα χαρακτηριστικά αυτά βέβαια εξαρτώνται από την δραστηριότητα ορισμένων αμυλασών και από το χρησιμοποιηθέν στέλεχος (Basso et al., 2016).



Εικόνα 3: Τα κύτταρα του *Brettanomyces* όπως φαίνονται στο μικροσκόπιο σε κλίμακα 10μ (Callego et al., 2017).



## 2.2 *Metschnikowia pulcherrima*

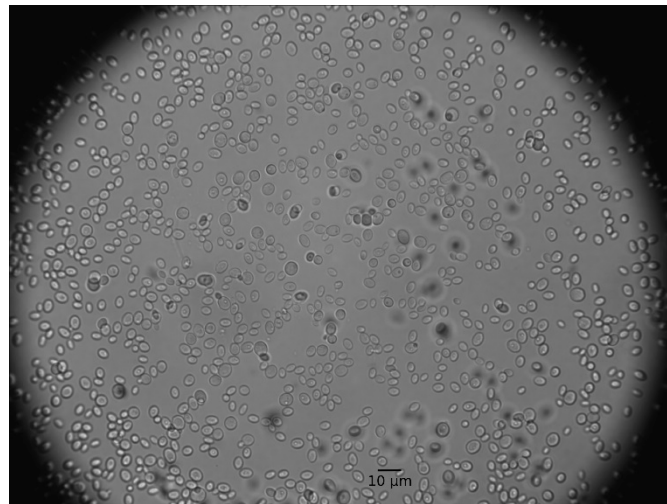
Η *Metschnikowia pulcherrima* ή αλλιώς *Candida pulcherrima* είναι ένα είδος ζύμης με ιδιαίτερη σημασία στην οινοποίηση όταν βρίσκεται στα σταφύλια ή στον εξοπλισμό του οινοποιείου, κερδίζοντας έτσι και το ενδιαφέρον στην παραγωγή του ζύθου. Ανήκει στους ασκομύκητες, η αναπαραγωγή της γίνεται με εκβλάστηση και το σχήμα της είναι ωοειδές και ελλειψοειδές. Συναντάται στη φύση και έχει απομονωθεί από σταφύλια, κεράσια, νέκταρ λουλουδιών, φρούτα ή άλλα φυτά που βρίσκονται σε αποσύνθεση και μεταφέρονται από έντομα, τα οποία και αποτελούν τους φορείς για την διάδοση αυτού του είδους ζύμης (Morata et al,2019).

Χάρη στην ικανότητα της να παράγει μια αδιάλυτη κόκκινη χρωστική ουσία, την πουλχεριμίνη με αντιμικροβιακή δράση, χρησιμοποιείται για βιολογική σταθεροποίηση και μπορεί να δράσει ανασταλτικά στην ανάπτυξη για τα γένη *Candida tropicalis* και *Candida albicans*. Αντίθετα, η ανάπτυξη του *Saccharomyces cerevisiae* δεν επηρεάζεται λόγω έλλειψης της αντιμικροβιακής δραστηριότητας που παρουσιάζει η *Metschnikowia pulcherrima* σε αυτό το είδος, οπότε καθίσταται δυνατός ο συνδυασμός τους για την εκκίνηση σε διαδοχικές ή και μικτές ζυμώσεις. Όπως συμβαίνει με τους περισσότερους non-*Saccharomyces* μικροοργανισμούς που προέρχονται από τα σταφύλια, έτσι και η *Metschnikowia pulcherrima* παρουσιάζει μέτρια έως χαμηλή ζυμωτική ικανότητα σε γλεύκη με συγκεντρώσεις αιθανόλης πάνω από 4-5%. Για τον λόγο αυτό, στις μικτές ζυμώσεις πρέπει να χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με ζυμομύκητες που παρουσιάζουν μεγαλύτερη ζυμωτική ικανότητα σε αυτές τις συγκεντρώσεις για πραγματοποιηθεί η περάτωση της ζύμωσης, όπως είναι ο *Saccharomyces cerevisiae*. Στην παραγωγή κρασιών με χαμηλότερη συγκέντρωση αιθανόλης είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί η *Metschnikowia Pulcherrima* μόνο για την εκκίνηση της ζύμωσης (Vicente et al,2020).

Πρόκειται για είδος ζύμης με ιδιαίτερη σημασία στην διαδικασία της ζύμωσης χάρη στην ικανότητα που έχει να απελευθερώνει αρωματικές πτητικές ενώσεις ενισχύοντας το συνολικό αρωματικό προφίλ των οίνων. Στην περίπτωση των διαδοχικών ζυμώσεων, παράγονται μεγαλύτερες ποσότητες ανώτερων αλκοολών, κυρίως ισοβουτανόλης και φαινυλαιθανόλης. Ο συνδυασμός του με *Saccharomyces uvarun* ευνοεί τον σχηματισμό της 2-φαινυλαιθανόλης και του οξικού οξέος μειώνοντας την παραγωγή του οξικού αιθυλεστέρα. Τέλος, όταν χρησιμοποιείται μόνο του,

παράγονται μεγάλες ποσότητες οξικού αιθυλεστέρα με αρνητικές επιπτώσεις στο τελικό άρωμα και γεύση του οίνου (Mateo & Maicas, 2016).

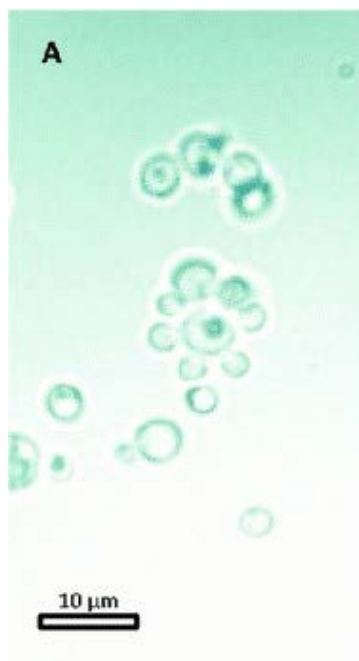
Φαίνεται ότι μεταβάλλει το αρωματικό μπουκέτο στο κρασί παράγοντας υψηλά επίπεδα προπανοϊκού αιθυλεστέρα, 2-μεθυλοπροπυλεστέρα, 2 μεθυλοβουτύλ-εστέρα, δεκανοϊκό αιθυλεστέρα και 2 φαινυλ-αιθυλεστέρα (Daniel Einfalt, 2020).



*Εικόνα 4: Τα κότταρα της Metschnikowia pulcherrima όπως φαίνονται από το μικροσκόπιο σε κλίμακα 10 μm (Morata et al., 2019).*

### 2.3 *Torulasporea delbrueckii*

Το στέλεχος *Torulasporea delbrueckii* είναι γνωστό από την βιομηχανία του οίνου γιατί δίνει περισσότερο φρουτώδη χαρακτήρα στο κρασί καθώς επίσης μειώνει την παραγωγή ανεπιθύμητων ενώσεων όπως οι φαινόλες και οι θειούχες ενώσεις. Το ιδιαίτερο που έχει ως non-*Saccharomyces* ζύμη είναι η αντοχή της σε υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης. Η ζύμωση ωστόσο με αυτό το στέλεχος φαίνεται να είναι πιο αργή από εκείνη που πραγματοποιείται με στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae*, καθώς απαιτεί οξυγόνο. Τα τελευταία στοιχεία δείχνουν ότι η παραγόμενη αιθανόλη στον ζύθο κυμαίνεται από 0.8 έως 4 %, αφήνοντας αζύμωτα σάκχαρα στο γλεύκος (Capece et al., 2018). Άλλο ένα χαρακτηριστικό που έχει ιδιαίτερη σημασία είναι η ανοχή που παρουσιάζει στα ίσο α-οξέα που προέρχονται από τον λυκίσκο (έως και 90 IBU) και επίσης ότι είναι ανεκτικοί σε συνθήκες υψηλής ωσμωτικής πίεσης και πολλαπλασιάζονται ικανοποιητικά σε χαμηλές θερμοκρασίες. Η πιο ενδιαφέρουσα συνεισφορά της ζύμης αυτής είναι στο προφίλ των πτητικών ενώσεων του ζύθου. Τα επίπεδα εστέρων που παράγονται κυμαίνονται στα 0.8 mg/L και οι ανώτερες αλκοόλες σε χαμηλά επίπεδα, περίπου στα 18 mg/L. Ορισμένα στελέχη παράγουν 2-φαινυλαιθανόλη (αρώματα λουλουδιών), ν-προπανόλη, βουτανόλη, αμυλική αλκοόλη και οξικό αιθυλεστέρα. Επίσης παράγει μεγάλες ποσότητες διακετυλίου, οι οποίες δεν μπορούν να μειωθούν κατά την ωρίμανση του (Basso et al., 2016).



Εικόνα 5: Τα κύτταρα της *Torulasporea delbrueckii* όπως φαίνονται στο μικροσκόπιο σε κλίμακα 10 μm (Callego et al., 2017).

## 2.4 *Wickerhamomyces anomalus*

Ο *Wickerhamomyces anomalus* (ή αλλιώς *Pichia anomala*) παράγει φαινυλαιθυλική αλκοόλη, οξικό φαινυλαιθέρα, αλλά κυρίως οξικό αιθυλεστέρα. Αυτή η ένωση επηρεάζει τη γεύση και το προφίλ γεύσης του ζύθου, προσφέροντας ένα ενδιαφέρον φρουτώδες ή έναν δυσάρεστο χαρακτήρα που μοιάζει με διαλύτη, ανάλογα με τις τιμές συγκέντρωσης. Ορισμένες μελέτες δείχνουν ότι αυτό το είδος παρουσιάζει αδυναμία να μεταβολίζει τη μαλτόζη, ενώ άλλες έρευνες ότι ορισμένα άγρια στελέχη του *W.anomalus* έχουν την ικανότητα να χρησιμοποιούν σάκχαρα και να αναπτυχθούν καλύτερα ακόμα και από άλλες ζύμες ζυθοποίησης. Σύμφωνα με όλα τα παραπάνω, ο *W.anomalus* μπορεί να αποτελέσει μια καλή υποψήφια ζύμη για διαδοχικές ή μικτές ζυμώσεις με άλλες ζύμες και αυτό χάρη στην ανασταλτική τους δράση έναντι άλλων μικροοργανισμών (Capece et al., 2018).

Πίνακας 1: Ο ρόλος των μη συμβατικών ζυμών στην παραγωγή καινοτόμων ζύθων (Capece et al., 2018).

ΑΡΩΜΑ-ΓΕΥΣΗ (FLAVOUR)	ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΑΛΚΟΟΛΗΣ	ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ
<i>Dekkera/ Brettanomyces</i> : Παραγωγή εστέρων (αρωματικός χαρακτήρας φρούτων και λουλουδιών), δραστικότητα β-γλυκοζιδάσης	<i>Torulasporea delbrueckii</i> : αδυναμία ζύμωσης μαλτόζης και μαλτοτριόζης	<i>Dekkera/Brettanomyces</i> : δραστικότητα β-γλυκοζιδάσης (αποδόμηση δεξτρινών)
<i>Torulasporea delbrueckii</i> : Παραγωγή 2-φαινυλαιθανόλης και αμυλικών αλκοολών (αρώματα φρούτων και λουλουδιών)	<i>Pichia kluyveri</i> : περιορισμένη ικανότητα ζύμωσης γλυκόζης	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> : δραστικότητα αμυλάσης (αφομοίωση δεξτρινών)
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> : παραγωγή οξικού αιθέρα, προπανοϊκού αιθέρα, φαινυλαιθανόλης, 2-οξικού - φαινυλαιθέρα (αρώματα φρούτων)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> : δραστικότητα αμυλάσης (αφομοίωση δεξτρινών)	

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup>: Θετικά και αρνητικά κατά Gram βακτήρια

Τα βακτήρια γαλακτικού οξέος (LAB) ανήκουν στους ετεροζυμωτικούς δηλαδή παράγουν γαλακτικό οξύ μαζί με άλλα οξέα και αλκοόλες ή ακόμα και διακετύλιο. Είναι τα πιο διαδεδομένα στην φύση, που σχετίζονται με το φυτικό στοιχείο και έτσι η είσοδος τους στο ζυθοποιείο είναι τόσο συχνές όσο και αναπόφευκτες. Ευτυχώς εμποδίζεται η ανάπτυξη τους στην μύρα, λόγω της αντιβακτηριακής δραστηριότητας ορισμένων ενώσεων που προέρχονται από το λυκίσκο ιδιαίτερα τα ίσο- α-οξέα. Είναι σε θέση να αλλοιώσουν την μύρα λόγω οξίνισης, σχηματισμού θολώματος και παραγωγή διακετυλίου. Πολλά στελέχη επίσης μπορούν να παράγουν πολυσακχαρίτες και να προσδώσουν λιπαρή υφή. Ωστόσο, αυτά που έχουν προσαρμοστεί στις αυστηρές συνθήκες που επικρατούν στην μύρα (δηλαδή, ανεπτυγμένη ανοχή λυκίσκου) είναι οι πιο διαδεδομένοι μικροοργανισμοί αλλοίωσης μύρας μέχρι σήμερα. Κάποιοι από αυτούς είναι: *Pediococcus damnosus*, *Pediococcus inopinatus*, *Pediococcus dextrinicus*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus parabuchneri*, *Lactobacillus delbruecki*.

Το γένος *Pediococcus* είναι ιδιαίτερα γνωστά για την παραγωγή διακετυλίου και το σχηματισμό γαλακτικού οξέος και λόγω της ανάπτυξής τους σε χαμηλές θερμοκρασίες, μολύνει συχνά τόσο τις lager όσο και τις ale. (Boculich & Bamforth, 2013).

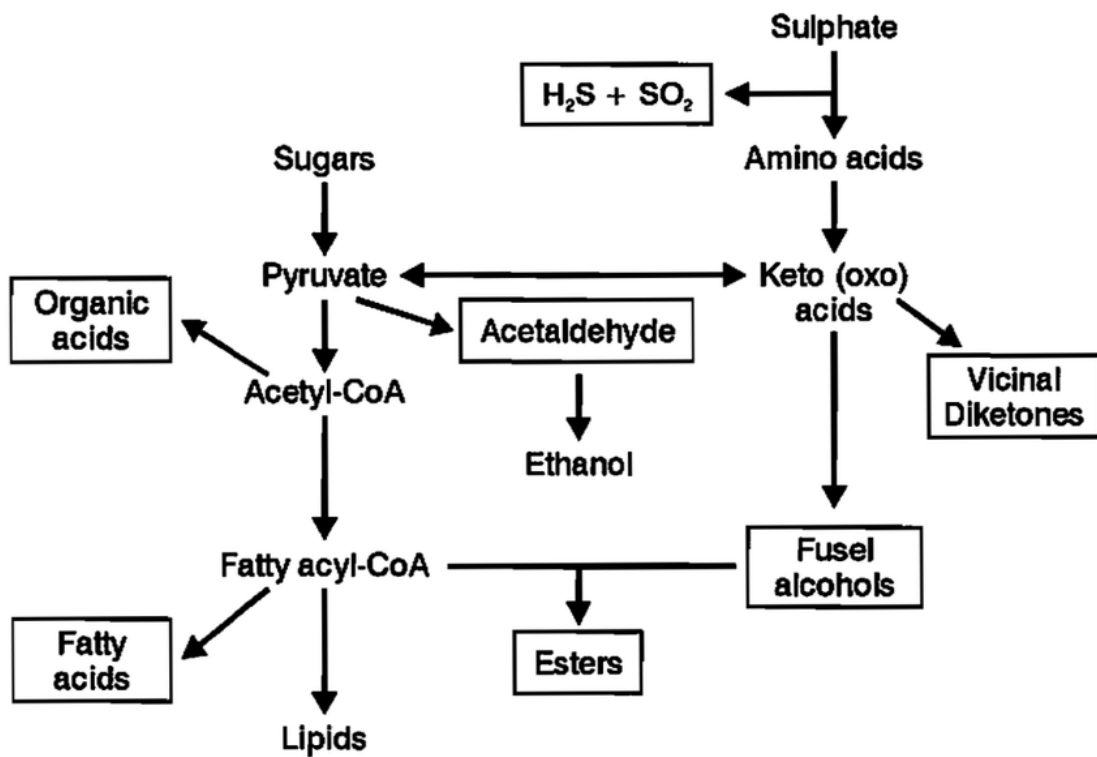
## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup>: Ζύμωση και δευτερογενείς μεταβολίτες

Η ζύμωση αποτελεί το κλειδί για να κατανοήσουμε την προέλευση των αρωματικών ενώσεων. Σε γενικές γραμμές, είναι η μεταβολική διαδικασία μετατροπής των σακχάρων σε αλκοόλη και οξέα, από ζύμες ή βακτήρια. Ο σχηματισμός της αιθανόλης γίνεται μέσω της γλυκολυτικής οδού Emden-Meyerhof- Parnas Pathway καθώς η γλυκόζη μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό οξύ και στην συνέχεια σε CO<sub>2</sub> και H<sub>2</sub>O μέσω του κύκλου του Krebs. Πρόκειται για αναερόβια διαδικασία(δεν απαιτεί την παρουσία οξυγόνου) κατά την οποία το πυροσταφυλικό οξύ που παράγεται από τη γλυκόλυση μετατρέπεται σε αιθανόλη και CO<sub>2</sub>. Στον κόσμο της ζυθοποίησης, υπάρχουν τρία βασικά είδη ζύθου που διαμορφώνονται ανάλογα με τον τρόπο ζύμωσης που έχουν υποστεί: οι βυθοζύμωτοι (μετά την ζύμωση καθιζάνουν στον πυθμένα, θερμοκρασία 6-12 °C, προέρχεται από υβριδισμό του *S. cerevisiae* με *S. Bayanus*), οι αφροζύμωτοι (κατά το τέλος της ζύμωσης ανεβαίνουν στην επιφάνεια και σχηματίζουν ένα στρώμα ζύμης διευκολύνοντας την συλλογή τους με απομάκρυνση του αφρού, θερμοκρασία 6-12 °C) και οι ζύθοι φυσικής - αυθόρμητης ζύμωσης (με άγριες ζύμες που βρίσκονται στο περιβάλλον).

Οι κύριοι μεταβολίτες που προκύπτουν κατά την διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης είναι η αιθανόλη, το διοξείδιο του άνθρακα και η γλυκερόλη. Αν και αυτοί οι μεταβολίτες συνεισφέρουν στην μύρα και στις spirit properties, έχουν μικρή επίδραση στα χαρακτηριστικά της γεύσης και του αρώματος. Στον ζύθο και σε οποιοδήποτε αλκοολούχο ποτό, η γεύση και το άρωμα καθορίζεται κατά κύριο λόγο από δευτερογενή μεταβολικά προϊόντα, ανάλογα με τη σύσταση του γλεύκους και τις υπάρχουσες συνθήκες ζύμωσης, όπως για παράδειγμα το στέλεχος της ζύμης, η ποικιλία της βύνης, η θερμοκρασία που διεξάγεται η ζύμωση, το pH και η πυκνότητα του γλεύκους (Graham G. Stewart, 2017).

Τα κύρια στοιχεία που παράγονται από τη μαγιά είναι οι ανώτερες αλκοόλες, εστέρες, γειτονικές δικετόνες και άλλες καρβονυλικές ενώσεις και οι θειούχες ενώσεις, τα οποία καθορίζουν την τελική ποιότητα της μύρας, ειδικά όταν είναι φρέσκια. Οι ανώτερες αλκοόλες και οι εστέρες είναι επιθυμητά πτητικά συστατικά με κάποιες μικρές εξαιρέσεις. Οι ενώσεις αυτές σε συνδυασμό με τον μεταβολισμό των ζυμομυκήτων συμβάλλει στην βιοσύνθεση κάποιων άλλων ομάδων εξίσου δραστικών

στην γεύση και στο άρωμα οι οποίες είναι τα οργανικά οξέα, οι θειούχες ενώσεις και οι αλδεΐδες. Η δραστηριότητα αυτή των ζυμών ονομάζεται μεταβολική (metabolimics).



Εικόνα 6: Κύριοι μεταβολικοί οδοί με τους οποίους οι ζύμες ζυθοποίησης συνθέτουν ανώτερες αλκοόλες, εστέρες, ενώσεις του θείου, ακεταλδεΐδες, γειτονικές δικετόνες και αιθανόλη (Graham G. Sterwart, 2017).

#### 4.1. Ανώτερες αλκοόλες

Ο έλεγχος την βιοσύνθεσης των ανώτερων αλκοολών δεν είναι τόσο απλός, καθώς είτε έχουν παραχθεί από υποπροϊόντα του μεταβολισμού των αμινοξέων, είτε μέσω του πυροσταφυλικού και της αιθανόλης από τον μεταβολισμό των υδατανθράκων.

Οι ανώτερες αλκοόλες παράγονται από τις ζύμες ως παραπροϊόντα του μεταβολισμού και καταβολισμού των αμινοξέων. Κατά τον καταβολισμό, τα αμινοξέα μεταβολίζονται από τα κύτταρα ζύμης και προκύπτει το α-ακετοξύ, το οποίο υφίσταται αντίδραση και τέλος σχηματίζονται ανώτερες αλκοόλες. Αυτό το μονοπάτι περιεγράφηκε αρχικά ως μονοπάτι του Ehrlich (Ehrlich pathway). Ο μεταβολισμός των αμινοξέων ξεκινά με υδατάνθρακες, οι οποίοι μετατρέπονται σε α-ακετοξύ και ακολουθεί η διαδικασία της αποκαρβοξυλίωσης για τον σχηματισμό ανώτερων αλκοολών (Michel et al, 2016).

Όσο αφορά τη γεύση και το άρωμα, οι ανώτερες αλκοόλες που συναντώνται στη μύρα είναι η ν-προπανόλη, ισοβουτανόλη, η αμυλική (πεντυλική), η ισοαμυλική, η 2-φαινυλαιθανόλη και άλλες 40 περίπου αλκοόλες. Το κατώφλι αντίληψης της ν-προπανόλης έχει την υψηλότερη τιμή και κυμαίνεται στα 600 mg/L και δίνει στη μύρα γλυκιά αλκοολική γεύση. Η ισοβουτανόλη και η αμυλική αλκοόλη προσδίδουν και οι δυο αρώματα διαλύτη, διαφέρουν ωστόσο στα κατώφλια αντίληψης με την ισοβουτανόλη να έχει 100 mg/L και την αμυλική 50-70 mg/L. Τέλος, η ισοαμυλική αλκοόλη δίνει αρώματα μπανάνας και έχει κατώφλι αντίληψης 50-65 mg/L και η 2-φαινυλαιθανόλη με αρώματα τριαντάφυλλου και κατώφλι αντίληψης 40mg/L (Graham G. Stewart, 2017).



## 4.2. Εστέρες

Οι εστέρες σχηματίζονται σε μεγάλο βαθμό κατά τον μεταβολισμό των ζυμών, από αλκοόλες και οργανικά οξέα. Οι πτητικοί εστέρες στον ζύθο χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: τους οξικούς εστέρες και τους αιθυλεστέρες λιπαρού οξέος μέσης αλύσου. Οι οξικοί εστέρες συντίθενται από το οξικό οξύ με αιθανόλη ή άλλες ανώτερες αλκοόλες (προπανόλη, βουτανόλη κλπ). Οι αιθυλεστέρες μέσης αλύσου σχηματίζονται με μία ρίζα αιθανόλης (Michel et al,2016).

Αν και κατά την ζύμωση μπορούν να σχηματιστούν δεκάδες διαφορετικοί εστέρες, πιο σημαντικοί ως προς το άρωμα της μπύρας είναι ο οξικός αιθυλεστέρας (ανεπιθύμητο άρωμα διαλύτη), οξικός ισοαμυλεστέρας (άρωμα μπανάνας), οξικός ισοβουτυλεστέρας (άρωμα φρούτων), οξικός αιθυλεστέρας (άρωμα τριαντάφυλλου και μελιού), εξανοϊκός ή καπροϊκός αιθυλεστέρας (άρωμα μήλου) και τέλος ο οκτανοϊκός αιθυλεστέρας ή καπρυλικός (αρώματα ξινού μήλου). Η σύνθεση των εστέρων στηρίζεται στην σύνδεση των οργανικών οξέων με συνένζυμο με σκοπό να σχηματιστεί ένα μόριο ακετυλο-συνένζυμο Α.

Οι αερόβιες συνθήκες στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων θα πετύχουν τον σχηματισμό ATP μέσω του κύκλου του KREBS από το ακετυλο-συνένζυμο Α. Εάν δεν υπάρχει οξυγόνο το ακετυλο-συνένζυμο Α θα σχηματίσει οξικούς εστέρες, ενώ οι αιθυλεστέρες μεσαίας αλυσίδας είναι εστέρες που σχηματίζονται από μακρύτερες αλυσίδες ακετυλο-CoA. Ο οξικός αιθυλεστέρας είναι ο πιο συνηθισμένος εστέρας που παράγεται από τις ζύμες (Pires et al , 2014).

### **Αιθανόλη + ακετυλοσυνένζυμο Α → οξικός αιθυλεστέρας + coASH**

Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι εστέρες έχουν πολύ χαμηλό όριο οσμής στην μπύρα και σε μεγάλο βαθμό, μπορεί να καθορίσουν το τελικό άρωμά της. Ωστόσο, εάν παραχθεί σε μεγαλύτερη συγκέντρωση, μπορεί να επηρεάσει αρνητικά την μπύρα με μια πικρή, υπεροπτική γεύση. Οι εστέρες σχηματίζονται κυρίως κατά τη διάρκεια της έντονης φάσης της πρώτης ζύμωσης με ενζυματική χημική συμπύκνωση οργανικών οξέων και αλκοολών (Graham G.Steward,2017).

### 4.3. Φαινόλες

Τα περισσότερα αρώματα και γεύσεις που προσδίδουν οι φαινόλες στον ζύθο είναι ανεπιθύμητα και συχνά αναφέρονται ως phenolic off-flavors. Εξαιρέση αποτελούν κάποιοι συγκεκριμένοι τύποι μύρας που η παρουσία τους είναι επιθυμητή, όπως η Belgian Lambic, Belgian Abbey, German wheat beer. Δίνουν συνήθως αρώματα γαρύφαλλου, καμένου, καπνιστού ή και πικάντικου. Οι πιο γνωστές ενώσεις που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία είναι η 4-βινυλγουαικόλη, η 4-βινυλφαινόλη, η 4-αιθυλογουαικόλη, η 4-αιθυλοφαινόλη, η 4-βινυλοσυριγγόλη, το στυρόλιο, η ευγενόλη και η βανιλίνη. Η παραγωγή τους εξαρτάται από το στέλεχος της ζύμης και την παρουσία πρόδρομων φαινολικών οξέων με υψηλό κατώφλι αντίληψης όπως για παράδειγμα το φουρουλικό, το κουμαρικό και το κινναμικό οξύ που προέρχονται από την βύνη. Στελέχη ζύμης όπως το *Brettanomyces sp.* είναι ικανά να μειώσουν τις 4-αιθυλογουαικόλη και 4-αιθυλοφαινόλη. Τα κατώτατα όρια για αυτές τις πτητικές φαινόλες είναι αρκετά χαμηλά:

- 4-αιθυλφαινόλη δίνει στυφά αρώματα με όριο αντίχνευσης 0.9 mg/L
- 4-αιθυλογουαικόλη δίνει γλυκά αρώματα και χαρακτηριστικά αρώματα καπνιστού κρέατος με όριο αντίχνευσης 0.13 mg/L
- 4-βινυλγουαικόλη δίνει πικράδα και αρώματα γαρύφαλλου με όριο αντίχνευσης 0.3 mg/L
- 4-βινυλοφαινόλη δίνει καπνιστά αρώματα με όριο αντίχνευσης 0.2 mg/L

#### 4.4. Καρβονυλικές ενώσεις

Οι καρβονυλικές ενώσεις που συμβάλλουν στην γεύση και στο άρωμα του φρέσκου ζύθου καθώς και πολύ σημαντική είναι η δράση τους στην σταθερότητα της μύρας. Παράγονται κατά την ζύμωση ως αποτέλεσμα του μεταβολισμού της ζύμης και υπολογίζεται ότι είναι πάνω από 200. Σε αυτές, ανήκουν διάφορες αλδεΐδες όπως η ακεταλδεΐδη και οι γειτονικές δικετόνες (VDKs) με πιο σημαντικό το διακετύλιο. Σε μεγάλες συγκεντρώσεις προκαλούν αλλοιώσεις στην γεύση. Αλδεΐδες όπως η προπανόλη, η πεντανόλη και η 2-μεθυλική βουτανόλη προσδίδουν αρώματα κομμένου γρασιδιού (Graham G.Steward,2017).

##### 4.4.1. Ακεταλδεΐδη

Στο τέλος της αλκοολικής ζύμωσης, η ακεταλδεΐδη είναι η ένωση που βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση (10 -15 mg /L). Πρόκειται για προϊόν της μαγιάς το οποίο προέρχεται από την αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού οξέος και είναι το μέσο προϊόν κατά την μετατροπή των σακχάρων σε αιθανόλη κατά την γλυκόλυση. Όταν υπάρχει στις μύρες σε συγκεντρώσεις πάνω από 10 mg/L προσδίδει ανεπιθύμητα χαρακτηριστικά, συγκεκριμένα πράσινου μήλου. Όπως με τις ανώτερες αλκοόλες και τους εστέρες, η συγκέντρωση της ακεταλδεΐδης εξαρτάται από το στέλεχος της ζύμης και τις συνθήκες ζύμωσης. Πιο σημαντικό θεωρείται το στέλεχος της ζύμης, ωστόσο επηρεάζεται από την θερμοκρασία ζύμωσης, την πυκνότητα του γλεύκους και τον ρυθμό εμβολιασμού. Η συγκέντρωση της ακεταλδεΐδης αυξάνεται όταν η θερμοκρασία ζύμωσης κυμαίνεται στους 30 °C.

Η αλκοολική αφυδρογονάση (ADH) και η αλδεΐδική αφυδρογονάση (ALDH) είναι τα δύο ένζυμα που ευθύνονται για τις μεταβολικές τους οδούς. Ο μεταβολισμός μεταξύ της αιθανόλης και της ακεταλδεΐδης καταλύεται από την αλδεΐδική αφυδρογονάση. Η παρουσία ακεταλδεΐδης είναι ένας από τους λόγους που τα κύτταρα ζύμης μπορούν να βρεθούν σε κατάσταση στρες (Graham G.Steward,2017).

#### 4.4.2. Γειτονικές δικετόνες – διακετύλιο – 2,3 πεντανοδιόνη

Το διακετύλιο και η 2,3-πεντανοδιόνη παράγονται και αυτά κατά τη ζύμωση του γλεύκους ως παραπροϊόντα των αμινοξέων βαλίνη και ισολευκίνη από στελέχη ζυμών ale και lager. Οι γειτονικές δικετόνες και ειδικά το διακετύλιο επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό το άρωμα και τη γεύση. Το διακετύλιο προσδίδει αρώματα καραμέλας και βουτύρου με κατώφλι περίπου 0.1-0.2 mg/L για τις lager και 0.1-0.4 mg/L για τις ale. Η 2,3-πεντανοδιόνη έχει παρόμοια γεύση με το διακετύλιο, αν και συχνά το άρωμα της περιγράφεται περισσότερο γλυκό με κατώφλι 1 mg/L. Πολλές φορές το άρωμα του είναι ανεπιθύμητο και μπορεί να θεωρηθεί ως ελάττωμα της μύρας σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από το κατώφλι. Υπάρχουν ωστόσο και μύρες όπως οι Czech pilsners που η παρουσία διακετυλίου είναι επιτρεπτή. Ο σχηματισμός του διακετυλίου μπορεί να προέρχεται από μικροβιακή μόλυνση, τον κυρίαρχο ρόλο όμως έχει ο μεταβολισμός της ζύμης (Graham G. Stewart, 2017).

#### 4.5. Οργανικά οξέα

Τα οργανικά οξέα συνεισφέρουν στην γεύση και στο άρωμα της μύρας καθώς και στην τελική ολική οξύτητα (pH) μαζί με ανόργανα οξέα . Η μεγάλη ομάδα των οξέων αυτών χωρίζεται σε δύο κατηγορίες : τα πτητικά και τα μη πτητικά οξέα. Στην μύρα τα πιο σημαντικά (ποσοτικά) πτητικά οργανικά οξέα που συναντάμε είναι το οξικό με όριο ανίχνευσης 175 mg/L και γεύση ξυδιού, το καπρυλικό με κατώφλι αντίληψης τα 15 mg/L και άρωμα κατσίκας, το καπρικό με κατώφλι 10 mg /L με άρωμα που περιγράφεται ως κυρώδες και τέλος το λαουρικό με κατώφλι 6.1 mg/L και άρωμα σαπουνιού. Επίσης, ακολουθούν το προπιονικό, το ισοβουτυρικό, το βουτυρικό και το ισοβαλερικό τα οποία σε υψηλές συγκεντρώσεις δίνουν αρώματα και γεύσεις ξινά και αλμυρά στην μύρα.

Τα μη πτητικά οξέα παράγονται από τις ζύμες και επηρεάζουν εξίσου την γεύση και το άρωμα της μύρας. Η παραγωγή τους εξαρτάται από το στέλεχος της ζύμης και τα περισσότερα από αυτά είναι παραπροϊόντα της γλυκόλυσης, του κύκλου του οξικού οξέος και τον μεταβολισμό των αμινοξέων και των λιπαρών οξέων. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν το οξαλικό οξύ με κατώφλι 500 mg/L και άρωμα αλμυρό και οξειδωμένο, το κιτρικό με κατώφλι 400 mg/L και άρωμα ξινό, το μηλικό οξύ με κατώφλι 700 mg/L και άρωμα μήλου, το φουμαρικό οξύ , το ηλεκτρικό με κατώφλι 400 mg/L και 220 mg/L αντίστοιχα και άρωμα ξινό, το γαλακτικό με κατώφλι 400 mg/L και επίσης άρωμα ξινό και τέλος το πυροσταφυλικό οξύ με κατώφλι 300 mg/L και άρωμα ζωοτροφής (Michel et al., 2016).

#### 4.6. Θειούχες ενώσεις

Οι πιο σημαντικές ενώσεις που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία είναι το διοξείδιο του θείου και το υδρόθειο. Το διοξείδιο του θείου αποτελεί αρκετά οικεία ένωση για τους ζυθοποιούς καθώς ως αντιοξειδωτικό παίζει μεγάλο ρόλο στην σταθερότητα και στην αύξηση της διάρκειας ζωής της μπίρας. Ακόμα συμβάλλει στην προστασία της γεύσης από αλλοιώσεις, ιδιαίτερα από τις καρβονυλικές ενώσεις. Σημαντικό επίσης ρόλο στην παραγωγή του, παίζει η σύσταση του ζυθογλεύκους και η άλεση της βύνης. Συνήθως παράγεται σε ποσότητες <10 g/L ως προϊόν του αναβολισμού των αμινοξέων. Το διοξείδιο του θείου είναι επιθυμητό χαρακτηριστικό για το άρωμα σε ορισμένες μπίρες τύπου lager και έχει όριο ανίχνευσης 2.5 mg/L.

Το υδρόθειο, από την άλλη, έχει πολύ χαμηλό όριο ανίχνευσης (0.005 mg/L). Πρόκειται για μία ανεπιθύμητη ένωση λόγω της έντονης μυρωδιάς κλούβιου αυγού που μπορεί εύκολα να καλύψει όλα τα άλλα αρώματα στην μπίρα. Συνήθως παράγεται κατά την διάρκεια της ωρίμανσης (Michel et al., 2016).

Πίνακας 2: Επίδραση των συνθηκών κατά την ζυθοποίηση στους εστέρες και στις ανώτερες αλκοόλες.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ
ΥΨΗΛΕΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ ΖΥΜΩΣΗΣ	↑ ΕΣΤΕΡΩΝ ΚΑΙ ΑΝΩΤΕΡΩΝ ΑΛΚΟΟΛΩΝ
↑ ΟΞΥΓΟΝΟΥ ΣΤΟΝ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟ	ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΣΤΕΡΩΝ
ΖΥΜΩΣΗ ΥΠΟ ΠΙΕΣΗ	ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΣΤΕΡΩΝ-ΚΑΡΒΟΝΥΛΙΚΩΝ -ΑΝΩΤΕΡΩΝ ΑΛΚΟΟΛΩΝ
ΥΨΗΛΗ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑ ΓΛΕΥΚΟΥΣ	↑ ΕΣΤΕΡΩΝ- ΑΛΚΟΟΛΩΝ
↑ ΜΑΛΤΟΖΗΣ ΤΟΥ ΓΛΕΥΚΟΥΣ	↓ ΕΣΤΕΡΩΝ
↑ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΤΟΥ ΓΛΕΥΚΟΥΣ	↓ ΕΣΤΕΡΩΝ

Ο συνδυασμός των δευτερογενών μεταβολιτών δίνει ζύθο με περισσότερο ή λιγότερο επιθυμητό αποτέλεσμα. Προφανώς οι ενώσεις αυτές πρέπει να διατηρούνται εντός ορισμένων ορίων διότι στην περίπτωση που κάποια από τις παραπάνω κυριαρχήσει θα επηρεαστεί αρνητικά η ισορροπία της γεύσης και του αρώματος στην μπύρα. Επιπλέον οι εστέρες και όχι μόνο συχνά δρουν σε συνδυασμό με άλλες ενώσεις που είναι πιθανό να επηρεάσουν το άρωμα και γεύση της μπύρας σε συγκεντρώσεις μικρότερες από το κατώφλι αντίληψης .

Οι αρωματικές ενώσεις με παρόμοια χαρακτηριστικά έχουν συχνά αλληλεπιδράσεις που μειώνουν το κατώφλι αντίληψης των μεμονωμένων ενώσεων. Στην μπύρα η παρουσία ενός μίγματος εστέρων μπανάνας, δηλαδή ισοαμύλιο και οξικό ισοβουτύλιο μειώνει τα το κατώφλι αντίληψης όπως και το άρωμα τριαντάφυλλου, υπεύθυνη για την οποία είναι η 2-φαινυλαιθανόλη (ανώτερη αλκοόλη) που βρίσκεται συνήθως κάτω από το όριο ανίχνευσης στον ζύθο. Επίσης σε ορισμένες περιπτώσεις οι αρωματικές ενώσεις αλληλοεπιδρούν συνεργατικά ή ανταγωνιστικά με αποτέλεσμα πιο έντονα αρώματα από τα αναμενόμενα. Για παράδειγμα, ορισμένοι οξικοί και αιθυλεστέρες αλληλοεπιδρούν συνεργικά για την ενίσχυση του συνολικού φρουτώδες αρώματος.

Στις περισσότερες μπύρες lager πάνω από το κατώφλι αντίληψης συναντάται μόνο ο οξικός ισοαμυλεστέρας (άρωμα μπανάνας), ενώ στις μπύρες ale συνήθως ο οξικός αιθυλεστέρας (άρωμα διαλύτη) και ο εξανοϊκός αιθυλεστέρας (άρωμα μήλου) σε υψηλότερα επίπεδα από το κατώφλι αντίληψης ως συμπληρωματικές αρωματικές ενώσεις (Graham G. Stewart, 2017).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5° Εξέλιξη του ζύθου κατά την αποθήκευσή του

Γενικά, η παλαίωση των ποτών συνδέεται με την παραμονή τους σε δρύινα βαρέλια η οποία αποτελεί και μια παλιά παράδοση που εξακολουθεί να χρησιμοποιείται με σκοπό τη βελτίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών πολλών αλκοολούχων ποτών και στην περίπτωση του ζύθου, χρησιμοποιείται σε κάποιες ιδιαίτερες βέλγικες μπίρες. Η επαφή με το ξύλο, είναι δυνατό να προσδώσει στο προφίλ του ζύθου ιδιαίτερες νότες καρύδας, βανίλιας, ξύλου, πικάντικου και καπνιστού. Αυτά τα οργανοληπτικά αποτελέσματα αποδίδονται γενικά στις cis και trans λακτόνες του ξύλου, στις πτητικές φαινόλες όπως η ευγενόλη και η γουαιακόλη και φαινολικές αλδεΐδες όπως η βανιλίνη και οι φουρανικές αλδεΐδες. Η κύρια πηγή των οργανοληπτικών αυτών αλλαγών φαίνεται να είναι η εκχύλιση των αρωματικών ενώσεων που υπάρχουν στο ξύλο πριν την θερμική επεξεργασία του (π.χ. λακτόνες, ευγενόλη) ή και μετά κατά την καύση του ξύλου με αντιδράσεις Maillard .

Ωστόσο στην ζυθοποίηση, παλαίωση του ζύθου μπορεί να πραγματοποιηθεί και με την παραμονή του στην φιάλη. Η παλαίωση του μετά την εμφιάλωση, είναι ένα περίπλοκο φαινόμενο που αποτελείται από μια σειρά πολύπλοκων αντιδράσεων. Αρχίζοντας από την δεκαετία των 1960, αρκετές έρευνες έχουν συγκεντρωθεί στις χημικές αλλαγές της παλαίωσης του ζύθου που μέχρι σήμερα είναι δύσκολο να διαχειριστεί. Με την αυξανόμενη εξαγωγή ζύθου, λόγω της παγκοσμιοποίησης της αγοράς, τα προβλήματα διάρκειας ζωής του ίσως αποτελέσει αρκετά σημαντικό ζήτημα για μερικά ζυθοποιεία αφού συνήθως καθορίζεται από την σταθερότητα της μικροβιολογίας, τα κολλοειδή, τον αφρό, το χρώμα και τη γεύση της. Στο παρελθόν, η εμφάνιση θολερότητας και η επιμόλυνση από μικροοργανισμούς κατά την αποθήκευσή του θεωρούνταν φαινόμενο που δημιουργούσε προβλήματα. Ωστόσο, με την πρόοδο στο κομμάτι της χημείας και της τεχνολογίας της ζυθοποίησης, αυτά τα προβλήματα είναι πλέον υπό έλεγχο.

Από θερμοδυναμικής άποψης, ένα μπουκάλι μπίρας είναι ένα κλειστό σύστημα που προσπαθεί να φτάσει σε μια κατάσταση με την μέγιστη εντροπία και την ελάχιστη ενέργεια. Τα συστατικά ενός ζύθου που μόλις έχει εμφιαλωθεί δεν βρίσκονται σε ισορροπία. Τα μόρια του υποβάλλονται σε πολλές αντιδράσεις κατά την αποθήκευσή του, τα οποία τελικά θα είναι αυτά που θα καθορίσουν τον τελικό χαρακτήρα του ζύθου. Συνήθως όμως, η ωρίμανση του καθορίζεται από τους ρυθμούς αντίδρασης



κατά τις συνθήκες ωρίμανσης, οι οποίοι αντίστοιχα αυξάνονται με υψηλότερη συγκέντρωση υποστρώματος και θερμοκρασία αποθήκευσης.

Πλέον το μεγαλύτερο ενδιαφέρον έχει επικεντρωθεί στους παράγοντες που επηρεάζουν τις αλλαγές στο άρωμα και στην γεύση του ζύθου, αφού το λεγόμενο flavor θεωρείται η πιο σημαντική παράμετρος αξιολόγησής του (B.Vanderhaegen et al,2006).

## 5.1. Αλλαγές στη γεύση και στο άρωμα

Η παλαίωση του ζύθου είναι μια μη οξειδωτική διαδικασία και απαιτεί όσο το δυνατόν χαμηλότερα επίπεδα οξυγόνου. Η επαφή με το οξυγόνο ίσως προκαλεί μια γρήγορη αλλοίωση των αρωμάτων και της γεύσης τα οποία εξαρτώνται από την περιεκτικότητα σε οξυγόνο του εμφιαλωμένου ζύθου. Εκτός από την συγκέντρωση του οξυγόνου τα χαρακτηριστικά του επηρεάζονται και από την θερμοκρασία αποθήκευσης, λόγω των χημικών αντιδράσεων που εμπλέκονται. Οι ρυθμοί διαφορετικών αντιδράσεων δεν αυξάνονται το ίδιο με αύξηση της θερμοκρασίας. Για παράδειγμα, σύμφωνα με μελέτες, όταν η παλαίωση μίας μύρας lager πραγματοποιείται σε θερμοκρασίες 25 °C αναπτύσσονται αρώματα καραμέλας, ενώ σε θερμοκρασίες 30-37 °C κυριαρχούν αρώματα χαρτονιού. Συμπεραίνουμε δηλαδή, ότι οι αλλαγές που πραγματοποιούνται στην γεύση και στο άρωμα είναι κάτι πιο σύνθετο-περίπλοκο και εξαρτάται κυρίως από τον τύπο του ζύθου, την συγκέντρωση του οξυγόνου και την θερμοκρασία αποθήκευσης (Bart Vanderhaegen,2006).

Κάποια αρώματα, όπως τα φρουτώδη συναντώνται πιο σπάνια σε ζύθους μετά την παλαίωση τους, σε αντίθεση με κάποια άλλα όπως αυτά του χαρτονιού που αποτελούν και το κύριο μειονέκτημα συνήθως για τις μύρες lager και κύρια ένδειξη ότι έχει υποστεί παλαίωση. Αυτό όμως δεν μπορεί να αποτελέσει κανόνα, αφού ανάλογα τον τύπο μύρας διαφοροποιούνται και τα αρώματα παλαίωσης. Για παράδειγμα, σε ζύθο τύπου Strong ale έχουν παρατηρηθεί πιο έντονα αρώματα και γεύσεις γλυκόριζας και καραμέλας παρά χαρτονιού (Whitear,1981). Ωστόσο για κάποιες συγκεκριμένες μύρες, τα αρώματα αυτά είναι πιο ιδιαίτερα από τα αρχικά. Επιπλέον, μπορεί να επιτευχθεί σταθερότητα των αρωμάτων για συγκεκριμένους ζύθους, αφού έντονες καμένες γεύσεις και αρώματα σε μαύρες μύρες μπορούν να επικαλύψουν την ανάπτυξη αρωμάτων κατά την παλαίωση.

Τα προϊόντα από την αντίδραση Maillard όπως η φουρφουράλη, αυξάνονται περισσότερο κατά την διάρκεια της ωρίμανσης, ιδιαίτερα στην περίπτωση που η ξήρανση της βύνης έχει πραγματοποιηθεί σε υψηλότερες συνθήκες ή όταν η θερμοκρασία στο γλεύκος είναι υψηλότερη κατά την διάρκεια της ζυθοποίησης. Το θειώδες είναι ικανό να πραγματοποιήσει αναστολή αυτών των αντιδράσεων.

## 5.2. Αλλαγές στις ανώτερες αλκοόλες

Ειδικά στον εμφιαλωμένο ζύθο, η υπερβολική ποσότητα οξυγόνου μπορεί να προκαλέσει ταχεία αλλαγή στο άρωμα και την γεύση του. Ένας αποτελεσματικός τρόπος για την επίτευξη σταθερότητας των χαρακτηριστικών αυτών είναι η ελαχιστοποίηση του σχηματισμού και της δραστηριότητας των μορίων του οξυγόνου τόσο στη μύρα όσο και στο γλεύκος.

Οι πιο σημαντικές αλκοόλες είναι η αιθανόλη, η 2-μεθυλοπροπανόλη, 2-μεθυλοβουτανόλη, 2-φαινυλαιθανόλη, 3-μεθυλοβουτανόλη. Σύμφωνα με έρευνες, οι συγκεντρώσεις των αντίστοιχων αλδεϋδών αυξάνονται κατά την ωρίμανση, ιδιαίτερα με παρουσία οξυγόνου. Επίσης την αύξηση τους προκαλούν οι υψηλές θερμοκρασίες και το χαμηλό pH (Bart Vanderhaegen,2006).

### 5.3. Αλλαγές στις καρβονυλικές ενώσεις

Από την αρχή των ερευνών για τις ενώσεις σχετικά με την παλαίωση, τα καρβονύλια κέντρισαν το ενδιαφέρον. Αυτές οι ενώσεις ήταν γνωστό ότι προκαλούσαν αλλαγές στις γεύσεις και στα αρώματα τροφίμων. Η ακεταλδεΐδη είναι μία από τις πρώτες ενώσεις όπου η συγκέντρωσή της παρατηρήθηκε να αυξάνεται κατά την διάρκεια παλαίωσης του ζύθου.

Επίσης, θεωρείται ότι η αύξηση της (E)-2-nonenal κατά την αποθήκευση, μπορεί να ευθύνεται για το «μούχλιασμα» της μύρας η οποία φαίνεται να αυξάνεται στους 40 °C μέσα σε λίγες μέρες, σε επίπεδα υψηλότερα από το κατώφλι αντίληψης. Αντίθετα, στους 20 °C δεν έχει ανιχνευθεί, ακόμη και μετά από 4 μήνες αποθήκευσης.

Ορισμένες κετόνες, οι οποίες οι συγκεντρώσεις τους αυξάνονται ανάλογα με την ηλικία της μύρας είναι η 3-methyl-butan-2-one και 4-methylpentan-2-one και οι γειτονικές δικετόνες, το διακετύλιο και η 2,3-πεντανοδιόνη και ιδιαίτερα σε υψηλά επίπεδα οξυγόνου. Το διακετύλιο μπορεί να ξεπεράσει ακόμη και το κατώφλι αντίληψης.

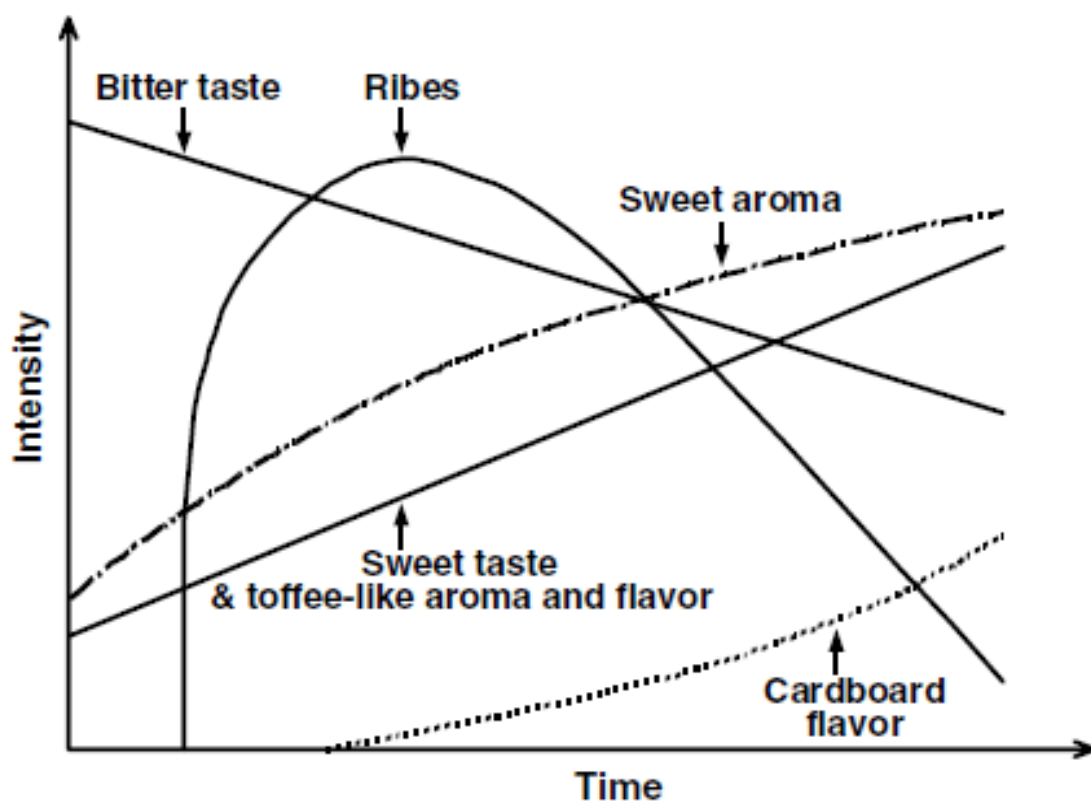
Οι κυκλικές ακετάλες (2,4,5-trimethyl-1,3-dioxolane, 2-isopropyl-4,5-dimethyl-1,3-dioxolane, 2-isobutyl-4,5-dimethyl-1,3-dioxolane και 2-sec butyl-4,5-dimethyl-1,3-dioxolane) προέρχονται από την αντίδραση μεταξύ της 2,3-βουτανοδιόλης (έως 280 mg/l στην μύρα) και μιας αλδεΐδης (ακεταλδεΐδη, ισοβουτανάλη, 3-μεθυλοβουτανάλη, ισοβουτανάλη, 3-μεθυλ-βουτανάλη και 2-μεθυλ-βουτανάλη isobutanal, 3-methylbutanal and 2-methyl-butanal). Στον ζύθο, ισορροπία μεταξύ της ακεταλδεΐδης και της 2,3 βουτανοδιόλης εμφανίζεται αρκετά γρήγορα. Σαν αποτέλεσμα, είναι η αύξηση της συγκέντρωσης της ακεταλδεΐδης κατά την διάρκεια παλαίωσης, που προκαλεί την συγκέντρωση της 2,4,5-trimethyl-1,3-dioxolane να αυξηθεί παρόμοια (Bart Vanderhaegen, 2006).

#### 5.4. Αλλαγές στους εστέρες

Στον φρέσκο ζύθο, οι πτητικοί εστέρες προσδίδουν θετικά αρώματα και φρουτώδες - αρωματικές νότες. Για παράδειγμα, ο οξικός ισοαμυλεστέρας, που παράγεται από τις ζύμες, δίνει γεύση και άρωμα μπανάνας. Ωστόσο, κατά την διάρκεια της αποθήκευσης, η συγκέντρωση του μειώνεται σε επίπεδα χαμηλότερα από το κατώφλι αντίληψης, το οποίο έχει σαν αποτέλεσμα να μειώνονται τα φρουτώδη αρώματα στο ζύθο και να δημιουργούνται αρώματα πιο γλυκά (Pires et al, 2017). Αντίθετα, ορισμένοι πτητικοί εστέρες όπως ο 3-μεθυλ-βουτυρικός αιθυλεστέρας, ο 2-μεθυλ-βουτυρικός αιθυλεστέρας, ο γαλακτικός αιθυλεστέρας και ο οξικός φαινυλαιθυστερας (ethyl 3-methylbutyrate, ethyl 2-methyl-butyrate, ethyl 2-methylpropionate, ethyl nicotinate, diethyl succinate, ethyl lactate, ethyl phenylacetate, ethyl formate, ethyl furoate and ethyl cinnamate) που συνθέτονται κατά την παλαίωση του ζύθου αναπτύσσουν αρώματα και γεύσεις «κρασιού». Τέλος, οι λακτόνες ή οι κυκλικοί εστέρες (όπως c-hexalactone και c-nonolactone) που προσδίδουν αρώματα φρουτώδες και ροδάκινου έχουν την τάση να αυξάνουν την συγκέντρωσή τους και να εμφανίζουν ιδιαίτερη σημασία τόσο στην γεύση όσο και στο άρωμα του παλαιωμένου ζύθου (Bart Vanderhaegen,2006).

### 5.5. Αλλαγές στις θειούχες ενώσεις

Οι θειούχες ενώσεις έχουν γενικά εξαιρετικά χαμηλό κατώφλι αντίληψης στο ζύθο και οι συγκεντρώσεις τους μπορούν να επηρεάσουν αισθητά την γεύση. Το διμεθυλοσουλφίδιο (DMS) μπορεί να φτάσει πάνω από το όριο αντίληψης που είναι της τάξης του 0.1 μg/L όπως και η 3-methyl-3-mercaptopbutyl formate (Bart Vanderhaegen, 2006).



Εικόνα 7: Αλλαγές στο προφίλ του ζύθου κατά την αποθήκευσή του (Vanderhaegen et al., 2006).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6<sup>ο</sup>: Ζύθοι με υψηλή πυκνότητα

Σε όλη την διάρκεια της ζυθοποίησης, πολύ σημαντική είναι η μέτρηση της πυκνότητας, καθώς αποτελεί δείκτη των σακχάρων που περιέχονται στο ζυθογλεύκος και πιο συγκεκριμένα τα γραμμάρια σακχάρων που υπάρχουν σε 100 γραμμάρια (°P).

Η μέτρηση που πραγματοποιείται μετά τον βρασμό και πριν τον εμβολιασμό, αναφέρεται ως Original gravity (OG) και αποτελεί μέτρο των ζυμώσιμων και μη ζυμώσιμων συστατικών πριν την έναρξη της ζύμωσης. Όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή του OG, τόσο περισσότερα σάκχαρα μπορούν να καταναλωθούν από τις ζύμες με αποτέλεσμα την υψηλότερη παραγωγή αιθανόλης.

Στα γλεύκη με υψηλή πυκνότητα, παρατηρείται αναστολή στην ανάπτυξη και την βιωσιμότητα των ζυμών. Αυτό κυρίως παρουσιάζεται στις ξηρές μαγιές, διότι λόγω της ωσμωτικής πίεσης καταστρέφεται το κυτταρικό τοίχωμα των ζυμών πριν ρυθμίσουν τις λειτουργίες τους, με αποτέλεσμα να μην πολλαπλασιάζονται. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται ωσμωτικό στρες και μπορεί να αποφευχθεί με την σωστή ενυδάτωση της ζύμης σε συνδυασμό με την σταδιακή προσθήκης της στο γλεύκος. (Allan Wolfe, 2015).

Αν και αρχικά η ζύμωση, ακόμα και σε αυτές τις περιπτώσεις, είναι εξαιρετικά γρήγορη, καθώς αυξάνεται το ποσοστό της αλκοόλης, συχνά επιβραδύνεται. Ο ρυθμός ζύμωσης σε αυτή την περίπτωση είναι σχετικά αργός και χρειάζεται περισσότερος χρόνος για να ολοκληρωθεί η ζύμωση και στην συνέχεια η ωρίμανση. Η μέτρηση της πυκνότητας με το τέλος της ζύμωσης ονομάζεται Final Gravity (FG) και όπως είναι αναμενόμενο θα έχει τιμή αρκετά χαμηλότερη από την Original.

Ιδιαίτερη σημασία έχει σαφώς η επιλογή του κατάλληλου στελέχους ζύμης, καθώς δεν αρκεί το συγκεκριμένο να παράγει μόνο τα επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, αλλά και να παρουσιάζει την απαραίτητη ανοχή στην αλκοόλη. Για παράδειγμα, σε πολλούς τυπικούς ζύθους που παρουσιάζουν ανοχή σε συγκεντρώσεις αλκοόλης 8-10 %, θα πραγματοποιηθεί διακοπή της ζύμωσης όταν η συγκέντρωση της ξεπεράσει αυτό το όριο (Brad Smith, 2018).

Ωστόσο, το ισορροπημένο άρωμα και η ισορροπημένη γεύση δεν είναι αυτά που χαρακτηρίζουν τους ζύθους υψηλής πυκνότητας. Τα χαρακτηριστικά αυτά, εξαρτώνται από διάφορους παράγοντες όπως το στέλεχος ζύμης, τα αμινοξέα, τα

σάκχαρα κτλ. Η υψηλή διαθεσιμότητα των αμινοξέων (λευκίνη, βαλίνη και ισολευκίνη) οδηγεί στην παραγωγή μεγαλύτερων συγκεντρώσεων ανώτερων αλκοολών και πιο συγκεκριμένα της ισοβουτανόλης, της αμυλικής και της ισοαμυλικής αλκοόλης. Επίσης, υψηλές είναι και οι ποσότητες εστέρων που παράγονται, ιδιαίτερα από γλεύκη με αυξημένα επίπεδα γλυκόζης και φρουκτόζης. Η παραγωγή του διακετυλίου, που αποτελεί πρόδρομο του ακετυλογαλακτικού, είναι επίσης πιθανό να επηρεάζεται από την συγκέντρωση των αμινοξέων (Brian R. Gibson, 2011). Όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω, σε αυτούς τους ζύθους χρειάζεται περισσότερος χρόνος σε σχέση με τους υπόλοιπους για ωρίμανση, έτσι ώστε να μαλακώσουν και να ωριμάσουν οι ανώτερες αλκοόλες και τα υπόλοιπα χαρακτηριστικά και έτσι να ολοκληρώσουν το αρωματικό και γευστικό προφίλ τους. Κάποιοι ζύθοι, όπως το barley wine, χρειάζονται ένα χρόνο ή και περισσότερο για να τελειοποιήσουν το άρωμα και την γεύση τους (Brad Smith, 2018).



## ΜΕΡΟΣ Β΄: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup>: Σκοπός και σχέδιο εργασιών

Σκοπός της εργασίας ήταν να εξεταστεί η παραγωγή ζύθου με διαφορετικές μη συμβατικές ζύμες καθώς και να μελετηθούν οι μεταβολές στις αρωματικές ενώσεις και στο αρωματικό προφίλ του κάθε ζύθου με υψηλή περιεκτικότητα σακχάρων.

Η παραγωγική διαδικασία πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο παλαιότερης διπλωματικής εργασίας κατά την οποία μελετήθηκαν στελέχη non-*Saccharomyces* στην ζύμωση ζύθου.

Πραγματοποιήθηκε παραγωγή ζυθογλεύκους, στο οποίο αφού πρώτα χωρίστηκε σε τρία μέρη, προστέθηκαν στο κάθε ένα ξεχωριστά τα τρία είδη ζυμομυκήτων που μελετήθηκαν σε αυτή την εργασία. Συγκεκριμένα, στο ένα προστέθηκε ο συμβατικός ζυμομύκητας *S. cerevisiae* και στα υπόλοιπα οι μη συμβατικοί ζυμομύκητες, ο *T. delbrueckii* και η *M. Pulcherrima*.

Ο ζύθος που παράχθηκε ήταν τύπου American Pale Ale, ανοιχτού χρώματος και με μικρή ποσότητα λυκίσκου χωρίς έντονα αρωματικά στοιχεία, έτσι ώστε να δοθεί προσοχή σε εκείνα που προσδίδουν οι παραπάνω ζυμομύκητες.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2°: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

### 2.1 Όργανα και αντιδραστήρια

Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν τα εξής όργανα :

- Φυγόκεντρος HERMLE Z 200 A
- ARE Heating Magnetic Stirrer VELP. SCIENTIFICA
- Πλατόμετρο (0-7 Plato)
- Πλατόμετρο (7-14 Plato)
- Πλατόμετρο(14-20 Plato)
- Σπεκτροφωτόμετρο UV mini 1240 Shimadzu
- Αλκοολόμετρο 174000 Alcoholmeter 0-10 Class II in 1/10 DS laboratories DUJARDIN-SALLERON
- Μηχανικό shaker Labline 3525 Incubator Shaker LabX

Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντιδραστήρια :

- Ώξινο φωσφορικό κάλιο (Potassium phosphate dibasic puriss) >99% SIGMAALDRICH
- Δίσοξινο φωσφορικό κάλιο (POTASSIUM DIHYDROGEN POSPHATE) >98% PENTA
- Θεϊκό αμμώνιο (AMMONIUM SULFATE A.G.) >99.5% PENTA
- Θεϊκό μαγνήσιο (Magnesium sulfate heptahydrate) >99.5% MERCK
- Θεϊκός ψευδάργυρος (Zink sulfate heptahydrate) >99.5% MERCK
- Εκχύλισμα ζύμης (Yeast Extract) LAB
- Γλυκόζη (D-(+)-Glucose), 99% Alfa Aesar
- Φρουκτόζη (D-FRUCTOSE) >98.5% Duchefa Biochemies
- Μαλτόζη (D-(+)-Maltose monohydrate) > 99% MERCK
- *Saccharomyces cerevisiae* (Safale US-05, Fermentis by Lesaffre, Marcq-en-Baroeul, France)
- *Torulaspora delbrueckii* (BIODIVA TD 291, Lallemand, Montreal, Canada)
- *Metschnikowia pulcherrima* (FLAVIA MP 346)

- NaOH Sodium hydroxide pellets pure <99% MERCK
- Δινιτροσαλικυλικό οξύ (3,5-Dinitrosalicylic acid) 98% SIGMA-ALDRICH
- Potassium sodium tartrate tetrahydrate 99% SIGMA-ALDRICH
- Ένυδρο όξινο φωσφορικό νάτριο (di-Sodium hydrogen phosphate dehydrate) >99.5 MERCK
- Ιωδικό κάλιο (Potassium iodate) >99.7-100% MERCK
- Αιθανόλη (Ethanol) 99.8% ACROS ORGANICS
- Γλυκίνη (Glycine) 98.5 - 101.0 %SERVA
- n-Πεντάνιο (n-Pentane) CARLO ERBA
- Διαιθυλαιθέρας (Diethylether) >99.5% FERAK
- Θεικό νάτριο (Sodium Sulfate, anh. a.r.) Chem-Lab NV
- 3-οκτανόλη
- HCl 3N
- Ισοοκτάνιο Uvasol Isooctane for spectroscopy >99.8% SIGMA-ALDRICH

## 2.2 Παρασκευή ζυθογλεύκους

Για την παρασκευή του βυνογλεύκους χρησιμοποιήθηκαν 24 kg βύνης Pale Ale, τα οποία προστέθηκαν σε δεξαμενή μαζί με 100L νερό, όταν η θερμοκρασία του νερού είχε φτάσει στους 62 °C στην οποία και παρέμεινε περισσότερο από 1 ώρα. Σκοπός σε αυτό το σημείο ήταν η εκχύλιση των υδατοδιαλυτών συστατικών της βύνης, όπως επίσης και η δράση των αμυλασών για να επιτευχθεί σχηματισμός των ζυμώσιμων υδατανθράκων σε μαλτόζη. Ακολουθεί αύξηση της θερμοκρασίας στους 72 °C όπου και διατηρείται για να δράσει η α-αμυλάση. Κατά την αύξηση της θερμοκρασίας το μίγμα παρακολουθείται για να διαπιστωθεί εάν έχει διασπαστεί όλο το άμυλο, με προσθήκη μερικών σταγόνων ιωδίου. Εφόσον έχει διασπαστεί όλη η ποσότητα αμύλου, η θερμοκρασία αυξάνεται στους 78 °C για 5 λεπτά ώστε να αδρανοποιηθούν τα ένζυμα. Ακολουθεί διήθηση στην δεξαμενή εκχύλισης με σκοπό την απομάκρυνση των υπολειμμάτων των πρώτων υλών και όταν αυτή ολοκληρωθεί ξεκινάει ο βρασμός του γλεύκους για 1 ώρα στους 100 °C. Στο σημείο αυτό προστίθενται 50 γρ. λυκίσκου και το γλεύκος συνεχίζει να βράζει μέχρι η πυκνότητα να φτάσει το 15 °P. Τέλος, ακολουθεί το στάδιο της ψύξης μέχρι η θερμοκρασία του να φτάσει στους 20 °C.

### 2.3 Εμβολιασμός ζυθογλεύκους

Η ποσότητα του ζυθογλεύκους χωρίστηκε σε τρεις κάδους ζύμωσης των 25 L αφού πρώτα απολυμάνθηκαν και ψύχθηκαν στους 13 °C. Ύστερα, σε τρεις κωνικές φιάλες των 200 mL προστέθηκαν 100 mL νερού τα οποία τοποθετήθηκαν σε χύτρα για αποστείρωση. Στην συνέχεια τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο για ψύξη σε θερμοκρασία των 20 °C. Μετέπειτα, οι ζύμες προστέθηκαν ξεχωριστά στην κάθε κωνική φιάλη και αφέθηκαν για 15 min σε ηρεμία. Παράλληλα, είχε αποστειρωθεί μια μικρή ποσότητα ζυθογλεύκους 100mL ανά ζύμη η οποία προστέθηκε μετά με τις ζύμες. Σκοπός είναι να δοθεί ένα χρονικό διάστημα προσαρμογής των ζυμών σε ένα θρεπτικό περιβάλλον για να βρίσκονται ήδη στην εκθετική φάση ανάπτυξης όταν γίνει η προσθήκη τους στο γλεύκος. Επίσης, η ποσότητα αυτή του ζυθογλεύκους είχε τοποθετηθεί σε θερμοκρασία 14 °C για να γίνει ομαλά η προσαρμογή των ζυμών στους στρεσογόνους παράγοντες της χαμηλής θερμοκρασίας. Ύστερα, ακολούθησε η προσθήκη των ζυμών σε ολόκληρη την ποσότητα του ζυθογλεύκους (11,5 g/25 L) στη θερμοκρασία των 13 °C.

## 2.4 Ανάλυση αρωματικών

Απαραίτητη για την ανάλυση των αρωματικών με αέρια χρωματογραφία είναι η διαδικασία της εκχύλισης, η οποία στο συγκεκριμένο πείραμα έγινε με στήλη Vigreux. Οι ουσίες που θέλουμε να προσδιορίσουμε μέσω της χρωματογραφίας εκχυλίζονται σε ένα μίγμα οργανικών διαλυτών, από το οποίο συλλέγεται η φάση του διαλύτη ενώ απορρίπτεται η φάση που περιέχει τις πρωτεΐνες. Ακολουθεί συμπύκνωση του μίγματος σε στήλη Vigreux, κατά την οποία απομακρύνονται οι πτητικοί διαλύτες και τελικώς συλλέγεται ένα μίγμα το οποίο είναι πλούσιο σε ουσίες που αποτελούν τον αρωματικό χαρακτήρα του ζύθου. Τέλος, το μίγμα αυτό αναλύθηκε σε GC-MS.

Μεθοδολογία:

- Σε ποτήρι ζέσεως τοποθετούνται 50 mL δείγματος 25 mL πεντάνιο και 25 mL αιθέρα.
- Το διάλυμα αφήνεται για 10 min υπό ήπια ανάδευση και στη συνέχεια τοποθετείται στη φυγόκεντρο για 10 min στις 3500 rpm.
- Μετά το πέρας των 10 min με την χρήση σιφωνίου διαχωρίζεται η οργανική φάση από το γλεύκος. Το διάλυμα των οργανικών διαλυτών που περιέχουν τις αρωματικές ενώσεις συλλέγεται.
- Στο γλεύκος προστίθεται εκ νέου μίγμα διαλυτών και πραγματοποιείται ξανά η παραπάνω διαδικασία.
- Σε διαχωριστική χοάνη τοποθετούνται οι οργανικές φάσεις που έχουν συλλεχθεί παραπάνω και προστίθενται περίπου 10 mL απιονισμένο νερό.
- Απορρίπτεται η κάτω φάση που είναι η υδατική και η οργανική τοποθετείται σε ποτήρι ζέσεως.
- Για την απορρόφηση της εναπομένουσας υγρασίας προστίθεται μικρή ποσότητα θεικού νατρίου στο δείγμα.
- Έπειτα από ήπια ανάδευση το δείγμα φιλτράρεται και τοποθετείται σε προζυγισμένη απιοειδή φιάλη.
- Η απιοειδής φιάλη συνδέεται με μία στήλη Vigreux και αφήνεται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 35-40 °C για περίπου 2 h.

- Μετά το τέλος της απόσταξης το δείγμα μεταφέρεται σε δοχείο vial και προστίθενται σε αυτό 10  $\mu\text{L}$  3-οκτανόλη, ως εσωτερικό πρότυπο.
- Τέλος το δείγμα υφίσταται ταχεία συμπύκνωση με την χρήση αέριου αζώτου μέχρι τελική μάζα περίπου ίση με 100 mg και πραγματοποιείται ένεση του δείγματος στη συσκευή GC-MS.

Για τον προσδιορισμό του αρωματικού προφίλ χρησιμοποιήθηκε αέριο χρωματογράφο- φασματόμετρο μάζας Hewlett-Packard 6890 Agilent Technologies 5975C VL MSD Triple-Axis detector. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με μια τριχοειδή στήλη διοξειδίου του πυριτίου HP-1 (Agilent Technologies) με διαστάσεις  $30\text{ m} \times 0.32\text{ mm} \times 0.25\text{ }\mu\text{m}$  ενώ ως φέρον αέριο χρησιμοποιείται ήλιο (He) με παροχή  $1\text{ mL/min}$ . Ποσότητα 1  $\mu\text{l}$  από κάθε εκχύλισμα εγχέεται στο χρωματογράφο με split ratio 100:1. Η θερμοκρασία της γραμμής μεταφοράς είναι  $38\text{ }^\circ\text{C}$ . Στο φασματόμετρο μάζας τα ηλεκτρόνια παράγονται στον θάλαμο ιονισμού από θερμαινόμενο μεταλλικό νήμα και έχουν δυναμικό της τάξεως των 70 eV στα 40-550 amu. Τέλος η ανάλυση των αποτελεσμάτων γίνεται με το λογισμικό HP Chemstation rev.A.06.03.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup>: Παρουσίαση αποτελεσμάτων και σχολιασμός

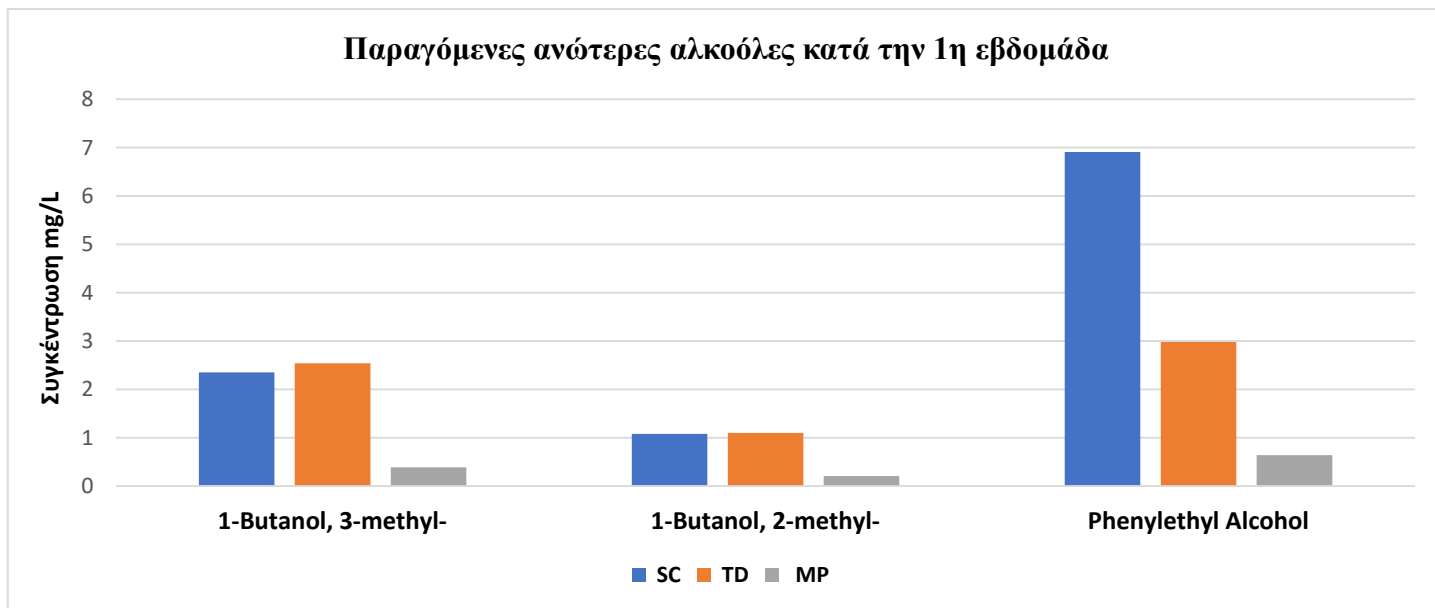
Σε αυτό το κεφάλαιο ακολουθεί η παρουσίαση και ο σχολιασμός των αποτελεσμάτων από τις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν με διαφορετικούς μικροοργανισμούς. Συγκεκριμένα ο πρώτος ζύθος παράχθηκε με *Saccharomyces cerevisiae*, ο δεύτερος με *Torulaspora delbrueckii* και τέλος ο τρίτος με *Metschnikowia pulcherrima* και οι τρεις σε συνθήκες χαμηλής θερμοκρασίας (13 °C).

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία οι ζύθοι τύπου Ale ζυμώνουν σε υψηλότερες θερμοκρασίες που κυμαίνονται από 16 °C έως 24 °C. Έρευνες έχουν δείξει ότι οι χαμηλότερες θερμοκρασίες δημιουργούν φάση στασιμότητας κατά την ανάπτυξη της ζύμης (Liszkowska & Berłowska, 2021).

Στο πείραμα που έγινε από Drosou et al. (2021) για την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών σε ζυμώσεις από διαφορετικά στελέχη ζυμών σε θερμοκρασίες 13°C και 20°C βρέθηκε ότι οι συγκεντρώσεις των ανώτερων αλκοολών, οξέων και εστέρων ήταν χαμηλότερες στους 13°C. Συγκεκριμένα, στην ζύμωση με *Torulaspora delbrueckii* στους 13 °C παρατηρήθηκαν μεγάλες μειώσεις στην παραγωγή των ανώτερων αλκοολών, ωστόσο οι ενώσεις αυτές αναφέρονται πιο αναλυτικά παρακάτω.

Στα διαγράμματα εμφανίζονται οι ουσίες που παράχθηκαν κατά την πρώτη εβδομάδα ωρίμανσης του ζύθου συγκριτικά με τις τρεις διαφορετικές ζυμώσεις που ολοκληρώθηκαν. Οι ουσίες αυτές διαχωρίζονται σε κατηγορίες ενώσεων: αλκοόλες, οξέα και εστέρες. Το είδος των ουσιών προσδιορίστηκε με την χρήση ειδικού λογισμικού, ενώ ως πρότυπο διάλυμα στον ποσοτικό προσδιορισμό χρησιμοποιήθηκε η 3-οκτανόλη.

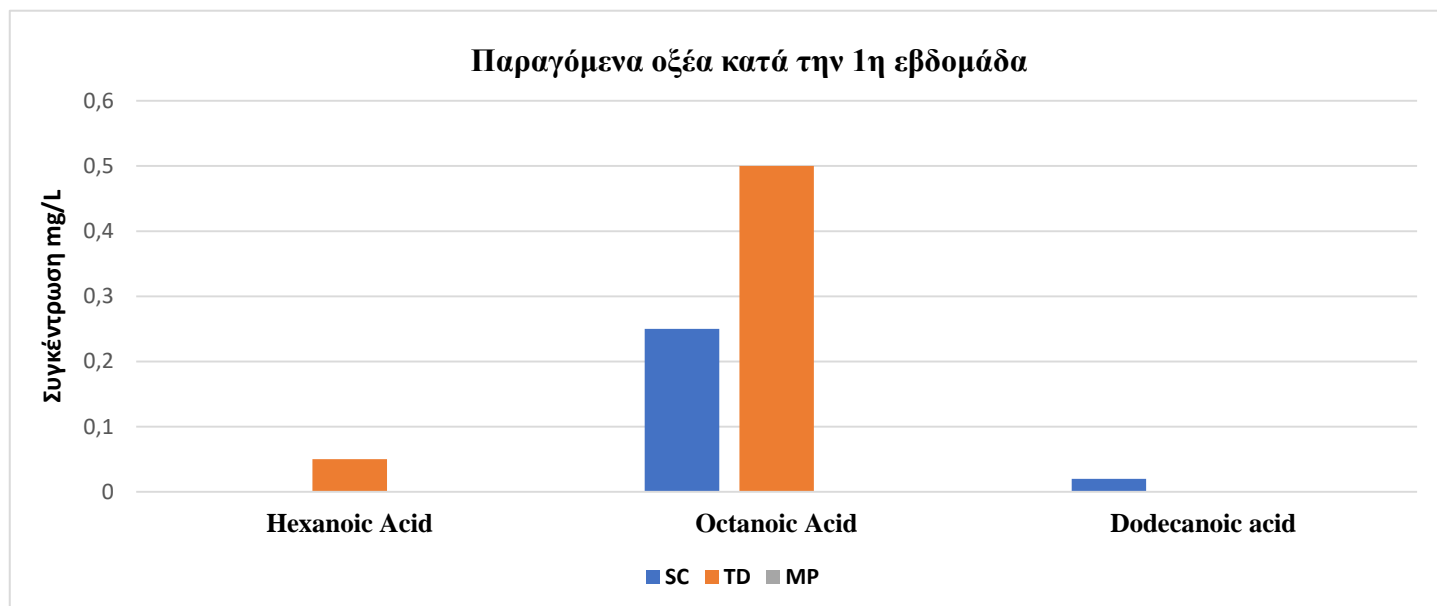




Διάγραμμα 1: Συγκριτικό διάγραμμα ανώτερων αλκοολών που παράχθηκαν στον κάθε ζύθο μετά από μία εβδομάδα ωρίμανσης

Σύμφωνα με τα παραπάνω, οι αλκοόλες που ανιχνεύθηκαν σε μεγαλύτερη συγκέντρωση είναι η φαινυλαιθυλική αλκοόλη (αρώματα τριαντάφυλλου, λουλουδιών) και για τα τρία στελέχη ζυμομυκήτων. Ωστόσο, είναι έντονα διακριτή η χαμηλή συγκέντρωσή της στην ζύμωση με *Metschnikowia pulcherrima*, ιδιαίτερα σε σύγκριση με τις άλλες δύο ζυμώσεις. Ανάμεσα στον *Saccharomyces cerevisiae* και την *Torulaspora delbrueckii*, παρατηρείται πολύ μικρή διαφορά στην 2-μεθυλοβουτανόλη-1 (αρώματα φρουτώδη, μπανάνας, διαλύτη και αλκοολούχου ποτού) και 3-μεθυλοβουτανόλη-1 (ζυμέλαιο) μετά από μία εβδομάδα εμφιάλωσης. Σύμφωνα με τους Hutzler et al. (2020), τα διάφορα στελέχη της *Torulaspora delbrueckii* μπορούν να υποστούν υψηλές συνθήκες οσμωτικής πίεσης καθώς και να αναπτυχθούν ικανοποιητικά σε χαμηλές θερμοκρασίες παράγοντας κυρίως αλκοόλες. Παρομοίως, ο ζυμομύκητας *Saccharomyces cerevisiae* ως μεσόφιλος οργανισμός, ο οποίος παρουσιάζει ανοχή σε θερμοκρασίες 15-24 °C, στις εκάστοτε συνθήκες χαμηλής θερμοκρασίας παρουσίασε υψηλές συγκεντρώσεις φαινυλαιθυλικής αλκοόλης αποτελώντας δείκτη ενός ζύθου με γλυκό και λουλουδένιο αρωματικό προφίλ. Τόσο η τρυπτοφόλη (αρώματα πικρά-αμυγδάλου), όσο και η τυροσόλη (αρώματα λιπαρού-δυσάρεστα) και η μεθιονόλη (αρώματα βραστών λαχανικών και κρεμμυδιού) δεν ανιχνεύθηκαν σε καμία από τις τρεις ζυμώσεις. Ακόμη, σύμφωνα με

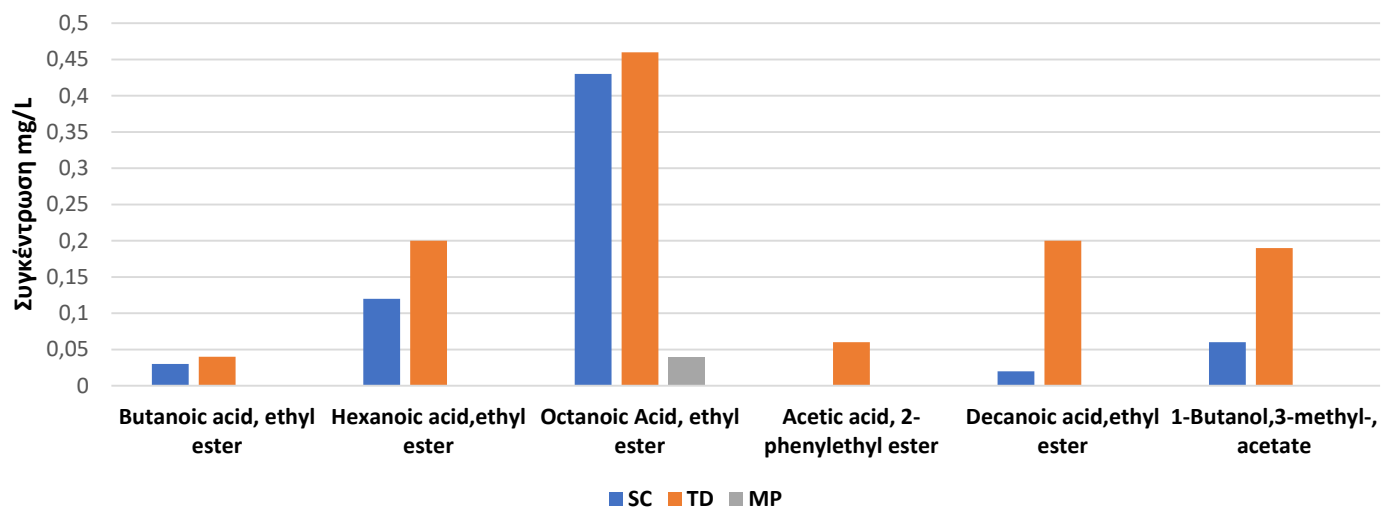
τους F. Drosou et al. (2021) οι ανώτερες αλκοόλες και συγκεκριμένα η ισοαμυλική αλκοόλη και η φαινυλαιθυλική αλκοόλη παρουσίασαν σημαντικά χαμηλότερες συγκεντρώσεις για τους ζύθους που ζυμώθηκαν στους 13 °C ιδιαίτερα από την *Torulasporea delbrueckii* με διαφορά μέχρι και 4mg/L.



Διάγραμμα 2: Συγκριτικό διάγραμμα οξέων που παράχθηκαν στον κάθε ζύθο μετά από μία εβδομάδα ωρίμανσης

Όπως φαίνεται από το διάγραμμα το εξανοϊκό οξύ (άρωμα τυριού, μανιταριού) με εξαίρεση στο ζυμομύκητα *Torulasporea delbrueckii* όπου και εδώ δεν ξεπερνάει τα όρια ανίχνευσης που κυμαίνεται στα 3 mg/L (Plessis et al.,2017). Το οκτανοϊκό οξύ (άρωμα τυριού, σαπουνιού και λιπαρού) βρίσκεται στις υψηλότερες συγκεντρώσεις, ιδιαίτερα για την ζύμωση της *T. delbrueckii* και ακολουθεί του *S. cerevisiae* χωρίς όμως οι τιμές τους να ξεπερνάνε τα όρια (5 mg/L) (Garcia M. et al.,2019). Δεν ανιχνεύθηκε σε καμία από τις περιπτώσεις το δεκανοϊκό οξύ και το βουτανοϊκό οξύ ενώ τέλος εντοπίστηκαν ίχνη του δωδεκανοϊκού οξέος (άρωμα λιπαρού και καρύδας) μόνο στον *S. cerevisiae*. Στη μελέτη που πραγματοποιήθηκε από Drosou et al.(2021) έγινε σύγκριση των συγκεντρώσεων των οξέων σε διαφορετικές θερμοκρασίες ζύμωσης για τον κάθε ζυμομύκητα. Παρατηρήθηκε ότι ο *Saccharomyces cerevisiae* δεν παρουσίασε σημαντικές μεταβολές για τις ζυμώσεις, ενώ αντίθετα η *Torulasporea delbrueckii* ήταν ικανή να παράγει μεγαλύτερες συγκεντρώσεις εξανοϊκού και οκτανοϊκού οξέος στους 20 °C.

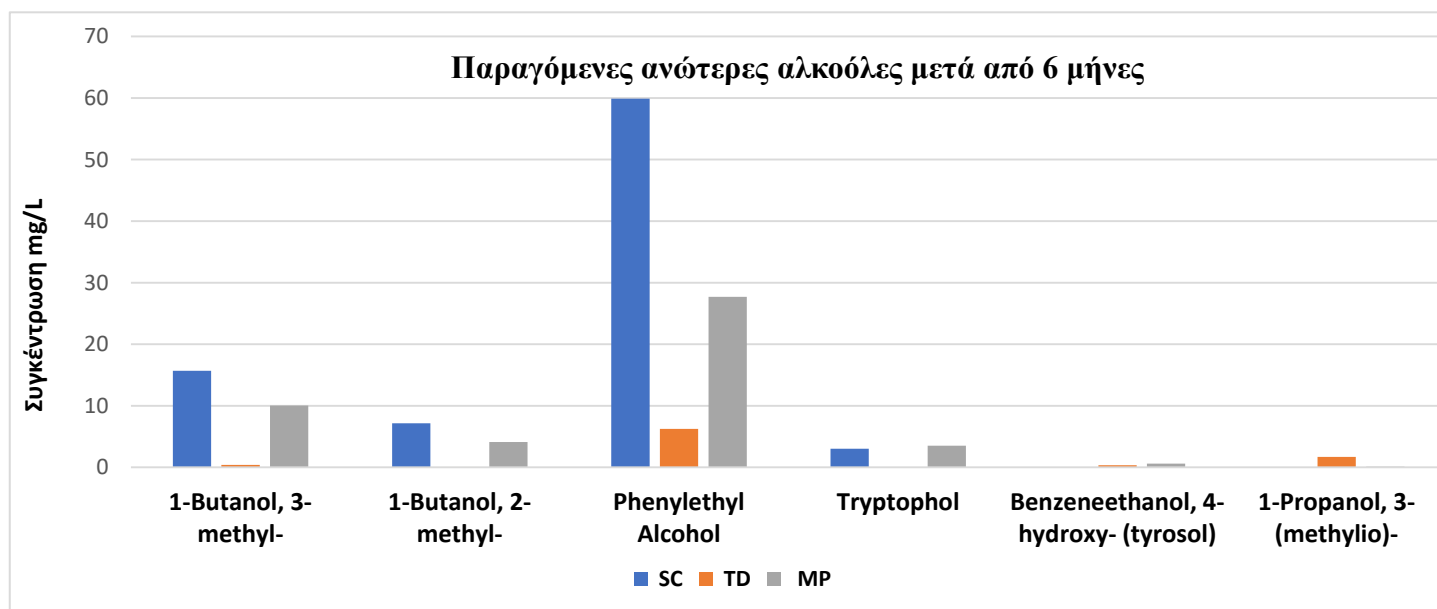
### Παράγόμενοι εστέρες κατά την 1η εβδομάδα



Διάγραμμα 3: Συγκριτικό διάγραμμα εστέρων που παράχθηκαν στον κάθε ζύθο μετά από μία εβδομάδα ωρίμανσης

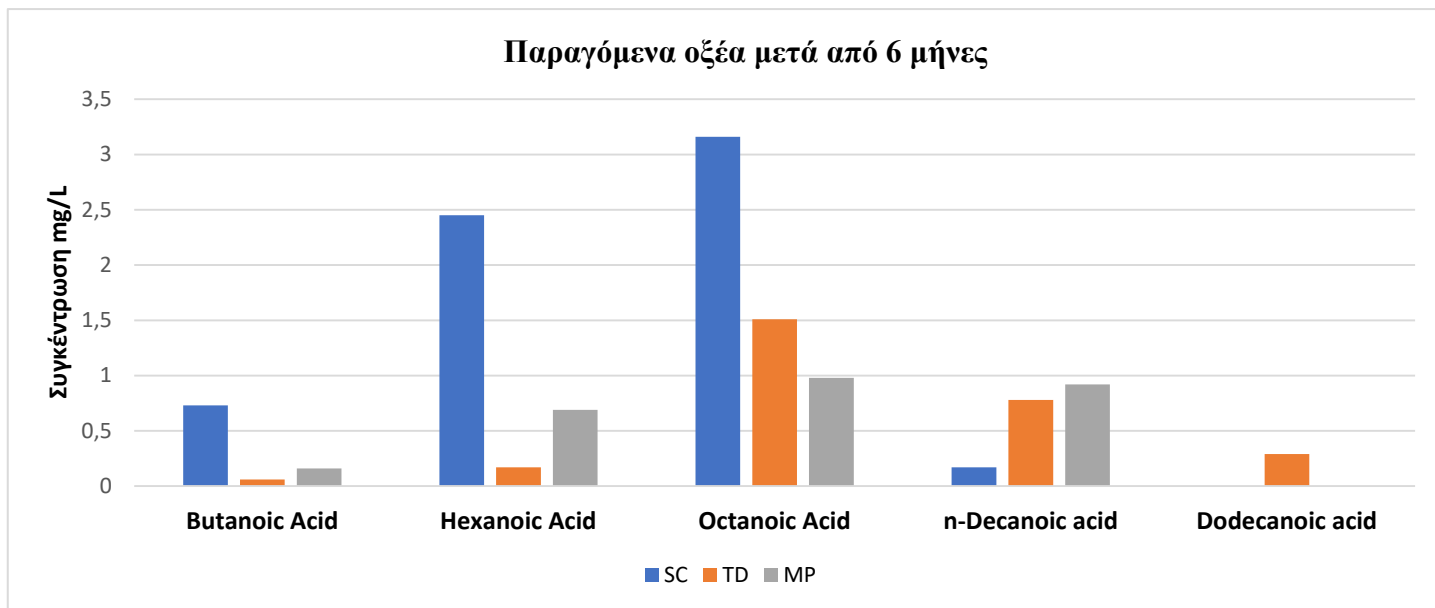
Οι ενώσεις εστέρων ανιχνεύθηκαν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, με παρόμοιες αυτών των *Saccharomyces cerevisiae* και *Torulasporea delbrueckii*, χωρίς όμως να ξεπερνάει κάποια από τις ζυμώσεις τα όρια ανίχνευσης. Συγκεκριμένα, αυτές είναι ο βουτανοϊκός αιθυλεστέρας (αρώματα φρουτώδης, ανανά), ο εξανοϊκός αιθυλεστέρας (αρώματα φρουτώδη, κεριού) και ο οκτανοϊκός αιθυλεστέρας (αρώματα φρουτώδη, ανανά, αχλαδιού) με ελάχιστα μεγαλύτερες τιμές στο ζύθο της *Torulasporea delbrueckii*. Ο οξικός ισοαμυλεστέρας (αρώματα φρουτώδη, μπανάνας, γλυκού) παρουσιάζει τις υψηλότερες τιμές στην ζύμωση με *T. delbrueckii*, αρκετά χαμηλότερες από τον *S. cerevisiae*, ενώ κανένα ίχνος δεν βρέθηκε από την *Metschnikowia pulcherrima*. Ο οξικός αιθυλεστέρας (αρώματα μήλου, λουλουδιών) ανιχνεύθηκε σε μικρές συγκεντρώσεις μόνο στη ζύμωση *Torulasporea delbrueckii*, ενώ δεν ανιχνεύθηκε δωδεκανοϊκός αιθυλεστέρας σε καμία από τις τρεις. Όσον αφορά στον δεκανοϊκό αιθυλεστέρα (αρώματα σαπουνιού, κεριού, λουλουδιών) οι υψηλότερες τιμές εντοπίστηκαν στην ζύμωση με *Torulasporea delbrueckii*, μικρότερες με *Saccharomyces cerevisiae* ενώ κανένα ίχνος δεν βρέθηκε από την *Metschnikowia pulcherrima*. Στο πείραμα από F. Drosou et al. (2021) ανιχνεύθηκαν υψηλότερες συγκεντρώσεις οκτανοϊκού αιθυλεστέρα για τον μη συμβατικό ζυμομύκητα *Torulasporea delbrueckii* στην ζύμωση που πραγματοποιήθηκε στους 20 °C.

Στους παρακάτω πίνακες και διαγράμματα παρουσιάζονται οι ουσίες που παράχθηκαν κατά το πρώτο εξάμηνο αποθήκευσης του ζύθου συγκριτικά με τις τρεις διαφορετικές ζυμώσεις που ολοκληρώθηκαν. Οι ουσίες αυτές διαχωρίζονται σε κατηγορίες ενώσεων: ανώτερες αλκοόλες, οξέα και εστέρες.



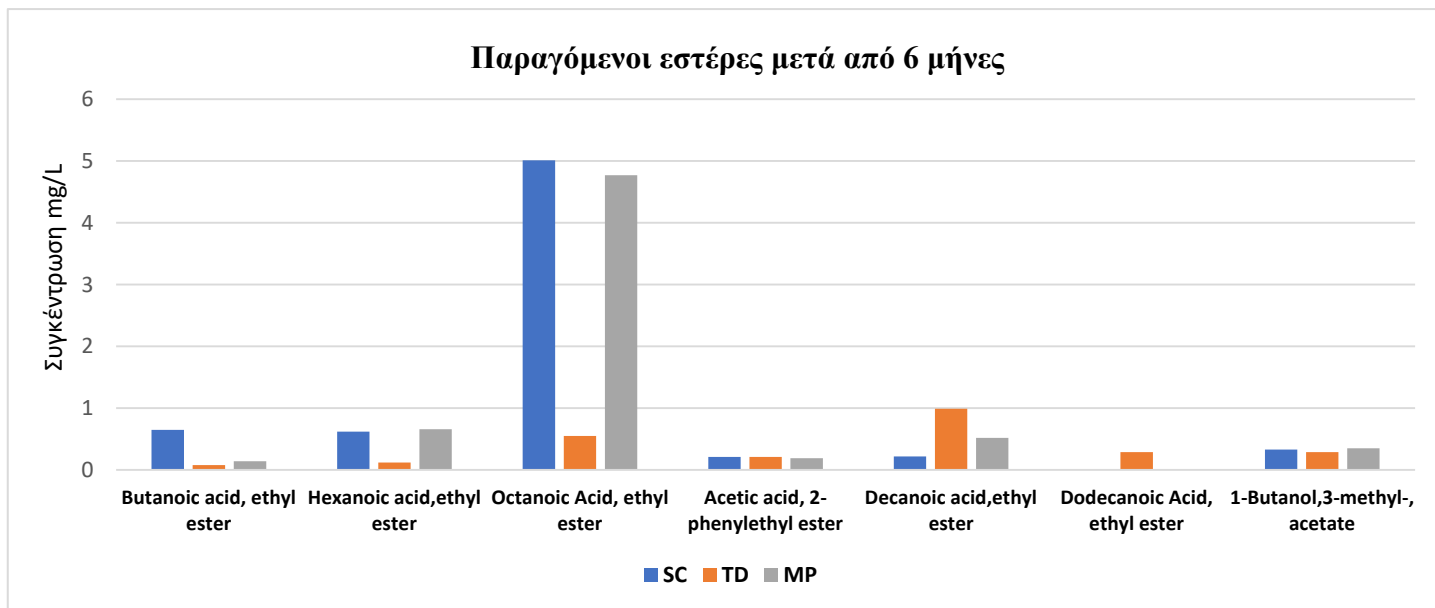
Διάγραμμα 4: Συγκριτικό διάγραμμα ανώτερων αλκοολών που παράχθηκαν στον κάθε ζύθο μετά από 6 μήνες ωρίμανσης

Κατά το 1<sup>ο</sup> εξάμηνο αποθήκευσης του ζύθου, παρατηρήθηκε στην ισοαμυλική αλκοόλη αύξηση στην συγκέντρωσή της, με υψηλότερες τιμές να λαμβάνει στη ζύμωση με *S. cerevisiae* και *M. pulcherrima* ξεπερνώντας και το όριο ανίχνευσης που είναι τα 6 mg/L (Plessis et al., 2017). Η ενεργή αμυλική αλκοόλη φαίνεται να μην παρουσιάζει μεγάλες διαφορές στις συγκεντρώσεις για τους ζύθους με *M. pulcherrima* και *S. cerevisiae* ενώ ίχνη της μόνο βρέθηκαν στον ζύθο με *T. delbrueckii*. Τα όρια ανίχνευσης φαίνεται να ξεπερνάει η φαινυλαιθυλική αλκοόλη (άρωμα τριαντάφυλλου) και για τις 3 ζυμώσεις (13 °C) με ιδιαίτερα υψηλές τιμές σε εκείνη με *S. cerevisiae*. Επιπλέον, η τρυπτοφόλη (αρώματα αμυγδάλου) και η τυροσόλη είναι οι μόνες ενώσεις που οι συγκεντρώσεις τους συναντώνται σε πιο υψηλά στην ζύμωση με *M. pulcherrima* σε σχέση με τις υπόλοιπες. Ωστόσο η τυροσόλη και η μεθανιόλη (1-propanol, 3-methyl)- ανιχνεύθηκαν σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις για όλους τους ζύθους ενώ κανένα ίχνος δεν βρέθηκε με τον *S. cerevisiae*.



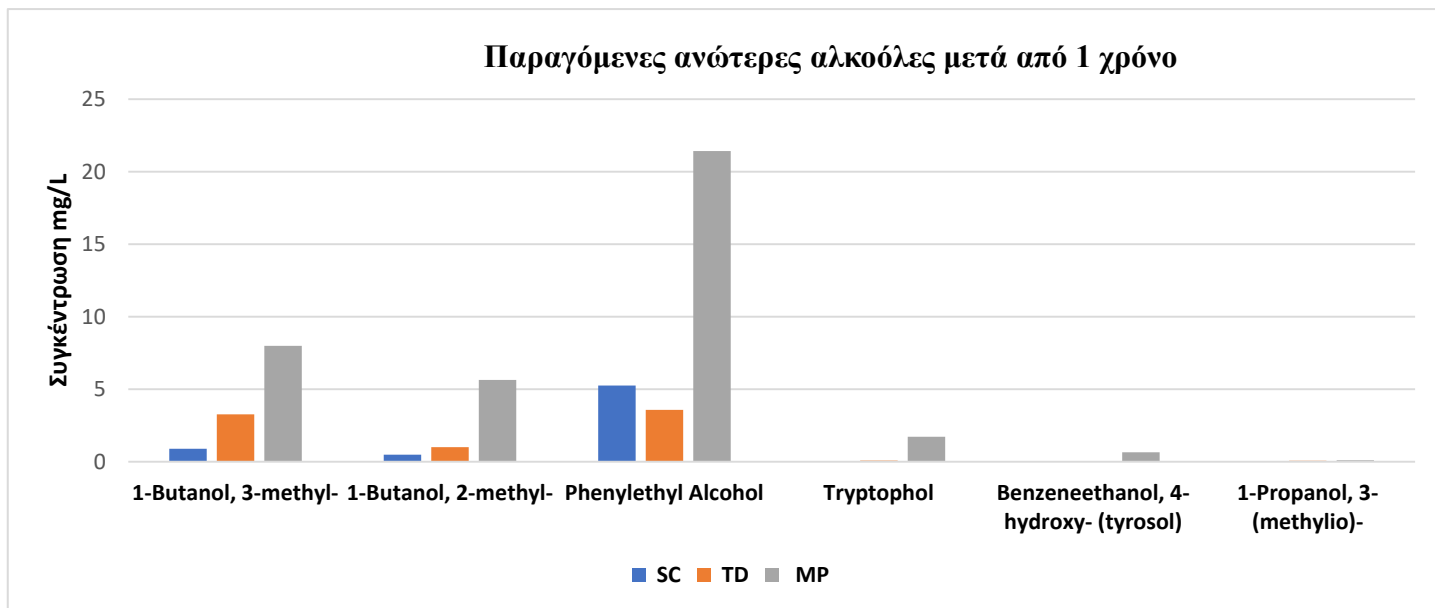
Διάγραμμα 5: Συγκριτικό διάγραμμα οξέων που παράχθηκαν στον κάθε ζύθο μετά από 6 μήνες ωρίμανσης

Παρατηρώντας την εξέλιξη των οξέων δεν φαίνεται κάποιο από τα παραπάνω να ξεπερνάει τα όρια ανίχνευσης σε καμία από τις τρεις περιπτώσεις. Το βουτανοϊκό οξύ παρουσιάζει μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στην ζύμωση με *S. cerevisiae* όπως και το εξανοϊκό, ενώ οι χαμηλότερες είναι εκείνες από την ζύμωση με *T. delbrueckii*. Όσον αφορά το οκτανοϊκό οξύ ανιχνεύθηκε σε υψηλότερη συγκέντρωση και πάλι από τον *S.cerevisiae*, σε αντίθεση με το δεκανοϊκό οξύ (n-Decanoic Acid) το οποίο φαίνεται να παράγεται στις χαμηλότερες τιμές στην ζύμωση αυτή συγκριτικά με τις άλλες δύο. Τέλος το δωδεκανοϊκό οξύ παρατηρήθηκε και πάλι να ανιχνεύεται μόνο στην ζύμωση με *T. delbrueckii*.



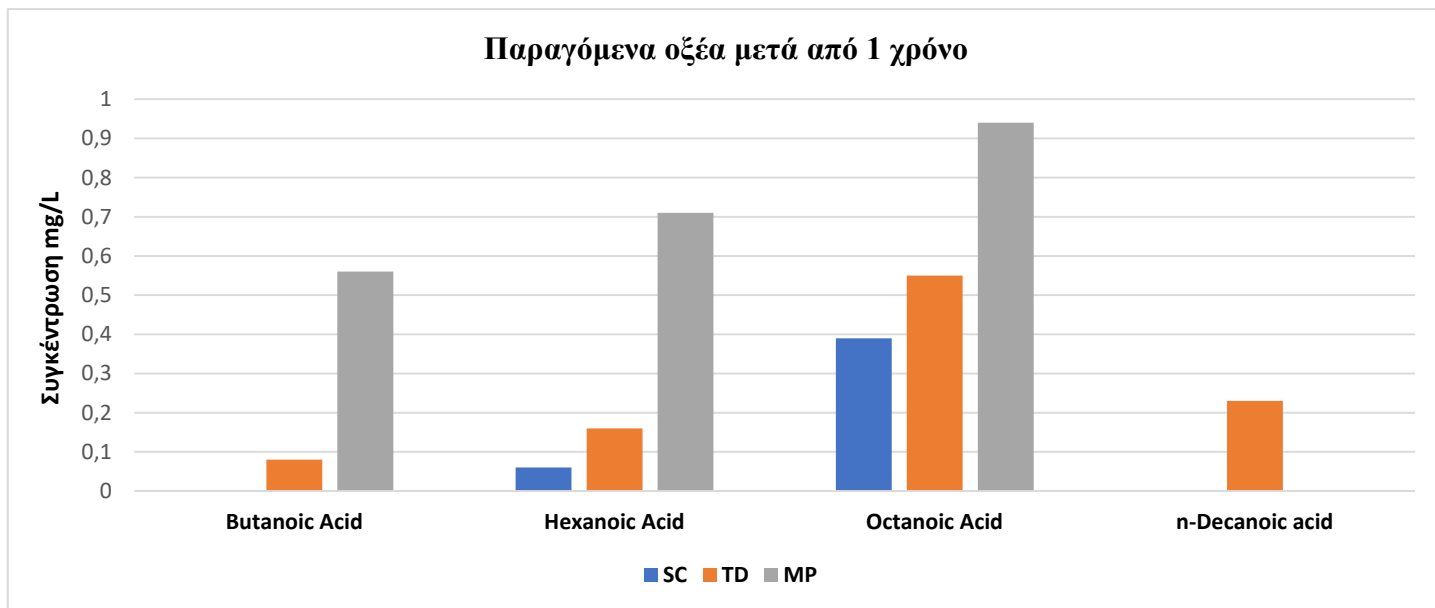
Διάγραμμα 6: Συγκριτικό διάγραμμα εστέρων που παράχθηκαν στον κάθε ζύθο μετά από 6 μήνες ωρίμανσης

Όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε, την υψηλότερη συγκέντρωση στους εστέρες εμφανίζει ο οκτανοϊκός αιθυλεστέρας (αρώματα φρουτώδη, αχλαδιού) ξεπερνώντας τα όρια ανίχνευσης για τις ζυμώσεις με *S. cerevisiae* και *M. pulcherrima*, ενώ σε χαμηλότερες τιμές συναντάται στην ζύμωση με *T. delbrueckii*. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις κάτω από το όριο ανίχνευσης και χωρίς μεγάλες αποκλίσεις μεταξύ των τριών ζυμώσεων ανιχνεύθηκαν ο βουτανοϊκός αιθυλεστέρας, ο οξικός φαινυλαιθυλεστέρας, οξικός ισοαμυλεστέρας και ο δεκανοϊκός αιθυλεστέρας με υψηλότερες τιμές στην ζύμωση με *T. delbrueckii*.



Διάγραμμα 7: Συγκριτικό διάγραμμα ανώτερων αλκοολών που παράχθηκαν στον κάθε ζύθο μετά από 1 χρόνο ωρίμανσης

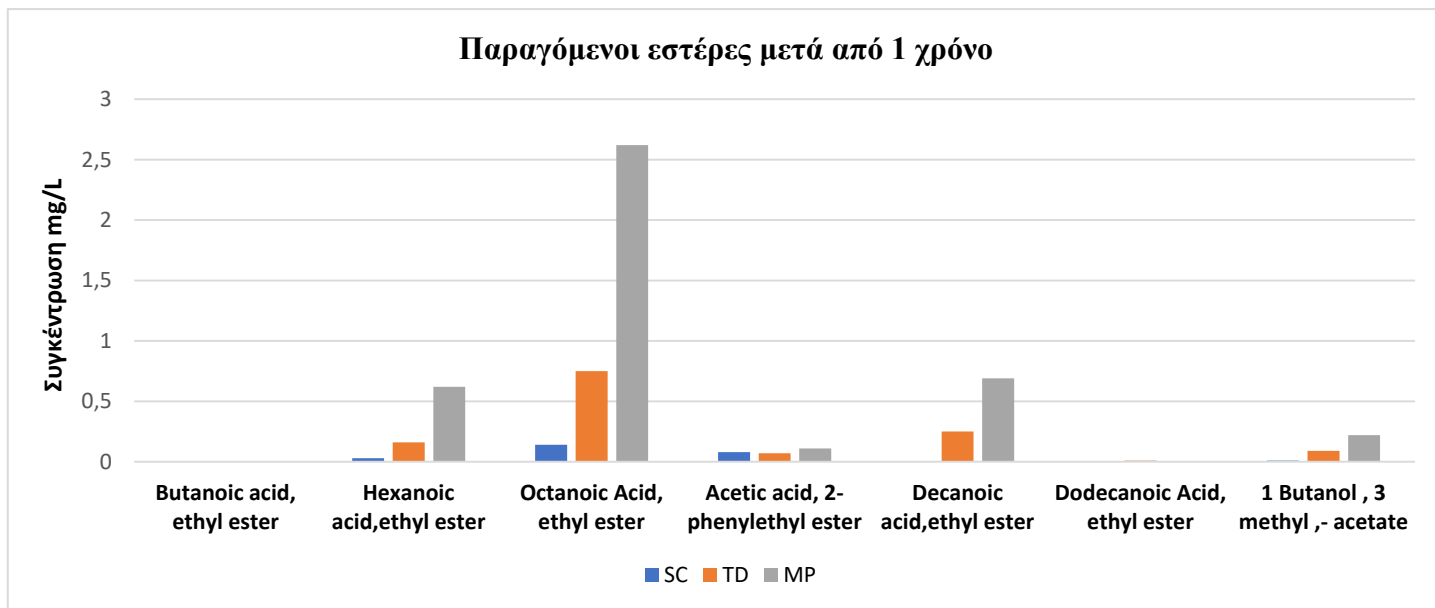
Μετά τον πρώτο χρόνο αποθήκευσης των ζύθων διακρίνεται σημαντική αύξηση στην συγκέντρωση κάποιων αλκοολών, ιδιαίτερα για τον ζύθο με *M. pulcherrima*. Συγκεκριμένα φαίνεται να ξεπερνάει τα όρια ανίχνευσης η ισοαμυλική αλκοόλη η ενεργή αμυλική αλκοόλη και η φαινυλαιθυλική αλκοόλη καθώς η συγκεκριμένη βρίσκεται πάνω από το όριο ανίχνευσης. Ακόμη, η τρυπτοφόλη και η τυροσόλη ανιχνεύθηκαν και πάλι μόνο για την *M. pulcherrima* καθώς για τις άλλες δυο ζυμώσεις είτε εντοπίστηκαν ίχνη, είτε δεν ανιχνεύθηκαν καθόλου.



Διάγραμμα 8: Συγκριτικό διάγραμμα οξέων που παράχθηκαν στον κάθε ζύθο μετά από 1 χρόνο ωρίμανσης

Από το σύνολο των οξέων παρατηρείται ότι στο ζύθο που προήλθε από την *M. pulcherrima* ανιχνεύθηκαν όλες οι ενώσεις των οξέων σε αρκετά υψηλότερες συγκεντρώσεις συγκριτικά, χωρίς όμως να ξεπερνούν τα όρια ανίχνευσής τους. Ωστόσο, το δεκανοϊκό οξύ βρέθηκε μόνο στην ζύμωση της *T. delbrueckii*, καθώς και το δωδεκανοϊκό οξύ δεν ανιχνεύθηκε πουθενά.

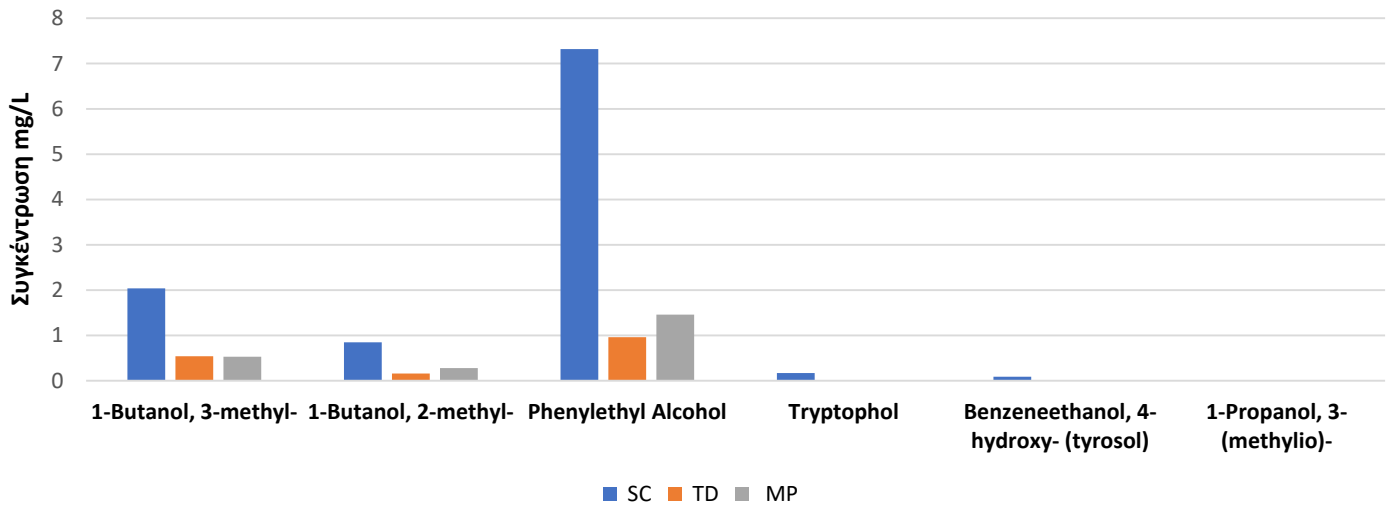




Διάγραμμα 9: Συγκριτικό διάγραμμα εστέρων που παράχθηκαν στον κάθε ζύθο μετά από 1 χρόνο ωρίμανσης

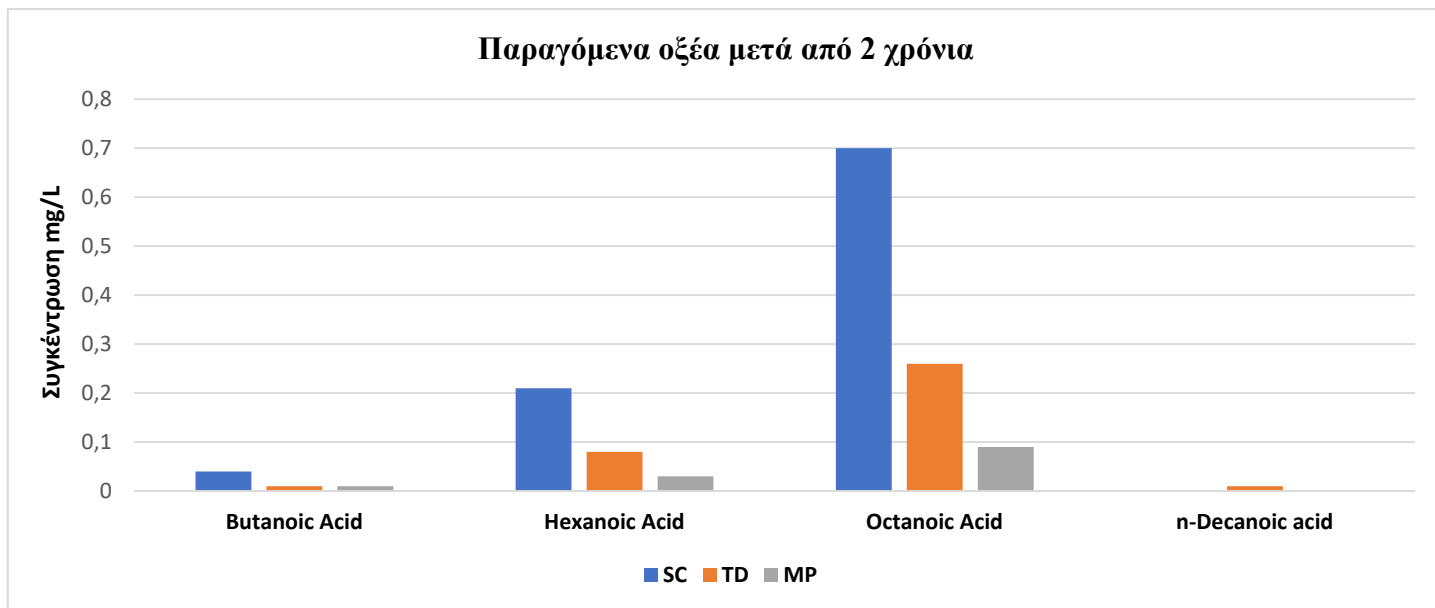
Από τα παραπάνω κατανοούμε ότι σε γενικές γραμμές το σύνολο των εστέρων βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα, χωρίς να ξεπερνάει τα όρια ανίχνευσης. Εξαιρέση αποτελεί ο οκτανοϊκός αιθυλεστέρας, ο εξανοϊκός αιθυλεστέρας και ο δεκανοϊκός αιθυλεστέρας οι οποίοι εμφανίζονται στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις τους στις ζυμώσεις με *M. pulcherrima* και στις χαμηλότερες σε εκείνες με τον ζυμομύκητα *S. cerevisiae*. Επίσης, ο βουτανοϊκός και ο δωδεκανοϊκός φαίνεται να βρίσκονται μόνο στην ζύμωση με *T. delbrueckii*, καθώς στις υπόλοιπες δύο δεν ανιχνεύθηκαν καν.

### Παραγόμενες ανώτερες αλκοόλες μετά από 2 χρόνια



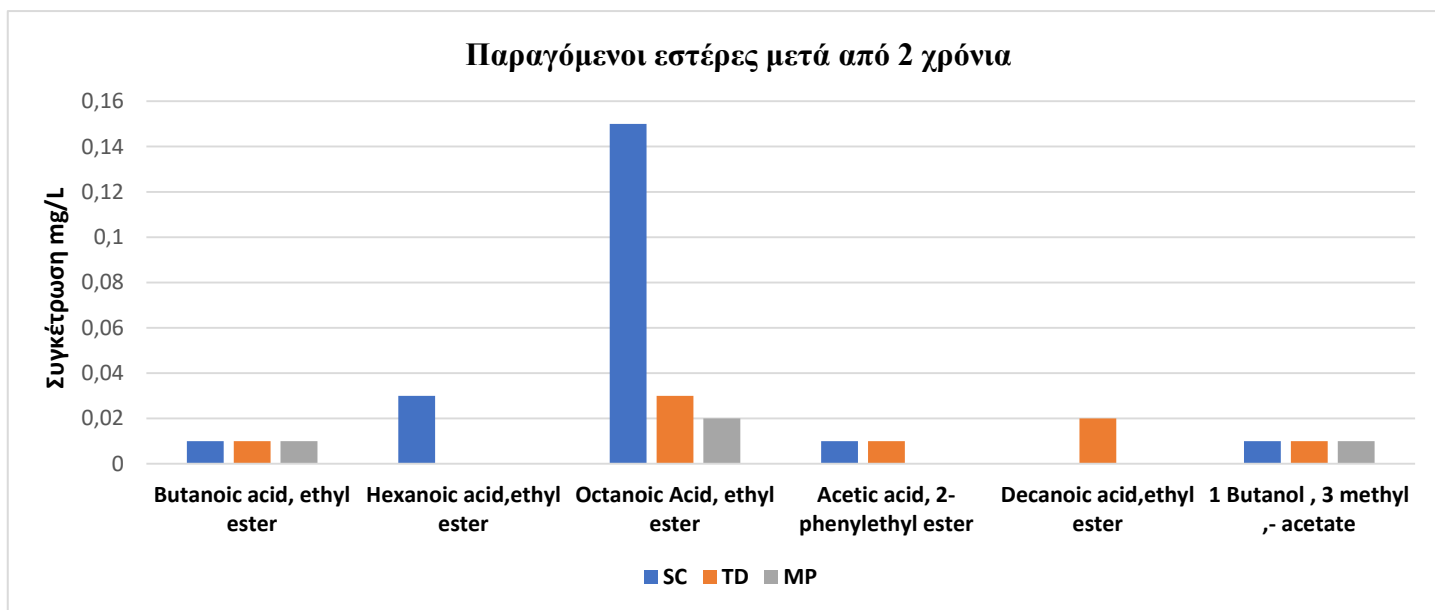
Διάγραμμα 10: Συγκριτικό διάγραμμα ανώτερων αλκοολών που παράχθηκαν στον κάθε ζύθο μετά από 2 χρόνια ωρίμανσης

Από το σύνολο των αλκοολών την μεγαλύτερη συγκέντρωση παρουσιάζει η φαινυλαιθυλική αλκοόλη, οι τιμές της οποίας συναντώνται σε χαμηλά επίπεδα και για τους δύο συμβατικούς μύκητες. Όσον αφορά στις υπόλοιπες αλκοόλες, μπορούμε να διακρίνουμε ότι σε αυτό το χρόνο ωρίμανσης των ζύθων οι τιμές τους βρίσκονται σε χαμηλά επίπεδα ακόμη και κάποιες οι οποίες δεν ανιχνεύθηκαν για τις ζυμώσεις με *M. pulcherrima* και *T. delbrueckii*. Αυτές είναι η τρυπτοφόλη, η τυροσόλη και η μεθιονόλη της οποίας ίχνη δεν εμφανίστηκαν ακόμη και στην ζύμωση με *S. cerevisiae*.



Διάγραμμα 11 : Συγκριτικό διάγραμμα οξέων που παράχθηκαν στον κάθε ζύθο μετά από 2 χρόνια ωρίμανσης

Όπως μπορούμε να διακρίνουμε από τα παραπάνω, τα οξέα βρίσκονται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις για τους ζύθους με μη συμβατικούς μύκητες, όπως επίσης ότι ως επί το πλείστον ανιχνεύθηκαν σε πολύ μικρές ποσότητες. Το βουτανοϊκό, το εξανοϊκό και το οκτανοϊκό οξύ συναντώνται στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις τους στις ζυμώσεις με τον ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* χωρίς όμως να ξεπερνούν τα όρια ανίχνευσης που ορίζει η βιβλιογραφία. Ίχνη του δεκανοϊκού οξέος ανιχνεύθηκαν μόνο στο ζύθο με *Metschnikowia pulcherrima*, καθώς και το δεκανοϊκό που και πάλι δεν βρέθηκε σε κανέναν από τους τρεις ζύθους.



Διάγραμμα 12: Συγκριτικό διάγραμμα εστέρων που παράχθηκαν στον κάθε ζύθο μετά από 2 χρόνια ωρίμανσης

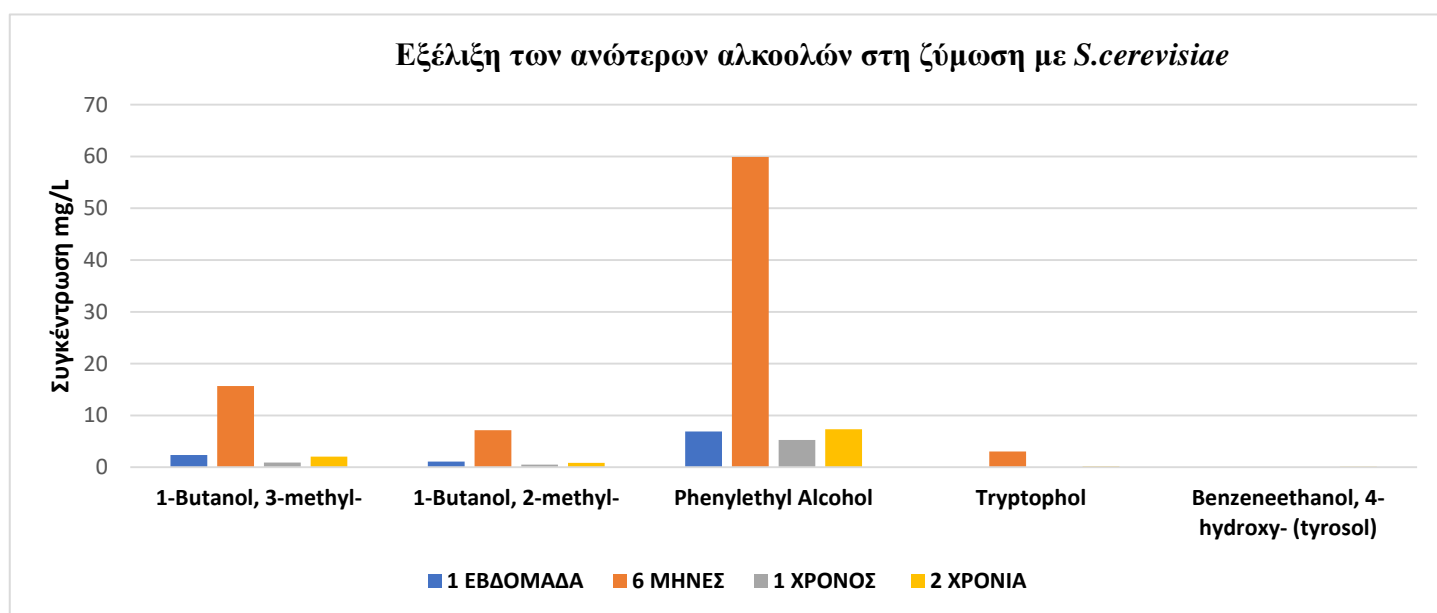
Ύστερα από 2 χρόνια διακρίνουμε αρκετά χαμηλές συγκεντρώσεις στις ενώσεις των εστέρων. Ο βουτανοϊκός αιθυλεστέρας (άρωμα φρουτώδη, ανανά) και ο οξικός ισοαμυλεστέρας (άρωμα μπανάνας) ανιχνεύθηκαν σε παρόμοιες συγκεντρώσεις και για τα τρία είδη ζυμομυκήτων σε πολύ χαμηλές τιμές 0.01 mg/L. Σε ελάχιστα πιο υψηλές συγκεντρώσεις παρατηρούμε ότι βρέθηκε ο εξανοϊκός αιθυλεστέρας (άρωμα μήλου). Ενδιαφέρον παρουσιάζει ο οκτανοϊκός αιθυλεστέρας (άρωμα φρουτώδες, μπανάνα, αχλαδιού) του οποίου η συγκέντρωση βρέθηκε μειωμένη σημαντικά στον ζύθο με *M. pulcherrima*. Τέλος, ο δεκανοϊκός αιθυλεστέρας (άρωμα κεριού) ανιχνεύθηκε μόνο στο ζύθο με *T. delbrueckii*, ενώ ίχνη του δωδεκανοϊκού (άρωμα φρουτώδες, γλυκού, σαπουνιού) δεν βρέθηκαν σε καμία από τις τρεις ζυμώσεις.

## ΣΥΝΟΛΙΚΑ

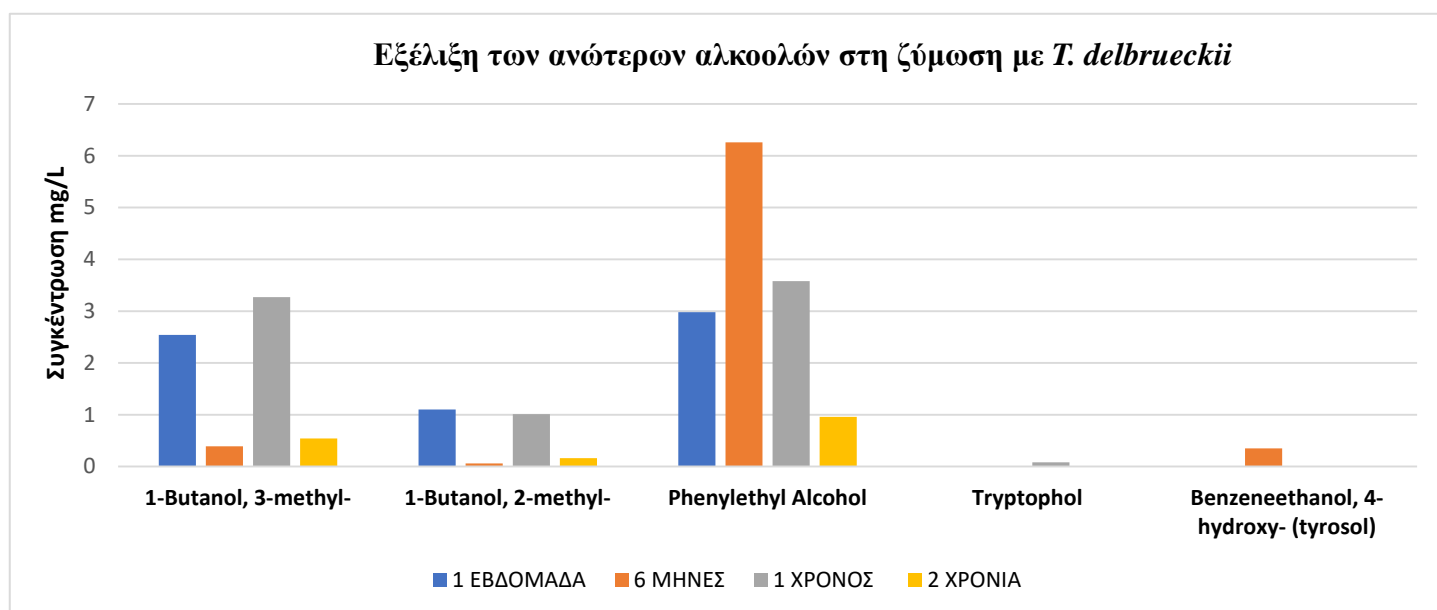
Συμπερασματικά, οι αρωματικές ενώσεις που παρουσίασαν τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στο σύνολο ήταν η φαινυλαιθυλική αλκοόλη, η ισοαμυλική αλκοόλη, η ενεργή αμυλική αλκοόλη, η τρυπτοφόλη και ο οκτανοϊκός αιθυλεστέρας. Επιπλέον παρατηρήθηκε ότι στην πλειοψηφία οι ενώσεις παρουσίασαν τις μέγιστες τιμές τους στον 6<sup>ο</sup> μήνα ωρίμανσης των ζύθων. Πιο αναλυτικά, η φαινυλαιθυλική αλκοόλη που προσδίδει αρώματα τριαντάφυλλου, ανιχνεύθηκε πάνω από τα όρια που ορίζει η βιβλιογραφία για τους ζύθους που ζυμώθηκαν και από τους δύο non-*Saccharomyces* στους 13 °C. Ωστόσο παρατηρήθηκε ότι ο ζύθος που προέρχεται από την ζύμωση με *Metschnikowia pulcherrima* διατηρούσε υψηλές συγκεντρώσεις (21.43 mg/L) φαινυλαιθυλικής αλκοόλης ακόμη και μετά τον 1<sup>ο</sup> χρόνο παλαίωσης των ζύθων καθώς για εκείνη με *Torulasporea delbrueckii* παρατηρήθηκε σημαντική ελάττωση. Ακόμη, κατά τον 2<sup>ο</sup> χρόνο οι ζυμώσεις παρουσιάζουν χαμηλές τιμές. Η 3-μεθύλ-βουτανόλη και η 2-μεθύλ-βουτανόλη που συνεισφέρουν στο αρωματικό προφίλ δίνοντας αρώματα μπανάνας, ζυμελαίου, ούισκι και αλκοολούχου ποτού αντίστοιχα, συναντώνται στην μεγαλύτερη συγκέντρωσή τους μετά τον 1<sup>ο</sup> χρόνο για την ζύμωση με *Metschnikowia pulcherrima*. Στον δεύτερο χρόνο οι εν λόγω ανώτερες αλκοόλες ανιχνεύθηκαν για όλους τους ζύθους σε συγκεντρώσεις κάτω του ορίου ανίχνευσης. Η τρυπτοφόλη που προσδίδει αρώματα αμυγδάλου εντοπίστηκε σε υψηλές συγκεντρώσεις, συγκριτικά με τις υπόλοιπες ενώσεις μόνο κατά τον 6<sup>ο</sup> μήνα ωρίμανσης μόνο για μία από τις μη συμβατικές ζύμες, και συγκεκριμένα για τη *Metschnikowia pulcherrima*. Στα επόμενα χρονικά διαστήματα που πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις είτε οι τιμές της βρέθηκαν αρκετά χαμηλές είτε δεν ανιχνεύθηκε καθόλου. Ο οκτανοϊκός αιθυλεστέρας ο οποίος συνεισφέρει στο αρωματικό προφίλ με αρώματα φρουτώδεις, αχλαδιού, μπανάνας παρουσίασε υψηλές συγκεντρώσεις για τον ζύθο που ζυμώθηκε από την *Metschnikowia pulcherrima* οι οποίες παρέμειναν πάνω από τα όρια ανίχνευσης και μετά τον ένα χρόνο. Γενικά, κατά τον 2<sup>ο</sup> χρόνο φαίνεται στο σύνολο των ενώσεων να κυριαρχούν οι ανώτερες αλκοόλες, ενώ αντίθετα τα οξέα είτε παρουσίασαν μείωση στην συγκέντρωσή τους και ανιχνεύθηκαν σε πολύ μικρή συγκέντρωση στον συγκεκριμένο χρόνο είτε δεν ανιχνεύθηκαν καθόλου.

### 3.1 Σύγκριση δειγμάτων ανά ζύμωση κατά την διάρκεια δύο ετών

Παρακάτω εμφανίζονται οι ουσίες που παράχθηκαν από τον κάθε ζυμομύκητα συμβατικό και μη μεμονωμένα με την πάροδο του χρόνου. Οι ουσίες αυτές διαχωρίζονται σε κατηγορίες ενώσεων: αλκοόλες, οξέα και εστέρες. Το είδος των ουσιών προσδιορίστηκε με την χρήση ειδικού λογισμικού, ενώ ως πρότυπο διάλυμα στον ποσοτικό προσδιορισμό χρησιμοποιήθηκε η 3-οκτανόλη.

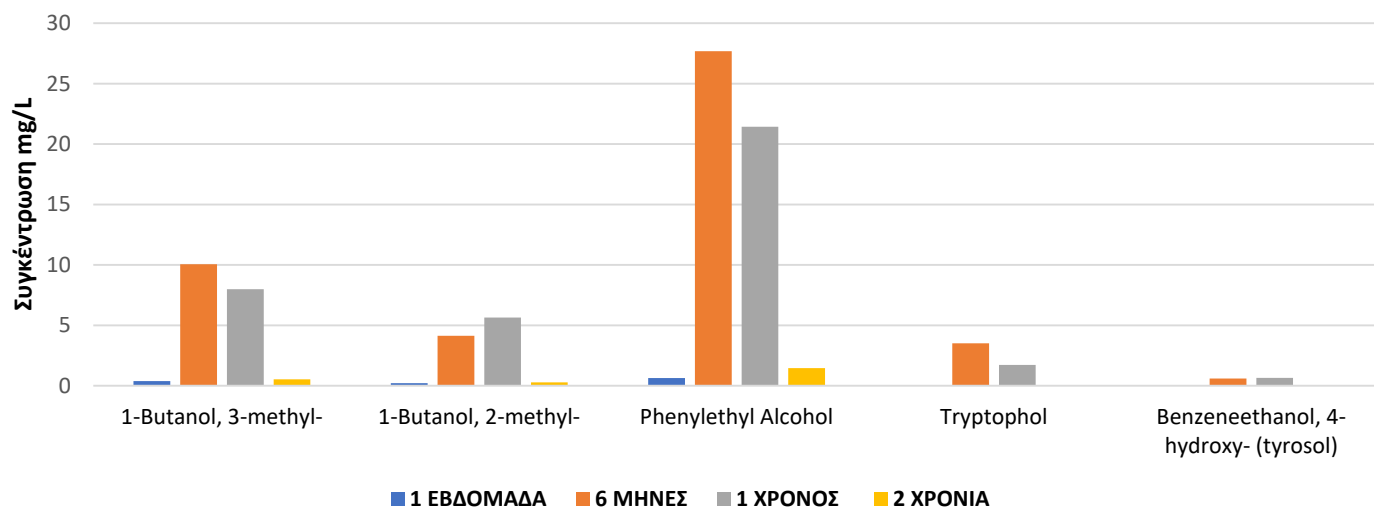


Διάγραμμα 13: Συγκριτικό διάγραμμα των ανώτερων αλκοολών που παράχθηκαν στον ζύθο από την ζύμωση με *S. cerevisiae* στους 13 °C κατά την ωρίμανσή του



Διάγραμμα 14: Συγκριτικό διάγραμμα των ανώτερων αλκοολών που παράχθηκαν στον ζύθο από την ζύμωση με *T. delbrueckii* στους 13 °C κατά την ωρίμανσή του

### Εξέλιξη των ανώτερων αλκοολών στη ζύμωση με *M.pulcherrima*

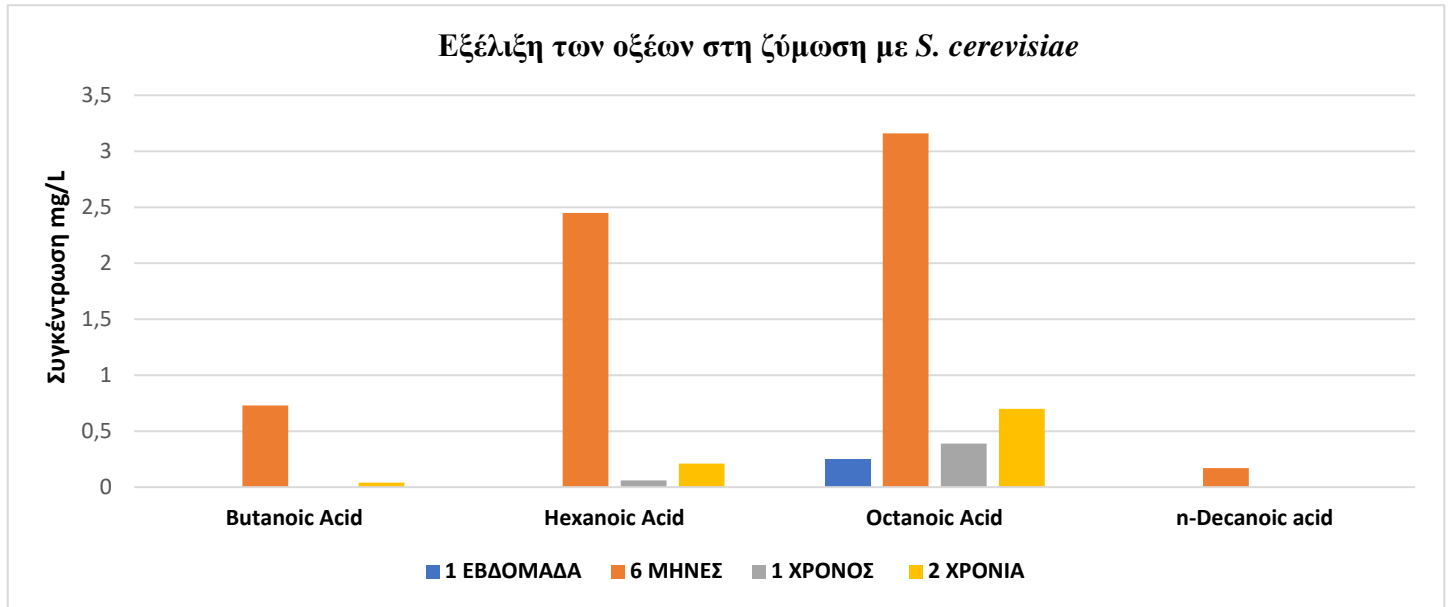


Διάγραμμα 15: Συγκριτικό διάγραμμα των ανώτερων αλκοολών που παράχθηκαν στον ζύθο από την ζύμωση με *M. pulcherrima* στους 13 °C κατά την ωρίμανσή του

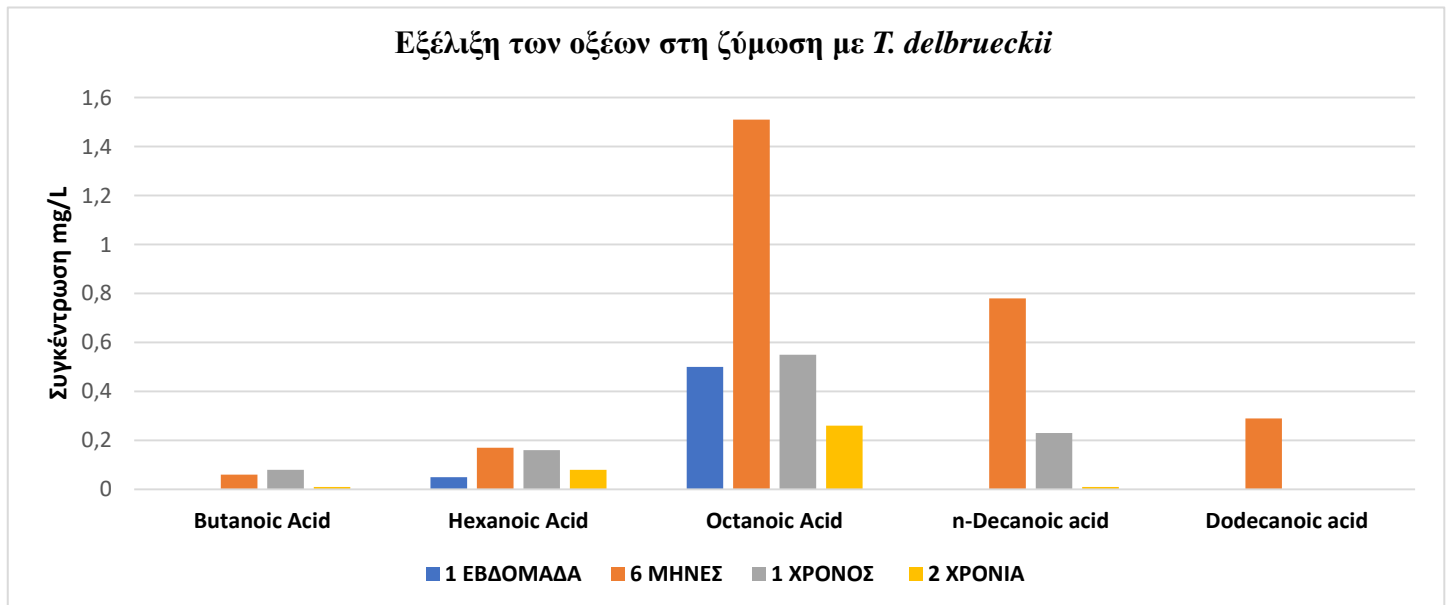
Όπως φαίνεται από το διάγραμμα 13, οι μεγαλύτερες αλλαγές στις συγκεντρώσεις παρατηρούνται στην 3-μεθυλ-βουτανόλη, 2-μεθυλ-βουτανόλη και στην φαινυλαιθυλική αλκοόλη. Και οι τρεις αλκοόλες ξεπερνούν τα όρια ανίχνευσης μετά τους 6 μήνες αποθήκευσης ενώ μετά τον 1<sup>ο</sup> και τον 2<sup>ο</sup> χρόνο οι συγκεντρώσεις τους μειώνονται τόσο που δεν φαίνεται να επιδρούν στη σύνθεση. Ακόμη παρατηρήθηκε ότι οι συγκεντρώσεις τους μετά τα δυο χρόνια εμφάνισαν μικρή αύξηση στην συγκέντρωσή τους, χωρίς όμως να ξεπεράσει ούτε τα όρια ούτε τις τιμές του πρώτου εξαμήνου. Η τυροσόλη διαπιστώθηκε ότι δεν παράχθηκε από τον σακχαρομύκητα ενώ η τρυπτοφόλη εμφάνισε κάποιες υψηλές τιμές στον 6<sup>ο</sup> μήνα που στην συνέχεια ελαττώθηκαν. Τα μεγάλα ποσοστά των αλκοολών αυτών δηλώνουν ότι ο συγκεκριμένος ζύθος στο μισό χρόνο μετά την εμφιάλωσή του θα έχει αρώματα τριαντάφυλλου που προέρχονται από την φαινυλαιθυλική αλκοόλη, ήπια φρουτώδη λόγω της τρυπτοφόλης, από τις αμυλικές αλκοόλες.

Όσον αφορά τον ζύθο που προέρχεται από την ζύμωση με *Torulaspora delbrueckii* μόνο η φαινυλαιθυλική αλκοόλη διαπιστώνεται να ξεπερνά τα όρια ανίχνευσης μετά τους 6 μήνες ενώ όλες οι υπόλοιπες ενώσεις ανιχνεύθηκαν σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις. Τέλος παρατηρείται μετά το πέρας των 2 χρόνων οι αμυλικές αλκοόλες να αυξάνουν και πάλι την συγκέντρωσή τους και να βρίσκονται σε πιο υψηλά επίπεδα απ'ότι ανιχνεύθηκαν ένα χρόνο πριν.

Η *Metschnikowia pulcherrima* παρομοίως παρουσιάζει τις μεγαλύτερες τιμές στον μισό χρόνο μετά την εμφιάλωσή της. Σε σύγκριση με τον άλλο μη συμβατικό ζυμομύκητα που μελετήθηκε εμφάνισε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε όλες τις αλκοόλες των τελευταίων δειγμάτων.

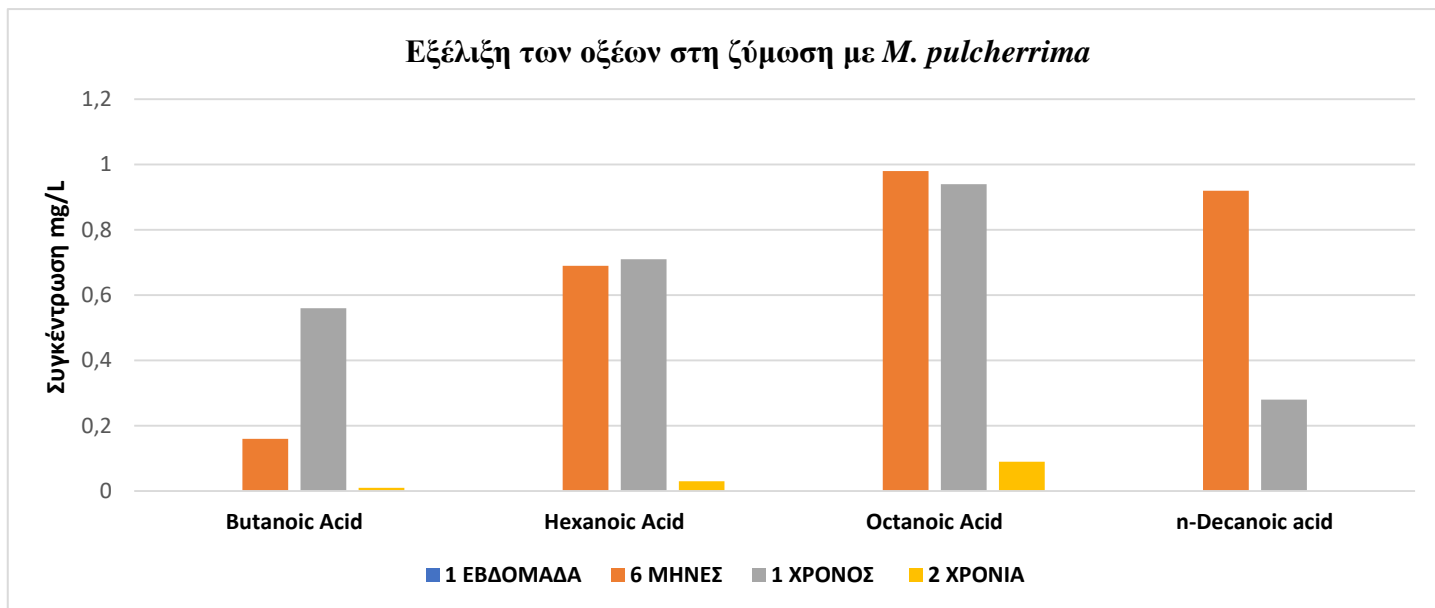


Διάγραμμα 16: Συγκριτικό διάγραμμα των οξέων που παράχθηκαν στον ζύθο από την ζύμωση με *S. cerevisiae* στους 13 °C κατά την ωρίμανσή του



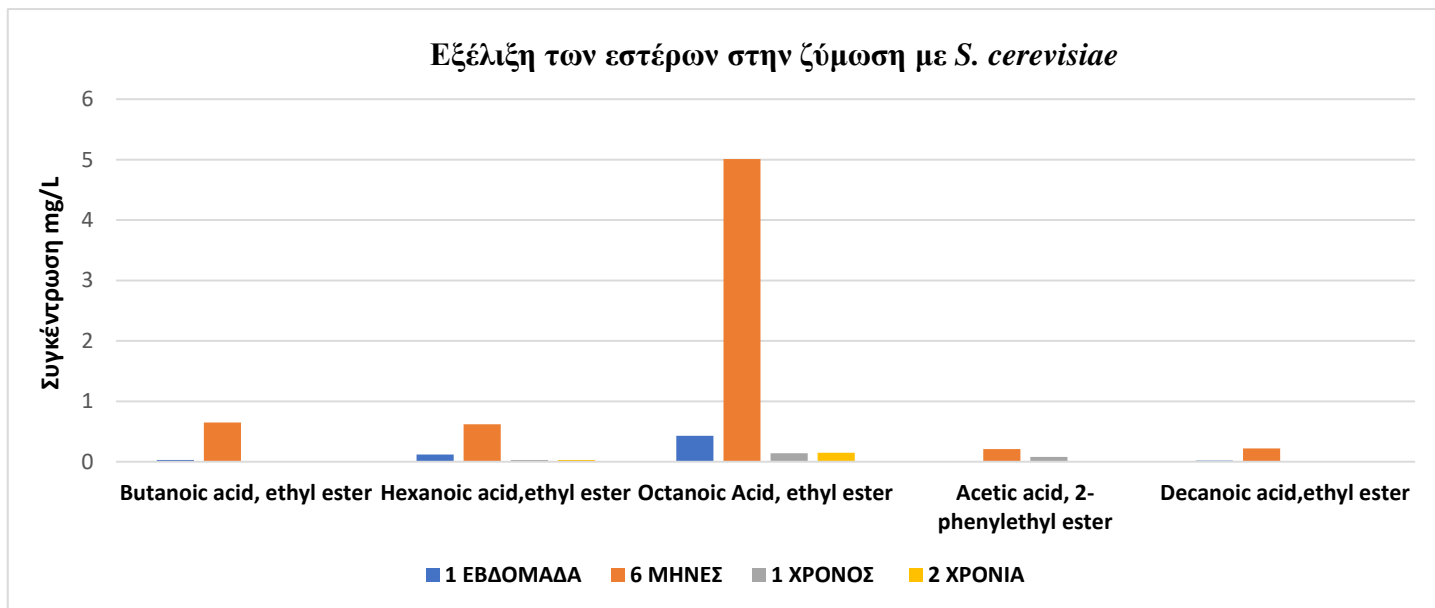
Διάγραμμα 17: Συγκριτικό διάγραμμα των οξέων που παράχθηκαν στον ζύθο από την ζύμωση με *T. delbrueckii* στους 13 °C κατά την ωρίμανσή του



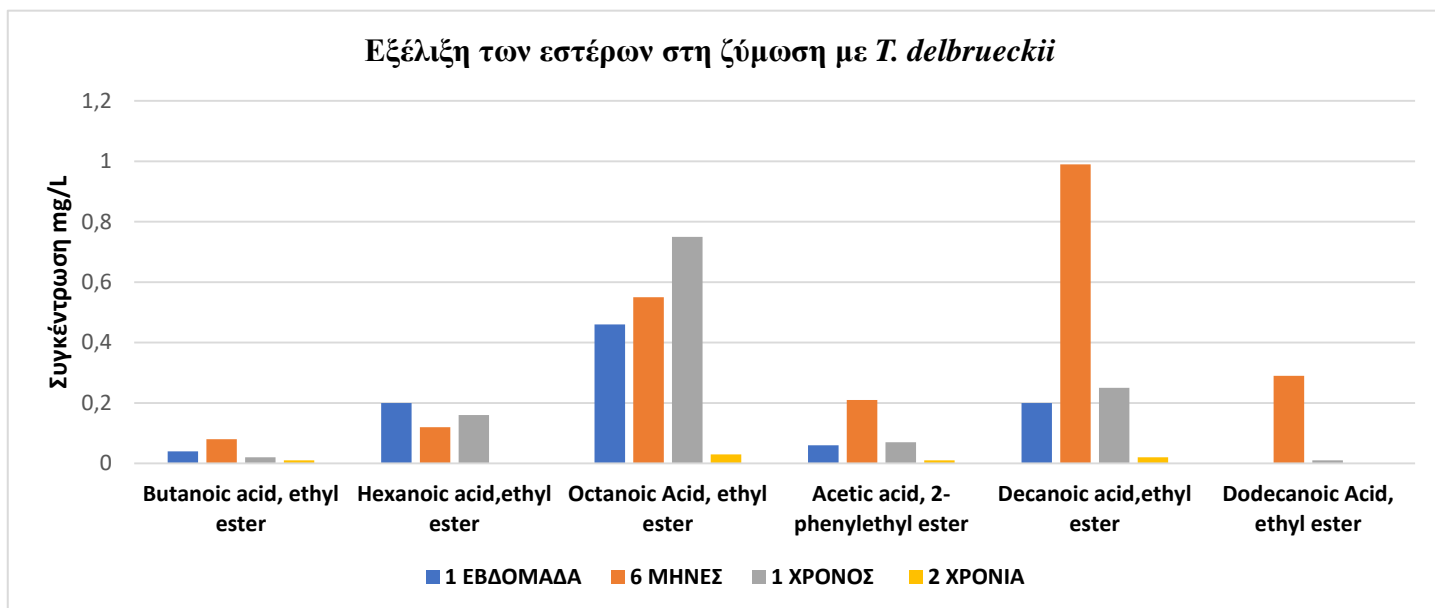


Διάγραμμα 18: Συγκριτικό διάγραμμα των οξέων που παράχθηκαν στον ζύθο από την ζύμωση με *M. pulcherrima* στους 13 °C κατά την ωρίμανσή του

Από τα πιο πάνω διαγράμματα διαπιστώνουμε ότι ο ζύθος που προέρχεται από την *Torulasporea delbrueckii* ανέπτυξε την 1<sup>η</sup> εβδομάδα τις μεγαλύτερες ποσότητες οξέων συγκριτικά με τις υπόλοιπες δύο και πάλι όμως σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Στους έξι μήνες φαίνεται ότι η *Metschnikowia pulcherrima* είχε την ικανότητα να παράγει τις μεγαλύτερες ποσότητες δεκανοϊκού οξέος. Μετά τον 1<sup>ο</sup> χρόνο παρατηρείται αύξηση στην συγκέντρωση των οξέων για τον ζύθο με *Metschnikowia pulcherrima* σημειώνοντας τις μεγαλύτερες τιμές όλων των οξέων συγκριτικά και με τους τρεις ζύθους. Σε γενικές γραμμές όμως καμία ένωση οξέων από όλες τις ζυμώσεις δεν ανιχνεύθηκε κοντά στα όρια ανίχνευσης που ορίζει η βιβλιογραφία.

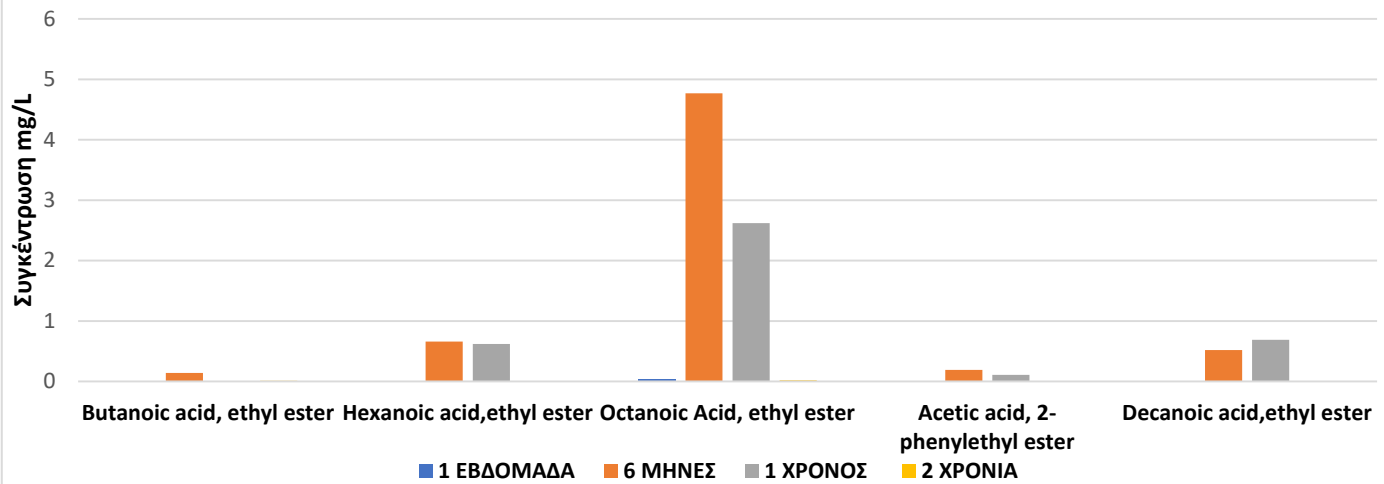


Διάγραμμα 19: Συγκριτικό διάγραμμα των εστέρων που παράχθηκαν στον ζύθο από την ζύμωση με *S. cerevisiae* στους 13 °C κατά την ωρίμανσή του



Διάγραμμα 20: Συγκριτικό διάγραμμα των εστέρων που παράχθηκαν στον ζύθο από την ζύμωση με *T. delbrueckii* στους 13 °C κατά την ωρίμανσή του

### Εξέλιξη των εστέρων στη ζύμωση με *M. pulcherrima*



Διάγραμμα 21: Συγκριτικό διάγραμμα των εστέρων που παράχθηκαν στον ζύθο από την ζύμωση με *M. pulcherrima* στους 13 °C κατά την ωρίμανσή του

Στο σύνολο των εστέρων της πρώτης εβδομάδας το μεγαλύτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο ζύθος με *Metschnikowia pulcherrima* καθώς με την πάροδο του χρόνου αυξήθηκαν οι συγκεντρώσεις των ενώσεις και ιδιαίτερα του οκτανοϊκού αιθυλεστέρα. Μετά τον 1<sup>ο</sup> χρόνο αν και οι συγκεντρώσεις της μειώθηκαν παρουσίασε και πάλι τιμές άνω του ορίου ανίχνευσης που αποδεικνύουν ότι ο συγκεκριμένος ζύθος περιέχει αρώματα μήλου και γλυκάνισου από τον εξανοϊκό αιθυλεστέρα, και αρώματα βερίκοκου και μπανάνας από τον οκτανοϊκό αιθυλεστέρα. Τέλος στον 2<sup>ο</sup> χρόνο ανιχνεύθηκαν μικρές ποσότητες κάποιων εστέρων και συγκεκριμένα μόνο ο οκτανοϊκός αιθυλεστέρας διαπιστώθηκε να είναι κοντά στα όρια ανίχνευσης.

## ΣΥΝΟΛΙΚΑ

Σχετικά με τις ανώτερες αλκοόλες παρατηρήθηκε αύξηση στην συγκέντρωσή τους μετά τους 6 μήνες και ιδιαίτερα για την φαινυλαιθυλική αλκοόλη, την ισοαμυλική και την ενεργή αμυλική αλκοόλη στο ζύθο που παράχθηκε από τον σακχαρομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*. Σε σύγκριση με τους μη συμβατικούς, η *Metschnikowia pulcherrima* διαπιστώθηκε πιο ικανή στην παραγωγή μεγαλύτερων ποσοτήτων ανώτερων αλκοολών μετά την εμφιάλωση ακόμη και μετά τον 1<sup>ο</sup> χρόνο.

Η σύγκριση της εξέλιξης των εστέρων για τους τρεις ζυμομύκητες, αποδεικνύει ότι οι ζύθοι με *Metschnikowia pulcherrima* περιέχουν υψηλές ποσότητες εστέρων οι οποίοι ακόμη και μετά από ένα χρόνο συνεισφέρουν αρωματικά στο προφίλ του.

Στη μελέτη του Μπέκου (2019) μετρήθηκαν κάποιες από τις παραπάνω ενώσεις σε ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν από τα ίδια στελέχη ζυμομυκήτων σε συνθήκες χαμηλής θερμοκρασίας 13 °C και 11 °P. Αυτό που παρατηρήθηκε αφορούσε στους μη συμβατικούς ζυμομύκητες, οι οποίοι παρουσίασαν υψηλότερες συγκεντρώσεις από εκείνους που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία. Αντίθετα στην παρούσα εργασία ο σακχαρομύκητας στους ζύθους με 15 °P διαπιστώθηκε ότι είχε την ικανότητα να παράγει μεγαλύτερες ποσότητες τόσο για τις ανώτερες αλκοόλες όσο και για τα οξέα και τους εστέρες. Συγκεκριμένα, οι τιμές της φαινυλαιθυλικής αλκοόλης, της ενεργής αμυλικής αλκοόλης, του οκτανοϊκού οξέος, του οκτανοϊκού αιθυλεστέρα και του εξανοϊκού αιθυλεστέρα ανιχνεύθηκαν αρκετά πιο ψηλά στην ζύμωση με 15 °P. Από την άλλη, η *Torulaspora delbrueckii* και η *Metschnikowia pulcherrima* παρατηρήθηκε ότι δεν εμφάνισαν υψηλές συγκεντρώσεις των ενώσεων της τρυπτοφώλης, της τυροσόλης και της μεθιονόλης στην περίπτωση ζύμωσης με υψηλή περιεκτικότητα σακχάρων.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup>: Συμπεράσματα

Στην παρούσα πτυχιακή μελετήθηκε η εξέλιξη των αρωματικών ενώσεων των ζύθων με υψηλή περιεκτικότητα σακχάρων που παρήχθησαν με χρήση συμβατικών και μη ζυμομυκήτων σε καθарές καλλιέργειες. Συγκεκριμένα οι ζύμες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ο *Saccharomyces cerevisiae*, η *Torulasporea delbrueckii* και η *Metschnikowia pulcherrima* και η ζύμωση για όλες πραγματοποιήθηκε στους 13 °C με αρχική πυκνότητα τα 15 °P. Η λήψη των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε χρόνο μία εβδομάδα, έξι μήνες, ένα χρόνο και δύο χρόνια παραμονής των ζύθων στις φιάλες.

Στο σύνολο τους οι αρωματικές ενώσεις παρουσίασαν αύξηση στη συγκέντρωσή τους κατά τον 6<sup>ο</sup> μήνα παλαίωσης, εξαιτίας της αυτόλυσης των ζυμών ως απόκριση στην μείωση θρεπτικών συστατικών του γλεύκους ζύμωσης. Όσον αφορά στον συμβατικό σακχαρομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* οι ενώσεις των ανώτερων αλκοολών που δίνουν χαρακτηριστικά αρώματα, όπως αυτό του τριαντάφυλλου, ήταν η φαινυλαιθυλική αλκοόλη, η ισοαμυλική αλκοόλη και η τρυπτοφόλη, οι οποίες ανιχνεύθηκαν στις υψηλότερες τιμές. Ωστόσο, μετά το πέρας των 2 χρόνων λόγω υδρόλυσης των εστέρων, παρατηρήθηκε αύξηση στις συγκεντρώσεις των ανώτερων αλκοολών και των οξέων, ενώ παράλληλα παρατηρήθηκε μείωση στις συγκεντρώσεις των εστέρων.

Η *Torulasporea delbrueckii* την 1<sup>η</sup> εβδομάδα μετά την εμφιάλωση εμφάνισε υψηλές συγκεντρώσεις μόνο για τις ενώσεις των ανώτερων αλκοολών, ενώ πολύ χαμηλές βρέθηκαν οι ενώσεις τόσο για τα οξέα όσο και για τους εστέρες. Λόγω των αντιδράσεων εστεροποίησης, παρατηρήθηκε αύξηση στις συγκεντρώσεις των εστέρων στον 1<sup>ο</sup> χρόνο μετά την εμφιάλωση. Στον 2<sup>ο</sup> χρόνο στον ζύθο με *Torulasporea delbrueckii* ανιχνεύθηκαν πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις που δεν φαίνεται να είναι ικανές να επηρεάσουν το αρωματικό προφίλ.

Η *Metschnikowia pulcherrima*, ομοίως με τον *S.cerevisiae*, εμφάνισε τις μεγαλύτερες τιμές στους έξι μήνες εμφιάλωσης, με υψηλότερες τις τιμές των ανωτερων αλκοολών και πιο συγκριμένα της φαινυλαιθυλικής αλκοόλης, της ισοαμυλικής και της ενεργής αμυλικής αλκοόλης. Τα οξέα ανιχνεύθηκαν σε χαμηλές συγκεντρώσεις με εξαίρεση το εξανοϊκό, το οκτανοϊκό και το δεκανοϊκό οξύ, ενώ οι ενώσεις των εστέρων και συγκεκριμένα ο βουτανοϊκος, ο εξανοϊκός αιθυλεστερας, ο

οκτανοϊκός αιθυλεστέρας και ο δεκανοϊκός αιθυλεστέρας παρουσίασαν υψηλές τιμές με κάποιες από αυτές να ξεπερνούν το κατώφλι αντίληψης. Κατά τον 1<sup>ο</sup> χρόνο παλαίωσης, οι συγκεντρώσεις των ανώτερων αλκοολών, αν και διατηρήθηκαν σε υψηλά επίπεδα, παρουσίασαν μείωση. Ωστόσο συγκρίνοντας τις με την αυξημένη συγκέντρωση των οξέων είναι γεγονός ότι αποτελεί απόρροια οξείδωσης των ανώτερων αλκοολών. Ο δεκανοϊκός αιθυλεστέρας ήταν ο μόνος από την κατηγορία των εστέρων που παρουσίασε αύξηση στον 1<sup>ο</sup> χρόνο καθώς βρέθηκε ότι όλοι οι υπόλοιποι εστέρες μειώθηκαν σε αυτό το διάστημα. Τέλος, όλες οι ενώσεις ανιχνεύθηκαν σε ίχνη μετά το πέρας των 2 χρόνων.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, γίνεται κατανοητό ότι η χρήση μη συμβατικών ζυμομυκήτων είναι ικανή να οδηγήσει στην παραγωγή ορισμένων ενώσεων που θα συνεισφέρουν στο αρωματικό προφίλ των ζύθων αυξάνοντας τις συγκεντρώσεις μετά το πέρας 6 μηνών και 1 χρόνου. Πιο αναλυτικά, η *Metschnikowia pulcherrima* παρουσίασε έντονο αρωματικό προφίλ στους ζύθους που παρήγαγε ακόμα και μετά τον 1 χρόνο, καθιστώντας την ικανή για χρήση στη βιομηχανία του ζύθου. Ωστόσο, οι ζύθοι με υψηλή περιεκτικότητα σακχάρων απαιτούν περισσότερο χρόνο για να ωριμάσουν και να ολοκληρωθεί το αρωματικό τους προφίλ, ιδιαίτερα όταν η ζύμωση τους πραγματοποιείται σε χαμηλότερη θερμοκρασία από το σύνηθες.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ambra Roberto, Pastore Gianni, Lucchetti Sabrina. 'The role of Bioactive Phenolic Compounds on the Impact of Beer on Health', Polyphenolic compounds in wine and beer, (18 January 2021)

Bart Vanderhaegen, Hedwig Neven, Hubert Verachtert, Guy Derdelinckx, 'The Chemistry of beer aging – a critical review', Centre of Malting and Brewing Science, Katholieke Universiteit Leuven, Kasstlpark Arenberg 22, B-3001 Heverlee, Belgium. (4 January 2005)

Basso Rafael, Alcarde Andre, Portugal Caure. 'Could non – *Saccharomyces* yeast contribute on innovative brewing fermentations?'. Article in Food Research International (June 2016)

Bokulich A. Nicolas, Bamforth Charles, 'The Microbiology of Malting and Brewing', Microbiology and Molecular Biology Reviews (2013)

Callego Maria Jesus, Gonzalez Carmen, Morata Antonio, 'Use of Non – *Saccharomyces* in Bottle Fermentation of Aged Beers', Department of Chemistry and Food Technology, Technical University of Madrid, Spain, (2017)

Capece Angela, Romianello Rossana, Siesto Gabriella, Romano Patrizia. 'Conventional and non – Conventional Yeasts in Beer Production. MDPI (1 June 2018)

Carrau Francisco, Boido Eduardo, Dellacassa Eduardo. 'Yeast Diversity And Flavor Compounds'. In Book: Fungal Metabolites (pp.569-597) DOI: 10.1007/978-3-319-25001-4\_32 (January 2017)

Clara Bosch Codern, Mentor: Annick Bosch Codern, 'Formation and Determination of Aromatic Compounds During Beer Fermentation', Kaho St. Lieven, (June 2013)

Drosou Fotini, Anastasakou Katerina, Tataridis Panagiotis, Dourtoglou Vasilis & Oreopoulou Vasiliki (2021): Study of the Fermentation Kinetics and Secondary Metabolites of *Torulasporadelbrueckii* Yeasts from Different Substrates, Journal of the American Society of Brewing Chemists, DOI: 10.1080/03610470.2021.1915660

Ferreira Ines, Guido Luis. 'Impact of Wort Amino Acids on Beer Flavour: A review'. MDPI LAQV/REQUIMTE. (28 March 2018)

Godoy Liliana, Acuna-Fontecilla, Catrileo Daniela. 'Formation and Flavor Compounds in Wine: A perspective of positive and Negative Contributions of Non-Saccharomyces Yeasts' Chemistry and Biochemistry of winemaking, Wine Stabilization and Aging. DOI:10.5772/intecopen.92562. (30 May 2020)

Holt Sylvester, Miks H. Marta, Trindade de Carvalho Bruna, Foulquie – Moreno R. Maria, Thevelein M. Johan. 'The molecular biology and floral aromas in beer and other alcoholic beverages' FEMS Microbiology Reviews (15 November 2018)

Holt Sylvester, Mukherjee, Lievens Bart, Verstrepen Kevin, Thevelein Johan. 'Bioflavoring by non – conventional yeasts in sequential beer fermentations. Food Microbiology 72 55-66. (16 November 2017)

Lafontaine Scott, T.H. Shellhamer, 'How Hoppy Beer Production Has Redefined Hop Quality and a Discussion of Agricultural and Processing Strategies to Promote it', Technical Quarterly, (January 2019) p 5

Maximilian Michel, Tim Meier- Dornberg, Fritz Jacob, Frank- Jurgen Mertner, R.Steven Wagner, Mathias Hutzler, 'Review : Pure non – *Saccharomyces* starter cultures for beer fermentation with a focus on secondary metabolites and practical applications', Institute of brewing & Distilling (15 September 2016)

Methner Yvonne, Hutzler Mathias, Matoulkova Dagmar, Jacob Fritz, Michel Maximilian 'Screening for the Brewing Ability of Different Non – *Saccharomyces* Yeasts' Research Center Weihenstephan for Brewing and Food Quality, Research Institute of Brewing and Malting, MDPI. (12 December 2019)

Morata Antonio, Loira Iris, Escott Carlos, Juan Manuel Del Frenco, Banuelos Maria Antonia, Jose Antonio Suarez-Lepe, 'Applications of *Metschnikowia pulcherrima* in Wine Biotechnology', Non – *Saccharomyces* in enology, (9 July 2019) p2

Olaniram Ademola, Hiralal Lettisha, Mokoena Mduduzi, Pilay Balakrishna. 'Flavour-Active Volatile Compounds in Beer: Production, Regulation and Control'. The Institute of Brewing & Distilling, (19 March 2017)

Pires J. Eduardo, Teixeira A. Jose, Branyik Thomas, Vicente A. Antonio, 'Yeast: the soul of beer's aroma – a review of flavour – active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast'. Appl. MicrobiolBiotechnol (2014) 98:1937-1949. (3 January 2014)



Plessis Heinrich, Toit Maret, Nieuwoudt Helene, Rijst M. van., Kid Martin, Jolly Neil. 'Effect of Saccharomyces, Non-Saccharomyces Yeasts and Malolactic Fermentation Strategies on Fermentation Kinetics And Flavor of Shiraz Wines' DOI: 10.3390/fermentation 3(4):64 (December 2017)

Saerens S. M. G., Verbelen P. J., Vanbeneden N., J. M. Thevelein, F.R. Delvaux. 'Monitoring the influence of high – gravity brewing and fermentation temperature on flavour formation by analysis of gene expression levels in brewing yeast. Appl. Microbiol Biotechnol (2008) 80:1039 -1051. (27 August 2008)

Saison Daan, David P. De Schutter, Uyttenhove Bregt, Delvaux Filip, Delvaux R. Freddy. 'Contribution of staling compounds to the aged flavour of lager beer by studying their flavour thresholds'. Food chemistry 1 14 (2009) 1206-1215, Elsevier – Science Direct. (31 October 2008)

Stewart Graham. 'The Production of Secondary Metabolites with Flavour Potential during Brewing and Distilling Wort Fermentations', The International Centre for Brewing and Distilling (IBCD), Heriot – Watt University, Riccarton, Edinburgh EH14 4AS, UK (27 November 2017)

Vanderhaegen B., Neven H., Coghe S., Verstrepen J. K., Derdelinckx G., Verachtert H. 'Bioflavoring and beer refermentation'. Appl. Microbiol. Biotechnol (2003) 62:140-150, Springer Verlag 2003 (21 May 2003)

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 3: Συγκριτικός πίνακας των αλκοολών που παράχθηκαν κατά την πρώτη εβδομάδα

COMPOUNDS	Συγκέντρωση (mg/L)		
	Saccharomyces cerevisiae	Torulaspota Delbrueckii	Metschnikowia Pulcherrima
1-Butanol,3-methyl-	2.35	2.54	0.39
1-Butanol, 2-methyl-	1.08	1.10	0.21
1-Propanol, 3-(methyl)-	ND	ND	ND
Phenylethyl Alcohol	6.9	2.98	0.64
Benzeneethanol, 4-hydroxy- (tyrosol)	ND	ND	ND
Tryptohol	ND	ND	ND

\*ND=NOT DETECTED

Πίνακας 4: Συγκριτικός πίνακας των οξέων που παράχθηκαν στον κάθε ζύθο κατά την πρώτη εβδομάδα

COMPOUNDS	Συγκέντρωση (mg/L)		
	Saccharomyces cerevisiae	Torulaspota Delbrueckii	Metschnikowia Pulcherrima
Butanoic Acid	ND	ND	ND
Hexanoic Acid	ND	0.05	ND
Octanoic Acid	0.25	0.5	ND
Dodecanoic Acid	0.02	ND	ND

\*ND=NOT DETECTED

Πίνακας 5: Συγκριτικός πίνακας των εστέρων που παράχθηκαν στον ζύθο κατά την πρώτη εβδομάδα

COMPOUNDS	Συγκέντρωση (mg/L)		
	Saccharomyces cerevisiae	Torulaspota Delbrueckii	Metschnikowia Pulcherrima
Butanoic acid, ethyl ester	0.03	0.04	ND
Hexanoic Acid, ethyl ester	0.12	0.2	ND
Octanoic Acid, ethyl ester	0.43	0.46	0.04
Acetic acid, 2- phenylethyl ester	ND	0.06	ND
Dodecanoic Acid, ethyl ester	0.02	ND	ND
1-Butanol,3-methyl-, acetate	0.06	0.19	ND

\*ND=NOT DETECTED

Για την πρώτη εβδομάδα εξετάστηκε μόνο ένα δείγμα λόγω καταστροφής του σκληρού δίσκου που περιείχε τα υπόλοιπα αποτελέσματα. Γι' αυτό δεν παρουσιάζονται αποκλίσεις στους παραπάνω πίνακες.

Πίνακας 6: Συγκριτικός πίνακας των αλκοολών που παράχθηκαν στον ζύθο μετά από 6 μήνες

COMPOUNDS	Συγκέντρωση (mg/L)		
	Saccharomyces cerevisiae	Torulaspota Delbrueckii	Metschnikowia Pulcherrima
1-Butanol,3-methyl-	15.68 ± 0.5	0.39 ± 0.01	10.06 ± 0.8
1-Butanol, 2-methyl-	7.16 ± 0.5	0.06 ± 0.04	4.13 ± 0.7
1-Propanol, 3-(methyl)-	0.33 ± 0.03	0.17 ± 0.01	0.12 ± 0.05
Phenylethyl Alcohol	59.9 ± 0.5	6.26 ± 0.57	26.69 ± 0.04
Benzeneethanol, 4-hydroxy- (tyrosol)	ND	0.35 ± 0.01	0.6 ± 0.02
Tryptohol	3.04 ± 0.01	ND	3.51 ± 0.3

\*ND=NOT DETECTED

Πίνακας 7: Συγκριτικός πίνακας των οξέων που παράχθηκαν στον ζύθο μετά από 6 μήνες

COMPOUNDS	Συγκέντρωση (mg/L)		
	Saccharomyces cerevisiae	Torulasporea Delbrueckii	Metschnikowia Pulcherrima
Butanoic Acid	0.73 ± 0.1	0.06 ± 0.04	0.16 ± 0.09
Hexanoic Acid	2.45 ± 0.1	0.17 ± 0.1	0.69 ± 0.2
Octanoic Acid	3.16 ± 0.8	1.51 ± 0.8	0.98 ± 0.4
Dodecanoic Acid	ND	0.29 ± 0.01	ND

\*ND=NOT DETECTED

Πίνακας 8: Συγκριτικός πίνακας των εστέρων που παράχθηκαν στον ζύθο μετά από 6 μήνες

COMPOUNDS	Συγκέντρωση (mg/L)		
	Saccharomyces cerevisiae	Torulasporea Delbrueckii	Metschnikowia Pulcherrima
Butanoic acid, ethyl ester	0.65 ± 0.1	0.08 ± 0.02	0.14 ± 0.07
Hexanoic Acid, ethyl ester	0.62 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.66 ± 0.3
Octanoic Acid, ethyl ester	5.01 ± 0.5	0.55 ± 0.04	4.77 ± 0.8
Acetic acid, 2- phenylethyl ester	0.21 ± 0.02	0.21 ± 0.03	0.19 ± 0.02
Decanoic Acid, ethyl ester	0.22 ± 0.03	0.99 ± 0.02	0.52 ± 0.1
Dodecanoic Acid, ethyl ester	ND	0.29 ± 0.01	ND
1-Butanol,3-methyl-, acetate	0.33 ± 0.3	0.29 ± 0.01	0.35 ± 0.01

\*ND=NOT DETECTED

Πίνακας 9: Συγκριτικός πίνακας των αλκοολών που παράχθηκαν στον ζύθο μετά από 1 χρόνο

COMPOUNDS	Συγκέντρωση (mg/L)		
	Saccharomyces cerevisiae	Torulasporea Delbrueckii	Metschnikowia Pulcherrima
1-Butanol,3-methyl-	0.9 ± 0.4	3.25 ± 0.48	7.9
1-Butanol, 2-methyl-	0.4 ± 0.1	1 ± 0.29	5.6
1-Propanol, 3-(methyl)-	ND	0.07 ± 0.02	0.1
Phenylethyl Alcohol	5.26 ± 0.2	3.58 ± 0.54	21.43
Benzeneethanol, 4-hydroxy- (tyrosol)	0.03 ± 0.001	ND	0.65
Tryptohol	0.01 ± 0.01	0.08 ± 0.02	1.5

\*ND=NOT DETECTED

Πίνακας 10: Συγκριτικός πίνακας των οξέων που παράχθηκαν στον ζύθο μετά από 1 χρόνο

COMPOUNDS	Συγκέντρωση (mg/L)		
	Saccharomyces cerevisiae	Torulasporea Delbrueckii	Metschnikowia Pulcherrima
Butanoic Acid	ND	0.08 ± 0.03	0.56
Hexanoic Acid	0.06 ± 0.02	0.16 ± 0.13	0.71
Octanoic Acid	0.39 ± 0.07	0.55 ± 0.54	0.94
Dodecanoic Acid	ND	ND	ND

\*ND=NOT DETECTED

Πίνακας 11: Συγκριτικός πίνακας των εστέρων που παράχθηκαν στον ζύθο μετά από 1 χρόνο

COMPOUNDS	Συγκέντρωση (mg/L)		
	Saccharomyces cerevisiae	Torulasporea Delbrueckii	Metschnikowia Pulcherrima
Butanoic acid, ethyl ester	ND	0.02 ± 0.01	ND
Hexanoic Acid, ethyl ester	0.03 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.62
Octanoic Acid, ethyl ester	0.14 ± 0.01	0.75 ± 0.69	2.62
Acetic acid, 2- phenylethyl ester	0.08 ± 0.001	0.07 ± 0.01	0.11

COMPOUNDS	Συγκέντρωση (mg/L)		
	Saccharomyces cerevisiae	Torulasporea Delbrueckii	Metschnikowia Pulcherrima
Butanoic acid, ethyl ester	ND	0.02 ± 0.01	ND
Dodecanoic Acid, ethyl ester	ND	0.01 ± 0.01	ND
Decanoic Acid, ethyl ester	ND	0.25 ± 0.06	0.69
1 Butanol , 3 methyl ,- acetate	0.01 ± 0.01	0.09 ± 0.1	0.22

\*ND=NOT DETECTED

Πίνακας 12: Συγκριτικός πίνακας των αλκοολών που παράχθηκαν στον ζύθο μετά από 2 χρόνια

COMPOUNDS	Συγκέντρωση (mg/L)		
	Saccharomyces cerevisiae	Torulasporea Delbrueckii	Metschnikowia Pulcherrima
1-Butanol,3-methyl-	2.04 ± 0.35	0.54 ± 0.06	0.5 ± 0.12
1-Butanol, 2-methyl-	0.85 ± 0.31	0.16 ± 0.05	0.2 ± 0.01
1-Propanol, 3-(methyl)-	0.01 ± 0.01	ND	ND
Phenylethyl Alcohol	7.32 ± 0.66	0.96 ± 0.33	1.46 ± 0.1
Benzeneethanol, 4-hydroxy- (tyrosol)	0.09 ± 0.01	ND	ND
Tryptohol	0.17 ± 0.04	ND	ND

\*ND=NOT DETECTED

Πίνακας 13: Συγκριτικός πίνακας των οξέων που παράχθηκαν στον ζύθο μετά από 2 χρόνια

COMPOUNDS	Συγκέντρωση (mg/L)		
	Saccharomyces cerevisiae	Torulasporea Delbrueckii	Metschnikowia Pulcherrima
Butanoic Acid	0.04 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.00
Hexanoic Acid	0.21 ± 0.02	0.08 ± 0.03	0.03 ± 0.00
n – Decanoic acid	ND	0.01 ± 0.01	ND
Octanoic Acid	0.7 ± 0.02	0.26 ± 0.13	0.09 ± 0.01
Dodecanoic Acid	ND	ND	ND

\*ND=NOT DETECTED

Πίνακας 14: Συγκριτικός πίνακας των εστέρων που παράχθηκαν στον ζύθο μετά από 2 χρόνια

COMPOUNDS	Συγκέντρωση (mg/L)		
	Saccharomyces cerevisiae	Torulasporea Delbrueckii	Metschnikowia Pulcherrima
Butanoic acid, ethyl ester	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01
Hexanoic Acid, ethyl ester	0.03 ± 0.01	ND	ND
Octanoic Acid, ethyl ester	0.15 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.01
Acetic acid, 2- phenylethyl ester	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	ND
Dodecanoic Acid, ethyl ester	ND	ND	ND
1 Butanol, 3 methyl ,- acetate	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01

\*ND=NOT DETECTED