



Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής
Σχολή Επιστημών Τροφίμων
Τμήμα Επιστημών Οίνου, Αμπέλου και
Ποτών

Μελέτη της *Metschnikowia pulcherrima* στην παραγωγή ζύθου

Πτυχιακή εργασία:
Τόρε Θεοδώρα

Επιβλέπουσα καθηγήτρια:
Δρόσου Φωτεινή

ΑΘΗΝΑ 2022

Τριμελής επιτροπή αξιολόγησης

Δρόσου Φωτεινή: Ακαδημαϊκή υπότροφος

Ντουρτόγλου Ευθαλία: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Οργανική Χημεία & Ενζυμολογία. Δ/ντρια Τομέα Χημείας και Τεχνολογίας Οίνου, Ζύθου και Ποτών.

Ντουρτόγλου Γεώργιος: Ακαδημαϊκός υπότροφος

Δήλωση συγγραφέα πτυχιακής εργασίας

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Τόρε Θεοδώρα του Κρίστο, με αριθμό μητρώου 718151091, 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, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολο τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου όσο και του Ιδρύματος.

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

Η Δηλούσα



Τόρε Θεοδώρα

Ευχαριστίες

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την Κυρία Φωτεινή Δρόσου, επιβλέπουσα της παρούσας πτυχιακής εργασίας, όπου με την πολύτιμη βοήθεια της και την επιμονή της στην λεπτομέρεια έφερα εις πέρας την διεξαγωγή της διπλωματικής μου εργασίας. Επίσης θα ήθελα να την ευχαριστήσω για την υπέροχη συνεργασία και την συνεισφορά της καθ' όλη τη διάρκεια, με τις συμβουλές της και την καθοδήγηση της.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια και τους φίλους μου, όπου με στήριξαν κατά τη διάρκεια της διεξαγωγής της πτυχιακής μου εργασίας, Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη φίλη και συμφοιτήτρια μου Μπότσιου Χαρά- Ναταλία όπου με στήριξε και με βοήθησε απεριόριστα.

Περίληψη

Τα τελευταία χρόνια ο χώρος της ζυθοποιίας έχει στραφεί στην αναζήτηση καινοτόμων ιδεών και παραγωγής ζύθων με πολύπλοκα αρωματικά χαρακτηριστικά. Κυρίαρχο ρόλο παίζουν οι ζυμομύκητες, οι οποίοι σε διαφορετικές συνθήκες ζύμωσης μπορούν να παράγουν πτητικές ενώσεις συνεισφέροντας έτσι στο τελικό αρωματικό προφίλ. Οι έρευνες που πραγματοποιούνται έχουν στόχο την ανάδειξη των μη συμβατικών ζυμομυκήτων στη μπίρα, είτε σε καθαρές καλλιέργειες είτε σε συνεμβολιασμό με τον *Saccharomyces cerevisiae*.

Στη παρούσα πτυχιακή εργασία μελετήθηκε η non-*Saccharomyces* ζύμη *Metschnikowia pulcherrima* στη παραγωγή ζύθου. Αναλυτικότερα, σκοπός ήταν η ανάδειξη της *M. pulcherrima* στην παραγωγή ζύθου τύπου American Pale Ale σε συνεμβολιασμό με τον *S. cerevisiae*. Έτσι, πραγματοποιήθηκαν τέσσερις διαφορετικές ζυμώσεις του ίδιου ζυθογλεύκου, οι οποίες διέφεραν ως προς την αναλογία των μικροοργανισμών και τη θερμοκρασία ζύμωσης. Οι αναλογίες ζύμωσης που πραγματοποιήθηκαν ήταν οι εξής : *Saccharomyces cerevisiae* : *Metschnikowia pulcherrima* 1:1 και 1:10 σε θερμοκρασίες ζύμωσης 13 °C και 20 °C. Πιο αναλυτικά, μελετήθηκε ο ρυθμός κατανάλωσης των σακχάρων και του διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου καθώς και η περιεκτικότητα σε αιθανόλη. Επιπλέον, εμβάθυνε στις παραγόμενες αρωματικές ενώσεις για τις διάφορες ζυμώσεις. Τα αποτελέσματα των μεικτών καλλιεργειών συγκρίθηκαν με τις αντίστοιχες ζυμώσεις με την καθαρή καλλιέργεια της *M. pulcherrima*. Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε μετά από 6 μήνες και ένα έτος ωρίμανσης. Συγκεκριμένα, ανιχνεύθηκαν και καταγράφηκαν ενώσεις ανώτερων αλκοολών, οξέων και εστέρων με τη βοήθεια της αέριας χρωματογραφίας. Από αυτές, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν η ισοαμυλική αλκοόλη, η ενεργή αμυλική αλκοόλη και η φαινυλαιθυλική αλκοόλη, οι οποίες προσδίδουν αρώματα μπανάνας, γλυκού, και τριαντάφυλλου στην παραγόμενη μπίρα. Επιπρόσθετα, ανιχνεύθηκαν και ποσότητες λιπαρών οξέων μεσαίας αλυσίδας, (παραδείγματος χάρη του οκτανοϊκού οξέος), αλλά και των αντίστοιχων εστέρων τους, όπως του οκτανοϊκού αιθυλεστέρα, αλλά και των εστέρων οξικού οξέος (όπως του οξικού φαινυλεθυλεστέρα και του οξικού ισοαμυλεστέρα) αναδεικνύοντας διάφορα φρουτώδη αρώματα στο τελικό προϊόν της μπίρας, τύπου American Pale Ale. Αντιστοίχως, και οι καθαρές ζυμώσεις κατάφεραν να αναδείξουν ποικίλλα αρώματα μετά από 6 μήνες και ένα έτος ωρίμανσης.

Abstract

In recent years, the brewing industry has turned to the research for innovative ideas and the production of beers with complex aromatic characteristics. Yeasts play a dominant role, which in different fermentation conditions can produce volatile compounds, contributing to the final aromatic profile. The experiments that carried out, has as a primary goal the elevation of non-conventional yeasts in beer in co-inoculation with the common *Saccharomyces cerevisiae*, but also of pure culture.

In the present study the non-conventional yeast, *Metschnikowia pulcherrima* was evaluated in beer production. Specifically, the main purpose was the prominence of *M. pulcherrima* in the production of an American Pale Ale co-inoculated with *Saccharomyces cerevisiae*. Therefore, four different fermentations of the same wort were conducted, in which differed in the ratio of microorganisms and the fermentation temperature. The fermentation ratios that were carried out, were the following: *Saccharomyces cerevisiae*: *Metschnikowia pulcherrima* 1:1 and 1:10 in fermentation temperatures 13 °C, 20 °C. Specifically, the rate of sugar and Free Amino Nitrogen consumption was studied, as well as the ethanol content. Moreover, the aromatic compounds that are produced during the different fermentations were evaluated. The results of mixed cultures were compared with the fermentations in pure culture of *M. pulcherrima*. Beer samples were collected after 6 months and 1 year of maturation. In particular, compounds such as higher alcohols, medium-chain fatty acids and esters were detected by means of GC-MS. Of great interest were isoamyl, active amyl and phenylethyl alcohol that give aromas such as banana, sweet and rose. In addition, quantities of medium chain fatty acids were detected, such as octanoic acid and their corresponding esters (i.e., ethyl octanoate), but also acetic acid esters (such as phenylethyl acetate and isoamyl acetate), enhancing the final product with fruity aromas. The pure fermentations managed to reveal various aromas after 6 months and a year of maturation, as well.

Περιεχόμενα	
Τριμελής επιτροπή αξιολόγησης	2
Δήλωση συγγραφέα πτυχιακής εργασίας.....	3
Ευχαριστίες.....	4
Περίληψη	5
Abstract	6
Ευρετήριο εικόνων	8
Ευρετήριο διαγραμμάτων.....	9
Ευρετήριο πινάκων	10
Εισαγωγή.....	12
Θεωρητικό μέρος	13
1 ^ο Κεφάλαιο: Εισαγωγή στην παραγωγή οίνου και ζύθου.....	13
1.1 Ιστορική αναδρομή του κρασιού.....	13
1.2 Ιστορική αναδρομή ζύθου	14
1.3 Βασικά στάδια οινοποίησης	15
1.4 Βασικά στάδια ζυθοποίησης	17
1.5 Σύσταση του οίνου και ζύθου.....	18
1.5.1 Σύσταση του οίνου.....	18
1.5.2. Σύσταση του ζύθου.....	19
2.1 Γενικά χαρακτηριστικά των ζυμών	20
2.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	22
2.3 Οι non- <i>Saccharomyces</i> ζύμες.....	22
2.3.1 Ο ρόλος των <i>non-Saccharomyces</i> στη παραγωγή οίνου και ζύθου	23
3 ^ο Κεφάλαιο: <i>Metschnikowia pulcherrima</i>	26
3.1 Γενικά χαρακτηριστικά	26
3.1.1 Η αντιμικροβιακή δράση της <i>Metschnikowia pulcherrima</i>	26
3.2 Τα κυριότερα στελέχη της <i>Metschnikowia pulcherrima</i>	27
3.3 Ζυμωτική συμπεριφορά της <i>Metschnikowia pulcherrima</i>	28
3.4 Η επιρροή της <i>Metschnikowia pulcherrima</i> στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά	29
4 ^ο Κεφάλαιο : Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά	30
4.1 Εισαγωγή.....	30
4.2 Χρώμα	30
4.3 Αφρός.....	31
4.4 Διαύγεια.....	31
4.5 Λυκίσκος.....	31
4.6 Πτητικές ενώσεις.....	33

4.7 Δευτερογενείς μεταβολίτες	33
4.7.1 Ανώτερες αλκοόλες	33
4.7.2 Εστέρες	34
4.7.3 Λιπαρά και οργανικά οξέα.....	35
4.8 Καρβονυλικές ενώσεις	35
4.9 Ωρίμανση της μπίρας.....	36
Πειραματικό μέρος	37
Κεφάλαιο 1 ^ο : Εισαγωγή πειραματικής διαδικασίας	37
Κεφάλαιο 2 ^ο : Πειραματική διαδικασία	38
2.1 Αντιδραστήρια και όργανα	38
2.2 Παραγωγή Ζυθογλεύκους.....	39
2.3 Εμβολιασμός Ζυθογλεύκους.....	39
Κεφάλαιο 3 ^ο : Αναλυτικές μέθοδοι	41
3.1 Μέτρηση σακχάρων με πυκνόμετρο	41
3.2 Προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε αιθανόλη με απόσταξη	41
3.3. Μέτρηση διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου (FAN).....	41
3.4 Ανάλυση αρωματικών	43
3.4.1 Διαδικασία εκχύλισης με τη στήλη Vigreux.....	43
3.4.2 Ανάλυση αρωματικών ουσιών με αέρια χρωματογραφία- φασματομετρία μάζας (GC-MS).....	43
Κεφάλαιο 4 ^ο : Παρουσίαση αποτελεσμάτων και σχολιασμός.....	45
4.1 Πυκνότητα σακχάρων	45
4.4 Προσδιορισμός αιθανόλης	48
4.5 Προσδιορισμός αρωματικού προφίλ	49
Κεφάλαιο 5 ^ο : Συμπεράσματα	60
Βιβλιογραφία.....	62
Παράρτημα Α : Αναλυτικοί πίνακες των συγκεντρώσεων των διάφορων ενώσεων που ανιχνεύθηκαν στις διάφορες αναλογίες και θερμοκρασίες με την βοήθεια του GC-MS\	65

Ευρετήριο εικόνων

Εικόνα 1: Τα κυρια γνωρίσματα ενός τυπικού κυτταρού ζυμης (Russel I., Stewart G. G., 1998)	20
Εικόνα 2: Καμπυλη αναπτυξης μικροοργανισμού	22
Εικόνα 3: Ο μικροοργανισμός <i>M. pulcherrima</i> όπως φαίνεται στο μικροσκόπιο	26
Εικόνα 4: Καλλιέργεια λυκίσκου, ο επωνομαζόμενος πράσινος χρυσός	31

Ευρετήριο διαγραμμάτων

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 1: Καμπύλες μείωσης της πυκνότητας των σακχάρων στο ζυμωμένο γλεύκος για τις διάφορες αναλογίες και θερμοκρασίες.	45
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 2: Καμπύλη μείωσης της πυκνότητας των σακχάρων στο ζυμωμένο γλεύκος της καθαρής καλλιέργειας <i>Metschnikowia pulcherrima</i> για τις διάφορες θερμοκρασίες	45
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 3: Καμπύλη κατανάλωσης του διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου στις διάφορες αναλογίες και θερμοκρασίες.....	47
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 4: Καμπύλη κατανάλωσης του διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου στις διάφορες θερμοκρασίες.....	47
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 5: Συγκεντρώσεις των ανώτερων αλκοολών στις διάφορες αναλογίες και θερμοκρασίες στους 6 μήνες ωρίμανσης.....	51
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 6: Συγκεντρώσεις των ανώτερων αλκοολών στις διάφορες αναλογίες και θερμοκρασίες στον 1 χρόνο ωρίμανσης.....	52
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 7: Συγκεντρώσεις των οξέων στις διάφορες αναλογίες και θερμοκρασίες στους 6 μήνες ωρίμανσης.....	53
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 8: Συγκεντρώσεις των οξέων στις διάφορες αναλογίες και θερμοκρασίες στον 1 χρόνο ωρίμανσης.....	53
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 9: Συγκεντρώσεις των εστέρων στις διάφορες αναλογίες και θερμοκρασίες στους 6 μήνες ωρίμανσης.....	54
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 10: Συγκεντρώσεις των εστέρων στις διάφορες αναλογίες και θερμοκρασίες στον 1 χρόνο ωρίμανσης.....	55
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 11: Συγκεντρώσεις των οξικών εστέρων στις διάφορες αναλογίες και θερμοκρασίες μετά από 6 μήνες ωρίμανσης.....	56
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 12: Συγκεντρώσεις των οξικών εστέρων στις διάφορες αναλογίες και θερμοκρασίες μετά από 1 χρόνο ωρίμανσης.....	57
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 13: Συγκεντρώσεις των λοιπών πτητικών ενώσεων στις διάφορες αναλογίες και θερμοκρασίες μετά από 6 μήνες ωρίμανσης.....	58
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 14: Συγκεντρώσεις των λοιπών πτητικών ενώσεων στις διάφορες αναλογίες και θερμοκρασίες μετά από ένα έτος ωρίμανσης.....	59

Ευρετήριο πινάκων

Πίνακας 1: Τα κυριότερα στελέχη της <i>M.pulcherrima</i>	27
Πίνακας 2: Οι κύριες χημικές ενώσεις και η αντίστοιχη ποσότητα τους που περιέχονται στον λυκίσκο.	32
Πίνακας 3: Οι κυριότερες ανώτερες αλκοόλες και το κατώφλι αντίληψης τους.....	34
Πίνακας 4: Οι κυριότεροι εστέρες και το κατώφλι αντίληψης τους.....	34
Πίνακας 5: Κυριότερα οργανικά οξέα και το κατώφλι αντίληψης τους.....	35
Πίνακας 6: Ποσότητες ξηρής ζύμης για τον εμβολιασμό του ζυθογλεύκου.....	40
Πίνακας 7: Περιεκτικότητα σε αιθανόλη (ABV) στις μπύρες των διαφόρων αναλογιών και θερμοκρασιών.	48
Πίνακας 8: Το χαρακτηριστικό άρωμα και το όριο ανίχνευσης όλων των ουσιών που προέκυψαν από την αέρια χρωματογραφία μάζας.....	49
Πίνακας 9: Συγκριτικός πίνακας για τις τιμές των ανώτερων αλκοολών στις διάφορες θερμοκρασίες και αναλογίες των ζυμώσεων μετά από παλαίωση 6 μηνών.....	65
Πίνακας 10: Συγκριτικός πίνακας για τις τιμές των οξέων στις διάφορες θερμοκρασίες και αναλογίες των ζυμώσεων μετά από παλαίωση 6 μηνών.....	65
Πίνακας 11: Συγκριτικός πίνακας για τις τιμές των εστέρων στις διάφορες θερμοκρασίες και αναλογίες της ζύμωσης μετά από παλαίωση 6 μηνών.....	66
Πίνακας 12: Συγκριτικός πίνακας των λοιπών αρωματικών ενώσεων που παράχθηκαν μετά από 6 μήνες παλαίωσης στις διάφορες θερμοκρασίες και αναλογίες συγκέντρωσης των ζυμώσεων.....	67
Πίνακας 13: Συγκριτικός πίνακας των ανώτερων αλκοολών που παράχθηκαν μετά από 1 χρόνο παλαίωσης στις διάφορες θερμοκρασίες και αναλογίες συγκέντρωσης των ζυμώσεων.....	67
Πίνακας 14: Συγκριτικός πίνακας για τις τιμές των οξέων στις διάφορες θερμοκρασίες και αναλογίες των ζυμώσεων μετά από παλαίωση 1 έτους.....	68
Πίνακας 15: Συγκριτικός πίνακας για τις τιμές των εστέρων στις διάφορες θερμοκρασίες και αναλογίες της ζύμωσης μετά από παλαίωση 1 έτους.....	69
Πίνακας 16: Συγκριτικός πίνακας των λοιπών αρωματικών ενώσεων που παράχθηκαν μετά από 1 έτος παλαίωσης στις διάφορες θερμοκρασίες και αναλογίες συγκέντρωσης των ζυμώσεων.....	69

Εισαγωγή

Οινολογία είναι η επιστήμη όπου διαπραγματεύεται την εκτενέστερη μελέτη όλων των πτυχών του οίνου και γενικότερα της οινοπαραγωγής. Αντίστοιχα η ζυθοποίηση είναι μια επιστήμη που εξετάζει την παραγωγή ζύθου. Από τα παλαιότερα χρόνια φαίνεται το ενδιαφέρον για την διερεύνηση της παραγωγής οίνου και ζύθου, καθώς υπάρχουν πολλές αναφορές σε αυτές και ποικίλλουν οι μέθοδοι που χρησιμοποιούν έως και σήμερα.

Σύμφωνα με τις διάφορες κατηγορίες οίνου και ζύθου αντίστοιχα, γίνονται οι κατάλληλες έρευνες και παρεμβάσεις για αναβάθμιση των προϊόντων αυτών, όσο αναφορά κυρίως το γευστικό και αρωματικό τους χαρακτήρα. Οι οίνοι χωρίζονται σε τρεις βασικές κατηγορίες, βάση του χρώματος τους, λευκός, ροζέ και ερυθρός. Υπάρχουν και άλλες υποκατηγορίες όπου βασίζονται στην περιεκτικότητα τους σε σάκχαρα και σε διοξείδιο του άνθρακα. Οι ζύθοι χωρίζονται σε τρεις μεγάλες κατηγορίες όπου είναι οι αφροζύμες (τύπου Lager), βυθοζύμες (τύπου Ale) και αυθόρμητες ζυμώσεις με ζύμες του περιβάλλοντος (τύπου Lambic). Επομένως, οι διαφορές στις μπίρες οφείλονται στη θερμοκρασία ζύμωσης και στη διαλογή των ζυμών.

Η οινοποίηση και η ζυθοποίηση βασίζονται στην μετατροπή των σακχάρων που υπάρχουν στο γλεύκος σταφυλιών και ζυθογλεύκος αντίστοιχα, σε αιθυλική αλκοόλη και διοξείδιο του άνθρακα μέσω των μικροοργανισμών, ζυμομυκήτων που είτε βρίσκονται ήδη στο υπόστρωμα είτε προστίθενται στην συνέχεια. Ο ζυμομύκητας που χρησιμοποιείται ευρέως στη παραγωγή οίνου και ζύθου είναι ο *Saccharomyces cerevisiae*. Ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός έχει παρουσιάσει πολύ καλή ζυμωτική ικανότητα καθώς και θετική οργανοληπτική επιρροή στο τελικό προϊόν. Ωστόσο λόγω της συνεχούς χρήσης του από τη βιομηχανία οίνου και ζύθου τα προϊόντα που παράγονται με τον *Saccharomyces cerevisiae* δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερη αρωματική και γευστική πολυπλοκότητα.

Τα τελευταία χρόνια λόγω και της ζήτησης του καταναλωτικού κοινού για καινοτόμα και γευστικά πιο πολύπλοκα προϊόντα η επιστημονική κοινότητα και βιομηχανία οίνου και ζύθου έχει στρέψει το ενδιαφέρον της προς την αναζήτηση νέων μεθόδων που θα διαφοροποιήσουν τα συγκεκριμένα ποτά ζύμωσης. Μεταξύ των μεθόδων που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή καινοτόμων ποτών ζύμωσης είναι η επιλογή μη συμβατικών ζυμών ή αλλιώς non-*Saccharomyces* ζυμών, οι οποίες μέσω του μεταβολισμού τους φαίνεται να παράγουν ενώσεις που συμβάλλουν στο οργανοληπτικό προφίλ του οίνου και του ζύθου.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία θα αναλυθεί εκτενώς μια non-*Saccharomyces* ζύμη η *Metschnikowia pulcherrima*, ο τρόπος που δρα στις ζυμώσεις οίνου και ζύθου καθώς και η οργανοληπτική επίδρασή της στο τελικό προϊόν.

Θεωρητικό μέρος

1^ο Κεφάλαιο: Εισαγωγή στην παραγωγή οίνου και ζύθου

1.1 Ιστορική αναδρομή του κρασιού

Σύμφωνα με αρχαιολογικές έρευνες έχουν βρεθεί ενδείξεις για την παραγωγή ζυμώσιμων ποτών στην Κίνα το 7000 π.Χ. (McGovern et. al. , 2004), για το κρασί στο Ιράν και την Αίγυπτο το 6000 π.Χ. και το 3000 π.Χ., αντίστοιχα. (McGovern et. al, 1997;Cavaliere et. al. 2003). Από εκείνη τη στιγμή, θεωρείται ότι η τεχνολογία ζύμωσης εξαπλώθηκε από τη Μεσοποταμία στον υπόλοιπο κόσμο. Η καλλιέργεια του αμπελιού και η παραγωγή του κρασιού εξαπλώθηκε γύρω από την Μεσόγειο Θάλασσα μέσω της Ελλάδας (2000 π.Χ.), της Ιταλίας (1000 π.Χ.), της Βόρειας Ευρώπης (100 μ.Χ.) και της Αμερικής (1500 μ.Χ.) (Pretorius, 2000).

Η πλειονότητα του κρασιού παρασκευαζόταν χρησιμοποιώντας ένα συγκεκριμένο είδος σταφυλιού από το αμπέλι γνωστό ως *Vitis vinifera*. Πριν από την κατανόηση της βοτανολογίας και της εξέλιξης, υπήρχε η θεωρία ότι όλα τα σταφύλια που προέρχονται από αυτό το συγκεκριμένο είδος είναι κατάλληλα για οινοποίηση, τα οποία προέρχονταν από την Ασία και μεταφέρθηκαν στην Ευρώπη κατά την διάρκεια των προϊστορικών χρόνων.

Αυτή η έννοια αναπτύχθηκε από τις Σημιτικές παραδόσεις του Παραδείσου και τον Ελληνικό μύθο του κρασιού όπου ο Θεός Διόνυσος μετανάστευσε από την Ινδία στην Ελλάδα. Κάποτε στην Ελλάδα, η *Vitis vinifera* πιστεύεται ότι μεταφέρθηκε στην Ιταλία και στην συνέχεια εξαπλώθηκε σε όλη την Γαλλία, τη Γερμανία και την υπόλοιπη περιοχή με ιστορικό αποικισμό. Ωστόσο, πολλές έρευνες έχουν οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι πολλά είδη του γένους *vitis vinifera* ήταν ενδογενής στην Ευρώπη και τον υπόλοιπο κόσμο και κατάφερε να εξελιχθεί ξεχωριστά από τα προηγούμενα είδη, ώστε να είναι ο δημιουργός.

Αρχαιολογικές ενδείξεις προτείνουν ότι τα σταφύλια των αμπελιών ανακαλύφθηκαν τριάντα οχτώ με εξήντα πέντα χιλιάδες χρόνια πριν. Με το τέλος της Τριτογενούς περιόδου (1.8 χιλιάδων χρόνων πριν), αναρίθμητα είδη του γένους *Vitis vinifera* διανεμήθηκαν από την Βόρεια Αμερική μέχρι την Ευρασία.

Η ακριβής ημερομηνία όπου ξεκινά η καλλιέργεια και η οινοπαραγωγή είναι άγνωστη λόγω της έλλειψης ιστορικών ενδείξεων. Πολλοί ιστορικοί πιστεύουν ότι η παραγωγή κρασιού ξεκίνησε το 8000 π.Χ. περίπου στην Μικρά Ασία και τη Νότια Καύκασο, αλλά έρχεται σε αντιπαράθεση με τη θεωρία της εξέλιξης. Κάποιοι άλλοι υποστηρίζουν ότι η οινοπαραγωγή ξεκίνησε ανάμεσα στο 6000 με 4000 π.Χ. στις ορεινές περιοχές ανάμεσα στη Μαύρη και Κασπία θάλασσα, κοντά στα σύνορα όπου είναι σήμερα η σημερινή Τουρκία, το Ιράκ και το Ιράν.

Περίπου το 2750 π.Χ., έγιναν ανασκαφές σε πήλινα δοχεία που αναγράφονταν κείμενα, από μια πόλη της Μεσοποταμίας, όπου αναφέρονταν η ανάπτυξη του σταφυλιού και του οίνου. Παρόλα αυτά η κύρια πηγή αλκοόλ φαίνεται να γίνεται από το κριθάρι και όχι από το κρασί.

Κατά τη διάρκεια της Χρυσής Εποχής υπάρχουν ξεχασμένα από τον εκάστοτε πολιτισμό, κάποια δοχεία που αποθήκευαν το κρασί τους, πρέσες κρασιού και κελάρια. Εκείνη την εποχή η μπίρα ήταν το κοινό αλκοούχο ποτό, ενώ το κρασί είχε κατοχυρωθεί από την κυρίαρχη τάξη όπου έλεγχε την παραγωγή και το εμπορικό δίκτυο. Ο κώδικας του Hammurabi από την αυτοκρατορία των Σουμέριων, περίπου το 1700 π.Χ., έκανε σαφές ότι η μπίρα ήταν το πιο σημαντικό ποτό, αλλά ταυτόχρονα υποδεικνύει ότι το κρασί το χρησιμοποιούσαν μόνο

η κυρίαρχη τάξη και για θρησκευτικές τελετές. Επίσης οι τοιχογραφίες, τα αγάλματα, οι πάπυροι αποδεικνύουν τις κοινωνικές και θρησκευτικές λειτουργίες που είχε το κρασί κατά την διάρκεια της εποχής των Αιγυπτίων (2000 με 1000 π.Χ. Με την άνοδο της Ελληνικής και Ρωμαϊκής αυτοκρατορίας το κρασί δεν ήταν απλώς ένα αλκοολούχο ποτό για το μαζικό πλυθισμό. Το κρασί απέκτησε υψηλή αξία για ιατρικούς σκοπούς, ιδιαίτερα για την απόλυμανση της πληγής.

Τη μεσαιωνική εποχή, στην Αγγλία το εμπόριο του κρασιού απέκτησε κανονισμούς. Το κοινοβούλιο προέβλεψε την τάση των παραγωγών να αποσκοπούν μόνο στο κέρδος και απαγόρευσε την πώληση νοθευμένου κρασιού. Παράλληλα στην Γαλλία, το κρασί ήταν ανώνυμο, προσδιορίζοντας μόνο την περιοχή, καθώς κατά κύριο λόγο πουλούσαν από το βαρέλι. Όμως, η ζήτηση για φθηνό κρασί, ενίσχυσε τους παραγωγούς να χρησιμοποιούν φθηνά πρόσθετα.

Με το τέλος του 1800, οι οινοπαραγωγοί ξεκίνησαν να αντιμετωπίζουν ένα σοβαρό πρόβλημα όπου είναι η υπέρ παραγωγή. Οι καιρικές διακυμάνσεις, οδήγησαν σε μεταβλητές ετήσιες συγκομιδές σταφυλιών και η τιμή βραχυπρόθεσμα κατέρευσε. Ευτυχώς, αυτό δεν διήρκεσε αρκετό χρονικό διάστημα αφού η ζήτηση του κρασιού επανήλθε γρήγορα, παίρνοντας τα απαραίτητα μέτρα και θέτωντας κανονισμούς.

1.2 Ιστορική αναδρομή ζύθου

Η λέξη μπίρα, χωρίς να υπάρχουν επιβεβαιωμένες ενδείξεις, υποστηρίζεται ότι προέρχεται από την αγγλοσαξωνική λέξη (Αρχαία Γερμανική, Old Norse) bjorr. Η πρώτη εκτίμηση για την ανακάλυψη της μπίρας, έγινε από τον αρχαιολόγο Huber, προσδιορίζοντας δύο αρχαίες πλάκες, όπου εκτίμησε ότι χρονολογούνται πριν 9000 χρόνια. Αυτή η θεωρία καταρρίφθηκε αργότερα, αξιολογώντας τις πλάκες ως νεότερες, 6000 ετών, όπως αναφέρεται από τους Σουμέριους.

Σύμφωνα με τους Σουμέριους, η ζύμωση εικάζεται ότι ήταν γυναικεία εφεύρεση λόγω της συνήθειας τους να φτιάχνουν άρτο. Με τη βοήθεια του κριθαριού και άλλους σπόρους δημητριακών, αφού τους άφηναν να βλαστήσουν, τους διέβρεχαν με το νερό της βροχής, τους αποξήρηναν στον ήλιο και τους άλεθαν με σκοπό την παραγωγή ζυμαριού. Μετά το ψήσιμο, το ψωμί διαβρεχόταν ξανά με αρκετό νερό. Με μεγάλη απορία των Σουμέριων, το ψωμί ζυμωνόταν χάρη της δράσης των άγριων ζυμών και των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος.

Όταν πλέον η αυτοκρατορία των Σουμέριων καταστράφηκε τη δεύτερη χιλιετία π.Χ., ο πολιτισμός των Βαβυλωνίων, ανέπτυξε και εξέλιξε την ήδη υπάρχουσα τεχνική της παραγωγής μπίρας. Παρήγαγαν είκοσι διαφορετικά είδη μπίρας, από τα οποία τα οχτώ παράγονταν από το φυτό Έμμερ (*Triticumdicocum*), οχτώ από κριθάρι και τέσσερα από μείγμα σπόρων. Παρά το γεγονός ότι δεν υπήρχε κάποια ιδιαίτερη τεχνογνωσία, η μπίρα έβγαине θολή, όμως δεν στάθηκε εμπόδιο στο εμπόριο της αφού έφτανε μέχρι την Αίγυπτο, χιλιόμετρα μακριά.

Υπάρχουν αναφορές από τον Αρχαίο Έλληνα ιστορικό Ηρόδοτο ότι οι Αιγύπτιοι ασχολούνταν με την μπίρα. Με τη βοήθεια των χουρμάδων βοηθούσαν να καλύψουν τυχόν ελαττώματα στη γεύση της. Επιπλέον, υπάρχουν ιθαγενείς όπου ζουν στον Νείλο και παράγουν ακόμη και σήμερα μπίρα με το παλιό παραδοσιακό τρόπο.

Αργότερα, η παραγωγή της μπίρας έγινε γνωστή στην Ευρώπη, με την Ελλάδα και τους Ρωμαίους να είναι οι πρωτοπόροι. Οι Αρχαίοι Γερμανοί (Τεύτονες) με τη σειρά τους χρησιμοποίησαν την μπίρα ως προσφορά στους θεούς τους όταν έκαναν θυσίες και άλλοτε για δική τους προσωπική χρήση (800 π.Χ.).

Κατά το μεσαίωνα, αναλαμβάνουν δράση οι μοναχοί όπου αρχίζουν να χρησιμοποιούν διάφορα μείγματα βοτάνων για να αρωματίσουν την μπίρα τους. Αναγκάστηκαν να θεμελιώσουν έναν νόμο για να εξασφαλίσουν την διασφάλιση της μυστικής συνταγής (Flavour Licence). Έτσι ο λυκίσκος έκανε για πρώτη φορά την εμφάνιση του ως αρωματικό συστατικό και ενίσχυσε το μονοπωλιακό καθεστώς. Υπήρχαν διάφορες αποτυχημένες προσπάθειες καθώς χρησιμοποιούσαν δηλητηριώδη βότανα ή προκαλούσαν παραισθήσεις στους καταναλωτές της μπίρας. Καθώς τα χρόνια περνούν, η βελτίωση της μπίρας και η διάθεση για εξαγωγή της αυξήθηκε ραγδαία. Το 1516 μ.Χ., ο Δούκας της Βαυαρίας, Wilhelm IV, καθιέρωσε με νόμο (Beer Purity Law) τις προδιαγραφές που έπρεπε να έχει μια σωστή Γερμανική μπίρα. Τα κύρια συστατικά της που καθιερώθηκαν ήταν το κριθάρι, ο λυκίσκος και το νερό. Στις αρχές του 19^{ου} αιώνα υπήρχαν δύο επαναστατικές ανακαλύψεις που συμβάλλουν δραστικά στην παραγωγή της μπίρας. Με πρώτη ανακάλυψη να γίνεται από τον James Watt όπου ανακαλύπτει την ατμομηχανή, με αποτέλεσμα η παραγωγή της μπίρας να παίρνει τον δρόμο της βιομηχανοποίησης. Η δεύτερη ήταν η τεχνητή ψήξη από τον Carlvon Linde, δίνοντας την ευκαιρία να μπορεί να παραχθεί μια ποιοτική μπίρα όχι μόνο τον χειμώνα αλλά όλο το χρόνο.

Τον 19^ο αιώνα έγιναν και άλλες πολύ σημαντικές έρευνες σχετικά με την μπίρα. Ο Louis Pasteur, αφιερώνοντας τη ζωή του στη μελέτη της διαδικασίας της μπίρας, διαπίστωσε τη δράση των ζυμών και των βακτηρίων. Επιθυμητή λύση για την αποφυγή ανεπιθύμητων βακτηρίων, πρότεινε την θέρμανση του ζύθου σε υψηλές θερμοκρασίες, αυτό που ονομάζουμε σήμερα «παστερίωση» (pasteurization).

Πολύ σημαντικό ρόλο έπαιξε και η συμβολή του Christian Hansen, Δανός επιστήμονας, ο οποίος κατάφερε να απομονώσει ένα κύτταρο ζύμης, με το οποίο παρήγαγε καθαρή καλλιέργεια ζυμών. Η διαδικασία της ζύμωσης βελτιώθηκε και η γεύση της μπίρας τελειοποιήθηκε. Τέλος, το 1964 τα ξύλινα βαρέλια αντικαταστάθηκαν από μεταλλικά με αποτέλεσμα να γίνεται καλύτερο καθάρισμα, γέμισμα, κλείσιμο και σφράγισμα.

1.3 Βασικά στάδια οινοποίησης

Οινοποίηση ονομάζεται η διαδικασία παραγωγής οίνου, η οποία μπορεί να διαχωριστεί σε τρεις υποκατηγορίες, την λευκή, τη ροζέ και την ερυθρή οινοποίηση. Με πρωταγωνιστικό ρόλο να έχει το σταφύλι, ακολουθώντας διάφορες καλλιεργητικές και βιοχημικές πρακτικές, επιθυμητός στόχος είναι το τελικό προϊόν να έχει όσο δυνατόν καλύτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά σύμφωνα με την ποικιλία και την καλλιεργούμενη περιοχή. Έτσι, υπάρχουν κάποια βασικά στάδια οινοποίησης όπου όμως μπορούν να διαφοροποιηθούν ανάλογα με το είδος του οίνου. Τα βασικά στάδια είναι τα εξής:

- I. Το πιο σημαντικό κομμάτι στην επιτυχία της οινοποίησης είναι η ασφαλής και ομαλή μεταφορά των σταφυλιών στο οινοποιείο. Η μεταφορά γίνεται μέσα σε παραδοσιακά κοφίνια ή πλαστικά τελάρα όσο το δυνατόν γρηγορότερα και ανέπαφα για να αποφευχθούν τυχόν αρνητικές επιπτώσεις στην εκχύλιση και οξείδωση του οίνου.

- II. Στην συνέχεια τα σταφύλια περνούν στο εκραγιστήριο με σκοπό να διαχωριστούν τα κοτσάνια από την ρόγα του σταφυλιού και να παραληφθεί ο χυμός που έχουν στο εσωτερικό τους οι ράγες. Στην λευκή οινοποίηση τα σταφύλια μετά τον απορραγισμό οδηγούνται με την βοήθεια ειδικής αντλίας στο πιεστήριο όπου επιτυγχάνεται η παραλαβή του γλεύκους με διαδοχικές πιέσεις. Για την ερυθρή οινοποίηση μετά το εκραγιστήριο ο σταφυλοπολτός οδηγείται σε δεξαμενές ζύμωσης με ελεγχόμενη θερμοκρασία 26 °C έως 28 °C.
- III. Για την λευκή οινοποίηση, όταν το γλεύκος παραλαμβάνεται από το πιεστήριο οδηγείται στις δεξαμενές, ακολουθεί η διαδικασία απολάσπωσης, όπου πραγματοποιείται η καθίζηση αιωρούμενων σωματιδίων και η μεταφορά του διαυγούς πλέον γλεύκους σε καθαρές δεξαμενές ζύμωσης. Για την ερυθρή οινοποίηση, εφόσον παραλείπεται το στάδιο του πιεστηρίου και της απολάσπωσης, ξεκινάει η ζύμωση με την παρουσία των στέμφυλων (τα κουκούτσια και οι φλούδες) και βοστρύχων και μέσω της διαβροχής πραγματοποιείται η εκχύλιση. Με τη διαδικασία της εκχύλισης επιτυγχάνεται ο εμπλουτισμός του χυμού των σταφυλιών με ανθοκυάνες, όπου είναι υπεύθυνες για το χρώμα, και με τανίνες, όπου είναι υπεύθυνες για τη στυφότητα των ερυθρών οίνων, ενώσεις οι οποίες είναι σημαντικές κυρίως για τους ερυθρούς οίνους.
- IV. Έπειτα ακολουθεί η διαδικασία της ζύμωσης όπου είναι κοινή για τις δύο οινοποιήσεις, λευκή και ερυθρή, όπου πραγματοποιείται η παραγωγή των κύριων προϊόντων, δηλαδή η μετατροπή των σακχάρων σε αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα. Επίσης, πραγματοποιείται η παραγωγή δευτερευόντων προϊόντων, όπως του μεταβολισμού των ζυμών, όπου είναι υπεύθυνα για την παραγωγή οίνου ποιότητας. Ωστόσο, για την ερυθρή οινοποίηση, η ζύμωση γίνεται με την παρουσία στεμφύλων, για να επιτευχθεί το επιθυμητό ερυθρό χρώμα, όπως και οι τανίνες, όπου αναφέρθηκε και στο στάδιο της εκχύλισης. Εφόσον, οι δύο αυτοί παράγοντες, δηλαδή η εκχύλιση, έχει το επιθυμητό αποτέλεσμα, γίνεται ο διαχωρισμός από τα στέμφυλα, όσο το γλεύκος ζυμώνει.
- V. Επιπρόσθετα, για την ερυθρή οινοποίηση ξεκινάει η μηλογαλακτική ζύμωση, όπου συμβαίνει η μετατροπή του μηλικού οξέος από τα γαλακτικά βακτήρια σε γαλακτικό οξύ και βοηθάει στην μείωση της οξύτητας. Για την λευκή οινοποίηση, το στάδιο V είναι η παραμονή του στις δεξαμενές για την επίτευξη της ωρίμανσης.
- VI. Για την ερυθρή οινοποίηση ακολουθεί το στάδιο της ωρίμανσης.
- VII. Ακολουθεί η σταθεροποίηση του οίνου, όπου ισχύει και για τις δύο οινοποιήσεις. Πραγματοποιούνται διάφορες φυσικοχημικές και βιοχημικές κατεργασίες.
- VIII. Επόμενο στάδιο είναι η διήθηση, όπου είναι υπεύθυνο για την επίτευξη διαυγές οίνου.
- IX. Εφόσον έχει ολοκληρωθεί και το στάδιο VIII ακολουθεί η εμφιάλωση του οίνου.

Το στάδιο IX ισχύει για οίνους ταχείας κατανάλωσης, συνήθως λευκούς οίνους, σπανιότερα για ερυθρούς. Για τους ερυθρούς ακολουθεί η διαδικασία της παλαίωσης όπου ανάλογα με την ποικιλία και την καλλιεργούμενη περιοχή, παλαιώνουν από 6 μήνες έως 4 χρόνια σε δρύινα βαρέλια. Μετά το πέρας της παλαίωσης ακολουθούν τα στάδια που προαναφέρθηκαν, δηλαδή οι απαραίτητες κατεργασίες, η διήθηση και η εμφιάλωση του τελικού προϊόντος.

1.4 Βασικά στάδια ζυθοποίησης

Ζυθοποίηση ονομάζεται η διαδικασία παραγωγής ζύθου και ανεξαρτήτως από το είδος μπίραςπου θα παραχθεί υπάρχουν κάποια βήματα που πρέπει να ακολουθηθούν. Στην ζυθοποίηση χρησιμοποιούνται δύο είδη κριθαριού, το δίστιχο και το εξάστιχο, το οποίο μετατρέπεται σε βύνη για να μπορεί να χρησιμοποιηθεί. Η Βυνοποίηση παίζει πρωταρχικό ρόλο για να παραχθεί ένα αξιόλογο τελικό προϊόν. Η διαδικασία της βυνοποίησης περιλαμβάνει την συλλογή του κριθαριού, τον σωστό καθαρισμό της από σκόνες και διάφορους τυχόν ξένους μικροοργανισμούς. Ακολουθεί η ταξινόμηση των κόκκων του, η διαβροχή του, η βλάστηση και η ξήρανση του. Αξιοσημείωτο είναι ότι ανάλογα με τον τύπο βύνης που θα παραχθεί υφίσταται μια επιπλέον κατεργασία καβουρδίσματος για να παραληφθεί καστανή και βαθύχρωμη βύνη για να παραχθεί η αντίστοιχη μπίρα.

- I. Το πρώτο σημαντικό στάδιο είναι η άλεση της βύνης. Ο κύριος στόχος είναι η επίτευξη της αύξησης της επιφάνειας της βύνης, όπου τα ένζυμα έχουν την δυνατότητα να δράσουν και τα αποκοδομήσουν τις ουσίες που βρίσκονται σε αυτή.
- II. Ακολουθεί η διαδικασία της πολτοποίησης, όπου δρουν διάφορα ένζυμα και διασπούν τις αδιάλυτες ουσίες της βύνης σε διαλυτές, π.χ. άμυλο και πρωτεΐνες. Με αυτό τον τρόπο δημιουργείται το ζυμώσιμο και μη ζυμώσιμο εκχύλισμα.
- III. Επόμενο στάδιο αποτελεί η διήθηση, όπου είναι η απομάκρυνση των υπολειμμάτων της βύνης. Ταυτόχρονα, πραγματοποιείται η έκπλυση των βυνοϋπολειμάτων για να συγκεντρωθεί ολόκληρο το εκχύλισμα. Έτσι, παραλαμβάνεται το τελικό εκχύλισμα όπου αποτελείται από τις ζυμώσιμες και μη ζυμώσιμες ουσίες.
- IV. Το στάδιο IV είναι ο βρασμός του βυνογλεύκου. Σε αυτό το στάδιο γίνεται και η προσθήκη κατάλληλου λυκίσκου. Επιπρόσθετα, επιτυγχάνεται η αποστείρωση του βυνογλεύκου, η καταστροφή των ενζύμων, η παραγωγή διάφορων ενώσεων με αποτέλεσμα τη δημιουργία νέων αρωμάτων, η συμπύκνωση της πυκνότητας στον επιθυμητό βαθμό, η κροκίδωση των πρωτεϊνών όπου απομακρύνονται ως θερμό ίζημα.
- V. Με το πέρας του χρόνου βρασμού ακολουθεί η μεταφορά του ζυθογλεύκου μέσα από αντλίες σε αναδευτήρες για την απομάκρυνση των στερεών υπολειμμάτων και ύστερα με την βοήθεια εναλλακτών ροής για την ψύξη του ζυθογλεύκου. Όταν υπάρχουν οι κατάλληλες συνθήκες προστίθενται οι ζύμες για να ξεκινήσει η διαδικασία της ζυθοποίησης. Ανάλογα άμα είναι βυθοζύμες οι θερμοκρασίες πρέπει να κυμαίνονται από 6 έως 9 °C ενώ εάν είναι αφροζύμες από 18 έως 21 °C.
- VI. Το ζυθογλεύκος μεταφέρεται σε δεξαμενές ζύμωσης για να ξεκινήσει η διαδικασία της ζύμωσης. Συγκεκριμένα με την βοήθεια βυθοζυμών η ζύμωση κρατάει 8 έως 12 μέρες ενώ με την βοήθεια αφροζυμών οι μέρες μειώνονται αρκετά σε 2 έως 5. Επομένως, στο στάδιο VI παράγονται τα κύρια προϊόντα όπου είναι η αιθυλική αλκοόλη και το διοξείδιο του άνθρακα. Παράλληλα, παράγονται και δευτερεύοντα προϊόντα μέσω του μεταβολισμού των ζυμών, όπου παίζουν καταλυτικό ρόλο στα τελικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά.

- VII. Αφού ολοκληρωθεί η ζύμωση ακολουθεί η ωρίμανση όπου λαμβάνει χώρα μέσα στις δεξαμενές σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες 0 έως 2 °C για 4 έως 8 εβδομάδες. Κατά την περίοδο αυτή η μπίρα εξελίσσεται.
- VIII. Τέλος, την σειρά τους έχουν το φιλτράρισμα, η εμφιάλωση και η σωστή αποθήκευση. Ως ποτό με μικρό αλκοολικό βαθμό θέλει ιδιαίτερη μεταχείριση, σε δροσερό περιβάλλον.

1.5 Σύσταση του οίνου και ζύθου

1.5.1 Σύσταση του οίνου

Όπως είναι γνωστό η πρώτη ύλη που χρησιμοποιείται για την παραγωγή κρασιού είναι το σταφύλι. Το σταφύλι αποτελείται από βοστρύχους, φλοιούς, γίγαρτα και σάρκα όπου είναι οι πρώτες ενδείξεις για το τελικό προϊόν. Μέσω των διάφορων αμπελοοινικών τεχνικών, βιολογικών και χημικών πρακτικών αναδεικνύονται με τον ορθό τρόπο τα συστατικά του σταφυλιού. Στη συνέχεια προστίθενται και άλλες ουσίες, όπως επίσης και στο τέλος της ζύμωσης, όπου συνεισφέρουν με τη σειρά τους για οίνους ποιότητας.

- Σάκχαρα

Τα σάκχαρα αποτελούν τη βασική πηγή αλκοόλης και άλλων υποπροϊόντων της αλκοολικής ζύμωσης και συνεισφέρουν τόσο στα οργανοληπτικά συστατικά όσο και στη θρεπτική αξία του οίνου. Σύμφωνα με τον τύπο κρασιού, την τελική ποσότητα αλκοόλης, ο οινοπαραγωγός αποφασίζει τη χρονική διάρκεια του τρύγου. Λόγω των καλλιεργητικών πρακτικών, τη γεωγραφική θέση, και το κλίμα διαμορφώνεται και η περιεκτικότητα των σακχάρων στις ράγες των σταφυλιών.

- Οξέα

Τα κυριότερα οξέα που συναντώνται στο γλεύκος είναι το τρυγικό, το μηλικό και το κιτρικό. Η παρουσία των οξέων στο γλεύκος έχει ενδιαφέρον, διότι συμβάλλουν στη χρονική διάρκεια του τρύγου και της ζύμωσης, όσο και στη σωστή επιλογή ζυμομυκήτων. Σημαντικό ρόλο έχει και στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του οίνου που θα παραχθεί.

- Νερό

Το νερό βρίσκεται σε μεγαλύτερη αναλογία από τα συστατικά. Υπάρχει στο σταφύλι, στο γλεύκος και στο τελικό προϊόν. Είναι ο διαλύτης όλων των συστατικών και συνεισφέρει σε όλες τις κατεργασίες που πραγματοποιούνται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης.

- Αζωτούχες ενώσεις

Οι αζωτούχες ενώσεις παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον από οινολογικής πλευράς. Είναι πηγές αζώτου και βοηθούν στην ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό των ζυμομυκήτων. Συνήθως προϋπάρχουν στα σταφύλια, όμως υπάρχουν περιπτώσεις όπου προστίθενται στην αρχή της ζύμωσης για να δημιουργήσουν ευνοϊκές συνθήκες για την ανάπτυξη των ζυμομυκήτων.

- Ζύμες

Διάφορα είδη ζυμομυκήτων προϋπάρχουν στο σταφύλι, όπου έχουν την δυνατότητα να συντελέσουν την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης. Όμως, το γλεύκος συνήθως εμβολιάζεται με επιλεγμένα είδη ζυμών είτε στην αρχή της αλκοολικής ζύμωσης, είτε στην πορεία της. Οι επιλογή ζυμών έχει καθοριστική σημασία στο τελικό προϊόν, εφόσον είναι υπεύθυνες μέσω του μεταβολισμού τους για την περιεκτικότητα σε αλκοόλη και την παραγωγή των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών που διαθέτει ο τελικός οίνος.

1.5.2. Σύσταση του ζύθου

- Βύνη

Η βύνη είναι αδιαμφισβήτητα ένα από τα βασικά συστατικά της μπίρας. Προέρχεται από την πρώτη ύλη όπου είναι το κριθάρι. Σύμφωνα με την επεξεργασία που υπέστη δίνει και τα ανάλογα χαρακτηριστικά της στο τελικό προϊόν, τόσο γευστικά όσο και χρωματικά. Η βύνη αποτελείται από ζυμώσιμα σάκχαρα, όπως είναι η γλυκόζη, η φρουκτόζη, η μαλτόζη και η μαλτοτριόζη. Ωστόσο, περιέχει και δεξτρίνες όπου είναι μη ζυμώσιμοι ολιγοσακχαρίτες. Επιπλέον περιέχει πρωτεϊνικά συστατικά όπου συνεισφέρουν στη σταθεροποίηση του αφρού της μπίρας.

- Νερό

Το νερό είναι το κυριότερο συστατικό της μπίρας, όπου καταλαμβάνει ποσοστό 90%. Η σύνθεση του νερού που χρησιμοποιείται έχει καθοριστική επίδραση στη ποιότητα του τελικού προϊόντος. Το νερό αξιολογείται ως προς τα ιχνοστοιχεία του, την σκληρότητα του και προσδίδει τα απαραίτητα χαρακτηριστικά στη ζύμωση της μπίρας.

- Λυκίσκος

Η βύνη δίνει τα σάκχαρα, ο λυκίσκος προσδίδει τη πικρή γεύση και το άρωμα στη μπίρα. Λόγω των ιδιοτήτων του συνεισφέρει στην εξισορρόπηση της γλυκιάς γεύσης της βύνης, στον αρωματικό χαρακτήρα, στην αντιβακτηριακή προστασία και φυσική διαύγηση. Επομένως, η διαλογή του λυκίσκου συμβάλλει ενεργά στον οργανοληπτικό χαρακτήρα της μπίρας.

- Ζύμες

Οι ζύμες είναι οι κύριοι παράγοντες που ευθύνονται για τη ζύμωση τόσο της οινοποίησης όσο και της ζυθοποίησης. Με τη χρήση επιλεγμένων ζυμών ακολουθεί η ομαλή εκκίνηση της ζύμωσης και τελική απολαβή των βέλτιστων οργανοληπτικών χαρακτηριστικών στο τελικό προϊόν.

2^ο Κεφάλαιο: Οι ζύμες και ο ρόλος τους στην παραγωγή οίνου και ζύθου

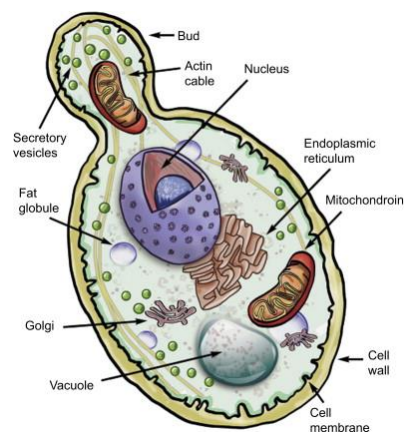
2.1 Γενικά χαρακτηριστικά των ζυμών

Οι ζύμες είναι ευκαρυωτικοί μονοκύτταροι μικροοργανισμοί που διανέμονται ευρέως στο φυσικό περιβάλλον. Περίπου 1000 είδη ζυμών είναι γνωστά, όμως αυτό στην πραγματικότητα αντιπροσωπεύει μόνο ένα κλάσμα της βιοποικιλότητας ζυμών στην Γη. Οι ζυμωτικές της δραστηριότητες έχουν αξιοποιηθεί από ανθρώπους για χιλετίες στην παραγωγή μπίρας, κρασιού και ψωμιού.

Ποικίλλουν σε μέγεθος, σχήμα και χρώμα αναλόγως του γένους ή του είδους. Μπορούν να παρατηρηθούν μόνο με μικροσκόπιο και όχι με γυμνό οφθαλμό λόγω των μικρών του διαστάσεων καθώς και του μήκους των κυττάρων τους που φθάνει τα 6-12 μm. Τα κύτταρα της ζύμης μπορεί να είναι ελλειψοειδή-ωοειδή (*Saccharomyces spp.*), κυλινδρικά με ημισφαιρικά άκρα (*Schizosaccharomyces spp.*), φιαλόμορφα (*Pityrosporum spp.*), νηματοειδή με ψευδούφες και διαφράγματα (π.χ. *Candida albicans*), τριγωνικά (*Trigonopsis spp.*), καμπυλωτά (*Cryptococcus cereamius*), σφαιρικά ή επικείμενα (Walker, 1998). Το είδος ζυμομύκητα που χρησιμοποιήθηκε περισσότερο και μελετήθηκε είναι ο *Saccharomyces cerevisiae*. Αυτό το είδος αναπαράγεται χωρίς επαφή με την εκκόλαψη και φυλετικά με την σύζευξη των κυττάρων των αντίθετων τύπων ζευγαρώματος. Άλλες ζύμες αναπαράγονται με σχάση, παραδείγματος χάρη ο *Schizosaccharomyces pombe*, και με σχηματισμό ψευδοϋφών όπως οι διμορφικές ζύμες, όπως το παθογόνο *Candida albicans* (Walker G., 2009).

Διαθέτουν δομή ενός ευκαρυωτικού κυττάρου με ένα εξωτερικό κυτταρικό τοίχωμα που περιβάλλει εσωτερικά τα οργάνιδια. Μέσα σε αυτό βρίσκεται το μιτοχόνδριο όπου παίζει σημαντικό ρόλο διότι εκεί πραγματοποιείται ο κύκλος του Krebs.

ΕΙΚΟΝΑ 1: ΤΑ ΚΥΡΙΑ ΓΝΩΡΙΣΜΑΤΑ ΕΝΟΣ ΤΥΠΙΚΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΥ ΖΥΜΗΣ (RUSSEL I., STEWART G. G., 1998)



Ο κύκλος του Krebs, γνωστός και ως κύκλος του κιτρικού οξέος ή κύκλος του τρικαρβοξυλικού οξέος, είναι μια από τις σημαντικότερες αλληλουχίες αντίδρασης στην Βιοχημεία. Η σειρά αντιδράσεων όπου συντελούνται στον κύκλο του Krebs, ευθύνονται για τις περισσότερες ενεργειακές ανάγκες σε πολύπλοκους οργανισμούς, τα μόρια που παράγονται σε αυτές τις αντιδράσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δομικά στοιχεία για μεγάλο αριθμό σημαντικών διεργασιών, συμπεριλαμβανόμενης της σύνθεσης των λιπαρών οξέων, στεροειδών,

χοληστερόλης, αμινοξέα για την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών, και για τις πουρίνες και πυραμιδίνες όπου χρησιμοποιούνται στην σύνθεση του DNA (Morris, 2015).

Στην ζυθοποίηση όπως και στην οινοποίηση, η ζύμη έχει την ιδιότητα να μετατρέπει τα σάκχαρα της ζύμης σε αιθυλική αλκοόλη και διοξείδιο του άνθρακα (CO₂) σε αερόβιες συνθήκες αλλά και να μεταβολίζει τα σάκχαρα σε CO₂ και νερό (H₂O) υπό αερόβιες συνθήκες. Το διοξείδιο του άνθρακα που σχηματίζεται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης μπορεί να έχει θετικό είτε αρνητικό αντίκτυπο στη συνολική απόδοση του ζύθου ή οίνου αντίστοιχα.

Παρόλο που η επιστήμη έχει δώσει την δυνατότητα στην ειδίκευση και τεχνογνωσία των βιομηχανικών διεργασιών, η κατάλληλη διαχείριση της ζύμωσης φαίνεται να είναι μια διαδικασία η οποία εξισορροπεί την ανάπτυξη της ζύμης με τον μεταβολισμό της, προκειμένου να σχηματίζονται οι επιθυμητές ενώσεις τόσο των γεύσεων και των αρωμάτων εντός ενός συγκεκριμένου χρονικού πλαισίου. Η ανάπτυξη των ζυμομυκήτων προχωρά μέσω τεσσάρων μεγάλων κατηγοριών (Lodolo et. al. , 2008).

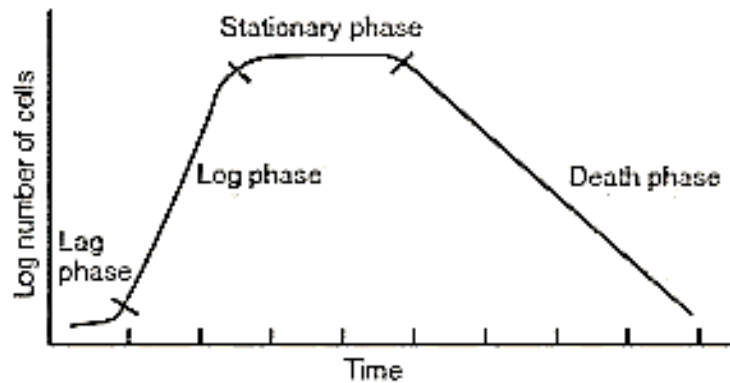
- Λανθάνουσα φάση (Lag phase):
Οι μικροοργανισμοί υπόκεινται σε κατάσταση όπου στην αρχή δεν πολλαπλασιάζονται αλλά προσπαθούν να προσαρμοστούν στο νέο περιβάλλον. Σημαντικό ρόλο παίζουν κάποιοι παράγοντες όπως η θερμοκρασία, το pH, η παρουσία ή απουσία οξυγόνου. Σύμφωνα με την διάρκεια αυτής της φάσης κρίνεται η πορεία της ζύμωσης διότι για παράδειγμα εάν ο ζυμομύκητας στην παραγωγή οίνου καθυστερήσει να ξεκινήσει η ζύμωση θα έχει ανεπιθύμητα αποτελέσματα. Τα υπάρχοντα βακτήρια θα αναπτύσσονται και θα καταναλώνουν τα σάκχαρα με αποτέλεσμα το γλεύκος και η ποιότητα του τελικού προϊόντος να αποδυναμωθεί και να αποκτήσει μη επιθυμητά χαρακτηριστικά (Νεραντζής, 2010).
- Εκθετική φάση (Exponential phase):
Κατά την διάρκεια της εκθετικής φάσης, όπου λόγω των άριστων συνθηκών που επικρατούν, οι μικροοργανισμοί αρχίζουν να διαιρούνται με ταχύ ρυθμό και ο αριθμός τους αυξάνεται εκθετικά. (Νεραντζής, 2010)
- Στατική φάση (Stationary phase):
Οι μικροοργανισμοί εξακολουθούν να καταναλώνουν τα θρεπτικά υλικά που υπάρχουν, με αποτέλεσμα κάποια στιγμή αυτά να αρχίζουν να μειώνονται. Επομένως, ξεκινά να υπάρχει μια σταδιακή μείωση της ανάπτυξης τους. Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών μειώνεται και ο αριθμός των κυττάρων που παράγεται είναι ίσος με αυτόν που πεθαίνει. (Νεραντζής, 2010)
- Φάση θανάτου (Death phase):
Τα κύτταρα που πεθαίνουν γίνονται όλο και περισσότερα με αποτέλεσμα να σταματούν να μεταβολίζουν. Στη φάση θανάτου η καλλιέργεια λύεται σταδιακά με αναλαμπές ανάπτυξης και καταβύθισης. Τα εναπομείναντα κύτταρα αναπτύσσονται μέχρι να τελειώσει το νέο υπόστρωμα και να βυθιστεί η καλλιέργεια σε μικρότερες συγκεντρώσεις. (Νεραντζής, 2010)

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την καμπύλη ανάπτυξης ενός μικροοργανισμού είναι οι εξής βασικοί:

1. Η Θερμοκρασία όπου κάθε μικροοργανισμός έχει την βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης η οποία είναι μια περιοχή θερμοκρασιών στην οποία η ταχύτητα ανάπτυξης είναι μέγιστη.
2. Το pH όπου η συγκέντρωση υδρογόνου επηρεάζει είτε θετικά είτε αρνητικά την ανάπτυξη των μικροοργανισμών.
3. Η διαθεσιμότητα του νερού όπου ποικίλλει και εξαρτάται από την ποσότητα του νερού και την συγκέντρωση των διαλυτών στερεών που υπάρχουν στο νερό.

4. Η ωσμωτική πίεση όπου πολλοί μικροοργανισμοί έχει παρατηρηθεί ότι δεν μπορούν σε υψηλή ωσμωτική πίεση. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην αλατότητα ή στην περιεκτικότητα του σακχάρου είτε σε αυξημένη συγκέντρωση ηλεκτρολυτών στο θρεπτικό υλικό.
5. Το οξυγόνο όπου υπάρχουν διάφορες υποκατηγορίες ανάλογα με την απαίτηση του κάθε μικροοργανισμού. Υπάρχουν οι αυστηρά αερόβιοι, υποχρεωτικά αερόβιοι, μικροαερόφιλους, υποχρεωτικά αναερόβιους.

ΕΙΚΟΝΑ 2: ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ



2.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Η ζύμη που έχει χρησιμοποιηθεί εκτενέστερα από την ανθρωπότητα είναι ο *Saccharomyces cerevisiae*, για την παραγωγή οίνου, μπύρας, ψωμιού, την εξαγωγή φαγητού και αρωμάτων, όπως επίσης και για θεραπευτικούς σκοπούς.

Ο *S. cerevisiae* ανήκει στο γένος *Saccharomyces*, όπου μελετήθηκε για πρώτη φορά το 1838 από το Meyen και προσδιορίστηκε το 1970 από τους Rees. Είναι ένας ευκαρυωτικός μικροοργανισμός όπου ανήκει στο βασίλειο των μυκήτων και την κλάση των ασκομυκήτων. Το κυτταρικό του τοίχωμα είναι συνήθως ελλειψοειδές, αν και αυτό μπορεί να διαφέρει σύμφωνα με το κάθε στέλεχος. Έχει σχήμα είτε ωοειδές, είτε σφαιρικό ή κυλινδρικό. Η διάμετρος του κυττάρου του κυμαίνεται από 5-10μm και το πλάτος του από 1-3 και 1-7μm και η αναπαραγωγή του γίνεται εγγενώς (Παπανικολάου, 2006). Το γονιδίωμα του είναι περίπου 12,2 Mb με 6.275 γονίδια, οργανωμένα σε συμπαγή μορφή με 16 χρωμοσώματα. Θεωρείται ότι μόνο τα 5.800 γονίδια είναι λειτουργικά.

Λόγω των ελάχιστων απαιτήσεων ανάπτυξης, οι ζυμομύκητες έχουν εύκολη διαχείριση για να αναπτυχθούν στο εργαστήριο (*in vitro*). Λαμβάνοντας υπόψη, ότι ο συγκεκριμένος ζυμομύκητας έχει την πιο προηγμένη επιλογή γενετικής, χρησιμοποιείται ως κύριο μοντέλο για ανακαλύψεις σε μηχανισμούς γονιδιακής ρύθμισης και άλλες κυτταρικές διεργασίες τις τελευταίες δεκαετίες (Duina et. al. , 2014).

2.3 Οι non-*Saccharomyces* ζύμες

Τα προηγούμενα χρόνια οι non-*Saccharomyces* ζύμες χαρακτηρίζονταν ως ζύμες αλλοίωσης λόγω των πολλών προβλημάτων που δημιουργούσαν στη ζύμωση με το βασικότερο πρόβλημα τους να είναι η χαμηλή αντοχή στην αιθανόλη κατά τη ζυμωτική φάση (Ταταρίδης , 2013). Αυτά τα προβλήματα έχουν αρχίσει σταδιακά να ελαττώνονται, διότι η γνώση και η

τεχνογνωσία αναπτύσσεται με ραγδαίους ρυθμούς. Σε αυτό έχει συνδράμει το αυξανόμενο ενδιαφέρον για τη χρήση τους είτε ως μεμονωμένες ζύμες εκκίνησης, είτε σε συνδυασμό με ένα συμβατικό στέλεχος όπως ο *S. cerevisiae* για την παραγωγή ζύθων, οίνων και άλλων οينوπνευματωδών ποτών. Οι λόγοι που χρησιμοποιούνται ποικίλλουν και συνήθως προτείνονται για την θετική τους επίδραση στο άρωμα των οίνων και ζύθων. Διακρίνονται, επίσης, για την συνεισφορά τους στη μείωση του επιπέδου αλκοόλης, τη ρύθμιση της οξύτητας, όπως και για την παραγωγή ενζύμων που βοηθούν στην βελτίωση κατά την διαδικασία της οينوποίησης, για παράδειγμα διήθηση και εκχύλιση χρωμάτων (Padilla et. al. , 2016); (Petruzzi et. al. , 2017).

Τα είδη *non-Saccharomyces* τα οποία έχουν μελετηθεί εκτενέστερα είναι τα εξής: *Torulaspora delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Candida zemplinina*, είδη *Hanseniaspora* και *Lachancea thermotolerans* (Comitini et. al., Selected non-Saccharomyces wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*, 2011) *Schizosaccharomyces pombe* και *Pichia Kluyveri* (Benito et. al. , 2019). Τα περισσότερα είδη που προαναφέρθηκαν δεν έχουν το ίδιο θετικά ζυμωτικά χαρακτηριστικά συγκριτικά με τον συμβατικό ζυμομύκητα *S. cerevisiae*. Αρχικά, κατά το μεταβολισμό των σακχάρων, παρουσιάζουν μικρή ικανότητα ζύμωσης σε αιθανόλη και χαμηλή αντοχή σε πρόσθετα όπως το θειώδες (SO₂) με εξαίρεση το είδος *Schizosaccharomyces* που αντέχει σε αυτές τις συνθήκες.

Η ζυμωτική ικανότητα των παραπάνω ζυμομυκήτων παρουσιάζει περιθώρια βελτίωσης εάν εφαρμοστούν μαζί με ένα εμπορικό στέλεχος *S. cerevisiae*. Αυτή η συνύπαρξη όμως, προδιαθέτει μια καθυστέρηση ως προς την ολοκλήρωση της ζύμωσης λίγων ημερών σε σύγκριση με έναν καθαρό εμβολιασμό *S. cerevisiae* (Benito et. al. , 2019).

2.3.1 Ο ρόλος των *non-Saccharomyces* στη παραγωγή οίνου και ζύθου

Όπως έχει αναφερθεί, οι περισσότερες αλκοολικές ζυμώσεις γίνονταν με τη χρήση του *Saccharomyces cerevisiae*, ο οποίος είναι υπεύθυνος για την μετατροπή των σακχάρων σε αιθανόλη και την παραγωγή των αναρρίθμητων δευτερευόντων μεταβολιτών, οι οποίοι είναι στενά συνδεδεμένοι με την αρωματικό χαρακτήρα του τελικού προϊόντος (Berbegal, C. et. al., 2017). Επιπρόσθετα με τον *S. cerevisiae*, ο μούστος περιέχει φυσικά μεικτές καλλιέργειες από διάφορα γένη και είδη *non-Saccharomyces*, σε διάφορες περιεκτικότητες, οι οποίες συμπεριλαμβάνονται και στην αλκοολική ζύμωση (Maicas & Mateo , 2016). Οι *non-Saccharomyces* ζύμες για τα πρώτα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης υπερισχύουν μέχρι η αλκοόλη να φτάσει τα επίπεδα 4 % (v/v), όταν οι περισσότερες μη συμβατικές ζύμες δεν μπορούν πλέον να επιβιώσουν (Pretorius I. , 2020). Παλαιότερα, επικρατούσε η άποψη ότι οι μη συμβατικές ζύμες ήταν επιζήμιες για την αλκοολική ζύμωση, λόγω της χαμηλής ζυμωτικής ικανότητας, της χαμηλής αντοχής σε οινολογικά πρόσθετα, όπως είναι το διοξείδιο του θείου και λόγω της παραγωγής του οξικού οξέος. Επίσης, οι *non-Saccharomyces* θεωρούνταν υπεύθυνες για την υψηλή πτητική οξύτητα, την παραγωγή οξικού αιθυλεστέρα, τις δυσάρεστες οσμές και τις επιμολύνσεις των τελικών προϊόντων. Ωστόσο, σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, οι μη συμβατικές ζύμες συνεισφέρουν στην διαδικασία της αλκοολικής ζύμωσης και της ποιότητας του οίνου και ζύθου, ειδικά σε συνεμβολιασμό με τον *S. cerevisiae* (Berbegal, C. et. al., 2017); (Maicas & Mateo , 2016); (Tristezza, M. et. al. , 2016); (Comitini et. al., 2017); (Berbegal, C. et. al., 2020).

2.4 Η σημασία του συνεμβολιασμού του *Saccharomyces cerevisiae* με τις *non-Saccharomyces* ζύμες

Κατά την διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας έχουν γίνει πολλές έρευνες για μεικτές ζυμώσεις με *Saccharomyces cerevisiae* και μη συμβατικές ζύμες (Comitini et. al., 2011). Βέβαια το αποτέλεσμα της μεικτής καλλιέργειας στην τελική ποιότητα του κρασιού ή του ζύθου εξαρτάται από τα στελέχη που χρησιμοποιούνται και τις τεχνικές εμβολιασμού (Sadoudi et. al., 2012).

Γενικά υπάρχουν δύο τρόποι εμβολιασμού με τις μη συμβατικές ζύμες σε μεικτές καλλιέργειες. Η πρώτη μέθοδος είναι ο συνεμβολιασμός του επιλεγμένου *non-Saccharomyces* στελέχους σε υψηλή συγκέντρωση κυττάρων με την ταυτόχρονη προσθήκη στελέχους *S. cerevisiae*. Η δεύτερη μέθοδος, είναι ο διαδοχικός εμβολιασμός, όπου στον αρχικό εμβολιασμό των *non-Saccharomyces* που ζυμώνουν μόνοι τους για ένα χρονικό διάστημα προστίθεται ο *S. cerevisiae* για να ολοκληρωθεί η ζύμωση (Comitini et. al., 2011). Υποστηρίζεται, ότι καλύτερη μέθοδος συνεμβολιασμού είναι ο διαδοχικός εμβολιασμός διότι αποφέρει οίνους με μεγαλύτερη πολυπλοκότητα (Benito et. al. , 2019).

Οι Jood et al. το 2017 έδειξαν ότι οι μεικτές ζυμώσεις που χρησιμοποιούν τον *S. cerevisiae* και διάφορα είδη *Kazachstania* έχουν πολύ ιδιαίτερο αρωματικό προφίλ, ενώ οι Varela et al. το 2016 ανέδειξαν ότι οι ζυμώσεις που γίνονται με το συνδυασμό *Metschnikowia pulcherrima* και *S. uvarum* χαρακτηρίζονται από αυξημένες συγκεντρώσεις 2-φαινυλαιθιλικής αλκοόλης και 2-οξικού φαινυλαιθυλεστέρα ουσίες στενά συνδεδεμένες με θετικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά.

Στη ζυθοποίηση, το ζυθογλεύκος αερίζεται πριν ή κατά την προσθήκη των ζυμών για να υποστηριχθεί η πρωταρχική ανάπτυξη του πληθυσμού. Κατά τη διάρκεια της προσθήκης των ζυμομυκήτων, η ζύμωση διεξάγεται χωρίς προσθήκη οξυγόνου, στην περίπτωση όμως της χρήσης κάποιου μη συμβατικού ζυμομύκητα (π.χ. *T. delbrueckii*) απαιτείται ένα χαμηλό επίπεδο οξυγόνου για την πραγματοποίηση της. Κατά την συνδυαστική καλλιέργεια των *non-Saccharomyces* και *Saccharomyces* αυτή η εξάρτηση από το οξυγόνο μπορεί να επιφέρει ελεγχόμενη ανάπτυξη των μη συμβατικών ζυμών (Capece et. al. , 2018).

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός, ότι τα στελέχη *S. cerevisiae* που θα επιλεγθούν θα πρέπει να πληρούν ορισμένα χαρακτηριστικά για την ομαλή συμβίωση τους με *non-Saccharomyces*. Μερικά από τα χαρακτηριστικά που αναζητούν τα στελέχη των *S. cerevisiae*, είναι η αποτελεσματική μετατροπή των σακχάρων σε διοξειδίο του άνθρακα, η υψηλή ενζυμική δραστηριότητα, η υψηλή παραγωγή γλυκερόλης και επιθυμητές δευτερογενείς ενώσεις (Maicas & Mateo , 2016).

Η χρήση μη συμβατικών ζυμών στη μπύρα, όπως για παράδειγμα η *Torulaspora delbrueckii*, ο *Brettanomyces/Dekkera* έχουν μελετηθεί σε καθαρές ζυμώσεις για παραγωγή ζύθου με χαμηλό αλκοολικό τίτλο και ενίσχυση του οργανοληπτικού προφίλ του. Ορισμένα στελέχη δεν έχουν τη ικανότητα να ζυμώνουν όλα τα σάκχαρα του ζυθογλεύκου, όλα όμως τα στελέχη επιδρούν θετικά στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Υπάρχουν μελέτες στις οποίες αποδεικνύεται ότι τα στελέχη της *T. delbrueckii* σε καθαρή καλλιέργεια και σε μεικτή καλλιέργεια με στελέχη του *S. cerevisiae* να παρατηρείται αξιοσημείωτη αλλαγή στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Όταν τα συγκεκριμένα στελέχη ζυμώνουν μόνο τους τότε οι ζυμώσεις χαρακτηρίζονται από νότες φρούτων και γεμάτο σώμα, ενώ όταν βρίσκονται σε μεικτές ζυμώσεις το άρωμα των φρούτων είναι πιο ενισχυμένο και υπάρχει η αίσθηση ενός ήπιου αρώματος λυκίσκου. Επίσης, αυτές οι μπύρες έχουν μεγαλύτερη διαύγεια και πιο συμπαγή αφρό. Σε πρόσφατες μελέτες, οι Holt et. al. (2018) έλεγξαν διεξοδικά 17 μη συμβατικά είδη ζυμών σε διαδοχικές ζυμώσεις, με *S. cerevisiae*. Σε αυτές τις ζυμώσεις, πιθανά αρώματα είναι της μπανάνας χάρη στον οξικό ισοαμυλεστέρα από τη *Pichia kluyverii*, πιο πικάντικα αρώματα

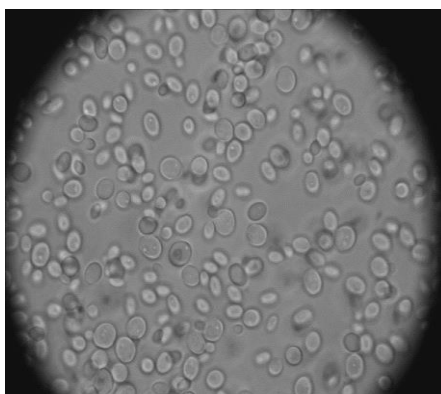
(από τις φαινολικές ενώσεις) από είδη *Brettanomyces* και άρωμα τριαντάφυλλου από τη *T. delbrueckii*.

3^ο Κεφάλαιο: *Metschnikowia pulcherrima*

3.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Η *Metschnikowia pulcherrima* ή όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία *Candida pulcherrima*, *Saccharomyces pulcherrimus*, *Rhodotorula pulcherrimus* ανήκει κι αυτή στο είδος των ασκομυκήτων και έχει βελανοειδές σχήμα. Ο ζυμομύκητας *M. pulcherrima* εντοπίζεται στο νέκταρ των λουλουδιών, στην επιφάνεια των φρούτων ή σε φυτικούς ιστούς κατά τη φάση της αποσύνθεσης όπου μεταφέρονται σε νέους ξενιστές από έντομα. Ακόμη βρίσκεται και στο γλεύκος των σταφυλιών μετά την σύνθλιψη (Ευθυμίου, 2015).

ΕΙΚΟΝΑ 3: Ο ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ *M. PULCHERRIMA* ΟΠΩΣ ΦΑΙΝΕΤΑΙ ΣΤΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ



Πιο συγκεκριμένα έχει ελλειψοειδές σχήμα, μεγεθος 2-12 μm x 2-10 μm , και αναπαράγεται με την εκκόλαψη και δεν μπορεί εύκολα να ξεχωρίσει από τον *Saccharomyces cerevisiae* κατά την μελέτη του στο μικροσκόπιο. Τα στελέχη της *M. pulcherrima* μπορούν να ταυτοποιηθούν με την χρήση επιλεγμένων και διαφορετικών υποστρωμάτων. Για παράδειγμα, στελέχη δείχνουν να αντιδρούν θετικά ως προς τη β -γλυκοζιδιτική και πρωτεολυτική (ενζυμική) δραστηριότητα. Φαίνεται να μπορούν να αναπτυχθούν φυσιολογικά σε υπόστρωμα YPD και L-λυσίνης, όπως επίσης μπορούν να χρησιμοποιήσουν τη γλυκοζυλιωμένη υδροκινόνη ως πηγή άνθρακα σε πλάκες άγαρ.

3.1.1 Η αντιμικροβιακή δράση της *Metschnikowia pulcherrima*

Η αντιμικροβιακή δραστηριότητα των στελεχών της *M. pulcherrima* ενάντια σε άλλες ευαίσθητες ζύμες αξιολογείται από τον Rosini το 1985 με το λεγόμενο Killer-test, όπου χρησιμοποιείται άγαρ βύνης ως μέσο της καλλιέργειας, προσαρμοσμένο σε pH 4,4 με τη χρήση διαλύτη κιτρικού-φωσφορικού άλατος. Τα αποτελέσματα που έβγαιναν θετικά ως προς την αντιμικροβιακή δράση παρατηρήθηκε ότι εμφανιζόντουσαν ως αναστολείς της ανάπτυξης των ευαίσθητων στελεχών, τα οποία περιτριγυριζόνταν από έναν ξεκάθαρο κύκλο γύρω από τη ζύμη. Έχει αποδειχθεί ότι οι αντιμικροβιακές δράσεις εναντίον των ζυμών επηρεάζουν το τελικό αποτέλεσμα του κρασιού, αλλά φαίνεται ότι δεν έχει καμία επιρροή ως προς τα στελέχη του *S. cerevisiae*. Ωστόσο, τα στελέχη #46 και #48 της *M. pulcherrima* έχουν άμεσο αντίκτυπο στην πορεία ζύμωσης των *non-Saccharomyces* όπως για παράδειγμα στα γένη *Brettanomyces*, *Hanseniaspora* και *Pichia*.

Πιο συγκεκριμένα, το στελέχος της *M. pulcherrima* #48 σε διάφορα πειράματα μεικτών καλλιιεργειών δείχνει να έχει ευρεία αντιμικροβιακή δραστηριότητα, καθορίζοντας τον πρόωρο θάνατο των ευαίσθητων *non-Saccharomyces* ζυμών. Όμως, η ανασταλτική δραστηριότητα του στελέχους #48 δεν προκύπτει από το φαινόμενο Killer, όπου μεσολαβούν διάφορες πρωτεϊνικές χημικές ενώσεις, αλλά φαίνεται να συμβαίνει λόγω της εξάπλωσης του πουλχεριμινικού οξέος, που είναι προκάτοχος της χρωστικής pulcherrimin. Η χρωστική pulcherrimin είναι υπεύθυνη για την ακινητοποίηση του σιδήρου στο μέσο ανάπτυξης. Η αντιμικροβιακή δράση συνδέεται άμεσα με την έκκριση του πουλχεριμινικού οξέος, το οποίο παράγει μια κόκκινη χρωστική όταν συνδέεται με ελεύθερα ιόντα σιδήρου (Śiriczki (2006), Türkkel and Ener (2009). Πράγματι, όταν προστίθεται σίδηρος σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (20mg l⁻¹), η ανασταλτική δραστηριότητα εξαφανίζεται και οι αποικίες φέρουν ένα πιο έντονο καφέ χρώμα (χάρη στην ενδοκυτταρική παραγωγή της χρωστικής pulcherrimin). Επομένως, σε μεικτές καλλιέργειες, η παροχή μεγάλης ποσότητας σιδήρου καθορίζει την απώλεια της αντιμικροβιακής δράσης της *M. pulcherrima*. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, η παρουσία της *M. pulcherrima* σε ζυμώσεις με συνεμβολιασμό με τα στελέχη *S. cerevisiae* είναι περιορισμένη τις πρώτες ημέρες (Sadoudi et. al., 2012); (Milanović et al, 2013). Αυτή η μικρή επιρροή της *M. pulcherrima* σε στελέχη του *S. cerevisiae* σχετίζεται με το μηχανισμό δράσης του πουλχεριμινικού οξέος. Η έλλειψη της αντιμικροβιακής δραστηριότητας στο *S. cerevisiae* οφείλεται στη παρουσία του AFT1 όπου αυξάνει τα επίπεδα του σιδήρου (Hamza and Baetz, 2012), (Holmes-Hampton et al., 2013). Έτσι, η *M. pulcherrima* συνίσταται σε ελεγχόμενες ζυμώσεις με στελέχη *S. cerevisiae* με σκοπό να αναβαθμίσει το αρωματικό προφίλ του τελικού προϊόντος και να αντιμετωπίσει την αλλοίωση του (Comitini et. al., 2011) (Zott et. al. , 2011)

3.2 Τα κυριότερα στελέχη της *Metschnikowia pulcherrima*

Στελέχη της *Metschnikowia pulcherrima* χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο στις ζυμώσεις οίνου και μπίρας. Συνήθως απομονώνονται από διάφορες ποικιλίες σταφυλιών αφού είναι ενδογενείς ζύμες. Παρακάτω αναφέρονται ενδεικτικά μερικά παρασκευάσματα που βελτιώνουν με την παρουσία τους την αλκοολική ζύμωση και το τελικό προϊόν:

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: ΤΑ ΚΥΡΙΟΤΕΡΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΤΗΣ *M.PULCHERRIMA*

Όνομα προϊόντος	Εταιρεία	Συνεισφορά στην αλκοολική ζύμωση	Website
Level 2 Flavia™/ Flavia MP346	Lallemand	Ενισχύει ποικιλιακά αρώματα, λόγω των τερπενίων και των πτητικών θειολών. Βελτιώνει την αίσθηση στο στόμα λόγω της απελευθέρωσης των πολυσακχαριτών και της πρόωρης αυτόλυσης.	https://www.lallemandwine.com/
Levulia Pulcherrima	AEB	Ενισχύει τους αιθυλικούς εστέρες, το φαινυλαιθυλικό οξύ, ισοαμυλικό οξύ και τα τερπένια.	https://www.aeb-group.com/

Excellence B-Nature	Lamothe-Abiet	Ελέγχει την ενδογενή microbiota στο σταφύλι και το μούστο. Μειώνει τα προζυμωτικά θειούχα.	https://lamothe-abiet.com/
Zymaflore Egide	Laffort	Μείγμα της <i>Torulaspora delbrueckii</i> και της <i>Metschnikowia pulcherrima</i> . Προστατεύει και αναστέλλει την ανάπτυξη της ενδογενούς microbiota.	https://laffort.com/
AWRI Obsession	Maurivin	Ενισχύει τα αρώματα των σκούρων φρούτων και την πολυπλοκότητα των κόκκινων κρασιών.	https://www.abbiotek.com/

3.3 Ζυμωτική συμπεριφορά της *Metschnikowia pulcherrima*

Είναι γεγονός ότι η ζυμωτική ικανότητα της μη συμβατικής ζύμης *Metschnikowia pulcherrima* είναι χαμηλή. Αυτό αποδεικνύεται από μερικά στελέχη της *M.pulcherrima* τα οποία έχουν την ικανότητα να παράξουν 4% v/v αιθανόλη (Comitini et. al., Selected non-Saccharomyces wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*, 2011). Παρόλα αυτά, υπάρχουν μελέτες όπου παρατηρείται η παραγωγή της αιθανόλης να ξεπερνά το 6-7% v/v (Combina et. al. , 2005). Σύμφωνα με αυτές τις μελέτες, και ότι η παρουσία της *M.pulcherrima* στο μούστο διατηρεί το 19-39 % της οικολογίας των ζυμών (Combina et. al. , 2005), καθιστά απαραίτητη την παρουσία ενός ζυμομύκητα που να έχει υψηλή ζυμωτική ικανότητα όπως για παράδειγμα το *Saccharomyces cerevisiae* ή το *Schizosaccharomyces pombe*, για την πλήρη κατανάλωση των σακχάρων (Escott et. al. , 2018).

Η ζυμωτική συμπεριφορά της *M. pulcherrima* παρατηρείται χαμηλότερη συγκριτικά με άλλες *non-Saccharomyces* ζύμες. Συγκεκριμένα, η παραγωγή του διοξειδίου του άνθρακα (CO₂) κατά την διάρκεια της ζύμωσης είναι μικρότερη της *M.pulcherrima* σε σχέση με τον *Saccharomyces cerevisiae*. Με την τιμή του διοξειδίου του άνθρακα με στελέχη της *M. pulcherrima* να αγγίζουν τα 4.5 g ανά 100ml, ενώ με στελέχη του *Saccharomyces cerevisiae* να είναι 12.9 g ανά 100ml (Romano P, et al., 2003).

Όσον αφορά στις συνθήκες όπου η *Metschnikowia pulcherrima* μπορεί να αναπτυχθεί είναι σε χαμηλές θερμοκρασίες, συγκεκριμένα από 15 °C έως 20 °C. Επιπρόσθετα, μπορεί να αναπτυχθεί σε μεγάλο εύρος pH, από 3 έως 6 (Santamauro et. al., 2014). Ωστόσο, παρουσιάζει αστάθεια σε pH κάτω από την τιμή 4. Η μη συμβατική ζύμη *M. pulcherrima* ευνοείται σε μέτριες τιμές πτητικής οξύτητας, όπου κυμαίνονται από 0.3 έως 0.4 g/L εκφρασμένο σε οξικό οξύ (Comitini et. al., Selected non-Saccharomyces wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*, 2011). Όταν χρησιμοποιείται σε συνεμβολιασμό με το *S. cerevisiae*, μειώνει τα επίπεδα πτητικών οξέων κατά 10-75% και αυξάνει τα επίπεδα γλυκερόλης κατά 4-40%, σύμφωνα με την πρακτική εμβολιασμού που έχει ακολουθηθεί, το στέλεχος και την αντοχή του εκάστοτε στελέχους κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης (Contreras et al., 2014).

Η εν λόγω μη συμβατική ζύμη έχει την ικανότητα να χρησιμοποιεί τη γλυκόζη, σακχαρόζη, φρουκτόζη, γαλακτόζη και μαλτόζη ως πηγή άνθρακα. Όμως παρουσιάζει αδυναμία ή απουσία ανάπτυξης ως προς τη λακτόζη. Αντιστοίχως, δεν δείχνει αντοχή στο νιτρικό άγαρ. Επιπλέον, η αντοχή της *M.pulcherrima* ως προς το διοξείδιο του θείου (SO₂) είναι αρκετά χαμηλή συγκριτικά με τον *Saccharomyces cerevisiae*, τον *Saccharomyces ludwigii* ή τον *Schizosaccharomyces pombe*. Ωστόσο, συγκριτικά με άλλες μη συμβατικές ζύμες δείχνει μέτρια αντοχή.

Σε μικτές καλλιέργειες με τον *Saccharomyces cerevisiae*, παρατηρείται ότι υπάρχει πολύ γρήγορη μείωση της βιωσιμότητας της μετά από λίγες μέρες λόγω της χαμηλής αντοχής στην αιθανόλη όπου παράγεται από τον *Saccharomyces cerevisiae* (Sadoudi et. al., 2012); (Wang C et. al., 2016). Η αναδυόμενη πρακτική όπου είναι ικανή να μειώσει την περιεκτικότητα των άγριων ζυμών στο σταφύλι, θα διευκολύνει ιδιαίτερα την υπεροχή της *M.pulcherrima* στον διαδοχικό εμβολιασμό με στελέχη του *S. cerevisiae*, όπως επίσης και στην ανάπτυξη του αρωματικού προφίλ των οίνων (Morata et. al. , 2016).

3.4 Η επιρροή της *Metschnikowia pulcherrima* στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά

Η χρήση της *M.pulcherrima* σε καθαρή καλλιέργεια οδηγεί σε πολύ μεγάλη παραγωγή του οξικού αιθυλεστέρα όπου έχει αρνητικό αντίκτυπο (Varela et. al., 2016). Ωστόσο σε μεικτές καλλιέργειες των *non-Saccharomyces* ζυμών με τον *Saccharomyces uvarum* μειώνεται η παραγωγή του αιθανικού αιθυλεστέρα, ταυτόχρονα όμως αυξάνεται η παραγωγή της 2-φαινυλαιθυλικής αλκοόλης και του οξικού φαινυλαιθυλεστέρα (Varela et. al., 2016). Επιπρόσθετα, ο συνεμβολιασμός της *M.pulcherrima* με τον *S. cerevisiae* μπορεί να οδηγήσει σε αρωματική πολυπλοκότητα, (Zot K. et. al., 2011). Αυτό συμβαίνει κυρίως λόγω της υψηλής παραγωγής των εστέρων και παράγονται χάρη στην έντονη εξωκυτταρική ενζυμική δραστηριότητα της *M.pulcherrima*. (Escott et. al. , 2018); (Jolly et. al. , 2019). Ομοίως, ο διαδοχικός εμβολιασμός επιφέρει υψηλή συγκεντρωση των ανώτερων αλκοολών και ειδικότερα της ισοβουτανόλης και της φαινυλαιθανόλης (Prior et. al., 2019).

4^ο Κεφάλαιο : Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά

4.1 Εισαγωγή

Είναι γεγονός ότι η κατεύθυνση της αγοράς αλλάζει ανά τακτά χρονικά διαστήματα, με κοινό παρονομαστή όμως, την υψηλή ποιότητα. Το καταναλωτικό κοινό στρέφεται και ενδιαφέρεται περισσότερο για καινούργιες και καινοτόμες ιδέες. Παρόλα αυτά, τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, όπως είναι τα αρώματα, η γεύση και η επίγευση που προσδίδει το κρασί και η μπίρα αποτελούν το βασικό πυλώνα της αξιολόγησης τους. Πιο συγκεκριμένα, τα ανθικά και φρουτώδες αρώματα, βρίσκονται σε υψηλή ζήτηση στην βιομηχανία των αλκοολούχων ποτών και υπάρχει μια συνεχής αναζήτηση και εξέλιξη των διάφορων αρωματικών χαρακτηριστικών. Τα αλκοολούχα ποτά που προέρχονται από σιτηρά, καλαμπόκι, ρύζι, ίσως υστερούν ως προς το φρουτώδες άρωμα για αυτό είναι αναγκαία η προσθήκη κάποιου λυκίσκου και η ζύμωση με την παρουσία διάφορων ζυμών. Έχει αναφερθεί, ότι υπεύθυνα για τα ενεργά αρωματικά συστατικά είναι κατά κύριο λόγο, οι ανώτερες αλκοόλες και οι εστέρες, όπου προκύπτουν από τη εκάστοτε ζύμωση. Όλα αυτά ανήκουν σε μια ευρύτερη κατηγορία όπου είναι τα δευτερεύοντα προϊόντα μιας ζύμωσης.

4.2 Χρώμα

Το χρώμα που έχει η μπίρα, είναι από τα πρώτα και καθοριστικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά που αντικρίζει ο καταναλωτής. Με βάση το στυλ της μπίρας, μπορεί να καθοριστεί αντίστοιχα και το χρώμα της. Κατά κύριο λόγο, το εκάστοτε χρώμα πηγάζει από τη ή τις βύνες που έχουν χρησιμοποιηθεί και το βαθμό άλεσης και ζήρασης τους. Οι δύο κύριες αντιδράσεις που γίνονται κατά τη ζύμωση και παίζουν σημαντικό ρόλο στο χρώμα της μπίρας είναι οι εξής:

1. Αντίδραση Maillard:

Ο Louis Camille Maillard το 1910 ανακάλυψε τις λεγόμενες αντιδράσεις ενζυμικής αμαύρωσης, όπου με την παρουσία θερμότητας συντελείται η αντίδραση ενός αμινοξέος με ενός σακχάρου. Τα κυκλικά παράγωγα πολυμερίζονται και σχηματίζουν καστανόχρωμες, αδιάλυτες, μελανοϊδίνες. Η αντίδραση Maillard και τα παράγωγα της είναι υπεύθυνα και το χρώμα στις τροφές. Οι υψηλότερες θερμοκρασίες επιταχύνουν την αντίδραση σε αντίθεση με τις χαμηλότερες. Αντίστοιχα, το υψηλότερο pH ευνοεί την αντίδραση. Τα μέτρια επίπεδα νερού, συμβάλλουν στη γρηγορότερη αντίδραση λόγω της μεγαλύτερης κινητικότητας των αντιδρώντων, περίσσεια νερού έχει αντίστροφα αποτελέσματα. Επιπλέον, ως συνέπεια της αντίδρασης είναι η απώλεια κάποιων σημαντικών αμινοξέων, όπως π.χ. της λυσίνης. Επομένως, οι συνθήκες πολτοποίησης και η επιλογή των πρώτων υλών υποδεικνύουν το τελικό χρώμα του προϊόντος.

2. Η οξείδωση των πολυφαινολών:

Είναι η δεύτερη αντίδραση σε σειρά που επηρεάζει το χρώμα της μπίρας. Παρόλο που κατά το βρασμό η θερμοκρασία είναι αρκετά υψηλή, οι πολυφαινόλες οξειδώνονται προς ο-κετόνες με την κατάλυση του ενζύμου περοξειδάση. Οι ο-κετόνες βρίσκονται στην ευρύτερη κατηγορία των αρωματικών δικετονών με χαρακτηριστικό άρωμα και χρώμα κίτρινο ή κόκκινο. Υπάρχει το ενδεχόμενο, οι ουσίες αυτές που παράγονται να μειωθούν κατά τη διάρκεια της ζύμωσης γιατί χρησιμοποιούνται ως θρεπτικό συστατικό από τους ζυμομύκητες (Lewis, M.J. and Bamforth, C.W. , 2006).

4.3 Αφρός

Ο αφρός είναι η αμέσως επόμενη οπτική παρατήρηση που μπορεί να κάνει ένας καταναλωτής. Είναι μια γρήγορη οργανοληπτική αξιολόγηση στην ποιότητα της μπίρα η σταθερότητα του αφρού. Για τη σταθεροποίηση του αφρού, οφείλονται οι πρωτεΐνες, τα ισο-α-οξέα, τα μεταλλικά ιόντα, οι πολυσακχαρίτες. Οι υδρόφοβες ουσίες έχουν την τάση να προσκολλώνται στο επάνω μέρος δηλαδή στις φυσαλίδες και να δημιουργούν τα αέρια που υπάρχουν στη μπίρα (διοξειδίο του άνθρακα, λιγότερο άζωτο και οξυγόνο) μέσω της πυρήνωσης. Οι υδρόφοβες ουσίες έχουν την ιδιότητα να συγκρατούνται μεταξύ τους και να δημιουργούν το γνωστό αφρό. Σε αντίθεση, τα λιπίδια, τα βασικά αμινοξέα και τα υψηλά επίπεδα αιθανόλης χαρακτηρίζονται ως αναστολείς της σταθεροποίησης του αφρού. Γι' αυτό κατά τη διαλογή των βυνών και του λυκίσκου, προσεκτικά επιλέγονται εκείνες με την υψηλότερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και α-οξέα αντίστοιχα. Πολύ σημαντικός παράγοντας για το σωστό αφρισμό της μπίρας είναι κατά πόσο άφρισε κατά τη ζύμωση, διότι κατά τον αφρισμό απομακρύνονται πολλές από τις υδρόφοβες ουσίες (Lewis, M.J. and Bamforth, C.W. , 2006)

4.4 Διαύγεια

Αδιαμφισβήτητα, ένα ακόμη χαρακτηριστικό που απασχολεί το καταναλωτικό κοινό είναι η διαύγεια και το θόλωμα του αλκοολούχου ποτού. Οι πρωτεΐνες και οι πολυφαινόλες είναι υπεύθυνες για τα κolloειδή και τα θολώματα. Τα πολυπεπτίδια που προκύπτουν από τη μετουσίωση των διάφορων πρωτεϊνών προκαλούν θόλωμα, όμως απομακρύνονται κατά το βρασμό, τη ζυθοποίηση και την ωρίμανση. Οι πολυφαινόλες προέρχονται από το λυκίσκο και από τη βύνη. Επίσης, άλλος παράγοντας είναι η βακτηριακή μόλυνση, όπου προλαμβάνεται με κατάλληλη και έγκαιρη απολύμανση. Επιπλέον, οι άγριες ζύμες που δεν απομακρύνονται ή κατακάθονται μπορεί να προκαλέσουν θόλωμα. Τέλος, κίνδυνοι όπως ανεπάρκεια του ασβεστίου στο νερό, μπορούν να προκαλέσουν το οξαλικό θόλωμα. Όμως, ανάλογα με το τύπο της μπίρας, το λίγο θόλωμα ίσως είναι και επιθυμητό.

4.5 Λυκίσκος

Ο λυκίσκος (*Humulus lupulus L.*) ανήκει στην οικογένεια *Cannabaceae* είναι ένα από τα υλικά της μπίρας, όπου προσφέρει πικράδα, άρωμα και γεύση (Machado et. al., 2019a), (Martins et. al., 2018). Επιπλέον, συνεισφέρει στην συντήρηση της μπίρας, χάρη στους δευτερογενείς μεταβολίτες όπου βρίσκονται στους αδένες της λουπουλόνης.

Εικόνα 4: Καλλιέργεια λυκίσκου, ο επονομαζόμενος πράσινος χρυσός



Ο λυκίσκος περιέχει διάφορες ομάδες οργανικών ενώσεων. Κάποιες από τις πιο σημαντικές ακολουθούν στον παρακάτω πίνακα.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2: ΟΙ ΚΥΡΙΕΣ ΧΗΜΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ ΚΑΙ Η ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΗ ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΤΟΥΣ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΝΤΑΙ ΣΤΟΝ ΛΥΚΙΣΚΟ

ΚΥΡΙΕΣ ΧΗΜΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ %W/W
A-OΞΕΑ	2.0-17.0
B-OΞΕΑ	2.0-10.0
ΑΙΘΕΡΙΟ ΕΛΑΙΟ	0.5-3.0
ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ ΚΑΙ ΤΑΝΙΝΕΣ	3.0-6.0
ΜΟΝΟΣΑΚΧΑΡΙΤΕΣ	2.0
ΑΜΙΝΟΞΕΑ	0.1
ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ	15.0
ΛΙΠΙΔΙΑ	1.0-5.0
ΠΗΚΤΙΝΕΣ	2.0
ΑΛΑΣ	10.0
ΚΥΤΑΡΡΙΝΗ ΚΑΙ ΛΙΓΝΙΝΗ	40.0-50.0
ΝΕΡΟ	8.0-12.0

Οι κύριες ενώσεις κατά βάση χωρίζονται σε τρεις μεγάλες κατηγορίες, τις ρητίνες, τις πολυφαινόλες και τα αιθέρια έλαια (Steenackers et. al., 2015). Οι κύριες ρητίνες στο λυκίσκο προέρχονται από τις χουμουλόνες (α-οξέα) και τις λουπουλόνες (β-οξέα), όπου είναι υπεύθυνα για την πικρή γεύση στη μπίρα, ενώ τα χαρακτηριστικά αρώματα προέρχονται από τα αιθέρια έλαια (Machado et. al. , 2019b). Επιπλέον, οι φαινολικές ενώσεις συνεισφέρουν στην συντήρηση και την σταθεροποίηση του οργανοληπτικού προφίλ της μπίρας, κυρίως χάρη στην αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή δράση τους και την ικανότητα της σταθεροποίησης του αφρού.

Υπάρχουν λυκίσκοι όπου χαρακτηρίζονται από την ικανότητα τους να προσφέρουν στις παραγόμενες μπίρες πικράδα και αρώματα, ταυτόχρονα . Οι κύριες χημικές ενώσεις, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τα αρώματα είναι οι εστέρες, όπου είναι στενά συνδεδεμένες με φρουτώδη χαρακτηριστικά, τα μονοτερπένια (με αρώματα όπως αυτά του κίτρου, ρετινώδη και χορτώδη αρώματα), τα σεσκιτερπένια (αρώματα ξύλου), κετόνες (νότες λουλουδιών), θειούχες ενώσεις (νότες θείου και φρούτων) και οι αλδεΐδες (χορτώδη αρώματα) (Machado et. al., 2019a) (Martins et. al., 2018).

Καθοριστικό ρόλο έχει και η χρονική στιγμή όπου προστίθεται ο λυκίσκος. Μπορεί να προστεθεί κατά τον βρασμό του ζυθογλεύκου, κατά την διάρκεια ή το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης, ή ακόμη και στο whirlpool. Εάν προστεθεί κατά τη διάρκεια του βρασμού, τα α-οξέα ισομερίζονται σε ισο-α-οξέα, τα οποία είναι υπεύθυνα για την πικράδα της μπίρας και συνεισφέρουν στην σταθεροποίηση του αφρού (J.S. Bland et. al. , 2015); (L. Česlová et. al. ,

2009). Αυτή η μέθοδος παρουσιάζει κάποιες δυσκολίες διότι κάποιες πτητικές ενώσεις οι οποίες προέρχονται από το λυκίσκο εξατμίζονται σε υψηλές θερμοκρασίες, όπως και άλλες ενδιαφέρουσες ενώσεις μπορεί να υποβαθμιστούν (A. Oberholster, B.M. Titus, 2016); (Steenackers et. al., 2015). Επιπλέον, εάν προστεθεί κατά τη διάρκεια ή το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης, προσδίδει λιγότερη πικράδα, όμως συνεισφέρει δραστικά στο αρωματικό και γευστικό προφίλ της μπίρας. Με τη μέθοδο dry hopping, ο λυκίσκος προστίθεται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης ή ακόμη και σε μεταγενέστερα στάδια της μπίρας (A. Oberholster, B.M. Titus, 2016); (P.H. Wolfe, 2012).

4.6 Πτητικές ενώσεις

Αρχικά, οι πτητικές ενώσεις είναι κάποιες οργανικές ενώσεις που έχουν υψηλή τάση ατμών, δηλαδή χαμηλό σημείο βρασμού. Με αυτό συνεπάγεται είτε η εξαέρωση μεγάλου αριθμού μορίων, είτε την εξαχνωση από μια υγρή ή αέρια φάση για να περιέλθουν στον περιβάλλοντα αέρα. Κατά κύριο λόγο, χωρίζονται σε τρεις μεγάλες κατηγορίες οι οποίες είναι οι εξής: α) πολύ πτητικές οργανικές ενώσεις β) πτητικές οργανικές ενώσεις γ) ημι-πτητικές οργανικές ενώσεις.

Με την ανάπτυξη της τεχνολογίας τη χρονική περίοδο του 1960 και την εφεύρεση της αέριας χρωματογραφίας, έγινε εφικτή η διερεύνηση των πτητικών ενώσεων σε αλκοολούχα ποτά και κατ' επέκταση της μπίρας. Πρόσφατα, οι καινούργιες τεχνικές, η εκχύλιση αρωμάτων μέσω της απόσταξης, έχει ευνοήσει την ορθή αξιολόγηση της σύνδεσης των ανιχνεύσιμων πτητικών ενώσεων με την αντίληψη μιας οσμής. Η τεχνική αυτή, μπορεί να ταυτοποιήσει με μεγάλη ευκολία εκατοντάδες χημικές ενώσεις. Η αέρια χρωματογραφία είναι πολύ σημαντική, εφόσον διαβεβαιώνει ότι τα εκχυλίσματα που αντιπροσωπεύουν ένα χαρακτηριστικό άρωμα υπάρχουν στο πρωτότυπο προϊόν.

4.7 Δευτερογενείς μεταβολίτες

Γενικότερα, οι δευτερογενείς μεταβολίτες καλούνται ως οι μεταβολίτες όπου δημιουργούνται στην στατική φάση των μικροοργανισμών, δεν απαιτούνται για την ανάπτυξη και διατήρηση των κυτταρικών λειτουργιών και είναι προϊόντα του πρωτογενούς μεταβολισμού. Οι μικροοργανισμοί έχουν την ικανότητα να συνθέτουν πολυάριθμες ομάδες δευτερογενών μεταβολιτών.

4.7.1 Ανώτερες αλκοόλες

Οι ανώτερες αλκοόλες βρίσκονται σε μεγαλύτερη αφθονία συγκριτικά με τις υπόλοιπες ενώσεις οι οποίες προσδίδουν οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Ο σχηματισμός των ανώτερων αλκοολών προέρχεται από διαφορετικές και περίπλοκες μεταβολικές οδούς (Pires E.J. et. al., 2014). Στο περίπλοκο θρεπτικό υλικό όπως είναι το ζυθογλεύκος, οι ανώτερες αλκοόλες σχηματίζονται μέσω της διαδικασίας της γλυκόλυσης. Κατά την διάρκεια της ζύμωσης, οι ζύμες παράγουν αιθανόλη αλλά και αναρρίθμητες μακρές αλυσίδες α-οξέων, οι οποίες ακολούθως μετατρέπονται σε αμινοξέα. Η επιλογή των στελεχών των ζυμών έχει πολύ μεγάλη επιρροή στην παραγωγή ανώτερων αλκοολών. Η ισοαμυλική αλκοόλη, η ενεργή αμυλική αλκοόλη, η 2-φαινυλαιθιλική αλκοόλη, η τρυπτοφώλη, η n-προπανόλη είναι μερικές ανώτερες αλκοόλες οι οποίες έχουν σημαντική επίδραση στον οργανοληπτικό χαρακτήρα του τελικού προϊόντος ανάλογα με τις συγκεντρώσεις τους. Είναι γεγονός ότι κάτω από 300 mg/L, οι συγκεκριμένες ανώτερες αλκοόλες προσδίδουν πολυπλοκότητα στη μπίρα, ενισχύοντας τα ανθικά και φρουτώδη αρώματα. Σε αντίθεση, μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των προαναφερθέντων

ανώτερων αλκοολών μπορεί να προκαλέσουν δυσάρεστα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Τέλος, παρατηρείται ότι τα στελέχη ale έχουν τη δυνατότητα μεγαλύτερης παραγωγής ωψηλών αλκοολών σε σχέση με τα στελέχη lager (Pires EJ. et. al., 2014).

ΠΙΝΑΚΑΣ 3: ΟΙ ΚΥΡΙΟΤΕΡΕΣ ΑΝΩΤΕΡΕΣ ΑΛΚΟΟΛΕΣ ΚΑΙ ΤΟ ΚΑΤΩΦΛΙ ΑΝΤΙΛΗΨΗΣ ΤΟΥΣ

Ανώτερες αλκοόλες	Κατώφλι αντίληψης (mg/L)
Αμυλική αλκοόλη	65
Ισοβουτανόλη (διαλύτης)	70
Προπανόλη (διαλύτης)	200
Μεθανοβουτανόλη (μπανάνα)	65
Φαινυλαιθυλική αλκοόλη (τριαντάφυλλα, γλυκύτητα)	125

4.7.2 Εστέρες

Οι εστέρες είναι χημικές ενώσεις οι οποίες προέρχονται από ένα καρβοξυλικό οξύ και μια αλκοόλη, είναι υψηλής βιομηχανικής σημασίας χάρη στα χαμηλά επίπεδα για το κατώφλι αντίληψης και είναι οι κύριες ενώσεις οι οποίες είναι υπεύθυνες για τα φρουτώδη αρώματα στη μπίρα (Budroni et. al. , 2017). Για τον κλάδο της ζυθοποίησης σημαντικοί εστέρες είναι κατά κύριο λόγο οι οξικοί εστέρες και τα λιπαρά οξέα μεσαίας αλυσίδας (MCFA). Όσον αφορά τους οξικούς εστέρες, έχουν συγκεντρώσεις παραπάνω από τα επίπεδα που αντιστοιχούν στο κατώφλι αντίληψης τους. Για τις μπίρες τύπου lager για παράδειγμα ο οξικός ισοαμυλεστέρας είναι υπεύθυνος για το άρωμα μπανάνας, ενώ τις μπίρες τύπου ale, για παράδειγμα ο οξικός αιθυλεστέρας έχει άρωμα διαλύτη. Γενικά, επικρατεί η άποψη ότι το ακετυλό-CoA το οποίο είναι απαραίτητο για την δημιουργία των οξικών εστέρων προέρχεται από την οξειδωση της ακεταλδεΐδης. Επιπρόσθετα, το ακετυλο-CoA είναι απαραίτητο για τη σύνθεση των λιπαρών οξέων μεσαίας αλυσίδας. Για τα λιπαρά οξέα μεσαίας αλυσίδας, ο εξανικός αιθυλεστέρας, ο οποίος έχει άρωμα μήλου, συνεισφέρει πολύ στην γευστική πολυπλοκότητα και έχει υψηλά επίπεδα όσον αφορά το κατώφλι αντίληψης, ειδικότερα στις μπίρες τύπου ale (Budroni et. al. , 2017).

ΠΙΝΑΚΑΣ 4: ΟΙ ΚΥΡΙΟΤΕΡΟΙ ΕΣΤΕΡΕΣ ΚΑΙ ΤΟ ΚΑΤΩΦΛΙ ΑΝΤΙΛΗΨΗΣ ΤΟΥΣ

Εστέρες	Κατώφλι αντίληψης (mg/L)
Οξικός αιθυλεστέρας (Φρουτώδης)	3,0
Οξικός ισοαμυλεστέρας (άρωμα μπανάνας)	1,2
Οξικός ισοβουλεστέρας (ανανάς)	0,7
Εξανοϊκός αιθυλεστέρας (ξινό μήλο)	0,22
Οκτανοϊκός αιθυλεστέρας (άγουρα φρούτα)	0,9

Οξικός φαινυλαιθυλεστέρας	0,4
---------------------------	-----

4.7.3 Λιπαρά και οργανικά οξέα

Τα οξέα προέρχονται από τις ζύμες και παράγονται κατά τη διάρκεια του κύκλου του Kreb's (Kreb's cycle), από τον καταβολισμό των αμινοξέων και από τις αντιδράσεις redox. Ωστόσο, άλλα οργανικά οξέα, όπως είναι το κιτρικό και το γλουταμικό προέρχονται απευθείας από το ζυθογλεύκος, και οι ζύμες δεν επηρεάζουν τις συγκεντρώσεις τους στη μπίρα. Υπάρχουν ταυτοποιηθεί πάνω από 100 οργανικά οξέα στη μπίρα, οι οποίες συνεισφέρουν στο pH κατά την διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης και στην "ξινή" και "αλμυρή" γεύση της μπίρας. Τα οργανικά οξέα είναι πολύ σημαντικές ενώσεις χάρη στην συνεισφορά τους στη σύνθεση των εστέρων. Αναλυτικότερα, οι ζύμες έχουν τη δυνατότητα ενσωμάτωσης των κορεσμένων και ακόρεστων λιπαρών οξέων (UFAs) από το ζυθογλεύκος είτε μπορούν να τις συνθέσουν από το ακετυλο-CoA. Όμως, λόγω της έλλειψης επαρκούς οξυγόνου κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, η σύνθεση των κορεσμένων και ακόρεστων λιπαρών οξέων γίνεται αδύνατη, ως αποτέλεσμα τα λιπαρά οξέα μεσαίας αλυσίδας (MCFAs) να απελευθερώνονται στο θρεπτικό μέσο (Bardi L, Cocito C, Marzona M., 1999). Τα MCFs παίζουν καθοριστικό ρόλο στην ζωτικότητα των ζυμών, στη γεύση της μπίρας και στη σταθεροποίηση του αφρού (Budroni et. al. , 2017).

ΠΙΝΑΚΑΣ 5: ΚΥΡΙΟΤΕΡΑ ΟΡΓΑΝΙΚΑ ΟΞΕΑ ΚΑΙ ΤΟ ΚΑΤΩΦΛΙ ΑΝΤΙΛΗΨΗΣ ΤΟΥΣ

Οργανικά οξέα	Κατώφλι αντίληψης (mg/L)
Οξικό οξύ	175
Καπριλικό οξύ	15
Βουτυρικό οξύ	2
Καπρικό οξύ	10
Οξαλικό οξύ	500
Μηλικό οξύ	700
Φουμαρικό οξύ	400
Σουκινικό οξύ	220
Γαλακτικό οξύ	400
Πυροσταφυλικό οξύ	300

4.8 Καρβονυλικές ενώσεις

Έχουν καταμετρηθεί πάνω από διακόσιες ενώσεις καρβονυλίων τόσο στις μπίρες όσο και σε άλλα αλκοολούχα ποτά. Αυτές οι ενώσεις έχουν την δυνατότητα να προσδώσουν φρεσκάδα και γενικότερα να επηρεάσουν τα αρώματα στη μπίρα. Η παρουσία των αλδευδών και των δικετονών είναι μη επιθυμητή για την ποιότητα της μπίρας. Συγκεκριμένα, οι ακεταλδεύδες

έχουν δυσάρεστο γευστικό χαρακτήρα και θυμίζουν "γρασίδι", ξεθυμασμένο χυμό μήλου. Σε κάποιες περιπτώσεις, όπως όταν υπάρχει εκτεταμένη οξυγόνωση του ζυθογλεύκου και υψηλά όρια οξειδωσης, οι αλδεΐδες μπορούν να συσσωρευτούν σε συγκεντρώσεις πολύ μεγαλύτερες από το κατώφλι αντίληψής τους (Vanderhaegen B. et. al. , 2003). Οι δικετόνες είναι δυσάρεστες ενώσεις για τις μπύρες τύπου lager, οι οποίες περιλαμβάνουν διακετύλιο. Το διακετύλιο έχει ένα αρκετά έντονο άρωμα καραμέλας, σε συγκεντρώσεις που ξεπερνούν τα 0.05 ppm, είναι ανεπιθύμητο. Το διακετύλιο αφομοιώνεται από τις ζύμες και έπειτα μετατρέπεται σε ακετοΐνη και 2-3 βουτανοδιόλη, οι ενώσεις αυτές έχουν χαμηλή επίδραση στο ποιότητα της μπύρας. Ωστόσο, υψηλές συγκεντρώσεις της βαλίνης και της ισολευκίνης στο ζυθογλεύκος περιορίζουν την παραγωγή της δικετόνης από τη ζύμη. Υψηλά όρια αφομοίωσης έχουν παρατηρηθεί σε υψηλές θερμοκρασίες ζύμωσης και όταν οι ζύμες αναπτύσσονται κάτω από αερόβιες συνθήκες είτε σε συνθήκες υψηλής πίεσης (Krogerus K. et. al. , 2013). Παρόλα αυτά, υπάρχουν και οι περιπτώσεις όπου οι δικετόνες (VDKs) χαρακτηρίζονται ως ελαττωματικές χημικές ενώσεις, διότι σε αρκετά είδη μπύρας ενδείκνυται ότι η παρουσία τους είναι ένας δείκτης μικροβιακής επιμόλυνσης.

4.9 Ωρίμανση της μπύρας

Η ωρίμανση της μπύρας θεωρείται ότι είναι ένα σοβαρό πρόβλημα όπου αντιμετωπίζει η βιομηχανία της ζυθοποίησης. Πιο συγκεκριμένα, μπορούν να επέλθουν αλλαγές στις χημικές ενώσεις κατά τη διάρκεια της παλαίωσης όπου πιθανόν να έχει αντίκτυπο στην ποιότητα της μπύρας. Η αρωματική αστάθεια είναι μια πολύπλοκη διαδικασία όπου οφείλεται από αναρίθμητες οξειδωτικές ή μη οξειδωτικές αντιδράσεις, όπου λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια της παλαίωσης της μπύρας (F. Lehnhardt, 2018) Επομένως, το μεγαλύτερο ενδιαφέρον στρέφεται στους μηχανισμούς πριν την εμφάνιση των μη επιθυμητών αρωμάτων (Murakami et. al. , 2003); (P. Schieberle, D. Komarek, 2003).

Είναι γεγονός ότι πλήθος αρωμάτων μπορεί να αναδειχθούν ακόμη και στη παλαίωση σύμφωνα με το είδος μπύρας που παράγεται (B. Vanderhaegen et. al. , 2006). Η ωρίμανση της μπύρας τύπου Lager έχει μελετηθεί εκτενέστερα διότι είναι επιρρεπής στις αλλαγές ως προς τις χημικές ενώσεις μετά τους τρεις έως έξι πρώτους μήνες σε θερμοκρασία δωματίου (J.J. Baert et. al. , 2012); (F. Lehnhardt, 2018); (D. Saison et. al. , 2009) (B. Vanderhaegen et. al. , 2006).

Είναι γεγονός ότι η εμφάνιση των αλλαγών των χημικών ενώσεων και κατ' επέκταση του αρωματικού προφίλ κατά της διάρκεια της παλαίωσης οφείλεται στην εξέλιξη των αλδευδών, εστέρων, οξέων, ανώτερων αλκοολών και άλλες χημικές ενώσεις όπου μπορεί να αναπτυχθούν σε διάφορα στάδια της ζύμωσης (I. M. Ferreira, L. Guido , 2018). Οι αλδεΐδες είναι χημικές ενώσεις με υψηλή συνεισφορά στην παλαίωση της μπύρας. Αυτές οι ενώσεις παράγονται κατά κύριο λόγο μέσω των αντιδράσεων Maillard και την οξείδωση των λιπιδίων (J.J. Baert et. al. , 2012). Η αύξηση της συγκέντρωσης των αλδευδών έχουν ως αποτέλεσμα την εμφάνιση και δυσάρεστων οσμών, όπως είναι η λιπαρότητα, το χαρτόνι και αρώματα ψωμιού (L.M. Gonçaves et. al., 2010); (W. Wang et. al., 2014). Όσο για τους εστέρες και τα οξέα, είναι αδιαμφισβήτητα πολύ σημαντικές πτητικές ενώσεις στη μπύρα. Είναι γεγονός ότι έχουν θετική επίδραση στο οργανοληπτικό χαρακτήρα, αλλά υψηλές συγκεντρώσεις εστέρων μπορεί να οδηγήσουν σε δυσάρεστα αρώματα (off-flavor) (S.Q. Liu, 2015); (K.J. Verstrepen et. al. , 2003). Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, η μπύρα υπόκειται σε ποικίλες χημικές αντιδράσεις όπου έχουν ως αποτέλεσμα τον υποβιβασμό κάποιων αρωμάτων.

Πειραματικό μέρος

Κεφάλαιο 1^ο: Εισαγωγή πειραματικής διαδικασίας

Η παρούσα εργασία είχε ως βασικό στόχο την επίτευξη παραγωγής μπύρας με διαφορετικά αρωματικά χαρακτηριστικά. Αυτή η διαδικασία επιτεύχθηκε με την προσθήκη μη συμβατικής ζύμης, συγκεκριμένα με τη *Metschnikowia pulcherrima*, άλλοτε καθαρής καλλιέργειας, είτε σε συνδυασμό με συμβατικές ζύμες *Saccharomyces cerevisiae*, σε διαφορετικές αναλογίες και διαφορετικές θερμοκρασίες κατά τη ζύμωση.

Καθώς η βιομηχανία εξελίσσεται και το καταναλωτικό κοινό προτιμά τις καινοτόμες ιδέες και πολύπλοκες γεύσεις και αρώματα, επιλέχθηκε η συγκεκριμένη ζύμη. Επιπρόσθετα, η *Metschnikowia pulcherrima* μπορεί να μεταβολίζει βασικά σάκχαρα του ζυθογλεύκου, όπως φρουκτόζη και γλυκόζη, παράγοντας αιθανόλη. Επομένως, η αναζήτηση του συγκεκριμένου ζυμομύκητα ως προς τις δυνατότητες του κατά τη ζυθοποίηση, λαμβάνουν χώρα στα παρακάτω πειράματα.

Τέσσερις ζυμώσεις όμοιας σύστασης πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση μεικτών καλλιεργειών του συγκεκριμένου *non-Saccharomyces* ζυμομύκητα, *Metschnikowia pulcherrima* σε συνδυασμό με το *Saccharomyces cerevisiae*. Αναλυτικότερα, οι δύο ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 13 °C και άλλες δύο σε θερμοκρασία 20 °C σε αναλογία 1:1 και 1:10 (*Saccharomyces cerevisiae*: *Metschnikowia pulcherrima*) αντίστοιχα. Στόχος της πειραματικής διαδικασίας ήταν η ανάδειξη των αρωματικών χαρακτηριστικών της συγκεκριμένης μη συμβατικής ζύμης. Επομένως, προτιμήθηκε η χρήση βύνης τύπου American Pale Ale, ελαφρώς ψημένη, που χαρακτηρίζεται από ήπια αρώματα. Παρά το γεγονός, οι μπύρες τύπου American Pale Ale, χαρακτηρίζονται από έντονα αρώματα που προέρχονται κατά κύριο λόγο από το λυκίσκο, όπως εσπεριδοειδή, πεύκο, μούρο, πεπόνι, στη συγκεκριμένη περίπτωση αυτά θα ήταν ανεπιθύμητα αρωματικά στοιχεία διότι θα υπερτερούσαν έναντι στα ενδεχόμενα αρωματικά χαρακτηριστικά και θα συγχέονταν μεταξύ τους. Για αυτό το λόγο, έγινε προσθήκη μικρής ποσότητας πικρικού λυκίσκου. Τέλος, έγιναν άλλες δύο ζυμώσεις σε θερμοκρασίες 13 °C και 20 °C καθαρής καλλιέργειας, όπου ήταν παρών μόνο ο ζυμομύκητας *Metschnikowia pulcherrima*.

Κεφάλαιο 2^ο: Πειραματική διαδικασία

2.1 Αντιδραστήρια και όργανα

Στη παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω όργανα:

- Φυγόκεντρος HERMLE Z 200 A
- ARE Heating Magnetic Stirrer VELP. SCIENTIFICA
- Πλατόμετρο 2510 Standard-Saccharimeter (Measuring range 0-100P) FUNKE GERBER
- Πλατόμετρο 2510 Standard-Saccharimeter (Measuring range 10-200P) FUNKE GERBER
- 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
- Χρωματόμετρο Minolta CR-200

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια:

- *Saccharomyces cerevisiae* (Safale US-05)
- *Metschnikowia pulcherrima* (FLAVIA MP 346)
- Κυανό του μεθυλενίου
- NaOH Sodium hydroxide pellets pure <99% MERCK
- Δινιτροσαλικυλικό οξύ (3,5-Dinitrosalicylic acid) 98% SIGMA-ALDRICH
- Potassium sodium tartrate tetrahydrate 99% SIGMA-ALDRICH
- Ένυδρο όξινο φωσφορικό νάτριο (di-Sodium hydrogen phosphate dehydrate) >99.5 MERCK
- 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

- Θειικό νάτριο (Sodium Sulfate, anh. a.r.) Chem-Lab NV
- 3-οκτανόλη
- HCl 3N
- Ισοοκτάνιο Uvasol Isooctane for spectroscopy >99.8% SIGMA-ALDRICH
- Φρουκτόζη (D-FRUCTOSE) >98.5% Duchefa Biochemies

2.2 Παραγωγή Ζυθογλεύκους

Χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή 100L του βυνογλεύκους 24 kg βύνης τύπου Pale Ale (ΒΕΡΓΙΝΑ Ζυθοποιία Μακεδονίας Θράκης Α.Ε.), η οποία πριν την πολτοποίηση αλέστηκε σε μικρό βαθμό, 1.2 mm. Τα στάδια είναι τα ακόλουθα:

- Στη δεξαμενή πολτοποίησης προστέθηκε η αλεσμένη βύνη μαζί με 63L νερό σε θερμοκρασία 65 °C. Υπάρχουν τρία στάδια πολτοποίησης, όπου είναι τα εξής:
- Κατά το πρώτο στάδιο η θερμοκρασία διατηρείται σταθερή στους 65 °C για περίπου 1 ώρα και δρα το ένζυμο β-αμυλάση.
- Ύστερα, η θερμοκρασία ανεβαίνει στους 75 °C και παραμένει σταθερή για περίπου 15 λεπτά, όπου δρα η α-αμυλάση.
- Αφού έχουν περάσει τα 15 λεπτά, σειρά έχει η δειγματοληψία μικρής ποσότητας στο οποίο προστίθενται κάποιες σταγόνες ιωδίου για να επιβεβαιωθεί η πλήρης διάσπαση του αμύλου. Στη περίπτωση όπου το δείγμα χρωματιστεί με το μπλε χρώμα σημαίνει ότι υπάρχει ακόμη ποσότητα αμύλου στο γλεύκος.
- Εάν η ποσότητα αμύλου έχει διασπαστεί, ακολουθεί η αύξηση της θερμοκρασίας της δεξαμενής στους 78 °C για τα επόμενα 5 λεπτά, ώστε να αδρανοποιηθούν τα ένζυμα.
- Ακολουθεί η εκχύλιση, διαύγαση του γλεύκους. Το γλεύκος αφού μεταφερθεί στη δεξαμενή εκχύλισης, κατά τα οποία απομακρύνονται όσο το δυνατόν περισσότερα τα στερεά υπολείμματα βύνης, προστίθενται ποσότητα νερού τόση ώστε ο τελικός όγκος τους γλεύκους πριν την διαδικασία βρασμού να είναι 120L.
- Για περίπου 1 ώρα ακολουθεί ο βρασμός με σταθερή θερμοκρασία στους 100 °C. Στην αρχή του βρασμού προστίθενται 50 g του λυκίσκου (Magnum[12%]) και το μείγμα βράζει για τα επόμενα 60 λεπτά. Επακολουθεί η προσθήκη άλλων 50g λυκίσκου και το μείγμα συνεχίζει να βράζει για 50 λεπτά.
- Αφού τελειώσει ο βρασμός, η συνολική ποσότητα γλεύκους είναι περίπου 132L και η πυκνότητα 12,2 °Plato.
- Τέλος, ακολουθεί η ψύξη μέχρι η θερμοκρασία του γλεύκους να φτάσει τους 20 °C.

2.3 Εμβολιασμός Ζυθογλεύκους

Για τον εμβολιασμό κάθε παρτίδας ζυθογλεύκους 20L, χρησιμοποιήθηκε το παρασκεύασμα Flavia. Είναι μια καθαρή καλλιέργεια της *Metschnikowia pulcherrima*, η οποία υπάρχει στη φύση από το Πανεπιστήμιο **de Santiago de Chile**, με την μοναδική της δυνατότητα να απελευθερώνει ένζυμα (π.χ. β-γλυκοζιδάση). Ως επί των πλείστον προτιμάται και προτείνεται από την εταιρεία Lallemand, σε διαδοχικούς συνεμβολιασμούς με συμβατικές επιλεγμένες

ζύμες, όπως είναι ο *Saccharomyces cerevisiae*. Το εν λόγω παρασκεύασμα συμβάλλει στο αρωματικό προφίλ, καθώς και στη περιεκτικότητα των πτητικών θειολών.

Προετοιμάστηκαν εμβόλια με ποσότητες ξηρής ζύμης, όπως φαίνονται και στο παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1), σύμφωνα με την παρακάτω μεθοδολογία:

- Σε τέσσερις κωνικές φιάλες των 250 mL προστίθενται 100 mL νερού και τοποθετούνται σε χύτρα για να αποστειρωθούν.
- Μετά την αποστείρωση, οι κωνικές φιάλες τοποθετούνται σε υδατόλουτρο με στόχο τη μείωση της θερμοκρασίας στους 20 °C.
- Με ασηπτικές διαδικασίες επακολουθεί η προσθήκη των διάφορων ποσοτήτων ξηρής ζύμης στις αποστειρωμένες πλέον κωνικές φιάλες και αφήνονται για 10 λεπτά σε ηρεμία.
- Εφόσον έχουν περάσει 10 λεπτά αναδεύονται με προσοχή και προστίθενται ποσότητα 100 mL του αποστειρωμένου γλεύκους. Σκοπός αυτής της διαδικασίας είναι η ομαλή προσαρμογή των ζυμών σε ένα θρεπτικό περιβάλλον έτσι ώστε όταν τελικά προστεθούν στο συνολικό να βρίσκονται ήδη στην εκθετική φάση ανάπτυξης.
- Μετά το πέρας κάποιων ωρών εμβολιάζεται η συνολική ποσότητα βυνογλεύκους, η οποία έχει μοιραστεί σε τέσσερις ίσες ποσότητες των 15-17 L.

ΠΙΝΑΚΑΣ 6: ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ ΞΗΡΗΣ ΖΥΜΗΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟ ΤΟΥ ΖΥΘΟΓΛΕΥΚΟΥΣ.

Μικροοργανισμός	Ποσότητα ξηρής ζύμης (g) για 15-17 L γλεύκους.
<i>S. cerevisiae</i>	10
<i>M. pulcherrima</i>	10
<i>S. cerevisiae</i> - <i>M. pulcherrima</i> , 1:1	5-5
<i>S. cerevisiae</i> - <i>M. pulcherrima</i> , 1:10	1-9

Αξιοσημείωτο είναι ότι η ποσότητα της ξηρής μάζας που επιλέχθηκε έγινε σύμφωνα με τη μάζα.

Κεφάλαιο 3^ο: Αναλυτικές μέθοδοι

3.1 Μέτρηση σακχάρων με πυκνόμετρο

Οι μετρήσεις των σακχάρων του εν ζυμωμένου γλεύκους πραγματοποιήθηκαν με έμμεσο τρόπο με βάση τη πυκνότητα του γλεύκους. Οι μετρήσεις έγιναν υπό καθημερινή επιτήρηση με τη χρήση πλατόμετρου.

Μεθοδολογία:

1. Παραλαμβάνονται 100mL από το δείγμα, με ανάδευση αφαιρείται το διοξείδιο του άνθρακα και έπειτα τοποθετείται σε ογκομετρικό κύλινδρο των 100mL.
2. Βυθίζεται το πυκνόμετρο στο δείγμα και καταγράφεται η μέτρηση. Το αποτέλεσμα δίνεται σε βαθμούς Plato.
3. Η μέτρηση που καταγράφηκε από το πυκνόμετρο αφορά τη σχετική πυκνότητα του δείγματος σε θερμοκρασία 20 °C. Εάν το δείγμα βρίσκεται σε διαφορετική θερμοκρασία, ανάγεται στους 20 °C σύμφωνα με τους διεθνείς πίνακες.

3.2 Προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε αιθανόλη με απόσταξη

Είναι μια μέθοδος εξίσου ακριβής, όμως απαιτεί μεγάλη ποσότητα δείγματος και για αυτό το λόγο επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί μόνο στα τελικά δείγματα. Έτσι, υπήρχε σύγκριση των αποτελεσμάτων ως προς την ακρίβεια των δύο μεθόδων, δεν χρησιμοποιήθηκε όμως για τη δημιουργία καμπυλών παραγωγής αιθανόλης.

Μεθοδολογία:

1. Πρώτο βήμα είναι η παραλαβή δείγματος μεγαλύτερη από 100mL, όπου φιλτράρεται με διηθητικό χαρτί, έτσι ώστε να απομακρυνθεί το διοξείδιο του άνθρακα.
2. Εφόσον το δείγμα έχει απαλλαχθεί από το διοξείδιο του άνθρακα, μεταφέρεται η ποσότητα των 100mL σε απιοειδή φιάλη στην οποία προστίθεται αντιαφριστικό διάλυμα.
3. Τα δείγματα αποστάζονται έως ότου το απόσταγμα να γεμίσει μια ογκομετρική φιάλη των 100mL περίπου μέχρι τα 2/3
4. Ακολουθεί η πλήρωση της ογκομετρικής φιάλης με νερό μέχρι την χαραγή.
5. Το δείγμα μετράται με αλκοολόμετρο σε θερμοκρασία των 20 °C, εάν τυχόν το δείγμα βρίσκεται σε διαφορετική τότε γίνεται η ανάλογη διόρθωση.

3.3. Μέτρηση διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου (FAN)

Η συγκεκριμένη μέθοδος πραγματοποιήθηκε όπως ακριβώς αναφέρεται στην επίσημη μέθοδο νινυδρίνης από το ACBS Methods of Analysis.

Παρασκευή αντιδραστηρίων:

Η μέτρηση του διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου γίνεται εφόσον παρασκευαστούν τα ακόλουθα αντιδραστήρια:*

- Αντιδραστήριο νινυδρίνης: Σε κωνική των 100mL προστίθενται 10g $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 6g KH_2PO_4 , 0.5g νινυδρίνης, 0.3g φρουκτόζης. Έπειτα, προστίθεται απιονισμένο νερό μέχρι τη χαραγή.
- Διάλυμα αραίωσης: Ζυγίζονται 2g KIO_3 και διαλύονται σε 600mL απιονισμένου νερού. Ακολουθεί η προσθήκη 400mL αιθανόλης (96%). Αποθηκεύεται στους 5°C.
- Πρότυπο διάλυμα γλυκίνης (stock solution): 107.2g γλυκίνης και διαλύονται σε 100mL απιονισμένου νερού. Αποθηκεύεται στους 0 °C.
- Πρότυπο αραιό διάλυμα γλυκίνης: 1mL από το διάλυμα c. Διαλύεται σε 100mL απιονισμένου νερού. Το πρότυπο διάλυμα περιέχει 2mg αμμωνιακού άζωτου/L.

Μεθοδολογία:

- Για κάθε ένα από τα δείγματα πραγματοποιείται αραίωση με απιονισμένο νερό.
- Οι δοκιμαστικοί σωλήνες έχουν 2mL αραιωμένο δείγματος, 2mL γλυκίνης και 2mL απιονισμένο νερό. Για κάθε ένα από τα παραπάνω δείγματα η μέθοδος πραγματοποιείται 3 φορές.
- Σε κάθε ένα από τα δείγματα προστίθεται 2mL από το αντιδραστήριο νινυδρίνης που έχει παρασκευασθεί.
- Όλοι οι δοκιμαστικοί σωλήνες πρώτα σφραγίζονται πολύ καλά για να μην υπάρχει τυχόν εξάτμιση, μετά θερμαίνονται σε νερό που βράζει για 16 λεπτά.
- Μετά το πέρας των 16 λεπτών, τα δείγματα απομακρύνονται και αφήνονται να κρυώσουν για περίπου 20 λεπτά, σε υδατόλουτρο με θερμοκρασία 20 °C.
- Επακολουθεί η προσθήκη 5mL από το διάλυμα αραίωσης, σε κάθε έναν από τους δοκιμαστικούς σωλήνες.
- Τέλος, αφού το φωτόμετρο ρυθμιστεί στα 570nm και μηδενιστεί με απιονισμένο νερό διάλυμα, τότε γίνεται η μέτρηση των παραπάνω δειγμάτων.

Υπολογισμοί:

- Υπολογίζεται ο μέσος όρος απορρόφησης των τριών επαναλήψεων κάθε δείγματος
- Ο μέσος όρος των ενδείξεων του φωτόμετρου στα 570nm για το τυφλό διάλυμα αφαιρείται από τους μέσους όρους των δειγμάτων γλεύκους και από το πρότυπο διάλυμα γλυκίνης.
- Το ελεύθερο αμμωνιακό άζωτο υπολογίζεται σε mg/L σύμφωνα με την παρακάτω σχέση:

FAN= απορρόφηση δείγματος/ απορρόφηση του πρότυπου γλυκίνης x 2 x βαθμός αραίωσης

3.4 Ανάλυση αρωματικών

3.4.1 Διαδικασία εκχύλισης με τη στήλη Vigreux

Για την ανάλυση των αρωματικών χαρακτηριστικών χρειάζεται να προηγηθεί μια εκχύλιση πρώτου την αέρια χρωματογραφία. Για αυτό το λόγο στην συγκεκριμένη εργασία προτιμήθηκε η διαδικασία εκχύλισης με τη στήλη Vigreux. Με τη μέθοδο αυτή οι ουσίες που χρειάζεται να προσδιοριστούν μέσω της χρωματογραφίας εκχυλίζονται σε ένα μείγμα οργανικών ουσιών. Η φάση που περιέχει το διαλύτη συλλέγεται και η φάση που περιέχει τις πρωτεΐνες απορρίπτεται. Ακολουθεί η συμπύκνωση του μείγματος σε στήλη Vigreux, όπου οι πιο πτητικοί διαλύτες απομακρύνονται και εν τέλει συλλέγεται ένα μείγμα πλούσιο σε ουσίες που προσδιορίζουν το αρωματικό προφίλ της μπίρας. Το τελικό μείγμα αναλύθηκε σε αέριο χρωματογράφο GC-MS.

Μεθοδολογία:

- Σε ποτήρι ζέσεως τοποθετούνται 50mL δείγματος απαλλαγμένο από το διοξείδιο του άνθρακα, 25mL πεντάνιο και 25mL αιθέρα.
- Το διάλυμα αφήνεται για 10 λεπτά σε ήπια ανάδευση και στη συνέχεια στη φυγόκεντρο για άλλα 10 λεπτά στις 3500 rpm.
- Εφόσον περάσουν 10 λεπτά, με τη βοήθεια σιφωνίου διαχωρίζεται η οργανική φάση από το γλεύκος. Το διάλυμα που περιέχει τους οργανικούς διαλύτες συλλέγεται και το υπόλοιπο απορρίπτεται.
- Στο γλεύκος πραγματοποιείται ξανά η παραπάνω διαδικασία, δηλαδή τοποθετούνται εκ νέου οι δύο διαλύτες, ακολουθεί ανάδευση και φυγοκέντριση.
- Έπειτα σε διαχωριστική χοάνη τοποθετούνται οι οργανικές φάσεις που έχουν συλλεχθεί με την παραπάνω διαδικασία και προστίθενται περίπου 10 mL απιονισμένο νερό.
- Σύμφωνα με τα παραπάνω απορρίπτεται η υδατική φάση, που βρίσκεται στο κάτω μέρος και συλλέγεται η οργανική φάση σε ένα καινούργιο ποτήρι ζέσεως.
- Για την απορρόφηση της εναπομένουσας υγρασίας προστίθεται μικρή ποσότητα από το στερεό θειικό νάτριο στο δείγμα.
- Ακολουθεί ήπια ανάδευση και το δείγμα φιλτράρεται και τοποθετείται σε προζυγισμένη απιοειδή φιάλη.
- Η απιοειδής αυτή φιάλη τοποθετείται στη στήλη Vigreux σε σταθερή θερμοκρασία 35-40 °C για περίπου 2 ώρες.
- Μετά την απόσταξη το δείγμα μεταφέρεται σε δοχείο vial και προστίθεται σε αυτό 10 mL 3-οκτανόλη, ως εσωτερικό πρότυπο.
- Το δείγμα υφίσταται συμπύκνωση με τη χρήση αέριου αζώτου έτσι ώστε η τελική μάζα του να είναι περίπου ίση με 100 mg και τέλος πραγματοποιείται ένεση του δείγματος στον αέριο χρωματογράφο GC-MS.

3.4.2 Ανάλυση αρωματικών ουσιών με αέρια χρωματογραφία- φασματομετρία μάζας (GC-MS)

Για τον προσδιορισμό των αρωματικών στοιχείων χρησιμοποιήθηκε αέριο χρωματογράφο-φασματόμετρο μάζας Hewlett –Pckard 6890 Agilent Technologies 5975C VL MSD Triple-Axis detector. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με μια τριχοειδή στήλη διοξειδίου του πυριτίου HP-5MS (Agilent Technologies) με διαστάσεις 30 m X 0.32 mm X 0.25 μm ενώ ως αέριο χρησιμοποιείται

το ήλιο (He) με παροχή 1 mL/min. Ποσότητα από κάθε εκχύλισμα εκχέεται στο χρωματογράφο με split ratio 100:1. Η θερμοκρασία της γραμμής μεταφοράς είναι 38 °C Στο φασματομέτρο μάζας τα ηλεκτρόνια παράγονται στο θάλαμο ιονισμού από θερμαινόμενο μεταλλικό νήμα και έχουν δυναμικό της τάξεως των 70 eV στα 40-550 amu. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων γίνεται με το λογισμικό HP Chemstation rev.A.06.03.

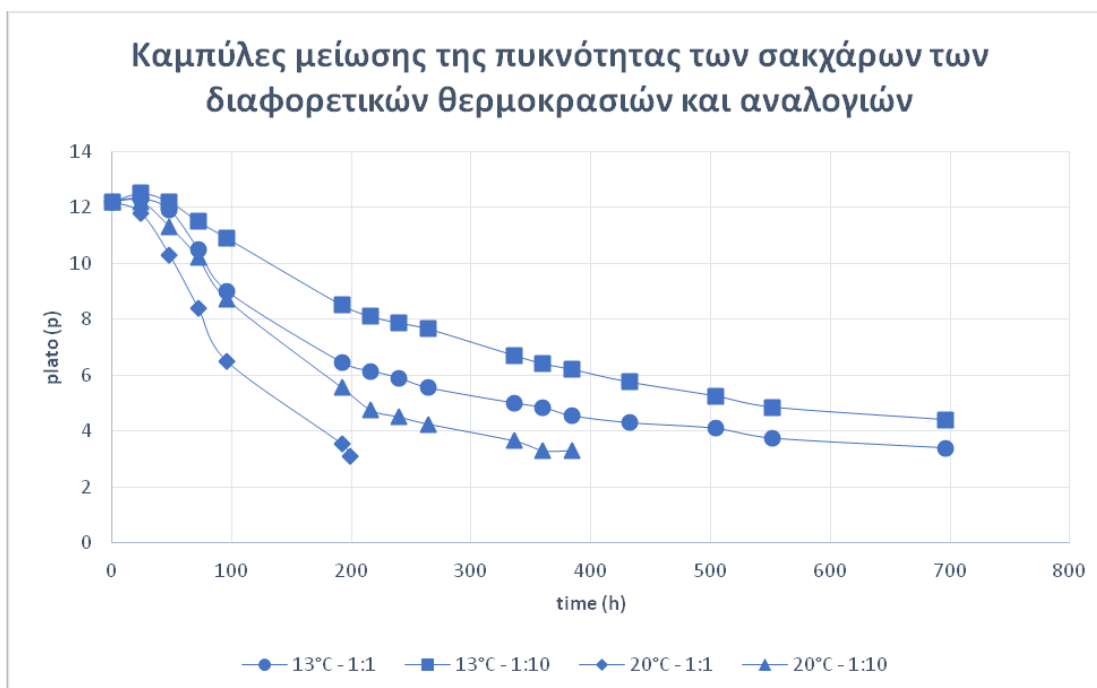
Κεφάλαιο 4^ο : Παρουσίαση αποτελεσμάτων και σχολιασμός

Όπως προαναφέρθηκε, στα πειράματα πραγματοποιήθηκαν τέσσερις ζυμώσεις μεικτής καλλιέργειας με διαφορετικές αναλογίες και σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Με αυτό τον τρόπο, παρατηρήθηκε η ανάπτυξη του *non-Saccharomyces* ζυμομύκητα *Metschnikowia pulcherrima* σε συνεμβολιασμό με τον *Saccharomyces cerevisiae* στις αναλογίες (*Saccharomyces cerevisiae* : *Metschnikowia pulcherrima*) 1:1 και 1:10 στους 13 °C και 20 °C. Στις ίδιες θερμοκρασίες πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις με καθαρή καλλιέργεια της *Metschnikowia pulcherrima*.

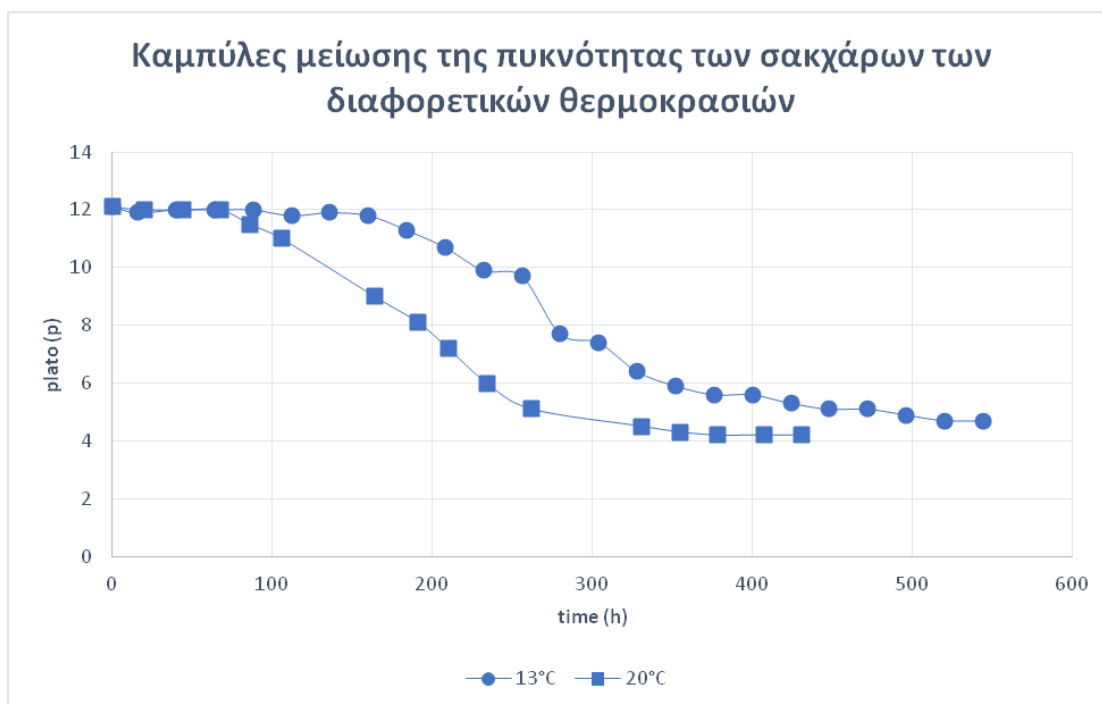
4.1 Πυκνότητα σακχάρων

Για την ημερήσια μέτρηση της συγκέντρωσης των εναπομεινάντων σακχάρων χρησιμοποιήθηκε πυκνόμετρο το οποίο ήταν βαθμονομημένο σε βαθμούς Plato. Στα παρακάτω διαγράμματα που ακολουθούν παρουσιάζεται η μείωση του βαθμού Plato κατά τη διάρκεια της ζύμωσης για τις τέσσερις διαφορετικές ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν καθώς και διάγραμμα σύγκρισης των καμπυλών αναφοράς. Έπειτα, παρουσιάζεται η κατανάλωση των σακχάρων και για τις καθαρές καλλιέργειες του μη συμβατικού ζυμομύκητα για τις θερμοκρασίες στους 13 °C και στους 20 °C, όπως και διάγραμμα σύγκρισης των καμπυλών αυτών.

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 1: ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΜΕΙΩΣΗΣ ΤΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΣΑΚΧΑΡΩΝ ΣΤΟ ΖΥΜΩΜΕΝΟ ΓΛΕΥΚΟΣ ΓΙΑ ΤΙΣ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΑΝΑΛΟΓΙΕΣ ΚΑΙ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ.



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 2: ΚΑΜΠΥΛΗ ΜΕΙΩΣΗΣ ΤΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΣΑΚΧΑΡΩΝ ΣΤΟ ΖΥΜΩΜΕΝΟ ΓΛΕΥΚΟΣ ΤΗΣ ΚΑΘΑΡΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ *METSCHNIKOWIA PULCHERRIMA* ΓΙΑ ΤΙΣ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ

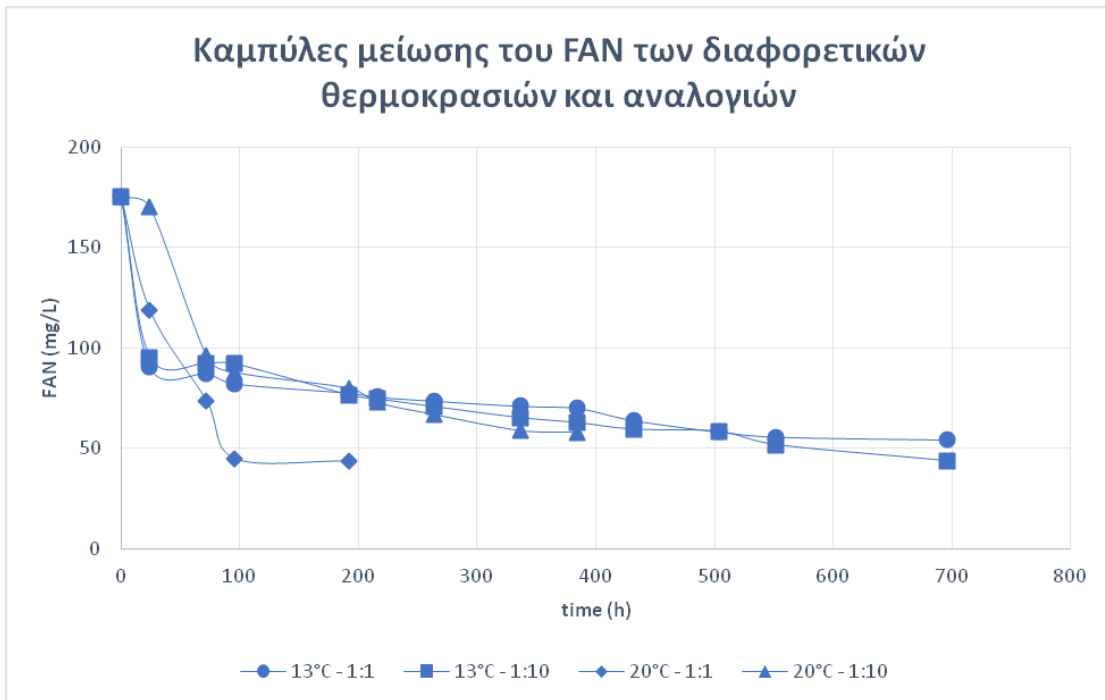


Αρχική μέτρηση Plato γλεύκους: 12.2 °Plato

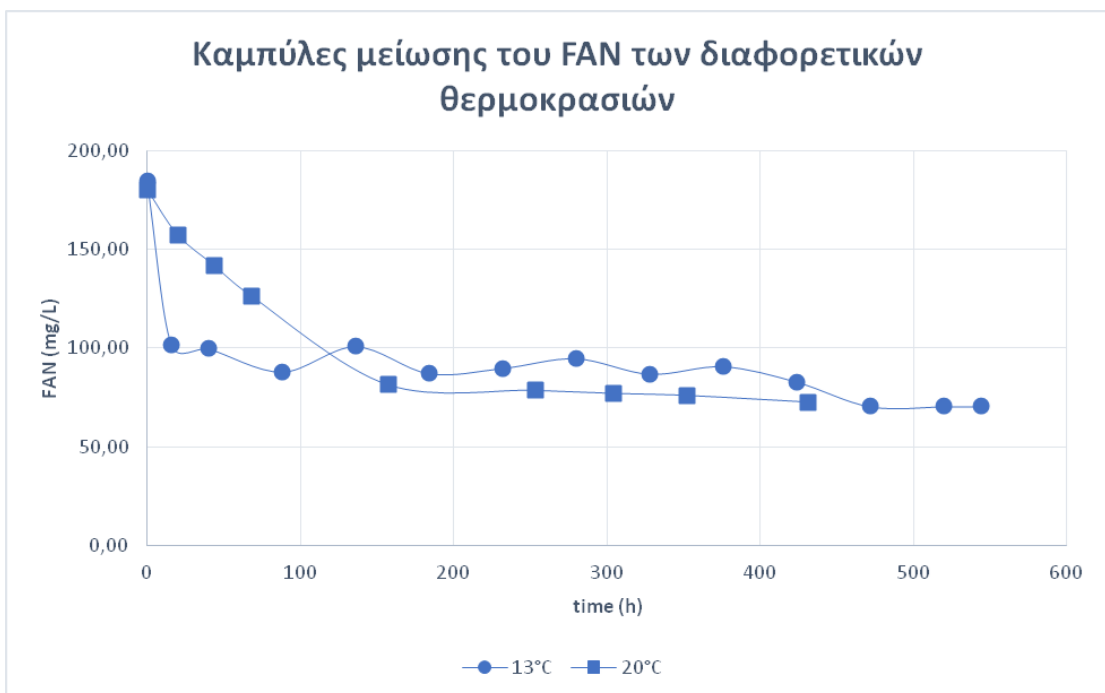
Από τα παραπάνω διαγράμματα (διάγραμμα 1 & 2) συμπεραίνεται ότι οι ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν στους 20 °C ολοκληρώθηκαν σε μικρότερο χρονικό διάστημα από εκείνες που πραγματοποιήθηκαν στους 13 °C. Επιπλέον, παρατηρείται ότι η ζύμωση με αναλογία 1:1 στους 20 °C είχε την πιο σύντομη χρονική διάρκεια ζύμωσης σε σύγκριση με όλες τις υπόλοιπες ζυμώσεις και τα λιγότερα εναπομείναντα αζύμωτα σάκχαρα, σε μόλις 9 ημέρες με 3.1 °Plato, ακολουθώντας στις 17 ημέρες η ζύμωση με αναλογία 1:10 στην ίδια θερμοκρασία με 3.3 °Plato. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ο εμβολιασμός με ίση ποσότητα από τον συμβατικό ζυμομύκητα και την άγρια ζύμη οδήγησε στην πιθανή κυριαρχία του *S. cerevisiae*, διότι είναι γεγονός ότι υπάρχει μείωση της βιωσιμότητας της *M. pulcherrima* μετά από σύντομη χρονική διάρκεια λόγω της χαμηλής αντοχής της στην αιθανόλη, η οποία παράγεται από τον *Saccharomyces cerevisiae* (Sadoudi et. al., 2012). Για τις ζυμώσεις στη θερμοκρασία των 13 °C και για τις δύο αναλογίες οι ζυμώσεις φαίνεται να ολοκληρώνονται στις 30 ημέρες, με την αναλογία 1:1 να έχει 3.4 °Plato και για την αναλογία 1:10 να έχει τιμή 4.4 °Plato. Επίσης, διαπιστώνεται ότι ο ρυθμός κατανάλωσης των σακχάρων είναι χαμηλότερος στη ζύμωση με αναλογία 1:10 στους 13 °C. Ωστόσο, σε αναλογία 1:10 και θερμοκρασία 13 °C υπάρχει αδυναμία αποζύμωσης του γλεύκους με 4.4 °Plato. Αυτό το γεγονός, πιθανόν να οφείλεται στην μικρότερη αναλογία του *Saccharomyces cerevisiae* στη ζύμωση, εφόσον έχει πρωταγωνιστικό ρόλο η *Metschnikowia pulcherrima*. Αξιοσημείωτο είναι ότι οι δύο ζυμώσεις των καθαρών καλλιιεργειών και στις δύο θερμοκρασίες (13 °C, 20 °C), έλαβαν τέλος χωρίς να τους δοθεί η ευκαιρία να φθάσουν στο μέγιστο τελικό βαθμό °Plato. Επομένως, εάν υπήρχε η δυνατότητα κάποιων ακόμη ημερών, ίσως έδιναν αποτελέσματα με σημαντικά μικρότερα ποσοστά αζύμωτων σακχάρων (διπλωματική: Τσαγκάρη Νίνα-Αικατερίνη 2021).

Στα διαγράμματα που ακολουθούν παρουσιάζεται ο ρυθμός κατανάλωσης του διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου σε κάθε πείραμα, αλλά και διαγράμματα σύγκρισης των αποτελεσμάτων του ρυθμού κατανάλωσης του διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου.

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 3: ΚΑΜΠΥΛΗ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗΣ ΤΟΥ ΔΙΑΘΕΣΙΜΟΥ ΑΜΜΩΝΙΑΚΟΥ ΑΖΩΤΟΥ ΣΤΙΣ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΑΝΑΛΟΓΙΕΣ ΚΑΙ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 4: ΚΑΜΠΥΛΗ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗΣ ΤΟΥ ΔΙΑΘΕΣΙΜΟΥ ΑΜΜΩΝΙΑΚΟΥ ΑΖΩΤΟΥ ΣΤΙΣ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ



Παρατηρώντας τις παραπάνω καμπύλες φαίνεται ότι την μεγαλύτερη κατανάλωση διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου έχει η ζύμωση 1:1 στους 20 °C. Επίσης, αυτή σημειώνεται να είναι η ζύμωση που ολοκληρώθηκε στο συντομότερο διάστημα. Όμως, κατά τις πρώτες ημέρες φαίνεται να έχουν τη μεγαλύτερη κατανάλωση διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου οι μεικτές ζυμώσεις στη θερμοκρασία 13 °C. Ειδικότερα, στη ζύμωση μεικτής καλλιέργειας με αναλογία ζυμών 1:1 την πρώτη ημέρα καταναλώθηκε μεγαλύτερη συγκέντρωση διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου σε σύγκριση με την αναλογία 1:10. Επιπλέον, η ζύμωση με αναλογία συγκέντρωσης 1:10 στη θερμοκρασία 20 °C, παρατηρείται πολύ μικρή κατανάλωση διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου, με σημαντικά μεγάλη κατανάλωση τη δεύτερη και τρίτη ημέρα ζύμωσης. Παρατηρείται, όμοια όπου βρίσκεται ο μη συμβατικός ζυμομύκητας σε μεγαλύτερη αναλογία από τον *S. cerevisiae* μια μικρή καθυστέρηση στην έναρξη ζύμωσης και μικρότερη κατανάλωση διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου. Αυτό οφείλεται στην έντονη ανάγκη των άγριων ζυμών σε άζωτο.

4.4 Προσδιορισμός αιθανόλης

Οι τιμές της περιεκτικότητας των τελικών προϊόντων σε αιθανόλη προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο της απόσταξης. Τα αποτελέσματα αυτών παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα:

ΠΙΝΑΚΑΣ 7: ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΕ ΑΙΘΑΝΟΛΗ (ABV) ΣΤΙΣ ΜΠΥΡΕΣ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΑΝΑΛΟΓΙΩΝ ΚΑΙ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΩΝ.

	Περιεκτικότητα σε αιθανόλη	%(v/v) (ABV)
Ζυμώσεις	Θερμοκρασία 13 °C	Θερμοκρασία 20 °C
Αναλογία 1:1	5.4	5.1
Αναλογία 1:10	5.0	5.5
100% <i>Metschnikowia pulcherrima</i>	3.9	4.6

Μια τυπική μπύρα American Pale Ale έχει περιεκτικότητα σε αιθανόλη 4.5-6.2% v/v. Όσον αφορά στην περιεκτικότητα σε αιθανόλη, οι ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν σε μεικτές καλλιέργειες παρατηρείται να έχουν μεγαλύτερες τιμές συγκριτικά με τις καθαρές καλλιέργειες στις διαφορετικές θερμοκρασίες. Αυτό συμβαίνει διότι η *M. pulcherrima* έχει χαμηλή ζυμωτική ικανότητα, με τα περισσότερα στελέχη της *M. pulcherrima* να αποκτήσουν 4 % v/v σε αιθανόλη (Comitini et. al., 2011). Πιο συγκεκριμένα για τις μεικτές καλλιέργειες φαίνεται ότι την μικρότερη τιμή έχει η ζύμωση με αναλογία 1:10 στους 13 °C, όπου είχε καταγραφεί η τιμή 4.4 °Plato, η οποία αντιμετώπισε αδυναμία αποζύμωσης του γλεύκους. Αντιθέτως η ίδια αναλογία στην ζύμωση με θερμοκρασία 20 °C παρατηρείται να συγκεντρώνει την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε αιθανόλη, με μικρή τιμή αζύμωτων σακχάρων (3.4 °P.). Ακολουθεί η αναλογία 1:1 στους 13 °C, με μικρή διαφορά, και ομοίως καταγράφηκε μικρή τιμή αζύμωτων σακχάρων (3.4 °Plato). Τέλος, στην ίδια αναλογία (*Saccharomyces cerevisiae* : *Metschnikowia pulcherrima*) σε θερμοκρασία 20 °C αποκτά τιμή 5.1% v/v αιθανόλη,), ήταν και η ζύμωση που ολοκληρώθηκε στο μικρότερο χρονικό διάστημα. Αυτή η ζύμωση έδωσε τη τιμή με τα λιγότερα αζύμωτα σάκχαρα (3.1 °Plato). (Διπλωματική: Τσάγκαρη Νίνα-Αικατερίνη 2021).

Στους 13 °C η καθαρή καλλιέργεια έδωσε τα περισσότερα αζύμωτα σάκχαρα (4.7 °Plato) για αυτό όπως φαίνεται και από τον πίνακα έχει την μικρότερη περιεκτικότητα σε αιθανόλη. Αντιστοίχως και η καθαρή καλλιέργεια στους 20 °C είχε αρκετά αζύμωτα σάκχαρα (4.2 °Plato), έχοντας μεγαλύτερη τιμή στη περιεκτικότητα της αιθανόλης.

4.5 Προσδιορισμός αρωματικού προφίλ

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται όλες οι ουσίες που καταγράφηκαν στην αέρια χρωματογραφία μάζας μετά από 6 μήνες παλαίωσης και μετά από 1 χρόνο παλαίωσης, καθώς και τα όρια ανίχνευσης και το άρωμα σύμφωνα με την βιβλιογραφία.

ΠΙΝΑΚΑΣ 8: ΤΟ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΟ ΑΡΩΜΑ ΚΑΙ ΤΟ ΟΡΙΟ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΟΛΩΝ ΤΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΕΚΥΨΑΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΜΑΖΑΣ.

Για τις ανώτερες αλκοόλες:

ΕΝΩΣΕΙΣ	ΑΡΩΜΑ	ΟΡΙΟ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ (mg/L)	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ
Isoamyl alcohol	Ζυμέλαιο, οινόπνευματώδες ποτό, ούισκι, μπανάνα	5-6.5	Mas et. al., 2017
Active amyl alcohol	Γλυκό, αλκοολούχο	0.045-0.83x 10 ⁻³	Mas et al.2017
1-Pentanol	-	-	-
2-Furanmethanol	-	-	-
Tryptophol	Αμύγδαλο, ήπιο φρουτώδες	Δεν είναι διαθέσιμο	The good scent company, 2009
Phenylethyl alcohol	Τριαντάφυλλο, ζαχαρωτά	4	Burdock, 2016

Για τα οξέα:

ΕΝΩΣΕΙΣ	ΑΡΩΜΑ	ΟΡΙΟ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ (mg/L)	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ
isobutyric acid	Βούτυρο	--	--
Butanoic acid	Κεράσι, ανανάς, τυρί	--	--

Isovaleric acid (Butanoic acid, 3-methyl)	Τυρί, όξινο, πικάντικο, ποδαρίλα, λιπαρό	1	(Simpson & Mairs, 2005)
Active valeric acid (Butanoic acid, 2-methyl)	Πικράδα, τυρί, όξινο	Δεν είναι διαθέσιμο	(Burdock.2016)
Hexanoic acid	Μανιτάρι, γαλακτοκομικά	8	(Mas et al., 2017)
Octanoic acid	Λιπαρό, σαπούνι	4-6	(Simpson & Mairs, 2005)
n-Decanoic acid	Πικρό, όξινο	10	(Mas et al., 2017)
Hexadecanoic acid	Κρεμώδες, κερι	10	(Mas et al., 2017)

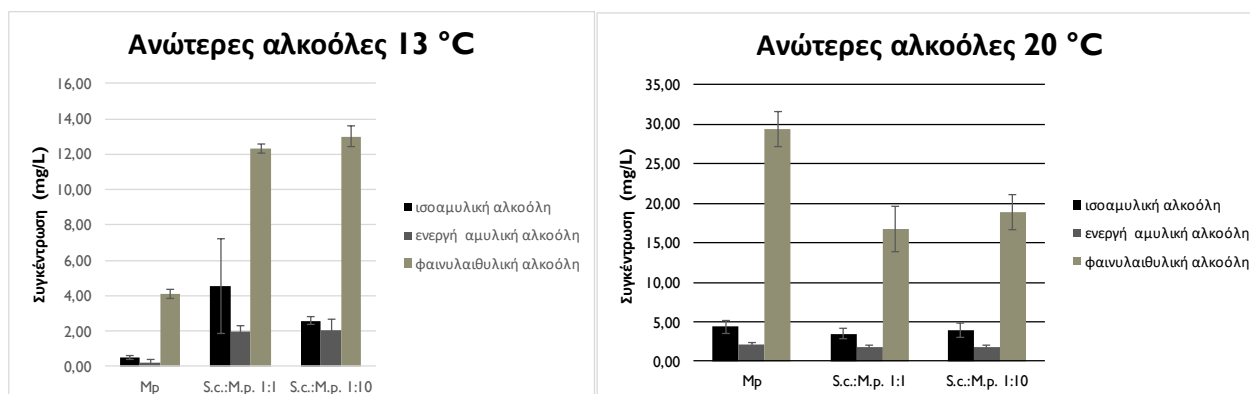
Για τους εστέρες:

ΕΝΩΣΕΙΣ	ΑΡΩΜΑ	ΟΠΙΟ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ (mg/L)	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ
Isoamyl acetate	Γλυκό, μπανάνα, αχλάδι	1.4	(Simpson & Mairs, 2005)
Hexanoic acid, ethyl ester	Μήλο, γλυκάνισος	0.2	(Simpson & Mairs, 2005)
Octanoic acid, ethyl ester	Φρουτώδες, βερίκοκο, μπανάνα, μπράντι, αχλάδι	0.04-0.058	(Laskin et al., 2005)
Phenyl ethyl acetate	Μπανάνα, μήλο, μέλι	0.05-0.38	(Laskin et al., 2005)
Decanoic acid, ethyl ester	Κερι	0.51-1.1	(Mas et al., 2017)
1,3-Benzenedicarboxylic acid, bis (2-ethylhexyl) ester	----	----	----

Στους ακόλουθους πίνακες παρουσιάζονται συγκριτικά οι τιμές που καταγράφηκαν μετά από 6 μήνες παλαίωσης στις διάφορες θερμοκρασίες και αναλογίες συγκέντρωσης στον αέριο χρωματογράφο μάζας χωρισμένες σε ενώσεις.

Παρακάτω βρίσκονται τα διαγράμματα (διάγραμμα 5 και 6) των ανώτερων αλκοολών, κατά τη διάρκεια παλαίωσης των 6 μηνών και τον ένα χρόνο στις διάφορες αναλογίες και θερμοκρασίες ζύμωσης.

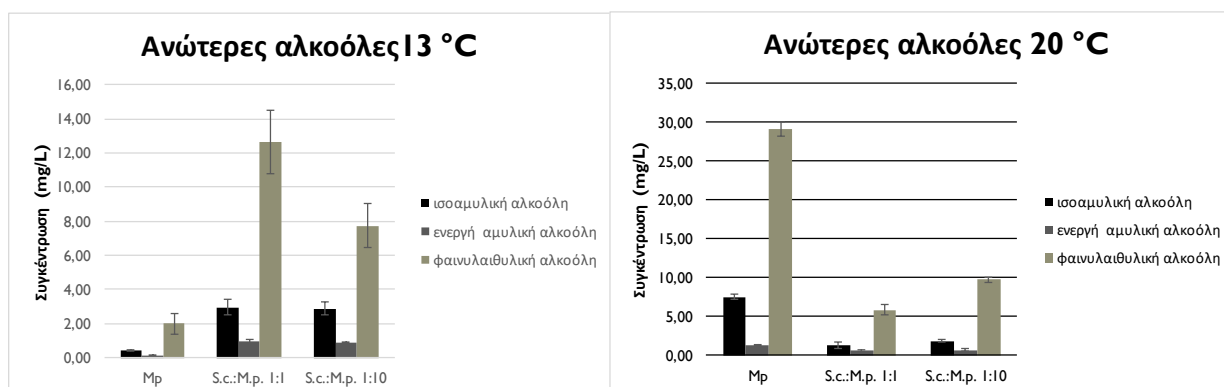
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 5: ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΤΩΝ ΑΝΩΤΕΡΩΝ ΑΛΚΟΟΛΩΝ ΣΤΙΣ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΑΝΑΛΟΓΙΕΣ ΚΑΙ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ ΣΤΟΥΣ 6 ΜΗΝΕΣ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ



Παρατηρώντας το παραπάνω διαγράμμα (διάγραμμα 5) γίνεται αντιληπτό ότι οι ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν σε μεικτές καλλιέργειες και στη θερμοκρασία ζύμωσης 13 °C δείχνει να έχει μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ανώτερων αλκοολών από την αντίστοιχη ζύμωση με καθαρή καλλιέργεια *M. pulcherrima* στους 6 μήνες ωρίμανσης. Ειδικότερα, παρατηρείται ότι στις μεικτές ζυμώσεις ισχύει ότι η ζύμωση με αναλογία 1:1 στην θερμοκρασία των 13 °C καταγράφεται η μεγαλύτερη τιμή συγκέντρωσης στην ισοαμυλική αλκοόλη. Όσον αφορά στην ενεργή αμυλική αλκοόλη και την φαινυλαιθυλική αλκοόλη δεν παρατηρούνται διαφορές στις δύο μεικτές καλλιέργειες (1:1 και 1:10) για την εξεταζόμενη θερμοκρασία 13 °C (διαγραμμα 5). Επιπρόσθετα στις ζυμώσεις των 20 °C, η ζύμωση με την αναλογία 1:10 έχει μεγαλύτερη συγκέντρωση της φαινυλαιθυλικής αλκοόλης. Η ισοαμυλική και η ενεργή αμυλική αλκοόλη παρατηρείται ότι διατηρούν παρόμοιες τιμές και στις δύο αναλογίες (20 °C). Γενικά, αποδεικνύεται ότι η υπεροχή της *M. pulcherrima* σε αναλογία βοηθά στην ανάδειξη των ανώτερων αλκοολών, διότι η *M. pulcherrima* επιδρά στη ζύμωση και αναδεικνύονται σε μεγαλύτερο βαθμό οι αρωματικές ενώσεις.

Η καθαρή καλλιέργεια της *M. pulcherrima* φαίνεται να υστερεί στην ζύμωση που πραγματοποιήθηκε στους 13 °C συγκριτικά με την ζύμωση στη θερμοκρασία των 20 °C. Η ισοαμυλική αλκοόλη φαίνεται να συγκεντρώνει πολύ μικρές τιμές στη ζύμωση που πραγματοποιήθηκε στους 13 °C. Αντιστοίχως, η ενεργή αμυλική αλκοόλη και η φαινυλαιθυλική αλκοόλη παρατηρούνται σε υψηλότερη συγκέντρωση στη ζύμωση η οποία πραγματοποιείται στη θερμοκρασία 20 °C, χαρακτηριστικά η φαινυλαιθυλική αλκοόλη να καταγράφει πολύ μεγάλη συγκέντρωση στην συγκεκριμένη θερμοκρασία.

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 6: ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΤΩΝ ΑΝΩΤΕΡΩΝ ΑΛΚΟΟΛΩΝ ΣΤΙΣ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΑΝΑΛΟΓΙΕΣ ΚΑΙ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ ΣΤΟΝ 1 ΧΡΟΝΟ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ



Στο διαγράμμα 6 απεικονίζονται οι παραγόμενες ανώτερες αλκοόλες μετά από έναν χρόνο ωρίμανσης. Αυτό που παρατηρείται εκ πρώτης όψεως είναι ότι οι ανώτερες αλκοόλες υπερισχύουν στη ζύμωση με ίση αναλογία του *Saccharomyces cerevisiae* και της *Metschnikowia pulcherrima* στις μεικτές ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν στους 13 °C. Αντιθέτως, για τις μεικτές ζυμώσεις στη θερμοκρασία των 20 °C παρατηρείται μεγαλύτερη συγκέντρωση των ανώτερων αλκοολών στην αναλογία όπου η *M. pulcherrima* υπερισχύει έναντι του *S. cerevisiae*. Αυτό υποδηλώνει ότι η *M. pulcherrima* μπορεί εξίσου να ανταγωνιστεί τον *S. cerevisiae* και συνεισφέρει στην ανάδειξη αρωματικών ενώσεων (Siriczki 2006; Türkel and Ener 2009).

Στις καθαρές ζυμώσεις της *M. pulcherrima* καταγράφονται αρκετά υψηλές τιμές με πολύ μεγάλη διαφορά στη ζύμωση που πραγματοποιήθηκε στους 20 °C, σε σχέση με την ίδια ζύμωση στη θερμοκρασία των 13 °C όπου ανιχνεύονται πολύ μικρές συγκεντρώσεις. Παρόλα αυτά, η καθαρή καλλιέργεια της *M. pulcherrima* δείχνει να έχει πολύ θετική επίδραση στη θερμοκρασία των 20 °C στον ένα χρόνο ωρίμανσης.

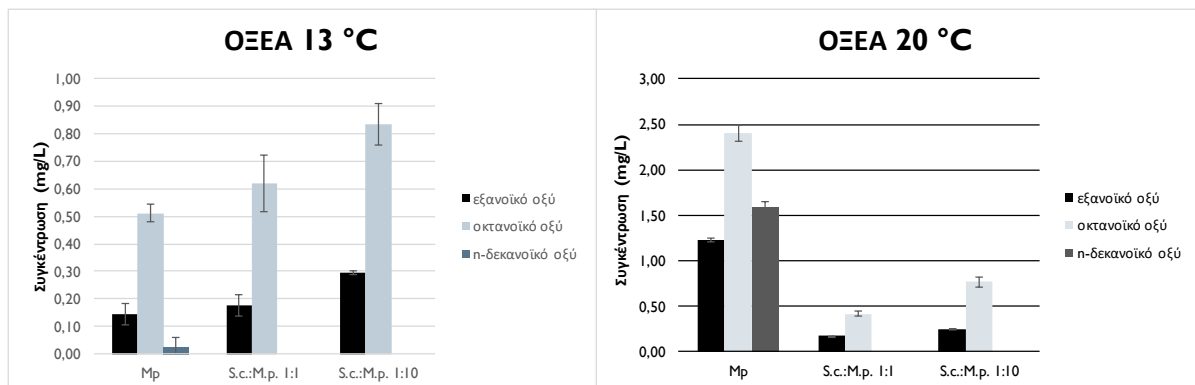
Εν κατακλείδι, παρατηρείται από τα διαγράμματα 5 και 6 ότι με την ωρίμανση της μπύρας, μετά το χρονικό διάστημα ενός έτους, μειώνονται οι συγκεντρώσεις κάποιων ανώτερων αλκοολών στις μεικτές ζυμώσεις και στις δύο εξεταζόμενες θερμοκρασίες. Συγκεκριμένα, στους 13 °C στη ζύμωση με αναλογία 1:1 διαπιστώνεται μια σταθερή μείωση στις ανώτερες αλκοόλες. Το ίδιο ισχύει για όλες τις προαναφερθέντες αλκοόλες στην αναλογία ζύμωσης 1:10. Έτσι, από το χρονικό διάστημα 6 μηνών έως 1 έτος ωρίμανσης στις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν και στις δύο εξεταζόμενες θερμοκρασίες οι ανώτερες αλκοόλες δείχνουν μια σταθερή πτώση στις συγκεντρώσεις τους.

Για τις καθαρές καλλιέργειες της *M. pulcherrima* οι συγκεντρώσεις των ανώτερων αλκοολών μειώνονται στις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν στους 13 °C από τους 6 μήνες μέχρι το 1 έτος ωρίμανσης. Λόγω της μείωσης των αλκοολών συνεπάγεται ότι πραγματοποιείται οξείδωση. Αντιθέτως, σύμφωνα με τους Vanderhaegen et. al., 2006 μπορεί να αναδειχθούν διάφορες χημικές ενώσεις κατά την ωρίμανση. η καθαρή καλλιέργεια της *M. pulcherrima* δείχνει σταθερή αύξηση στις συγκεντρώσεις της ισοαμυλικής αλκοόλης στις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν στους 20 °C. Αντιθέτως, για την ενεργή αμυλική αλκοόλη καταγράφεται μείωση στην ίδια θερμοκρασία. Τέλος, όσον αφορά την φαινυλαιθυλική αλκοόλη, παρατηρείται

ότι μετά τη χρονική διάρκεια ωρίμανσης 1 έτους παραμένει σταθερή η συγκέντρωση της.

Παρακάτω βρίσκονται τα διαγράμματα των οξέων (Διάγραμμα 7 και 8), κατά τη διάρκεια ωρίμανσης των 6 μηνών και τον ένα χρόνο στις διάφορες αναλογίες και θερμοκρασίες ζύμωσης.

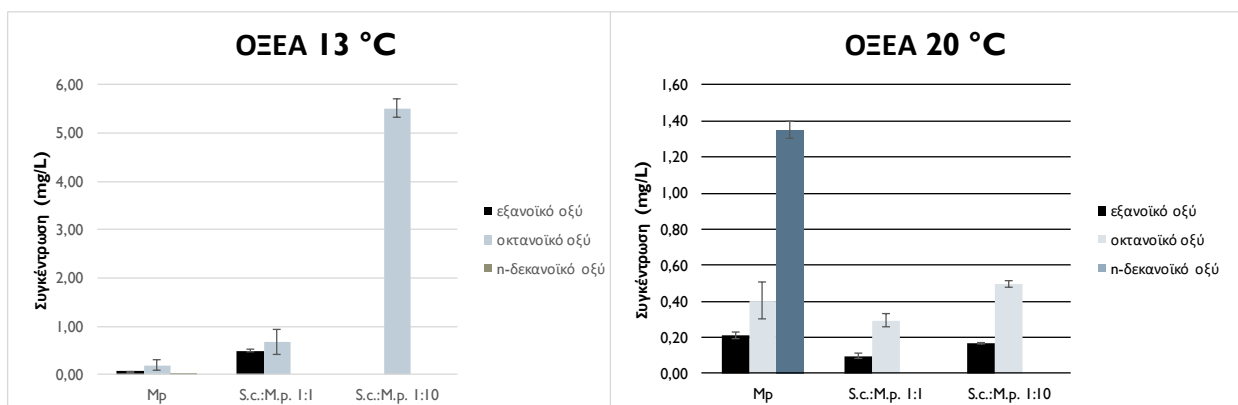
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 7: ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΤΩΝ ΟΞΕΩΝ ΣΤΙΣ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΑΝΑΛΟΓΙΕΣ ΚΑΙ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ ΣΤΟΥΣ 6 ΜΗΝΕΣ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ



Από το διάγραμμα 7 παρατηρείται ότι τα οξέα που ανιχνεύθηκαν με την βοήθεια της αέριας χρωματογραφίας μετά από 6 μήνες ωρίμανσης στις μεικτές καλλιέργειες δεν έχουν ιδιαίτερα μεγάλες διαφορές. Συγκεκριμένα για το n-δεκανοϊκό οξύ δεν ανιχνεύονται συγκεντρώσεις σε καμία από τις μεικτές αναλογίες και θερμοκρασίες. Όσον αφορά στο εξανοϊκό και το οκτανοϊκό οξύ δείχνουν να έχουν μεγαλύτερη τιμή συγκέντρωσης στις μεικτές ζυμώσεις οι οποίες πραγματοποιήθηκαν στους 13 °C, με ευνοϊκότερες συνθήκες στην αναλογία 1:10, όπου η *M. pulcherrima* υπερτερεί έναντι του *S. cerevisiae*, χάρη στην ανταγωνιστική της επίδραση κατά την διάρκεια της ζύμωσης (Siriczki 2006; Türkkel and Ener 2009).

Επιπρόσθετα, οι καθαρές καλλιέργειες της *M. pulcherrima* φαίνεται να έχουν πολύ μεγαλύτερη τιμή συγκέντρωσης στη ζύμωση που πραγματοποιήθηκε στους 20 °C. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι οι ιδανικότερες συνθήκες για την βέλτιστη ανάπτυξη της *M. pulcherrima* είναι οι θερμοκρασίες από 15 – 20 °C (Santamauro et. al., 2014).

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 8: ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΤΩΝ ΟΞΕΩΝ ΣΤΙΣ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΑΝΑΛΟΓΙΕΣ ΚΑΙ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ ΣΤΟΝ 1 ΧΡΟΝΟ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ



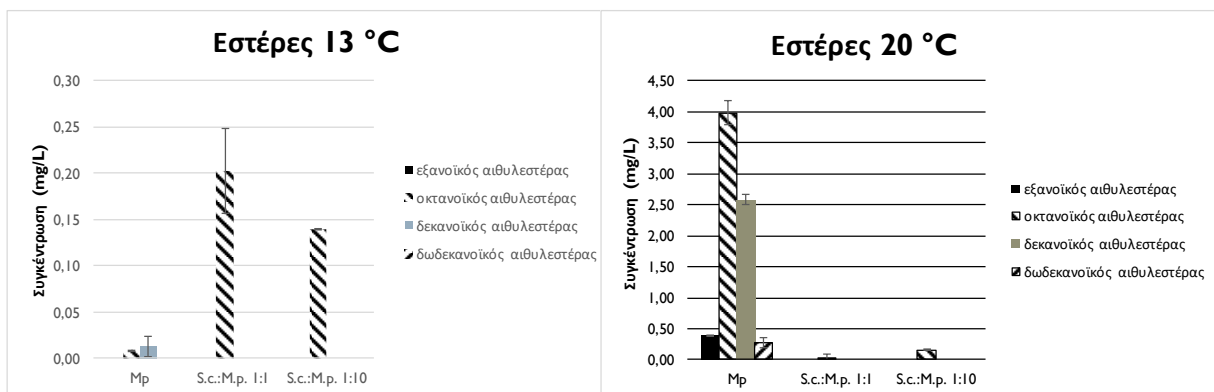
Σύμφωνα με το διάγραμμα 8 παρατηρείται ότι οι μεικτές καλλιέργειες οι οποίες πραγματοποιήθηκαν στη θερμοκρασία των 13 °C κατέγραψαν τις μεγαλύτερες τιμές συγκέντρωσης στις ενώσεις οξέων. Χαρακτηριστικά στην αναλογία ζύμωσης 1:10 ανιχνεύθηκε η μεγαλύτερη συγκέντρωση του οκτανοϊκού οξέος. Ωστόσο, το εξανοϊκό και το η-δεκανοϊκό οξύ φαίνεται ότι ανιχνεύθηκαν σε πάρα πολύ μικρή συγκέντρωση έως και καθόλου στην ίδια αναλογία και θερμοκρασία. Στις ζυμώσεις με ίσες αναλογίες των δύο ζυμομυκήτων διαπιστώνεται ότι στη θερμοκρασία των 13 °C καταγράφονται οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του οξανοϊκού οξέος και του οκτανοϊκού οξέος. Το η-δεκανοϊκό οξύ φαίνεται να μην έχει συγκεντρώσει κάποια τιμή και στις δύο θερμοκρασίες.

Στις ζυμώσεις με καθαρή καλλιέργεια της *M. pulcherrima* παρατηρείται να ανιχνεύονται μεγάλες συγκεντρώσεις του η-δεκανοϊκού οξέος στη ζύμωση όπου πραγματοποιήθηκε στους 20 °C συγκριτικά με τη ζύμωση που πραγματοποιήθηκε στη θερμοκρασία των 13 °C. Όμοια, το εξανοϊκό και το οκτανοϊκό οξύ δείχνουν ότι μπορούν να ανιχνευθούν σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στη ζύμωση όπου πραγματοποιήθηκε στους 20 °C.

Συνοπτικά, για τα οξέα ισχύει ότι οι μεικτές καλλιέργειες σε όλες τις αναλογίες και θερμοκρασίες κατά κύριο λόγο έδειξαν να μειώνονται οι συγκεντρώσεις τους από τους 6 μήνες έως τον ένα χρόνο ωρίμανσης. Ωστόσο, στην αναλογία 1:10 στην ίδια θερμοκρασία η συγκέντρωση του οκτανοϊκού οξέος αυξάνεται κατά πολύ μετά από χρονική περίοδο ενός έτους, επομένως αναμένεται η υπεροχή μιας λιπαρής αίσθησης (Simpson and Mairs , 2005) . Η υπεροχή του μη συμβατικού ζυμομύκητα σε συνεμβολιασμό με τον *S. cerevisiae* δείχνει ότι μπορεί να αναδείξει κάποιες ενώσεις σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στο στάδιο της ωρίμανσης. Όσο για τις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν στους 20 °C καταγράφονται μικρότερες τιμές στις συγκεντρώσεις μετά από 1 χρόνο ωρίμανσης. Συνεπώς, παρατηρείται ότι υπέστησαν οξειδωση, λόγω της αντίδρασης των οξέων με τις αλκοόλες για την παραγωγή εστέρων.

Παρακάτω βρίσκονται τα διαγράμματα (διάγραμμα 9 και 10) των εστέρων, κατά τη διάρκεια παλαίωσης των 6 μηνών και τον ένα χρόνο στις διάφορες αναλογίες και θερμοκρασίες ζύμωσης.

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 9: ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΤΩΝ ΕΣΤΕΡΩΝ ΣΤΙΣ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΑΝΑΛΟΓΙΕΣ ΚΑΙ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ ΣΤΟΥΣ 6 ΜΗΝΕΣ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ

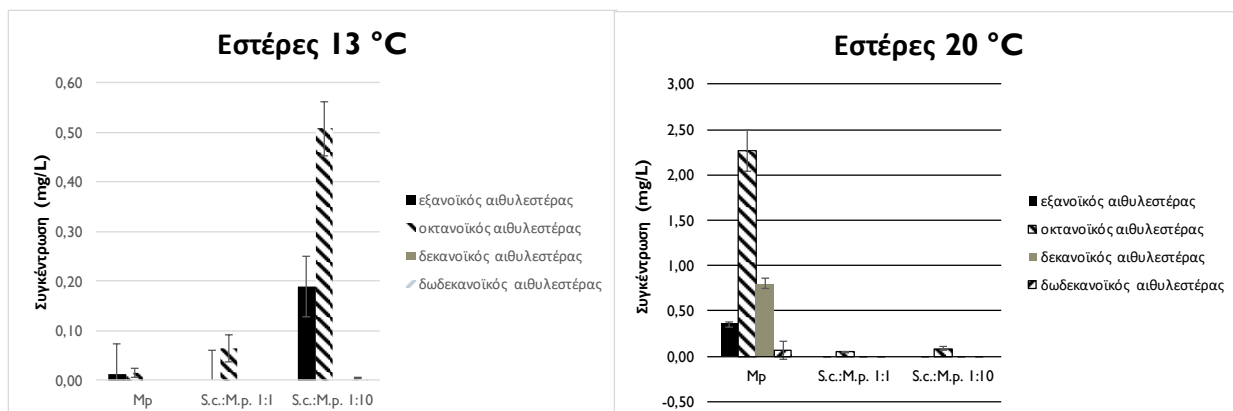


Σύμφωνα με το διάγραμμα 9, για τις μεικτές καλλιέργειες ισχύει ότι οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του εξανοϊκού και οκτανοϊκού αιθυλεστέρα καταγράφονται στην αναλογία

ζύμωσης 1:10 στη θερμοκρασία 20 °C. Στην ίδια ζύμωση (1:10) στην θερμοκρασία των 13 °C φαίνεται να μην ανιχνεύεται ο εξανοϊκός αιθυλεστέρας και να καταγράφεται πολύ μικρότερη συγκέντρωση ο οκτανοϊκός αιθυλεστέρας. Στις ζυμώσεις με ίση αναλογία των ζυμομυκήτων (1:1) παρατηρείται ότι στη θερμοκρασία των 13 °C ο οκτανοϊκός αιθυλεστέρας ανιχνεύεται περισσότερο σε σύγκριση με την ίδια αναλογία στους 20 °C, ενισχύοντας έτσι το τελικό προϊόν με φρουτώδη αρώματα. Στους 20 °C στην 1:10 φαίνεται ξεκαθαρά ότι η *M. pulcherrima* συμβάλει στο αρωμα λόγω της αυξημένης παραγωγής του οκτανοϊκού και εξανοϊκού αιθυλεστέρα και παρότι είναι σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις από το κατώφλι αντίληψης τους (0.4-0.58, 0.2 αντίστοιχα). Τέλος, παρατηρείται (διάγραμμα 9) ότι οι εστέρες, όπως είναι ο δεκανοϊκός και δωδεκανοϊκός αιθυλεστέρας υστερούν στην ανίχνευση τους μετά από 6 μήνες ωρίμανσης.

Για τις ζυμώσεις οι οποίες πραγματοποιούνται με την καθαρή καλλιέργεια της *M. pulcherrima* παρατηρείται ότι και στις δύο θερμοκρασίες οι συγκεντρώσεις των εστέρων είναι χαμηλές. Ο εξανοϊκός αιθυλεστέρας καταγράφει ελάχιστη μεγαλύτερη τιμή στη ζύμωση η οποία πραγματοποιήθηκε στους 20 °C. Επιπλέον, καταγράφονται ίχνη του δεκανοϊκού αιθυλεστέρα στη ζύμωση με θερμοκρασία 13 °C και του εξανοϊκού αιθυλεστέρα στη ζύμωση με θερμοκρασία 20 °C.

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 10: ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΤΩΝ ΕΣΤΕΡΩΝ ΣΤΙΣ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΑΝΑΛΟΓΙΕΣ ΚΑΙ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ ΣΤΟΝ 1 ΧΡΟΝΟ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ



Σύμφωνα με το διάγραμμα 10 οι συγκεντρώσεις των εστέρων μετά από 1 χρόνο ωρίμανσης στις μεικτές καλλιέργειες δείχνουν να είναι χαμηλές. Πιο αναλυτικά, παρατηρείται ότι στις ζυμώσεις οι οποίες η αναλογία των δύο στελεχών είναι ίση και στις δύο θερμοκρασίες (13 °C, 20 °C) καταγράφονται μικρές συγκεντρώσεις οκτανοϊκού αιθυλεστέρα, με λίγο μεγαλύτερη τη ζύμωση με θερμοκρασία 20 °C, ενισχύοντας έτσι τον φρουτώδη χαρακτήρα του τελικού προϊόντος. Ωστόσο, στις ζυμώσεις με αναλογία 1:10, ο οκτανοϊκός αιθυλεστέρας έχει μεγαλύτερη συγκέντρωση στη ζύμωση με θερμοκρασία 13 °C. Οι εστέρες εξανοϊκός αιθυλεστέρας, δεκανοϊκός αιθυλεστέρας, δωδεκανοϊκός αιθυλεστέρας (διάγραμμα 10) δεν ανιχνεύονται σε καμία μεικτή καλλιέργεια και σε καμία θερμοκρασία.

Η μη συμβατική ζύμη σε καθαρή καλλιέργεια παρουσιάζει υψηλότερες τιμές συγκέντρωσης στους εστέρες όπως είναι ο εξανοϊκός αιθυλεστέρας, οκτανοϊκός αιθυλεστέρας και δεκανοϊκός αιθυλεστέρας (διάγραμμα 10). Συγκεκριμένα, όλοι οι προαναφερθέντες εστέρες φαίνεται να

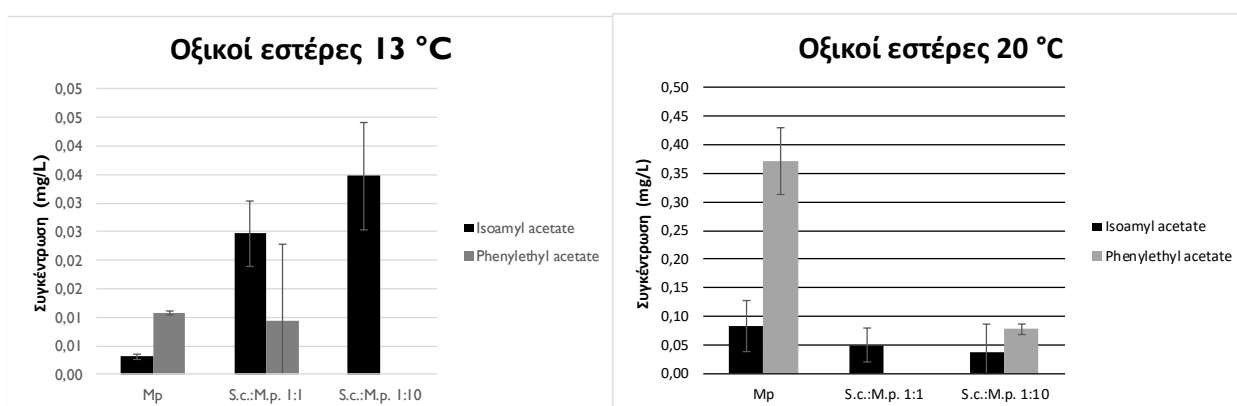
βρίσκονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στη καθαρή ζύμωση με θερμοκρασία 13 °C.

Συνοπτικά, είναι γεγονός ότι οι εστέρες είναι πολύ σημαντικές πτητικές ενώσεις οι οποίες παίζουν καθοριστικό ρόλο στη θετική επίδραση στο αρωματικό προφίλ της μπύρας, παρόλο που ανιχνεύονται συνήθως ίχνη τους. Η σύνθεση τους προέρχεται από την αντίδραση των ανώτερων αλκοολών και του acyl-CoA. Όσον αφορά στον εξανοϊκό αιθυλεστέρα φαίνεται να μειώνεται η τιμή της συγκέντρωσης του, εφόσον στη ζύμωση 1:10 στους 20 °C μετά από 6 μήνες ωρίμανσης είχε καταγραφεί 0.19 mg/L, ενώ στην ίδια αναλογία και θερμοκρασία μετά από 1 έτος ωρίμανσης δεν ανιχνεύεται. Γενικότερα στις μεικτές ζυμώσεις (διάγραμμα 9 και 10) για τον οκτανοϊκό αιθυλεστέρα υπάρχει μείωση της συγκέντρωσης σε όλες τις αναλογίες και θερμοκρασίες μετά το χρονικό διάστημα του ενός έτους. Στις μεικτές καλλιέργειες δεν καταγράφονται σε καμία ζύμωση και θερμοκρασία ο δεκανοϊκός και ο δωδεκανοϊκός αιθυλεστέρας.

Για την *M. pulcherrima* σε καθαρή καλλιέργεια οι τιμές των συγκεντρώσεων των εστέρων φαίνεται να έχουν ανοδική πορεία και στις δύο θερμοκρασίες (διάγραμμα 9 10). Χάρη στην αύξηση του εξανοϊκού αιθυλεστέρα και στις δύο εξεταζόμενες θερμοκρασίες μετά από ένα έτος παλαίωσης των καθαρών ζυμώσεων, ενισχύεται το άρωμα μήλου και γλυκάνισου (Simpson and Mairs , 2005). Ωστόσο, παρά το γεγονός ότι οι εστέρες επιδρούν θετικά στο αρωματικό χαρακτήρα της μπύρας, εάν ανιχνευθούν πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις μπορεί να οδηγήσουν σε δυσάρεστα αρώματα (off-flavor) (S.Q. Liu, 2015), καθώς ξεπερνάνε κατά πολύ το κατώφλι αντίληψης, όπως για παράδειγμα ο οκτανοϊκός αιθυλεστέρας (0.4-0.58).

Παρακάτω βρίσκονται τα διαγράμματα (διάγραμμα 11 και 12) των εστέρων, κατά τη διάρκεια παλαίωσης των 6 μηνών και τον ένα χρόνο στις διάφορες αναλογίες και θερμοκρασίες ζύμωσης.

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 11: ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΤΩΝ ΟΞΙΚΩΝ ΕΣΤΕΡΩΝ ΣΤΙΣ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΑΝΑΛΟΓΙΕΣ ΚΑΙ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ 6 ΜΗΝΕΣ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ

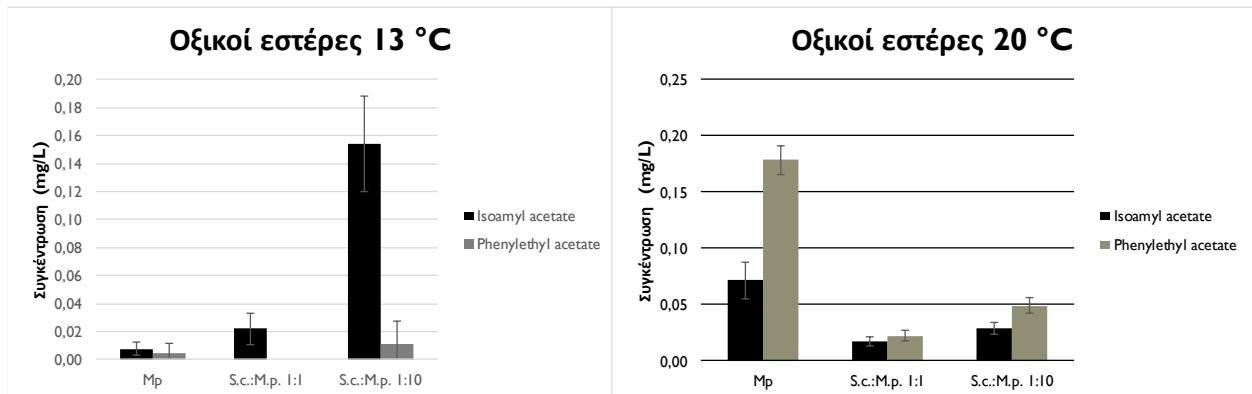


Σε γενικές γραμμές στο διάγραμμα 11 παρατηρείται ότι οι οξικοί εστέρες στις μεικτές ζυμώσεις στη θερμοκρασία 20 °C καταγράφουν πιο υψηλές συγκεντρώσεις. Ειδικότερα, για τον οξικό ισοαμυλεστέρα παρατηρείται υψηλότερη τιμή στην αναλογία ζύμωσης 1:1 στους 20 °C. Αντιθέτως, ο οξικός φαινυλαιθυλεστέρας ανιχνεύεται στη ζύμωση των 13 °C. Για τις μεικτές καλλιέργειες με αναλογία ζύμωσης 1:10, όπου η *M. pulcherrima* υπερέχει, φαίνεται ότι οι οξικοί εστέρες έχουν μεγαλύτερη τιμή στη ζύμωση που πραγματοποιήθηκε στους 20 °C, ενώ

στους 13 °C παρατηρείται ότι δεν ανιχνεύθηκε.

Επιπλέον, οι καθαρές καλλιέργειες της μη συμβατικής ζύμης παρατηρείται ότι ανιχνεύονται υψηλότερες συγκεντρώσεις στη ζύμωση με θερμοκρασία 20 °C. Με αυτό το τρόπο ενισχύεται στο τελικό προϊόν το γλυκό άρωμα, χάρη στον οξικό ισοαμυλεστέρα και τα φρουτώδη αρώματα όπως η μπανάνα και το μήλο χάρη στον οξικό φαινυλαιθυλεστέρα.

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 12: ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΤΩΝ ΟΞΙΚΩΝ ΕΣΤΕΡΩΝ ΣΤΙΣ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΑΝΑΛΟΓΙΕΣ ΚΑΙ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ 1 ΧΡΟΝΟ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ



Στο διάγραμμα 12 παρατηρείται ότι μετά από ένα έτος παλαίωσης της μπίρας για τις μεικτές καλλιέργειες οι αναλογίες 1:10 και στις δύο εξεταζόμενες θερμοκρασίες οι οξικοί εστέρες έχουν υψηλότερες συγκεντρώσεις. Αναλυτικά, στις ζυμώσεις 1:1 και στις δύο θερμοκρασίες ο οξικός ισοαμυλεστέρας παρατηρείται να έχει ακριβώς την ίδια συγκέντρωση (0.02mg/L). Όσον αφορά στον οξικό φαινυλαιθυλεστέρα παρατηρείται ότι έχει υψηλότερη τιμή στην αναλογία ζύμωσης 1:1 στους 20 °C. Μεγάλη διαφορά συγκεντρώσεων στις αναλογίες 1:10 έχει ο οξικός ισοαμυλεστέρας, με τη ζύμωση η οποία πραγματοποιείται στους 13 °C να καταγράφεται η συγκέντρωση 0.15mg/L. Αντίθετως, ο οξικός φαινυλαιθυλεστέρας έχει μεγαλύτερη τιμή συγκέντρωσης στους 20 °C. Γενικότερα, παρατηρείται η ανταγωνιστική δράση της *M. pulcherrima* έναντι του *S. cerevisiae*, όπου έχει τη δυνατότητα θετικής επίδρασης του τελικού προϊόντος, αφήνοντας μια γλυκιά, φρουτώδη αίσθηση (Simpson and Mairs , 2005).

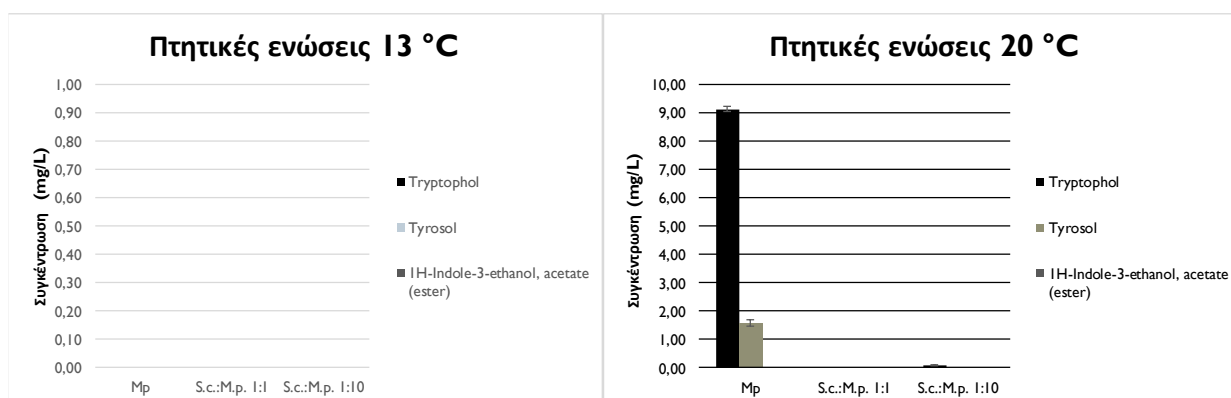
Όσον αφορά στις καθαρές καλλιέργειες σύμφωνα με το διάγραμμα 11 ισχύει ότι η ζύμωση η οποία πραγματοποιήθηκε στους 20 °C ανιχνεύονται υψηλότερες συγκεντρώσεις και για τον οξικό ισοαμυλεστέρα και τον οξικό φαινυλαιθυλεστέρα. Η *M. pulcherrima* αν και σε καθαρή καλλιέργεια φαίνεται να έχει εξίσου θετικό αντίκτυπο στο αρωματικό προφίλ της μπίρας.

Συνοπτικά από το διάγραμμα 11 και 12 παρατηρείται ότι για τις μεικτές ζυμώσεις οι οποίες πραγματοποιήθηκαν στους 13 °C καταγράφεται ανοδική πορεία στον οξικό ισοαμυλεστέρα στις αναλογίες 1:10. Η συμβολή της *M. pulcherrima* ήταν πολύ σημαντική, καθώς η υπεροχή της ανέδειξε τα αρωματικά χαρακτηριστικά του οξικού ισοαμυλεστέρα, όπως είναι η μπανάνα και το μήλο, παρά το χαμηλότερο κατώφλι αντίληψης (1.4mg/L) (Simpson and Mairs , 2005). Στην ίδια αναλογία και θερμοκρασία ο οξικός φαινυλαιθυλεστέρας μετά από 1 χρόνο παλαίωσης χάνει τα αρωματικά του χαρακτηριστικά, καθώς δεν ανιχνεύεται. Επιπρόσθετα, για την αναλογία 1:1 και στις δύο εξεταζόμενες θερμοκρασίες ισχύει ότι μειώνεται η συγκέντρωσή τους και κατ' επέκταση τα φρουτώδη αρώματα του τελικού προϊόντος. Ωστόσο, ο οξικός φαινυλεθυλεστέρας στη ζύμωση 1:1 στους 20 °C ανιχνεύεται σε ίχνη.

Μεγάλο ενδιαφέρον παρατηρήθηκε (διάγραμμα 11) στην καθαρή ζύμωση η οποία πραγματοποιήθηκε στους 20 °C μετά από 6 μήνες παλαίωσης. Ο οξικός φαινυλαιθυλεστέρας κατέγραψε τις τιμές κατωφλιού (0.05-038mg/L), ενισχύοντας έτσι τα αρώματα, μήλου, μπανάνας και μελιού (Laskin et. al., 2005). Παρατηρείται (διάγραμμα 12) υψηλή συγκέντρωση μετά από ένα χρόνο παλαίωσης στην ίδια θερμοκρασία αλλά μειωμένη περίπτωση στο μισό. Επιπρόσθετα, ο οξικός ισοαμυλεστέρας στους 20 °C φαίνεται να διατηρεί την τιμή συγκέντρωσης του μετά από ένα έτος ωρίμανσης. Όσον αφορά τις καθαρές καλλιέργειες στις ζυμώσεις στη θερμοκρασία 13 °C έχουν καταγραφεί ίχνη των δύο προαναφερθέντων οξικών εστέρων (διάγραμμα 11 και διάγραμμα 12).

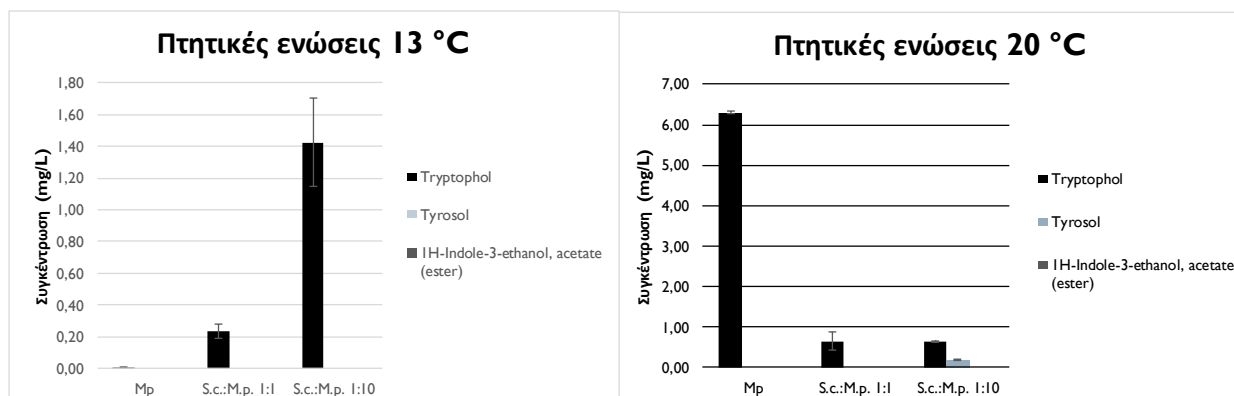
Παρακάτω βρίσκονται τα διαγράμματα (διάγραμμα 13 και 14) των λοιπών αρωματικών ενώσεων, κατά τη διάρκεια παλαίωσης των 6 μηνών και τον ένα χρόνο στις διάφορες αναλογίες και θερμοκρασίες ζύμωσης.

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 13: ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΤΩΝ ΛΟΙΠΩΝ ΠΗΤΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΤΙΣ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΑΝΑΛΟΓΙΕΣ ΚΑΙ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ 6 ΜΗΝΕΣ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ



Παρατηρώντας το διάγραμμα 13 παρατηρούνται υψηλές συγκεντρώσεις στη καθαρή ζύμωση η οποία πραγματοποιήθηκε στους 20 °C. Η τιμή της συγκέντρωσης της τρυπτοφώλης είναι αρκετά υψηλή (9.16mg/L). Έτσι, στους 6 μήνες ωρίμανσης, χάρη στην τρυπτοφόλη ενισχύεται το αρωματικό προφίλ του τελικού προϊόντος, έχοντας φρουτώδη χαρακτήρα και αφήνοντας μια αίσθηση αμυγδαλού (The good scent company, 2009). Επιπρόσθετα, καταγράφεται υψηλή συγκέντρωση και για την τυροσόλη. Ωστόσο, οι μεικτές καλλιέργειες δεν κατάφεραν να ανιχνεύσουν καμία τιμή της τρυπτοφώλης και τυροσόλης στις εξεταζόμενες αναλογίες και θερμοκρασίες. Εξάιρεση αποτελεί η μεικτή ζύμωση με αναλογία 1:10 στους 20 °C όπου υπάρχουν ίχνη της ένωσης της τρυπτοφώλης. Τέλος, δεν καταγράφηκε καμία τιμή για την 1H-Indole-3-ethanol, acetate (ester) σε καμία αναλογία και θερμοκρασία στους 6 μήνες ωρίμανσης.

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 14: ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΤΩΝ ΛΟΙΠΩΝ ΠΗΤΗΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΤΙΣ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΑΝΑΛΟΓΙΕΣ ΚΑΙ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΝΑ ΕΤΟΣ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ



Σύμφωνα με το διάγραμμα 14 για τις μεικτές ζυμώσεις η συγκέντρωση της τρυπτοφώλης ανιχνεύεται σε υψηλότερη συγκέντρωση στη ζύμωση με αναλογία 1:10 στους 13 °C, μετά από ένα χρόνο ωρίμανσης. Στην ίδια αναλογία αλλά στη θερμοκρασία 20 °C καταγράφεται και η τυροσόλη. Όσον αφορά την καθαρή καλλιέργεια της *M. pulcherrima* παρατηρείται αρκετά μεγάλη συγκέντρωση της τρυπτοφώλης μετά από ένα χρόνο ωρίμανσης. Η 1H-Indole-3-ethanol, acetate (ester) δεν ανιχνεύεται σε καμία αναλογία και θερμοκρασία μετά το πέρας του ενός έτους.

Συνοπτικά, καταγράφηκε άνοδος στις πητικές ενώσεις τρυπτοφόλη, τυροσόλη μετά από ένα έτος ωρίμανσης για τις μεικτές καλλιέργειες. Όπως προαναφέρθηκε σύμφωνα με τους Vanderhaegen et. al., (2006) διάφορες χημικές ενώσεις μπορεί να εμφανιστούν κατά την ωρίμανση. Όμως, για τις ζυμώσεις οι οποίες πραγματοποιήθηκαν στους 13 °C φαίνεται ότι στους 6 μήνες δεν ανιχνεύθηκε κάποια από τις προαναφερθέντες έννοιες (διάγραμμα 13), αλλά μετά από ένα έτος ωρίμανσης στην ίδια θερμοκρασία (διάγραμμα 14) καταγράφονται συγκεντρώσεις τρυπτοφώλης. Αυτό σημαίνει ότι ενισχύεται το άρωμα ξηρών καρπών, αμυγδάλου και φρούτων στο τελικό προϊόν (The good scent company, 2009). Ομοίως, στις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν στους 20 °C. Επιπλέον, ανιχνεύθηκε η τυροσόλη στην αναλογία ζύμωσης 1:10 στους 20 °C.

Για τις καθαρές ζυμώσεις της *M. pulcherrima* φαίνεται να υπάρχουν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στη ζύμωση στη θερμοκρασία των 20 °C, μετά από 6 μήνες ωρίμανσης της μπίρας. Εκεί, καταγράφονται υψηλότερες τιμές της τρυπτοφώλης και της τυροσόλης. Είναι γεγονός ότι κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, η μπίρα υπόκειται σε ποικίλες χημικές αντιδράσεις οι οποίες μπορεί να οδηγήσουν πιθανόν σε υποβιβασμό κάποιων αρωμάτων (Ben Hammouda et. al., 2017). Μετά από ένα χρόνο παλαίωσης διαπιστώνεται ότι η υπάρχει σταδιακή μείωση της συγκέντρωσης της τρυπτοφώλης και η τυροσόλη δεν ανιχνεύεται πλέον. Όσον αφορά τις ζυμώσεις οι οποίες πραγματοποιήθηκαν στους 13 °C δεν υπάρχει καμία διαφοροποίηση καθώς δεν ανιχνεύθηκε καμία πητική ένωση μετά το χρονικό διάστημα των 6 μηνών.

Κεφάλαιο 5° : Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η παραγωγή μπύρας με τη χρήση ενός μη συμβατικού ζυμομύκητα, της *Metschnikowia pulcherrima* σε μεικτές καλλιέργειες με τον *Saccharomyces cerevisiae*. Αναλυτικότερα, πραγματοποιήθηκαν διαφορετικές ζυμώσεις του ίδιου ζυθογλεύκους με διαφορετικές αναλογίες, 1:1, 1:10 και η καθαρή καλλιέργεια της *Metschnikowia pulcherrima*, σε θερμοκρασίες 13 °C και 20 °C. Μέσω της αέριας χρωματογραφίας, Καταγράφηκαν σημαντικές πτητικές ενώσεις μετά τη χρονική περίοδο των έξι μηνών και ενός έτους.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των ζυμώσεων παρατηρείται πως η χρονική διάρκεια της ζύμωσης επηρεάζεται καθοριστικά τόσο από την αναλογία των μικροοργανισμών στο ζυθογλεύκος όσο και από τη θερμοκρασία ζύμωσης. Συγκεκριμένα, οι ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν στους 20 °C ολοκλήρωσαν τη ζύμωση ταχύτερα και υπήρχε μικρότερο ποσοστό αζύμωντων σακχάρων. Η αναλογία ζύμωσης 1:1 ολοκληρώθηκε σε 9 ημέρες με 3.1 °Plato, η αναλογία ζύμωσης 1:10 χρειάστηκε 17 ημέρες για να ολοκληρωθεί με 3.3 °Plato. Με χαμηλότερο ρυθμό κατανάλωσης σακχάρων οι ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν στους 13 °C όπου διακόπηκαν στις 30 ημέρες ζύμωσης, με την αναλογία ζύμωσης 1:1 να φτάνει τους 3.4 °Plato και η αναλογία 1:10 τους 4.4 °Plato. Επιπλέον, οι ζυμώσεις με καθαρή καλλιέργεια της *M.pulcherrima* έχουν τη μεγαλύτερη καθυστέρηση στο ρυθμό εκκίνησης της ζύμωσης και να αφήνουν τα περισσότερα αζύμωτα σάκχαρα.

Επιπρόσθετα, σημαντικό χαρακτηριστικό της αλκοολικής ζύμωσης είναι η κατανάλωση αμμωνιακού αζώτου από τους ζυμομύκητες. Από τα αποτελέσματα διαπιστώνεται ότι στις καθαρές καλλιέργειες κατανάλωσαν μικρότερη κατανάλωση αμμωνιακού αζώτου από τις μεικτές καλλιέργειες, γεγονός θετικό για τις μη συμβατικές ζύμες. Η υψηλότερη κατανάλωση αμμωνιακού αζώτου πραγματοποιήθηκε από την αναλογία ζύμωσης 1:1 στους 20 °C. Οι τιμές αιθανόλης καταγράφηκαν υψηλότερες στις μεικτές καλλιέργειες, όπου κυμαίνονται από 5.0 έως 5.5 % (v/v), από τις καθαρές καλλιέργειες της *Metschnikowia pulcherrima*, με τιμές 3.9 % (v/v) στους 13 °C και 4.6 % (v/v) στους 20 °C. Εκτενέστερη μελέτη διεκπεραιώθηκε στα αρωματικά χαρακτηριστικά της μπύρας μετά από 6 μήνες και 1 έτος ωρίμανσης. Μεγάλο ενδιαφέρον είχαν τα αποτελέσματα των ανώτερων αλκοολών, των οξέων και των εστέρων. Σημαντικές ενώσεις, όπως η ισοαμυλική, η ενεργή αμυλική και η φαινυλαιθυλική αλκοόλη ενισχύουν τα αρώματα μπανάνας, γλυκού και τριαντάφυλλου. Επιπλέον, ανιχνεύθηκαν και ποσότητες λιπαρών οξέων μεσαίας αλυσίδας, όπως για παράδειγμα του οκτανοϊκού οξέος, αλλά και των αντίστοιχων εστέρων τους, όπως του οκτανοϊκού αιθυλεστέρα, αλλά και των εστέρων οξικού οξέος όπως του οξικού φαινυλεθυλεστέρα και του οξικού ισοαμυλεστέρα αναδεικνύοντας φρουτώδη αρώματα στο τελικό προϊόν της μπύρας, τύπου American Pale Ale. Γενικότερα, παρατηρήθηκε ότι τα συγκεκριμένα αρωματικά χαρακτηριστικά είχαν μια σταδιακή πτώση στις μεικτές ζυμώσεις από τους 6 μήνες έως τον 1 χρόνο ωρίμανσης. Ωστόσο, καταγράφηκαν μεικτές ζυμώσεις οι οποίες είχαν ανοδικές τιμές στις συγκεντρώσεις των αρωματικών ενώσεων, γεγονός θετικό για την συμβολή της *M. pulcherrima* σε συνεμβολιασμό με τον συμβατικό ζυμομύκητα *S. cerevisiae*. Αντίστοιχα, στις καθαρές καλλιέργειες καταγράφηκαν μικρότερες συγκεντρώσεις από τους 6 μήνες έως τον 1 χρόνο ωρίμανσης. Παρόλο αυτά, αρκετές ήταν οι περιπτώσεις στις οποίες ανιχνεύθηκαν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις μετά από 1 έτος ωρίμανσης της μπύρας. Έτσι, η *M. pulcherrima* αποδεικνύει ότι μπορεί να επιφέρει σε καθαρή καλλιέργεια εξίσου θετικά αρωματικά χαρακτηριστικά και μετά από χρονική περίοδο ενός έτους.

Σύμφωνα με τα παραπάνω γίνεται αντιληπτό ότι οι μεικτές ζυμώσεις με μη συμβατικό ζυμομύκητα και συγκεκριμένα με την *Metschnikowia pulcherrima* έχει πολλά θετικά

αποτελέσματα, για τη παραγωγή μπίρας με πολύπλοκα αρωματικά χαρακτηριστικά. Παρατηρείται ότι για τις μεικτές καλλιέργειες η αναλογία 1:10 (*Saccharomyces cerevisiae* : *Metschnikowia pulcherrima*) στη θερμοκρασία ζύμωσης 20 °C σημείωσε μεγαλύτερη πολυπλοκότητα, χάρη στην ανταγωνιστικότητα της *M. pulcherrima*. Ειδικότερα, μετά τους 6 μήνες ωρίμανσης αναδείχθηκαν τα περισσότερα αρωματικά χαρακτηριστικά με την βοήθεια του αέριου χρωματογράφου (GC-MS). Αντίστοιχα, ποικίλλες αρωματικές ενώσεις αναδείχθηκαν στις καθαρές καλλιέργειες της *M. pulcherrima* στις δύο εξεταζόμενες θερμοκρασίες. Σε κάθε περίπτωση, χρειάζεται να διεκπεραιωθούν εκτενέστερες μελέτες σε βάθος για την πλήρη εικόνα των αρωματικών χαρακτηριστικών που μπορούν να αναδειχτούν από τις μη συμβατικές ζύμες. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον θα είχε και ο συνεμβολιασμός με άλλους non-*Saccharomyces* ζυμομύκητες, με τον εμβολιασμό να γίνεται σε διαφορετικούς χρόνους.

Βιβλιογραφία

- A. Oberholster, B.M. Titus., (2016). Review: impact of dry hopping on beer flavor stability.
- B. Vanderhaegen et. al., (2006). The chemistry of beer aging – a critical review. Food Chemistry.
- Bardi L, Cocito C, Marzona M., (1999). Saccharomyces cerevisiae cell Fatty acid composition and release during fermentation without aeration and in absence of exogenous lipids. International Journal of Food Microbiology.
- Benito et. al., (2019). Mixed alcoholic fermentation of Schizosaccharomyces pombe and Lachancea thermotolerans and its influence on mannose-containing.
- Berbegal, C. et. al.,(2017). Microbial Resources and Innovation in the Wine Production Sector.
- Berbegal, C. et. al., (2020). PTR-ToF-MS for the Online Monitoring of Alcoholic Fermentation in Wine: Assessment of VOCs Variability Associated with Different Combinations of Saccharomyces/Non-Saccharomyces as a Case-Study.
- Budroni et. al. , M., (2017). Saccharomyces and Non-Saccharomyces Starter Yeasts.
- Capece et. al., (2018). Use of Saccharomyces cerevisiae var. bouardii in co-fermentations with S. cerevisiae for the production of craft beers with potential healthy value-added.
- Combina et. al., (2005). Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina.
- Comitini et. al., (2017). New Insights on the Use of Wine Yeasts.
- Comitini et. al., (2011). Selected non-Saccharomyces wine yeasts in controlled multistarter fermentations with Saccharomyces cerevisiae. Food Microbiol .
- Contreras et al., (2014). Evaluation of non-Saccharomyces yeasts for the reduction of alcohol content in wine.
- D. Saison et. al., (2009). Contribution of staling compounds to the aged flavour of lager beer by studying their flavour thresholds. Food Chemistry .
- Duina et. al., (2014). Budding Yeast for Budding Geneticists: A Primer on the Saccharomyces cerevisiae Model System.
- Escott et. al., (2018). Wine Spoilage Yeasts: Control Strategy. In Yeast.
- F. Lehnhardt, M. G., (2018). Forced into aging: Analytical prediction of the flavor-stability of lager beer. Critical Reviews in Food Science and Nutrition.
- Fleet, (1990). Yeasts in dairy products.
- I. M. Ferreira, L. Guido, (2018). Impact of wort amino acids on beer flavour. Fermentation .
- J.J. Baert et. al., (2012). On the origin of free and bound staling aldehydes in beer.
- J.S. Bland et. al., (2015). Isohumulones from hops (Humulus lupulus) and their potential role in medical nutrition therapy.
- Jolly et. al., (2019). The Role and Use of Non-Saccharomyces Yeasts in Wine Production.
- Jolly, N., (2003). South African Journal of Enology and Viticulture .

- K.J. Verstrepen et. al., (2003). Flavor-active esters: Adding fruitiness to beer.
- Krogerus K. et. al., (2013). Diacetyl and its control during brew-ery fermentation.
- L. Česlová et. al., (2009). Characterization of prenylflavonoids and hop bitter acids in various classes of Czech beers and hop extracts using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry.
- L.M. Gonçalves et. al., (2010). Analysis of aldehydes in beer by gas-diffusion microextraction: Characterization by high-performance liquid chromatography–diode-array detection–atmospheric pressure chemical ionization–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*.
- Lewis, M.J. and Bamforth, C.W., (2006). *Essays in Brewing Science*. Boston.
- Lodolo et. al., (2008). The yeast *Saccharomyces cerevisiae*– the main character in beer brewing.
- Machado et. al., (2019a). Hops: New perspectives for an Old beer ingredient. *Natural Beverages*.
- Maicas , S., & Mateo , J., (2016). *Microbial Glycosidases for Wine Production*.
- Martins et. al., (2018). Unveiling the lager beer volatile terpenic compounds.
- McGovern et. al., P. E., (2004). Fermented beverages of pre- and proto-historic China.
- Morata et. al., (2016). Influence of yeasts in wine colour. In *Grape and Wine Biotechnology*.
- Morris, C. J. (2015). *Dictionary of Energy*.
- Murakami et. al., A. (2003). Investigation of beer flavor by gas chromatography-olfactometry. *American Society of Brewing Chemists*.
- P. Schieberle, D. Komarek., (2003). Changes in key aroma compounds during natural beer aging *Freshness and Shelf Life of Foods*.
- P.H. Wolfe. (2012). *A Study of Factors Affecting the Extraction of Flavor When Dry Hopping Beer*. Oregon State University.
- Padilla et. al., (2016). Past and future of non-*Saccharomyces* yeasts: from spoilage microorganisms to biotechnological tools for improving wine aroma complexity.
- Petruzzi et. al., (2017). Microbial resources and enological significance: opportunities and benefits.
- Pires EJ. et. al., (2014). Yeast: The soul of beer’s aroma—a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast.
- Pretorius, I., (2020). *Tasting the Terroir of Wine Yeast Innovation*.
- Prior et. al., (2019). The utilisation of nitrogenous compounds by commercial non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine.
- Romano P, et al. (2003). Function of yeast species and strains in wine flavour.
- (1998). Russel I., & Stewart G. G.
- S.Q. Liu., (2015). Impact of yeast and bacteria on beer appearance and flavour *Brewing Microbiology: Managing Microbes*.

- Sadoudi et. al., (2012). Yeast-yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of non-Saccharomyces and Saccharomyces yeasts.
- Santamauro et. al., (2014). Low-cost lipid production by an oleaginous yeast cultured in non-sterile conditions using model waste resources. *Biotechnol. Biofuels*.
- Steenackers et. al., (2015). Chemical transformations of characteristic hop secondary metabolites in relation to beer properties and the brewing process: a review.
- The good scent company, (2009).
- Tristezza, M. et. al., (2016). The Oenological Potential of *Hanseniaspora uvarum* in Simultaneous and Sequential Co-Fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* for Industrial Wine Production.
- Vanderhaegen B. et. al., (2003). Bioflavoring and beer refermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*.
- Varela et. al. (2016). Volatile flavour profile of reduced alcohol wines fermented with the non-conventional yeast species *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces uvarum*. *Food Chem*.
- W. Wang et. al., (2014). A novel method for trace aldehyde determination in foodstuffs based on fluorescence labeling by HPLC with fluorescence detection and mass spectrometric identification. *Food Analytical Methods*.
- Walker, G. (2009). *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)*.
- Wang C et. al. (2016). The interaction between *Saccharomyces cerevisiae* and non-*Saccharomyces* yeast during alcoholic fermentation is species and strain specific.
- Zot K. et. al. (2011). The grape must non-*Saccharomyces* microbial community: Impact on volatile thiol release.
- Νεραντζης, Η., (2010). Γενική Μικροβιολογία . Αράκυνθος.
- Ταταρίδης, (2013). Use of non-saccharomyces *Torulaspora delbrueckii* yeast strains in winemaking and brewing .
- Νίνα -Αικατερίνη, (2021). Παραγωγή ζύθου με non-*Saccharomyces* ζύμες.

Παράρτημα Α : Αναλυτικοί πίνακες των συγκεντρώσεων των διάφορων ενώσεων που ανιχνεύθηκαν στις διάφορες αναλογίες και θερμοκρασίες με την βοήθεια του GC-MS\

ΠΙΝΑΚΑΣ 9: ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΓΙΑ ΤΙΣ ΤΙΜΕΣ ΤΩΝ ΑΝΩΤΕΡΩΝ ΑΛΚΟΟΛΩΝ ΣΤΙΣ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΟΓΙΕΣ ΤΩΝ ΖΥΜΩΣΕΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΠΑΛΑΙΩΣΗ 6 ΜΗΝΩΝ

Συγκεντρώσεις (mg/L)

Ενώσεις	1:1 (13 °C)	1:10 (13 °C)	<i>M.pulcherrima</i> (13 °C)	1:1 (20 °C)	1:10 (20 °C)	<i>M. pulcherrima</i> (20 °C)
Isoamyl alcohol	6.44±2.47	2.31±2.61	0.42±0.60	4.04±3.01	4.56±3.33	4.95±3.76
Active amyl alcohol	2.22±2.67	2.50±1.96	0.55±0.36	1.95±1.60	2.01±1.69	2.31±1.82
Methionool	ND	ND	ND	ND	ND	0.13±0.11
Phenylethyl alcohol	12.51±12.16	13.41±12.5	4.31±3.91	18.74±14.75	20.45±17.33	30.95±27.86
Tryptophol	ND	ND	0.03±0.05	ND	0.08±0.11	9.08±9.23
2-Furanethanol	ND	ND	ND	ND	0.02	0.49±0.35
Tyrosol	ND	ND	ND	ND	ND	1.69±1.52
Phenol	0.02	ND	0.31±0.28	ND	0.01	0.01

*ND= NOT DETECTED

ΠΙΝΑΚΑΣ 10: ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΓΙΑ ΤΙΣ ΤΙΜΕΣ ΤΩΝ ΟΞΕΩΝ ΣΤΙΣ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΟΓΙΕΣ ΤΩΝ ΖΥΜΩΣΕΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΠΑΛΑΙΩΣΗ 6 ΜΗΝΩΝ

Συγκεντρώσεις (mg/L)

Ενώσεις	1:1(13 °C)	1:10 (13 °C)	<i>M.P.</i> (13 °C)	1:1 (20 °C)	1:10 (20 °C)	<i>M.P.</i> (20 °C)
Isobutyric acid	0.07	0.12±0.06	ND	ND	0.05	ND
Butyric acid	0.06±0.07	0.06±0.04	0.01	0.01±0.05	0.07±0.05	0.25±0.30
Butanoic acid. 3-methyl	0.08±0.12	0.13	0.01	0.06±0.03	0.11	0.30±0.24

Butanoic acid. 2-methyl	0.04±0.05	0.07±0.06	ND	0.03	0.05	0.13±0.10
Hexanoic acid	0.15±0.20	0.29±0.30	0.17±0.12	0.17	0.25±0.26	1.22±1.24
Octanoic acid	0.55±0.69	0.78±0.89	0.49±0.53	0.40±0.44	0.81±0.72	2.47±2,34
n-Decanoic acid	ND	ND	0,05	ND	ND	1.55±1.63
Benzeneacetic acid	0.13	0.04±0.05	ND	ND	0.09	0.55±0.67

***ND=NOT DETECTED**

ΠΙΝΑΚΑΣ 11: ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΓΙΑ ΤΙΣ ΤΙΜΕΣ ΤΩΝ ΕΣΤΕΡΩΝ ΣΤΙΣ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΟΓΙΕΣ ΤΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΠΑΛΑΙΩΣΗ 6 ΜΗΝΩΝ.

Συγκεντρώσεις (mg/L)

Ενώσεις	1:1 (13 °C)	1:10 (13 °C)	<i>M.P.</i> (13 °C)	1:1 (20 °C)	1:10 (20 °C)	<i>M.P.</i> (20 °C)
Isoamyl acetate	0.03±0.02	0.04±0.03	ND	0.07±0.03	0.07	0.11±0.05
Phenylethyl acetate	0.02	ND	0.01	ND	0.08±0.07	0.41±0.33
Ethyl hexanoate	ND	ND	ND	ND	ND	0.38±0.39
Ethyl Octanoate	0.214±0.17	0.14	0.01	0.07	0.17±0.15	4.12±3.85
Ethyl butyrate	0.01	0.01	ND	0.01	0.02	ND
Ethyl decanoate	ND	ND	0.01±0.02	ND	ND	2.53±2.64
Ethyl dodecanoate	ND	ND	ND	ND	ND	0.33±0.21
Ethyl hexadecanoate	ND	ND	ND	ND	ND	0.64±0.54
Linoleic acid ethyl ester	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1H-Indole-3-ethanol. acetate ester	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Butanedioic acid, diethyl ester	ND	ND	ND	ND	ND	0.10±0.13
---------------------------------	----	----	----	----	----	-----------

***ND= NOT DETECTED**

ΠΙΝΑΚΑΣ 12: ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΤΩΝ ΛΟΙΠΩΝ ΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΠΟΥ ΠΑΡΑΧΘΗΚΑΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ 6 ΜΗΝΕΣ ΠΑΛΑΙΩΣΗΣ ΣΤΙΣ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΟΓΙΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΩΝ ΖΥΜΩΣΕΩΝ.

Συγκεντρώσεις (mg/L)

Ενώσεις	1:1 (13 °C)	1:10 (13 °C)	M.P. (13 °C)	1:1 (20 °C)	1:10 (20 °C)	M.P. (20 °C)
4-Vinyl guaiacol	ND	ND	ND	ND	ND	0.94±0.86
2(3H)-Furanone, 5-heptyldihydro (Peach lactone)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Benzofuran, 2,3-dihydro-	ND	ND	0.01	ND	ND	0.30±0.42
2-Methoxyhydroquinone	ND	ND	ND	ND	ND	0.60±0.53
3(2H)-Furanone, 4-hydroxy-2,5- dimethyl- Furaneol	ND	ND	ND	ND	ND	0.08±0.10
Ethanone, 1-(1H-pyrrol-2-yl)-	0.01	ND	4.88±3.91	0.01	0.02	0.17±0.14
Ethyl hydrogen succinate	ND	ND	ND	ND	ND	0.43
Disulfide, bis(1-methylethyl)	0.01	0.01	ND	ND	ND	ND

***ND= NOT DETECTED**

ΠΙΝΑΚΑΣ 13: ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΤΩΝ ΑΝΩΤΕΡΩΝ ΑΛΚΟΟΛΩΝ ΠΟΥ ΠΑΡΑΧΘΗΚΑΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ 1 ΧΡΟΝΟ ΠΑΛΑΙΩΣΗΣ ΣΤΙΣ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΟΓΙΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΩΝ ΖΥΜΩΣΕΩΝ.

Συγκεντρώσεις (mg/L)

Ενώσεις	1:1 (13 °C)	1:10 (13 °C)	<i>Metschnikowia Pulcherrima</i> (13 °C)	1:1 (20 °C)	1:10 (20 °C)	<i>M.pulcherrima</i> (20 °C)
Isoamyl alcohol	2.63 ± 3.28	2.61±3.16	0.44±0.45	1.07±1.63	1.76±2.01	7.78±7.36
Active amyl alcohol	0.86±1.06	0.87±0.94	0.15±0.13	0.44±0.73	0.84±0.61	1.42±1.33

Methionool	0.03±0.05	0.02±0.07	ND	0.01	0.02	0.13
Phenylethyl alcohol	11.36±13.96	8.64±6.84	2.58±2.42	5.44±6.32	10.03±9.50	29.73±28.43
Tryptophol	0.20±0.27	1.23±1.62	0.01	0.81±0.50	0.66±0.63	6.33±6.28
2-Furanethanol	0.06±0.08	0.29±0.34	ND	0.03	0.05±0.04	ND
Tyrosol	ND	ND	ND	ND	0.18±0.20	ND
Phenol	0.03±0.04	0.04	ND	0.01	0.03±0.01	ND

***ND= NOT DETECTED**

ΠΙΝΑΚΑΣ 14: ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΓΙΑ ΤΙΣ ΤΙΜΕΣ ΤΩΝ ΟΞΕΩΝ ΣΤΙΣ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΟΓΙΕΣ ΤΩΝ ΖΥΜΩΣΕΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΠΑΛΑΙΩΣΗ 1 ΕΤΟΥΣ.

Συγκεντρώσεις (mg/L)

Ενώσεις	1:1 (13 °C)	1:10 (13°C)	<i>M.P.</i> (13 °C)	1:1 (20 °C)	1:10 (20 °C)	<i>M.P.</i> (20 °C)
Isobutyric acid	0.04±0.08	0.08±0.61	ND	0.06	0.04±0.01	ND
Butyric acid	0.03±0.10	0.05±0.30	ND	0.03	0.04	ND
Butanoic acid, 3-methyl	0.03±0.12	0.08±0.25	ND	0.03±0.06	0.04	ND
Butanoic acid, 2-methyl	0.01±0.08	0.05±0.39	ND	0.02±0.03	0.03	ND
Hexanoic acid	0.47±0.52	ND	0.06±0.07	0.09±0.11	0.17±0.16	0.22±0.20
Octanoic acid	0.49±0.86	0.65±5.39	0.11±0.27	0.32±0.27	0.51±0.49	0.33±0.48
n-Decanoic acid	ND	ND	0.02	ND	ND	1.39±1.32
Benzeneacetic acid	0.11	0.91	ND	0.07±0.03	0.08	ND
Hexadecanoic acid	1.01±1.69	2.51±3.06	0.02	1.31±1.00	0.55±0.88	ND
Octadecanoic acid	0.53±0.48	0.48±0.55	ND	0.93±0.75	0.33±0.44	ND

***ND=NOT DETECTED**

ΠΙΝΑΚΑΣ 15: ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΓΙΑ ΤΙΣ ΤΙΜΕΣ ΤΩΝ ΕΣΤΕΡΩΝ ΣΤΙΣ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΟΓΙΕΣ ΤΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΠΑΛΑΙΩΣΗ 1 ΕΤΟΥΣ.

Συγκεντρώσεις (mg/L)

Ενώσεις	1:1 (13 °C)	1:10 (13 °C)	<i>M.P.</i> (13°C)	1:1 (20°C)	1:10 (20°C)	<i>M.P.</i> (20 °C)
Isoamyl acetate	0.01±0.03	0.03±0.18	0.01	0.01±0.02	0.03	0.08±0.06
Phenylethyl acetate	ND	0.02	0.01	0.02±0.03	0.04±0.05	0.19±0.17
Ethyl hexanoate	ND	0.18±0.20	0.01±0.02	ND	ND	0.38±0.33
Ethyl Octanoate	0.05±0.09	0.47±0.55	0.01±0.02	0.05	0.10±0.07	2.43±2.10
Ethyl butyrate	0.01	0.07	ND	0.01	0.01	0.08±0.07
Ethyl decanoate	ND	ND	ND	ND	ND	0.84±0.77
Ethyl dodecanoate	ND	ND	0.01	ND	ND	0.13
Ethyl hexadecanoate	ND	ND	ND	ND	ND	0.64
Linoleic acid ethyl ester	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1H-Indole-3-ethanol. acetate (ester)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Butanedioic acid, diethyl ester	0.04±0.08	0.02±0.08	ND	0.02±0.03	0.03±0.02	ND

***ND=NOT DETECTED**

ΠΙΝΑΚΑΣ 16: ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΤΩΝ ΛΟΙΠΩΝ ΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΠΟΥ ΠΑΡΑΧΘΗΚΑΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ 1 ΕΤΟΣ ΠΑΛΑΙΩΣΗΣ ΣΤΙΣ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΟΓΙΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΩΝ ΖΥΜΩΣΕΩΝ

Συγκεντρώσεις (mg/L)

Ενώσεις	1:1 (13 °C)	1:10 (13°C)	<i>M.P.</i> (13°C)	1:1 (20°C)	1:10 (20°C)	<i>M.P.</i> (20°C)
4-Vinylguaiacol	ND	ND	ND	ND	ND	0.70±062

2(3H)-Furanone, 5-heptyldihydro (Peach lactone)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Benzofuran, 2,3-dihydro-	ND	ND	0.01	ND	ND	ND
2-Methoxyhydroquinone	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3(2H)-Furanone, 4-hydroxy-2,5- dimethyl- Furaneol	ND	ND	ND	ND	ND	0.08
Ethanone, 1-(1H-pyrrol-2-yl)-	0.01	ND	4.88±3.91	0.01±0.02	0.02±0.03	ND
Ethyl hydrogen succinate	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Disulfide, bis(1-methylethyl)	0.01	0.01	ND	ND	ND	ND

***ND=NOT DETECTED**