



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΟΙΝΟΥ, ΑΜΠΕΛΟΥ ΚΑΙ ΠΟΤΩΝ

ΤΙΤΛΟΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

« Μελέτη της εξέλιξης του αρωματικού προφίλ ζύθων κατά την πάροδο δύο ετών »

Πτυχιακή εργασία της Κούτρα Βαρβάρα
Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Δρόσου Φωτεινή

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ.

Ελισάβετ Κουσίση:

Φωτεινή Δρόσου:

Ντουρτόγλου Ευθαλία:

Δήλωση Συγγραφέα Πτυχιακής Εργασίας

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Βαρβάρα Κούτρα του Παναγιώτη, με αριθμό μητρώου 161053 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 σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Ο/Η Δηλών/ούσα
Βαρβάρα Κούτρα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Διαφορετικά στελέχη ζύμης μπορούν να παράγουν ζύθο με ένα μοναδικό και πολύ πολύπλοκο αρωματικό και γευστικό προφίλ. Η χρήση μη συγκαταβατικής ζύμης παρέχει στους ζυθοποιούς ένα ασυναγώνιστο, εμπορικό πλεονέκτημα ώστε οι ίδιοι να διαφοροποιηθούν. Ο σκοπός αυτής της έρευνας ήταν να εξεταστεί το αρωματικό προφίλ των ζύθων που παράγονται από ένα στέλεχος ζύμης non-*Saccharomyces* και η εξέλιξη τους στον χρόνο, σε καθαρές και μικτές καλλιέργειες συγκριτικά με το στέλεχος ζύμης *Saccharomyces cerevisiae*. Συνεπώς η παραγωγή ζύθου pale-ale διεξάχθηκε και υπέστη ζύμωση με καθαρή καλλιέργεια *Saccharomyces cerevisiae*, της *T. delbrueckii* και με μια μικτή καλλιέργεια των ζυμών που αναφέρθηκαν προηγουμένως σε αναλογία 1:10 στους 20 °C. Μετά την ζύμωση οι ζύθοι που παράχθηκαν εμφιαλώθηκαν χωρίς φίλτρο και αποθηκεύτηκαν στους 13 °C. Συλλέχθηκαν δείγματα μετά από 7 μέρες, 6, 12, 24 μήνες παλαίωσης και αναλύθηκαν από την αέρια χρωματογραφία φασματομετρία μάζας ώστε να καθοριστεί το αρωματικό τους προφίλ. Έχουν μετρηθεί ενώσεις από την ομάδα υψηλότερων αλκοολών, οξέων και οι εστέρες τους. Από την ομάδα υψηλότερων αλκοολών, ανιχνεύθηκε φαινυλαιθυλική αλκοόλη σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στην ζύμωση μικτής καλλιέργειας συγκριτικά με την ζύμωση όπου έχει χρησιμοποιηθεί μονοκαλλιέργεια. Η εξέλιξη αυτής της ένωσης αυξήθηκε κατά την διάρκεια της παλαίωσης και μετά από 24 μήνες ο ζύθος που παράχθηκε με μικτή καλλιέργεια είχε την μέγιστη συγκέντρωση. Επιπλέον ανιχνεύθηκαν ο ισοαμυλικός εστέρας και ο φαινυλαιθυλικός εστέρας σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στον ζύθο που παράχθηκε με την *T. delbrueckii*, ενώ η συγκέντρωση στην μικτή καλλιέργεια αυξήθηκε μετά από 12 μήνες παλαίωσης. Ο εξανοϊκός αιθυλεστέρας υπήρχε στους ζύθους που ζυμώθηκαν από την *T. delbrueckii* ήδη μετά από 7 ημέρες, ενώ σε αυτούς που ζυμώθηκαν από *Saccharomyces cerevisiae* μετά από 24 μήνες. Τα στελέχη αναλύθηκαν επίσης για την παραγωγή φαινολικών ενώσεων, παρέχοντας φαινολικό χαρακτήρα στο τελικό προϊόν. Μετά από 6 μήνες ανιχνεύθηκαν νέες ενώσεις όπως το βουτανοϊκό οξύ, δεκανοϊκό οξύ και δωδεκανοϊκό οξύ και οι εστέρες τους. Επιπλέον αξιολογήθηκε το αισθητήριο προφίλ των ζύθων και εκτιμήθηκε ότι τα προϊόντα ζύμωσης των non-*Saccharomyces* ζυμών είναι περισσότερο φρουτώδη, με λουλουδάτο αρωματικό προφίλ. Ο ζύθος που ζυμώθηκε με μικτή καλλιέργεια εμφάνισε παρόμοιους αισθητήριους χαρακτήρες με αυτόν που ζυμώθηκε με *Saccharomyces cerevisiae*.

ABSTRACT

Different yeast strains can produce beer with a unique and very complex aroma and flavor profile. Using non-conventional yeast gives brewers an unparalleled selling point to differentiate themselves. The purpose of this research was to study the aroma profile of beers produced by a non-*Saccharomyces* yeast strain and its evolution over time, in both pure and mixed cultures compared to a *Saccharomyces cerevisiae* yeast strain. Thus, a Pale Ale beer production was carried out and fermented with pure cultures of *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii* and a mixed culture of the aforementioned yeasts at a 1:10 ratio at 20 °C. After fermentation the produced beers were bottled unfiltered and were stored at 13 °C. Samples were collected after seven days, six, twelve and twenty-four months of maturation, and were analysed by GC-MS for determining their aromatic profile. Compounds from the group of higher alcohols, acids and their esters have been quantified. From the group of higher alcohols, phenyl ethyl alcohol was detected in higher concentration in the mixed culture compared to either monoculture fermentations. The evolution of this compound increased during aging, and after 24 months the beer produced with the mixed culture had the utmost concentration. Moreover, isoamyl acetate and phenyl ethyl acetate were detected in higher concentration in beer produced with *T. delbrueckii* whereas the concentration in the mixed culture was enhanced after twelve months of maturation. Ethyl hexanoate was present in the *T. delbrueckii* beers already after seven days, whereas in the *S. cerevisiae* ones, only after 24 months. The strains were also examined for their production of phenolic compounds, providing a POF character in the final product. After six months, new compounds were detected, such as butanoic, decanoic and dodecanoic acids and their esters. Additionally, the sensory profile of the beers was assessed, and the product of the non-*Saccharomyces* yeast was evaluated as more fruity, with floral aromatic profile. The beer fermented by the mixed culture showed similar sensory characters to the *S. cerevisiae* fermentation one.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ABSTRACT	5
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	6
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	7
1. Η ΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΟΥ ΖΥΘΟΥ	7
1.1 ΒΥΝΟΠΟΙΗΣΗ	7
1.2 ΖΥΘΟΠΟΙΗΣΗ	8
.....	9
1.3 ΠΡΩΤΕΣ ΥΛΕΣ	10
2. ΖΥΜΕΣ	11
2.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12
2.3 <i>Metschnikowia pulcherrima</i>	14
2.4 <i>Torulaspota delbrueckii</i>	15
3.ΑΡΩΜΑΤΙΚΑ	17
3.1 ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΕΙΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ	19
3.2 ΑΛΚΟΟΛΕΣ	19
3.3.ΟΞΕΑ	22
3.4. ΕΣΤΕΡΕΣ	26
• Οκτανοϊκός αιθυλεστέρας	27
3.5 ΦΑΙΝΟΛΕΣ	28
3.6 ΘΕΙΟΥΧΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ	30
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	31
Παραγωγή ζύθου	31
Διαδικασία εκχύλισης με στήλη Vigreux	31
Ανάλυση αρωματικών συστατικών με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC-MS)	32
ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΜΤΩΝ ΚΑΙ ΣΧΟΛΙΑΣΜΩΝ	33
ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ	52
ΣΥΝΟΛΙΚΑ	52
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	53
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	54

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Η ΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΟΥ ΖΥΘΟΥ

Με το πέρασμα του χρόνου παρόλο που η παραγωγή του ζύθου μπορεί να εμφανίζει διάφορες παραλλαγές στην τεχνική, στη σύγχρονη ζυθοποιία φαίνεται να εντοπίζονται κάποια βασικά και απαραίτητα στάδια.

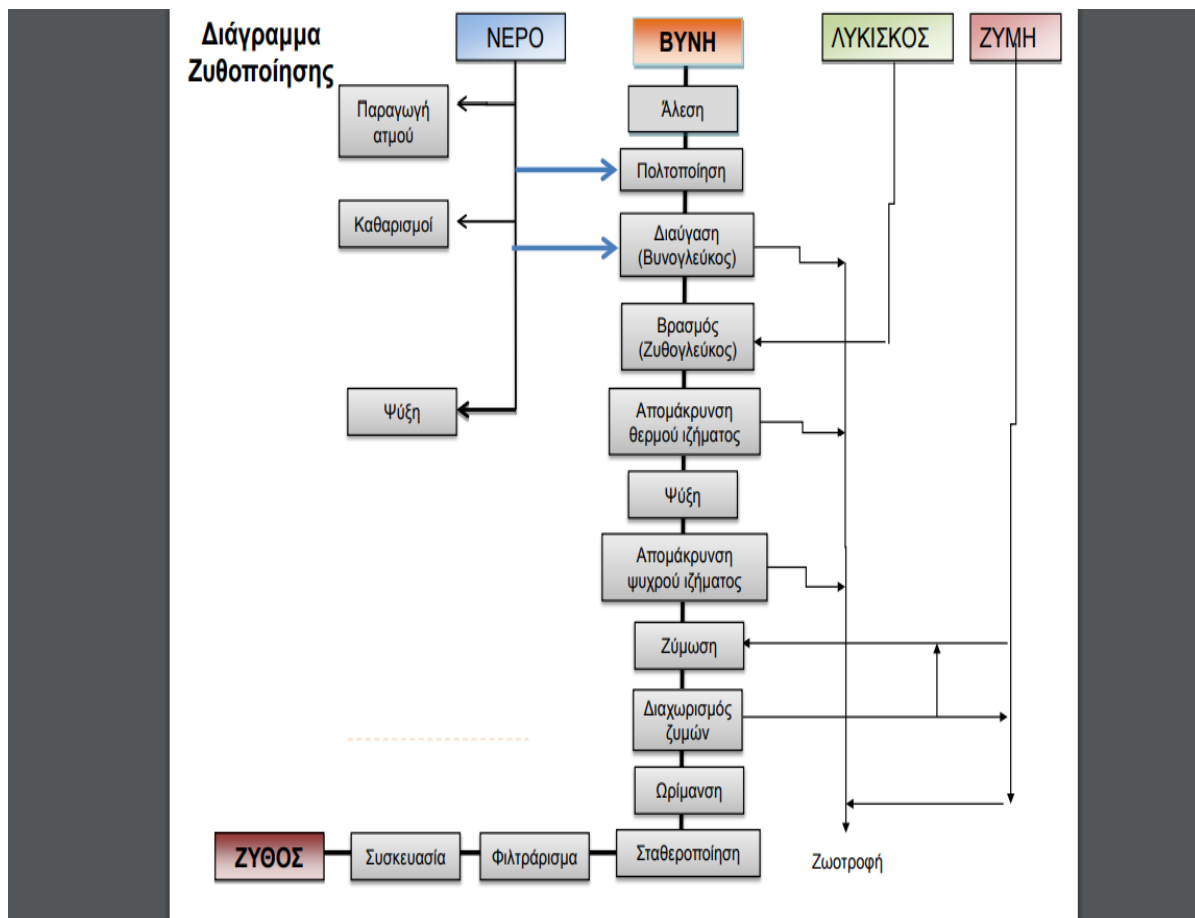
1.1 ΒΥΝΟΠΟΙΗΣΗ

1. Στο πρώτο στάδιο της βυνοποίησης γίνεται ο έλεγχος και η παραλαβή της πρώτης ύλης. Οι σπόροι του κριθαριού στο στάδιο αυτό παραλαμβάνονται και στη συνέχεια γίνεται έλεγχος για την καταλληλότητα του κριθαριού για βυνοποίηση με μηχανικές και χημικοτεχνικές αναλύσεις. (Ταταρίδης & Κεχαγιά, 2010).
2. Στο επόμενο στάδιο οι σπόροι διαβρέχονται με νερό προκειμένου να ξεκινήσει η βλάστηση τους. Καθώς περνά ο χρόνος το επίπεδο υγρασίας αυξάνεται ώστε να γίνουν οι απαραίτητες αλλαγές των ουσιών που περιέχει ο σπόρος ενώ παράλληλα πρέπει να επικρατούν αερόβιες συνθήκες (Ταταρίδης & Κεχαγιά, 2010).
3. Ο στόχος του βυνοποιού στη φάση της βλάστησης του σπόρου είναι να "ξυπνήσουν" τα ένζυμα και να ξεκινήσει σχηματισμός τους. Η παρουσία οξυγόνου είναι απαραίτητη προϋπόθεση για να επιτευχθεί η παραπάνω διαδικασία (Ταταρίδης & Κεχαγιά, 2010).
4. Η ξήρανση και η αποθήκευση της βύνης αποτελούν το τελικό στάδιο της βυνοποίησης. Στόχος σε αυτή την περίπτωση είναι η αδρανοποίηση των ενζύμων που προέκυψαν χωρίς όμως να καταστραφούν. Επίσης στο στάδιο αυτό η βύνη αποκτά γεύση, αρώματα και χρώμα που θα συναντήσουμε στον ζύθο. Από την διαδικασία αυτή το ξηρό προϊόν που τελικά προκύπτει ονομάζεται βύνη. Η βύνη είναι εύθρυπτη και εύγευστη, η υγρασία κυμαίνεται περίπου 4% και μπορεί να αποθηκευτεί χωρίς φόβο μικροβιακών αλλοιώσεων (Ταταρίδης & Κεχαγιά, 2010).

1.2 ΖΥΘΟΠΟΙΗΣΗ

1. Στο πρώτο στάδιο της ζυθοποίησης στόχος είναι η αύξηση της ειδικής επιφάνειας των κόκκων μέσω της άλεσης αυτών. Η αύξηση της ειδικής επιφάνειας δίνει τη δυνατότητα στα ένζυμα να δράσουν αλλά και να αυξήσει τον βαθμό εκχυλισιμότητας των ουσιών που περιέχονται σε αυτή (Ταταρίδης & Κεχαγιά, 2010).
2. Το στάδιο της πολτοποίησης είναι το επόμενο βήμα που ακολουθείται. Σε αυτό το στάδιο τα ένζυμα μετατρέπουν το άμυλο και τις πρωτεΐνες σε διαλυτές ουσίες. Τα προϊόντα της αποικοδόμησης αυτής δηλαδή το ζυμάσιμο και μη ζυμάσιμο εκχύλισμα θα χρησιμεύσουν: α) για την ανάπτυξη των ζυμών και β) για να προσδώσουν ιδιαίτερα χαρακτηριστικά στον ζύθο που θα παραχθεί.
3. Ακολουθεί η εκχύλιση ή διαύγαση, κατά την οποία γίνεται η απομάκρυνση των στερεών υπολειμμάτων της βύνης. Γίνεται προσθήκη νερού στο πολτοποιημένο γλεύκος το οποίο διέρχεται μέσα από τα υπολείμματα της ,για να εκχυλίσει ουσίες που είναι απαραίτητες για το προϊόν που θα προκύψει. Επίσης στο στάδιο αυτό είναι προστίθεται κατάλληλη ποσότητα νερού, ώστε τα σάκχαρα να βρίσκονται στην συγκέντρωση που επιθυμούμε (Ταταρίδης & Κεχαγιά, 2010).
4. Το επόμενο στάδιο είναι το στάδιο του βρασμού. Όταν το βυνογλεύκος φτάσει στο στάδιο του βρασμού προστίθεται σε αυτό πικρικός ή/και αρωματικός λυκίσκος. Όταν ολοκληρωθεί ο βρασμός, οι ουσίες του λυκίσκου και οι πρωτεΐνες που καθιζάνουν, απομακρύνονται με φυγοκέντριση (Ταταρίδης & Κεχαγιά, 2010).
5. Τελικά θα γίνει ψύξη του ζυθογλεύκος σε θερμοκρασία εμβολιασμού (20°C), θα προστεθεί αέρας και θα απομακρυνθεί μερικώς το ψυχρό θόλωμα.
6. Σε πλήρες συνθήκες αποστείρωσης, εμβολιάζεται με σωστή ποσότητα ζύμης, το ψυχρό γλεύκος. Θα ξεκινήσει η διαδικασία της ζύμωσης ώστε να παραχθεί κυρίως αιθανόλη και άλλες ουσίες.(Ταταρίδης & Κεχαγιά, 2010).
7. Στην συνέχεια έχουμε το στάδιο της ωρίμανσης, το οποίο υλοποιείται με την παρουσία ζυμών και κατά το οποίο σχηματίζονται αρωματικές ουσίες επιθυμητές στον ζύθο και απομακρύνονται οι ανεπιθύμητες καθώς αυξάνεται και η γευστική αρμονία στον ζύθο. Η ωρίμανση αποτελεί δηλαδή ένα στάδιο φυσικής σταθεροποίησης (Ταταρίδης & Κεχαγιά, 2010).
8. Στο τελικό στάδιο συμπεριλαμβάνεται η σταθεροποίηση που αποτελείται από την αποφυγή βιολογικών θολωμάτων με παστερίωση, την αποφυγή μη βιολογικών θολωμάτων, με αποθήκευση για μεγάλο χρόνο σε χαμηλές θερμοκρασίες και τη διήθηση μέσω μεμβρανών (Ταταρίδης & Κεχαγιά, 2010).
9. Ακολουθεί η απολάσπωση, κατά την οποία γίνεται απομάκρυνση των ζυμών και των υπολειμμάτων βύνης και λυκίσκου και τέλος η εμφιάλωση αυτού.

Στην εικόνα παρουσιάζεται το διάγραμμα ροής της παραγωγής ζύθου



Εικόνα 1 : Διάγραμμα ροής παραγωγής ζύθου.

1.3 ΠΡΩΤΕΣ ΥΛΕΣ

Τα βασικά υλικά που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή ζύθου είναι το κριθάρι, το νερό, η ζύμη και ο λυκίσκος. Υπάρχει η δυνατότητα να προστεθούν και άλλα υλικά, όπως ζάχαρη ή άλλα δημητριακά.

Νερό

Το νερό που χρησιμοποιείται είναι πόσιμο νερό χαμηλής περιεκτικότητας σε άλατα. Το νερό αυτό διακρίνεται σε δυο κατηγορίες, έχουμε το νερό που χρησιμοποιείται κατά το στάδιο της βυνοποίησης και το νερό που χρησιμοποιείται κατά το βρασμό και τη ζύμωση δηλαδή την ζυθοποίηση. Μόνο το δεύτερο περιέχεται στο ζύθο που θα παραχθεί.

Κριθάρι

Συνήθως επιλέγεται δίστιχο κριθάρι, το οποίο δεν είναι πλούσιο σε πρωτεΐνες και σε άμυλο. Σε κάποιους ζύθους μαζί με το κριθάρι χρησιμοποιούνται και άλλα είδη δημητριακών, όπως σιτάρι, βρώμη σίκαλη.

Λυκίσκος

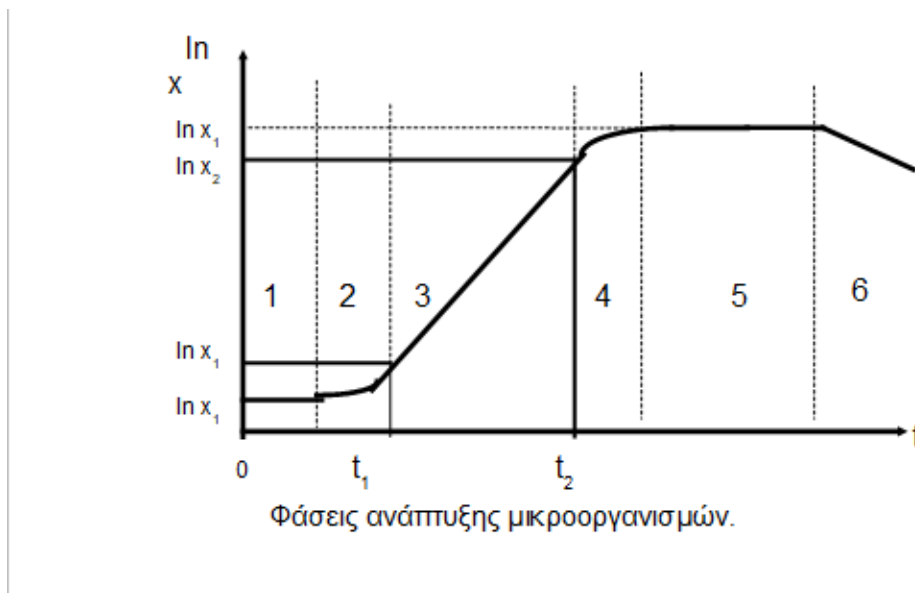
Ο λυκίσκος είναι ένα φυτό και ως πρώτη ύλη για τον ζύθο μας ενδιαφέρουν μόνο τα θηλυκά άνθη του και είναι αυτά που χρησιμοποιούνται. Σε αυτά υπάρχουν ρητίνες, οι οποίες κατά το βρασμό προσφέρουν τις αρωματικές και γευστικές ουσίες τους στον ζύθο. Επίσης ο λυκίσκος περιέχει συστατικά που δρουν ως συντηρητικά όπως είναι οι τανίνες και τα οργανικά οξέα

Ζύμη

Στην παραγωγική διαδικασία του ζύθου συμμετέχουν διάφορα είδη ζυμομυκήτων. Αυτά ασχολούνται εξολοκλήρου με την διαδικασία της αλκοολικής ζύμωσης, τον μεταβολισμό δηλαδή των σακχάρων και την παραγωγή της αλκοόλης και του διοξειδίου του άνθρακα. Ανάλογα με το είδος του ζύθου που θα παραχθεί επιλέγεται και η ζύμη που θα χρησιμοποιήσουμε.

2. ΖΥΜΕΣ

Οι ζύμες είναι συνήθως μονοκύτταροι μικροοργανισμοί και το μέγεθος τους κυμαίνεται από 2 -8 μm , ενώ ο πολλαπλασιασμός τους γίνεται κυρίως με εκβλάστηση, διχοτόμηση (σχιζομύκητες) ή σπορογονία (δυσμενείς συνθήκες). Μπορεί να είναι σπορογόνοι ή και άσποροι. Τα διάφορα είδη ζύμης ακολουθούν ακριβώς την ίδια εξέλιξη, δηλαδή ακολουθούν έξι φάσεις, τη λανθάνουσα φάση, τη φάση εκκίνησης, τη φάση εκθετικής ανάπτυξης, τη φάση επιβράδυνσης, τη στατική φάση και τη φάση θανάτου, όπως φαίνεται στην Εικόνα 2 (Nissen et al., 2003).



Εικόνα 2 : Φάσεις μικροοργανισμών

Η ζύμη προστίθεται στο βυνογλεύκος και λόγω της ζύμωσης θα προκύψει ένα ποτό που έχει αγαπηθεί από τον κόσμο, τον ζύθο. Οι μετατροπές αυτές είναι:

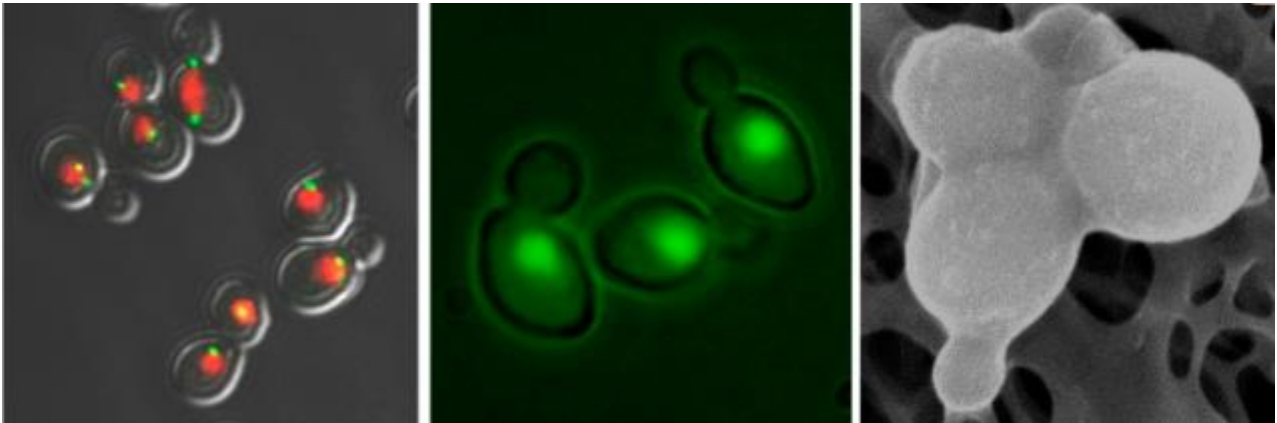
- Η παραγωγή αιθανόλης, λόγω της κατανάλωσης των σακχάρων του βυνογλεύκου από τις ζύμες. Άρα και μείωση της γλυκύτητας του βυνογλεύκου
- Η δημιουργία των οξέων τα οποία να μειώνουν το pH του ζύθου.
- Η ενανθράκωση του γλεύκου που οφείλεται στην παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα.
- Η δημιουργία κατά τη διαδικασία της ζύμωσης ενός πλήθους μεταβολικών ουσιών που προκύπτουν.

Από τα παραπάνω καταλαβαίνουμε ότι τα αρώματα που προκύπτουν από την βύνη και τον λυκίσκο μεταμορφώνονται σε ένα πολύπλοκο μίγμα ουσιών και αρμόδιοι για αυτό είναι οι ζυμομύκητες. Τα διάφορα είδη ζύμης που χρησιμοποιούνται συνήθως ανήκουν στην κατηγορία του *Saccharomyces cerevisiae*. (Lewis & Bamforth, 2006)

Στην παρούσα μελέτη θα αναλυθούν τα χαρακτηριστικά τριών συγκεκριμένων ειδών ζυμομυκήτων
α) *Saccharomyces cerevisiae* β) *Metschnikowia pulcherrima* γ) *Torulaspora delbrueckii*

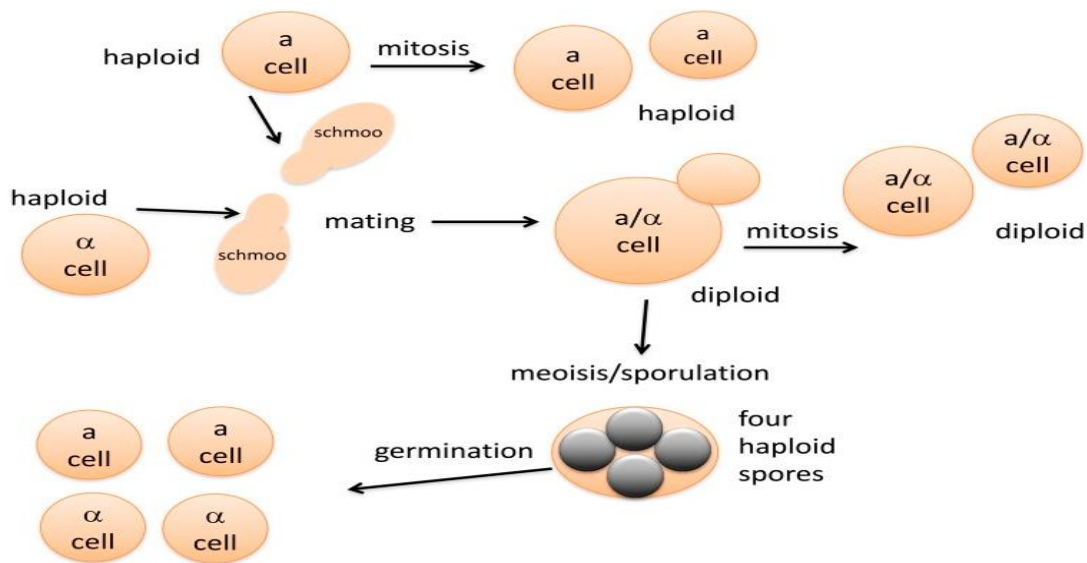
2.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Ο *S. cerevisiae* για τους επιστήμονες, χαρακτηρίζεται ως μύκητας ή μούχλα. Επιλέγεται συνήθως για έρευνα. Τα κύτταρα του ζυμομύκητα διαιρούνται τόσο γρήγορα όσο μία φορά κάθε 90 λεπτά σε βέλτιστες εργαστηριακές συνθήκες, μέσω μιας διαδικασίας εκβλάστησης στην οποία τα μικρότερα θυγατρικά κύτταρα τσιμπάνε ή εξαντλούνται από το μητρικό κύτταρο (Εικόνα 3). Η κοινή ονομασία "εκκολαπτόμενη ζύμη" προέρχεται από αυτό το αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό της κυτταρικής διαίρεσης και διακρίνει τον *S. cerevisiae* από άλλα είδη ζυμών.



Εικόνα 3: Ο μικροοργανισμός *S. cerevisiae* όπως φαίνεται από το μικροσκόπιο

Τα κύτταρα του *S. cerevisiae* στη φύση αλλάζουν εύκολα ανάμεσα σε δύο τύπους ζευγαρώματος: τα απλοειδή κύτταρα συσχετίζονται με απλοειδή κύτταρα α για να σχηματίσουν διπλοειδή. Υπό συνθήκες κακής θρεπτικής αξίας, τα διπλοειδή μπορούν να προκληθούν για να υποστούν μείωση και σπορίωση, σχηματίζοντας τέσσερα απλοειδή σπόρια, δύο από κάθε τύπο ζευγαρώματος (Εικόνα 4). Λόγω του μικροσκοπικού τους μεγέθους και των απλών απαιτήσεων ανάπτυξης, τα κύτταρα ζυμομυκήτων είναι φθηνά και εύκολα αναπτύσσονται στο εργαστήριο. Τα μη ζυγισμένα κύτταρα ζυμομύκητα έχουν διάμετρο περίπου 5 μm , μεταξύ των βακτηριδίων και των ανθρώπινων κυττάρων σε μέγεθος (Greig & Leu, 2009). Ωστόσο, δεν είναι σαφές εάν ο *S. cerevisiae* ως είδος εμφανίζεται φυσικά ή υπάρχει αποκλειστικά ως κατοικίδιο είδος. (Mortimer, 2000; Greig & Leu, 2009).

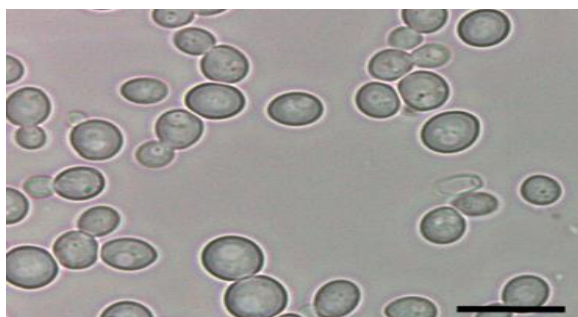


Εικόνα 4 : Ένα απλοποιημένο διάγραμμα κύκλου ζωής ζύμης.

Ο *S. cerevisiae* ήταν ο μικροοργανισμός που είχε κυρίαρχη θέση στις αυθόρμητες ζυμώσεις από τις πρώτες κιάλας προσπάθειες παραγωγής ζύθου στην ανθρώπινη ιστορία και έτσι τυχαία συνεχίστηκε η ζύμωση ζύθου με αυτόν τον μικροοργανισμό για αιώνες. Οι επιστήμονες τον 17^ο αιώνα ξεκίνησαν να αντιλαμβάνονται πως συμπεριφέρεται η συγκεκριμένη ζύμη κατά τη ζύμωση και τότε να χαρακτηριστεί η σημαντικότερη για την παραγωγή ζύθου (Basso et al., 2016). Ως σήμερα τα άτομα που έχουν εξειδικευτεί στην παραγωγή ζύθου έχουν κατορθώσει να γνωρίζουν απόλυτα τον μηχανισμό λειτουργίας τους, τις συνθήκες στις οποίες γίνεται η ζύμωση του, τον χρόνο της ζύμωσης του αλλά και των μονοπατιών μεταβολισμού των σακχάρων και των αμινοξέων όσον αφορά τον *S. cerevisiae*. Από τα παραπάνω προκύπτει ότι οι ζυθοποιοί μπορούν να παράγουν ένα προϊόν σταθερής ποιότητας με τα επιθυμητά χαρακτηριστικά πολύ εύκολα και σε μικρό χρόνο (Michel et al., 2016). Ο *S. cerevisiae* χρησιμοποιείται κυρίως για την παραγωγή αφροζυμωτών ζύθων (ale), κατά την διάρκεια αυτής τη ζύμωσης γίνεται η κροκίδωση ή συσσωμάτευση των ζυμών και στη συνέχεια προσκολλώνται στο διοξείδιο του άνθρακα που παράγεται με αποτέλεσμα να επιπλέουν στην κορυφή του γλεύκους. Αυτό δίνει τη δυνατότητα στους ζυθοποιούς να συλλέξουν τη ζύμη και να δημιουργήσουν περισσότερες αποικίες τις οποίες θα χρησιμοποιήσουν για την παραγωγή άλλων ζύθων.

2.3 *Metschnikowia pulcherrima*

Η *Metschnikowia pulcherrima* είναι non-Saccharomyces μικροοργανισμός ο οποίος παίζει σημαντικό ρόλο στην οινοποίηση του κρασιού όταν είναι παρών στα σταφύλια ή στον εξοπλισμό του οινοποιού (Ευθυμίου, 2015). Πρόκειται για μια ζύμη που εμφανίζεται συχνά σε αυθόρμητες ζυμώσεις. Το σημερινό ενδιαφέρον για τη συγκεκριμένη ζύμη υποστηρίζεται από την έκφραση πολλών εξωκυτταρικών δραστηριοτήτων, μερικές από τις οποίες ενισχύουν την απελευθέρωση διαφόρων αρωματικών ενώσεων. Έχει σχήμα σφαιρικό ή ελλειπτικό και δεν μπορεί να διακριθεί εύκολα από το *Saccharomyces cerevisiae* με μικροσκόπιο (Εικόνα 5). Ανήκει στο γένος των ασκομυκήτων και η αναμορφική του μορφή ονομάζεται *Candida pulcherrima*. Η *M. pulcherrima* είναι μια ζύμη που συναντάται στα σταφύλια, στα φρούτα (φρέσκα και αλλοιωμένα), στα λουλούδια, στο νέκταρ και στους χυμούς δέντρων.



Εικόνα 5 : Κυτταρική μορφολογία και σχήμα του *Metschnikowia pulcherrima*. Γραφική κλίμακα 10 μm .

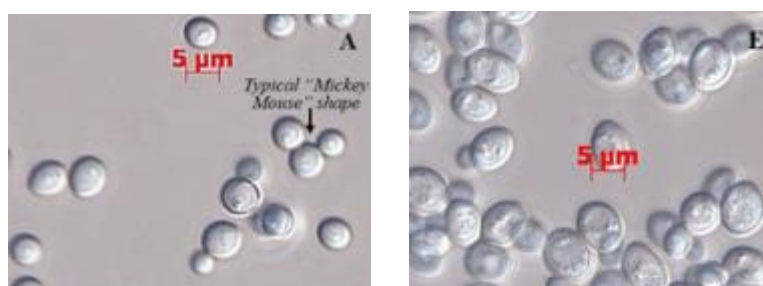
Γενικά τα στελέχη της *M. pulcherrima* έδειξαν την θετική δραστηριότητα του ενζύμου της β-γλυκοσιδάσης και την πρωτεολυτική τους δράση (Fernández, 2000). Η *M. pulcherrima* αναπτύσσεται σωστά είτε σε μέσο YPD είτε σε L-λυσίνη και μπορεί επίσης να χρησιμοποιήσει arbutin ως πηγή άνθρακα σε πλάκες άγαρ, υποδεικνύοντας την έκφραση της δραστηριότητας της β-γλυκοσιδάσης (Comitini et al., 2011). Η *M. pulcherrima* είναι σε θέση να χρησιμοποιεί γλυκόζη, σακχαρόζη, φρουκτόζη, γαλακτόζη και μαλτόζη ως πηγές άνθρακα, αλλά παρουσιάζει αδύναμη ή ανύπαρκτη ανάπτυξη λακτόζης (Loira, κεφάλαιο 15, Τύπος). Επίσης μπορεί να αναπτυχθεί σωστά υπό συνθήκες χαμηλής θερμοκρασίας (15-20 °C) και pH (3-6). Όταν βρίσκεται σε συνθήκες περιβαλλοντικού στρες όπως η έλλειψη αζώτου, η αναγνώρισή του στην οπτική μικροσκοπία είναι εύκολη χάρη στην εμφάνιση ενός λιπώδους σφαιριδίου μέσα στο κύτταρο στην αρχή της διαδικασίας σπορίωσης (Santamauro et al., 2014). Η απαίτηση σε άζωτο που χρειάζεται για να αναπτυχθεί η *M. pulcherrima* αξιολογήθηκε πρόσφατα και παρατηρήθηκε ότι ο ρυθμός κατανάλωσης της σε αμμώνιο είναι πιο αργός σε σύγκριση με άλλα είδη ζυμών (Bauer et al., 2019). Η χαμηλή ικανότητά της να ζυμώσει οφείλεται στην αργή πρόσληψη της σε άζωτο (Ribéreau-Gayon et al, 2006).

Η απλή χρήση της *M. pulcherrima*, σε μελέτες που έχουν γίνει, έχει οδηγήσει σε υπερβολική παραγωγή οξικού αιθυλεστέρα με αρνητικές επιπτώσεις στο άρωμα του οίνου (Varela, 2016). Η χρήση σε μικτές ζυμώσεις με *M. pulcherrima* και με *S. cerevisiae* έχει προκαλέσει την παραγωγή σε υψηλή περιεκτικότητα των οξικών εστέρων και της β-δαμασσενόνης με χαμηλότερα επίπεδα αλκοολών σε οίνους πάγου που παράγονται από την ποικιλία Vidal blanc (Zhang et al., 2018). Μια βελτίωση της αρωματικής πολυπλοκότητας των οίνων μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση της *M.*

pulcherrima ως συν-εκκινητής με τον *S. cerevisiae* (Comitini et al., 2011; Zott et al., 2011) κυρίως λόγω της υψηλής παραγωγής εστέρων που προέρχονται από την έντονη εξωκυτταρική ενζυματική δραστηριότητα (Escott et al., 2018). Παρομοίως, οι διαδοχικές ζυμώσεις με *M. pulcherrima* έδειξαν υψηλότερη παραγωγή ανώτερων αλκοολών, με ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις ισοβουτανόλης και φαινυλαιθανόλης (Bauer et al., 2019).

2.4 *Torulaspora delbrueckii*

Τα κύτταρα της *Torulaspora delbrueckii* έχουν κυρίως σφαιρικό σχήμα, αν και συχνά εμφανίζουν ωοειδές και ελλειψοειδές σχήμα. Το κυτταρικό της μέγεθος, κυμαίνεται από 2-6 × 3-7 μm, και αποτελεί συνήθως κριτήριο επιλογής της σε σχέση με άλλα είδη ζυμών που έχουν μεγαλύτερο μέγεθος όπως ο *S. cerevisiae* (Yarrow, 1984). Η *T. delbrueckii* παλαιότερα ήταν γνωστή ως *Saccharomyces delbrueckii* ή *Saccharomyces rosei* λόγω του αρώματος τριαντάφυλλου που προσδίδει στα προϊόντα ζύμωσής του (Jolly et al., 2006) (Εικόνα 6).



Εικόνα 6: (Α) Τα κύτταρα της *Torulaspora delbrueckii* (Ε) Τα κύτταρα του *S. cerevisiae*

Η *T. delbrueckii* μπορεί σπάνια να παράγει ψευδοϋφές, αλλά ποτέ δεν είναι αληθινές υφές. Ο κύκλος ζωής της δεν έχει διευκρινιστεί ακόμη αλλά εδώ και καιρό επικρατεί η αντίληψη ότι είναι ένας απλός ζυμομύκητας, κυρίως λόγω του μικρού μεγέθους του κυττάρου της (Yarrow, 1984). Ωστόσο, έχει πρόσφατα υποδειχθεί ότι η *T. Delbrueckii* μπορεί στην πραγματικότητα να είναι κυρίως διπλοειδής και ομοθυταλική (Albertin et al., 2014). Αν συμβαίνει αυτό, το μέγεθος των μικρών κυττάρων της *T. delbrueckii* μπορεί ακόμη να εξηγηθεί από το γεγονός ότι έχει μόνο 16 χρωμοσώματα στο διπλοειδές στάδιο, αντί των 32 χρωμοσωμάτων που υπάρχουν στους διπλοειδούς ζυμομύκητες του *S. cerevisiae* (Wolfe, 1997).

Έχουν γίνει πολλές έρευνες στη χρήση του μικροοργανισμού *T. delbrueckii*, αφού έχει δείξει θετικά στοιχεία όσον αφορά την αντοχή του σε υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης και σε χαμηλές θερμοκρασίες (κρυοανθεκτικός), τη μειωμένη παραγωγή ανεπιθύμητων ουσιών όπως η ακεταλδεΐδη, το μεθυλοπροπανικό οξύ και το οξικό οξύ, και ταυτόχρονα την παραγωγή άλλων επιθυμητών ουσιών (Canonico et al., 2015). Η χρήση της *T. delbrueckii*, είναι γνωστή στην παραγωγή κρασιού εδώ και αρκετά, όπου προτιμάται καθώς δίνει φρουτώδη αρώματα στο κρασί (Albertin et al., 2014). Η συγκεκριμένη ζύμη προτάθηκε πρώτη φορά για τη χρήση της στη ζυθοποιία από τους King και Dickinson (2000), οι οποίοι ανακάλυψαν ότι παρόλο που η *T. delbrueckii* προέρχεται από τη βιομηχανία οίνου έχει τη δυνατότητα να μετατρέπει τα αρώματα του λυκίσκου με αξιοσημείωτα αποτελέσματα όσον αφορά τις μονοτερπενικές αλκοόλες. Συγκεκριμένα έχει την δυνατότητα να μεταβολίζει την νερόλη αυξάνοντας την ποσότητα λιναλόλης.

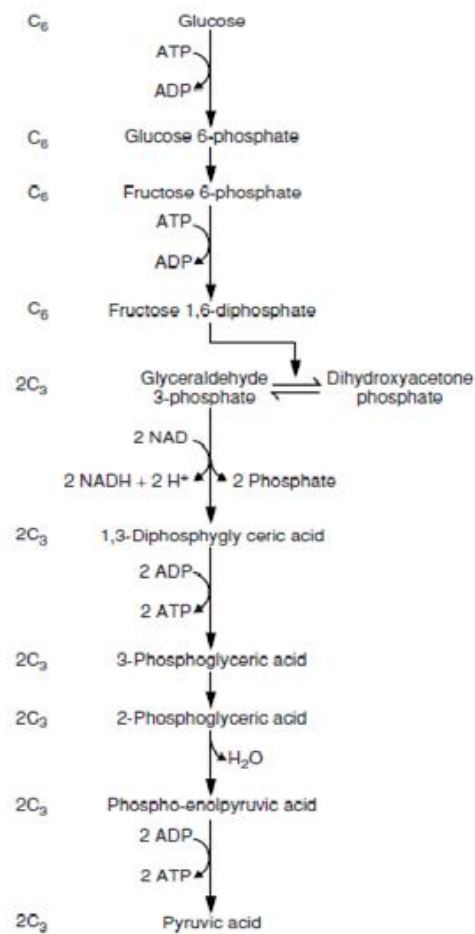
Τα τελευταία χρόνια έχουν δημοσιευθεί αρκετές έρευνες σχετικές με την χρήση της ζύμης *T. delbrueckii* για την παραγωγή ζύθου είτε μόνη της είτε σε συνδυασμό με κάποιο στέλεχος *cerevisiae*. Τα αποτελέσματα αυτών των ερευνών παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία καθώς φαίνεται ότι η περιεκτικότητα σε αιθανόλη του τελικού προϊόντος αλλά και τα χαρακτηριστικά της ζύμωσης γενικότερα εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από το είδος της ζύμης που χρησιμοποιείται, την συγκέντρωση των σακχάρων που είχε αρχικά και τη θερμοκρασία. Το ποσοστό της γλυκόζης που περιέχεται στο γλεύκος έχει σημαντικό ρόλο, καθώς η υψηλή συγκέντρωση της αποτελεί τροχοπέδη για την δράση του ενζύμου μαλτάση (Michel et al., 2016). Η δυνατότητα μεταβολισμού της μαλτόζης δεν είναι το μόνο χαρακτηριστικό της ζύμωσης που διαφοροποιείται. Ανάλογα με το στέλεχος η απαίτηση σε άζωτο και οξυγόνο αλλά και οι συγκεντρώσεις των παραγόμενων δευτερογενών μεταβολιτών επίσης διαφοροποιούνται (Basso et al., 2016).

Το αρωματικό προφίλ της *T. delbrueckii* είναι έντονα φρουτώδες και αυτό δημιουργείται από την υψηλή παραγωγή εστέρων κυρίως ισοαμυλεστέρα, ισοβουτυλεστέρα και οξικού φαινυλαιθυλεστέρα. Ακόμη σε υψηλές συγκεντρώσεις παράγονται η *n*-προπανόλη, ισοβουτανόλη και η ισοαμυλική αλκοόλη (ζυμέλαιο, οينوπνευματώδες ποτό, ούισκι, μπανάνα). Ωστόσο υπάρχουν και περιπτώσεις στις οποίες η ζύμωση με *T. delbrueckii* είχε ως αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή ακεταλδεΐδης (γρασίδι) και οξικού αιθυλεστέρα (άρωμα διαλύτη) (Michel et al., 2016). Στην περίπτωση μικτής ζύμωσης (*T. Delbrueckii* - *S. cerevisiae*) έχει βρεθεί ότι η παρουσία της *T. delbrueckii* αυξάνει την συγκέντρωση του οξικού φαινυλαιθυλεστέρα, του καπροϊκού και του καπρυλικού αιθυλεστέρα και συγχρόνως προκαλεί μείωση στη συγκέντρωση του οξικού ισοαμυλεστέρα και της φαινυλαιθανόλης (Canonic et al., 2015).

3.ΑΡΩΜΑΤΙΚΑ

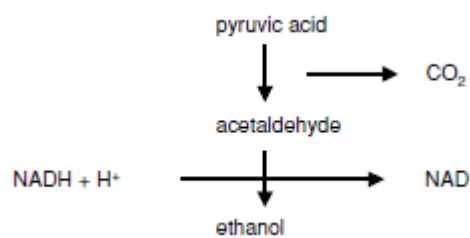
Στην ζυθοποιία οι μικροοργανισμοί δημιουργούνται σε καθορισμένες καταστάσεις στις οποίες παράγουν προϊόντα με επιθυμητά συστατικά. Ορισμένες από αυτές τις καταστάσεις είναι η χαμηλή θερμοκρασία καθώς και η απουσία οξυγόνου (Ταταρίδης & Κεχαγιά, 2010).

Οι ζυμομύκητες του ζύθου χρησιμοποιούν τα ζυμώσιμα σάκχαρα (γλυκόζη, φρουκτόζη, μαλτόζη και μαλτοτριόζη) ως μέσο ενέργειας (ATP) για την πραγματοποίησή της γλυκόλυσης ή το μονοπάτι EMP (Embden-Meyerhof-Parnas) το οποίο καταλήγει στη αποικοδόμηση της γλυκόζης σε δύο μόρια πυροσταφυλικού οξέος. Το αρχικό βήμα της γλυκόλυσης είναι η φωσφορυλίωση της γλυκόζης σε 6-φωσφορική γλυκόζη (G-6P) από το ένζυμο εξωκινάση. Το μονοπάτι αυτό είναι αρμόδιο για τα τρία βασικά προϊόντα της ζύμωσης, την αιθανόλη, το διοξείδιο του άνθρακα και τη γλυκερόλη (Xiros et al., 2013). Τα προϊόντα αυτά παράγονται όταν ένας σημαντικός μεταβολίτης το NADH, που δημιουργείται από την οξείδωση και τη φωσφορυλίωση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (GA-3P) στο έκτο στάδιο της γλυκόλυσης, οξειδώνεται ξανά σε NAD^+ . Χωρίς αυτές τις δύο αντιδράσεις από τις οποίες υπάρχει συνεχής παροχή NAD^+ το μονοπάτι MEP θα σταματούσε (Lewis & Bamforth, 2006) (Εικόνα 7).



Εικόνα 7 : Το μονοπάτι EMP (Embden-Meyerhof-Parnas)

Στη ζυθοποιία χρησιμοποιούνται αναερόβιοι ή προαιρετικά αναερόβιοι οργανισμοί, όπως οι μικροοργανισμοί που παράγουν αιθανόλη, οι οποίοι δεν χρησιμοποιούν μοριακό οξυγόνο και είναι σε θέση να αυξάνονται και να διαιρούνται χωρίς οξυγόνο. Το πυροσταφυλικό θα μετατραπεί σε αιθανόλη και θα αποβληθεί από το κύτταρο. Η παραγωγή της αιθανόλης είναι απαραίτητη υπό αναερόβιες συνθήκες, ώστε το NADH να αποδώσει τα ηλεκτρόνια του και να μετατραπεί ξανά σε NAD⁺. Η αναερόβια παραγωγή ενέργειας, όπως αυτή που μόλις περιγράψαμε, αποκαλείται ζύμωση (Ha et al., 2011).



Εικόνα 8 : Η μετατροπή του πυροσταφυλικού οξέος σε αιθανόλη

Από διαφορετικές μεταβολικούς οδούς παράγονται κάποια βασικά αρώματα του ζύθου που οφείλονται στην εκάστοτε ζύμη που χρησιμοποιείται. Περιλαμβάνουν αλκοόλες, οξέα, εστέρες, αλδεΐδες και κετόνες (Ταταρίδης & Κεχαγιά, 2010).

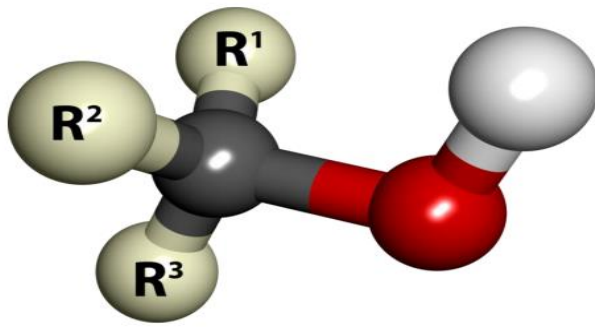
3.1 ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΕΙΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες είναι χημικές ενώσεις που έχουν μικρό μοριακό βάρος μπορούν να παραχθούν από οργανισμούς και δεν συμμετέχουν άμεσα στην ανάπτυξη ή στην αναπαραγωγή ενός οργανισμού. Η απουσία των δευτερογενών δεν προκαλεί άμεσο θάνατο αλλά προκαλεί μακροπρόθεσμα βλάβη της επιβίωσης, του πολλαπλασιασμού, ή του φαινότυπου του οργανισμού ή ενδεχομένως κάποια σημαντική αλλαγή σε όλα. Δεν έχουν γενικά συγκεκριμένους ρόλους σε βασικές μεταβολικές διεργασίες όπως π.χ. για τα φυτά η φωτοσύνθεση, η αναπνοή, η μεταφορά διαλυμένων ουσιών και η αφομοίωση θρεπτικών ουσιών. Για τον λόγο αυτό οι ενώσεις αυτές ονομάστηκαν δευτερογενείς μεταβολίτες ή προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού (Τσέκου, 2003).

3.2 ΑΛΚΟΟΛΕΣ

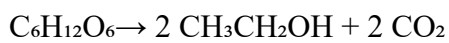
Αλκοόλες είναι οργανικές ενώσεις που περιέχουν στο μόριό τους ένα ή περισσότερα υδροξύλια ή υδροξυλικές ομάδες (-OH). Οι αλκοόλες διακρίνονται από την χαρακτηριστική μυρωδιά τους, το χαμηλό ιξώδες τους και το διάφανο χρώμα τους.

Οι αλκοόλες διαχωρίζονται σε κορεσμένες, όπου τα άτομα άνθρακα είναι συνδεδεμένα με απλό δεσμό και σε ακόρεστες όπου τα άτομα άνθρακα περιέχουν μεταξύ τους διπλό ή και τριπλό δεσμό. Διακρίνονται σε μονοσθενείς, για δύο υδροξύλια έχουμε τις δισθενείς και για τρία υδροξύλια έχουμε τις τρισθενείς αλκοόλες. Κριτήριο κατηγοριοποίησης αλκοολών αποτελεί και ο αριθμός των ατόμων άνθρακα με τους οποίους είναι συνδεδεμένο το υδροξύλιο. Οπότε προκύπτουν : α) Οι Πρωτοταγείς : Περιέχουν ένα αλκύλιο και δύο άτομα υδρογόνου στο άτομο του άνθρακα που συνδέεται με το υδροξύλιο. Χαρακτηριστική ιδιότητα αυτών είναι η ικανότητα να οξειδώνονται σε αλδεΐδες και κατόπιν σε καρβονικά οξέα. β) Οι Δευτεροταγείς: Περιέχουν δύο αλκύλια και ένα άτομο υδρογόνου στο άτομο του άνθρακα που συνδέεται με το υδροξύλιο. Κύρια ιδιότητα αυτών είναι η ικανότητα να οξειδώνονται σε κετόνες. γ) Οι Τριτοταγείς : Περιέχουν τρία αλκύλια και κανένα άτομο υδρογόνου στο άτομο του άνθρακα που συνδέεται με το υδροξύλιο. Χαρακτηριστική ιδιότητα αυτών είναι η ικανότητα να μην οξειδώνονται, παρά μόνο κάτω από πολύ έντονες οξειδωτικές συνθήκες, οπότε και διασπάται η ανθρακική αλυσίδα τους (Βαρβόγλης, 2005).

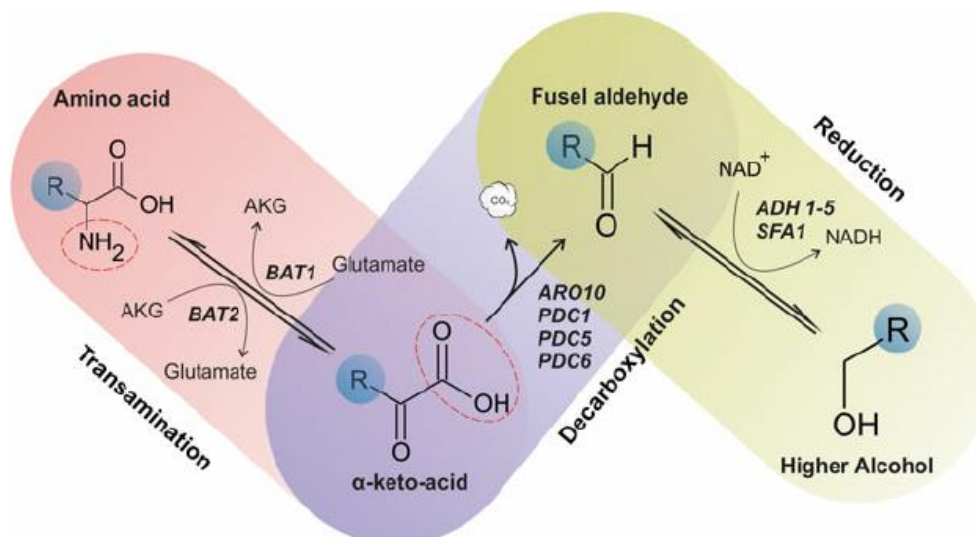


Εικόνα 9 : Απεικόνιση μοριακής δομής τριτοταγούς μεθανόλης

Η χημική εξίσωση που περιγράφει την αλκοολική ζύμωση της γλυκόζης είναι η εξής:



Η κύρια αλκοόλη που εμφανίζεται στον ζύθο είναι η αιθανόλη. Η παραγωγή ανώτερων αλκοολών από ζυμομύκητες συμβαίνει μέσω του μονοπατιού Ehrlich είτε από αμινοξέα που μεταφέρονται από την κυτταρική μεμβράνη είτε μέσω της *de novo* βιοσύνθεσης των αμινοξέων και των ενδιάμεσων α-κετοξέων αυτών. Το μονοπάτι Ehrlich περιλαμβάνει τρία στάδια: (1) την απομίνωση του αμινοξέος σε α-κετοξύ, (2) την αποκαρβοξυλίωση και (3) την αναγωγή της αλδεΐδης προς αλκοόλη με δραστηριότητα της αναγωγάσης αλδεΐδης (Hazelwood et al., 2008) (Εικόνα 10). Τα πιο σημαντικά υποστρώματα για τα αρώματα του ζύθου είναι τα αμινοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας δηλαδή, η λευκίνη η οποία παράγει την ισοαμυλική αλκοόλη ή 3-μεθυλοβουτανόλη, η ισολευκίνη η οποία αποδίδει την δραστική αμυλική αλκοόλη ή 2-μεθυλοβουτανόλη και η βαλίνη που παράγει την ισοβουτανόλη ή 2-μεθυλοπροπανόλη (Kohlhaw, 2003).

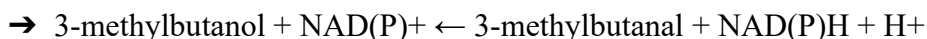
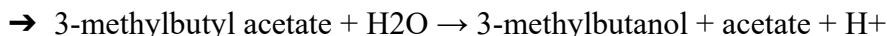
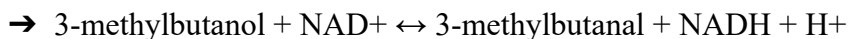


Εικόνα 10 : Το μονοπάτι Ehrlich

Κάποιες από τις πιο σημαντικές ανώτερες αλκοόλες είναι:

- Ισοαμυλική αλκοόλη

Η ισοαμυλική αλκοόλη είναι η πλέον ποσοτικά σημαντική ένωση για τα αρώματα στην ομάδα των υψηλότερων αλκοολών. Η ισοαμυλική αλκοόλη είναι γνωστή για τα αρώματα φρούτων που περιέχει και συγκεκριμένα δίνει έντονα αρώματα μπανάνας. Η ανώτερη αυτή αλκοόλη έχει όριο ανίχνευσης (detection) ίσο με 5-6.5 mg/L (Michel et al., 2016). Οι αντιδράσεις σχηματισμού της είναι οι εξής :



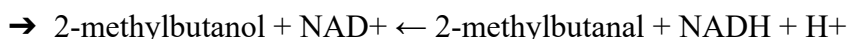
- Φαινυλαιθυλική αλκοόλη

Η φαινυλαιθυλική αλκοόλη γνωστή ως και βενζυλική αλκοόλη εμφανίζεται ως δευτερεύουσα συνιστώσα στους ζύθους. Η φαινυλαιθυλική αλκοόλη είναι μια αρωματική αλκοόλη που έχει μια σχετικά ισχυρή οσμή που μοιάζει με τριαντάφυλλο και ως εκ τούτου ο προσδιορισμός της σε διάφορους ζύθους αποτελεί το κεντρικό αντικείμενο πολλών μελετών (Nykänen & Suomalainen, 1983). Έχει όριο ανίχνευσης (detection) ίσο με 5-6.5 mg/L και σε τιμή 4 mg/L προσδίδει ένα άρωμα που θυμίζει τριαντάφυλλο και ζελεδάκια (Michel et al., 2016). Η αντίδραση σχηματισμού της είναι :



- Ενεργή αμυλική αλκοόλη

Η ενεργή αμυλική αλκοόλη ανήκει στις αλειφατικές αλκοόλες. Η αλειφατική αυτή αλκοόλη προσφέρει στο ζύθο το έντονο άρωμα της αλκοόλης ή του διαλύτη αλλά παράλληλα προσδίδει μια γλυκιά και ζεστή αίσθηση στο στόμα (Hegarty et al., 1995). Το όριο ανίχνευσης (detection) κυμαίνεται από 50-70 mg/L (Michel et al., 2016). Η αντίδραση παραγωγής της είναι :



- 3-αίθοξυ 1-προπανόλη

Η 3- αίθοξυ-1-προπανόλη ανήκει στην τάξη των οργανικών ενώσεων. Είναι μια εξαιρετικά ασθενής βασική ένωση και μπορεί να είναι μοναδικός μεταβολίτης του *S. cerevisiae*. Στον ζύθο προσδίδει κυρίως φρουτώδη αρώματα (Thegoodscentcompany, 2009).

- Τυροσόλη και Τρυπτοφόλη

Η τυροσόλη εμφανίζει ήπια αρώματα λουλουδιών και φρούτων. Η τρυπτοφόλη εμφανίζει ήπια φρουτώδη αρώματα αλλά έχουν εντοπιστεί και αρώματα αμυγδάλου (Thegoodscentcompany, 2009). Η τυροσόλη και η τρυπτοφόλη έχουν ανεπιθύμητα αρώματα σε κάποιους ζύθους κυρίως όταν βρίσκονται πάνω από το κατώφλι αντίληψης τους τα οποία αρώματα εμφανίζονται κατά το τέλος της ζύμωσης.

Αντίδραση παραγωγής της τυροσόλης :



Αντιδράσεις σχηματισμού της τρυπτοφώλης :



- 2-αίθυλ 1-εξανόλη

Παράγεται σε τεράστια κλίμακα για χρήση σε πολλές εφαρμογές όπως διαλύτες και ιδιαίτερα ως πρόδρομος για την παραγωγή άλλων χημικών ουσιών όπως μαλακτικά και πλαστικοποιητές (Bahrmann et al., 2005). Στον ζύθο εμφανίζει κυρίως γλυκά και φρουτώδη αρώματα, νότες από εσπεριδοειδή και λουλούδια (Thegoodscentcompany, 2009).

- 3- μεθυλόθειο 1-προπανόλη

Η 3- (μεθυλόθειο) -1-προπανόλη βρίσκεται σε αλκοολούχα ποτά, είναι ένα ευρέως διανεμημένο συστατικό αρωμάτων των τροφίμων και των ποτών δηλαδή περιέχεται στα κρασιά, στους ζύθους, στα αποθηκευμένα μήλα, στο πεπόνι, στον ανανά, στο τυρί τσένταρ, στα σπαράγγια, στην ντομάτα (Robinson et al., 2009). Τα αρώματα που προκύπτουν από αυτή την αλκοόλη στον ζύθο είναι ο ανανάς, η φράουλα, το τσάι και το μέλι. Έχει όριο ανίχνευσης (detection) 1mg/L (American Industrial Hygiene Association, 2013).

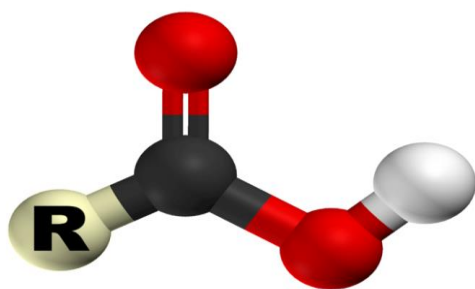
- 2-φουρανμεθανόλη

Η 2 φουρανμεθανόλη ή αλλιώς φουρφουρυλική αλκοόλη είναι μια οργανική ένωση που περιέχει ένα φουράνιο υποκατεστημένο με μία ομάδα υδροξυμεθυλίου. Η φουρφουρυλική αλκοόλη εμφανίζεται σε σημαντικές ποσότητες σε θερμικά επεξεργασμένα τρόφιμα όπως ο καφές, οι χυμοί φρούτων, τα ψημένα τρόφιμα. Επίσης εμφανίζεται σε αλκοολούχα ποτά αποθηκευμένα σε βαρέλια όπως οίνοι, οινοπνευματώδη ποτά όπως το μπράντυ και ουίσκι ως αποτέλεσμα ενζυματικής ή χημικής αναγωγής φουρφουράλης (Pérez-Prieto et al., 2003; Spillman et al., 1998; Mochizuki et al., 1997). Τα αρώματά της προσδίδουν στον ζύθο νότες από καμένη καραμέλα και καφέ (Thegoodscentcompany, 2009).

3.3.ΟΞΕΑ

Τα περισσότερα από τα μονοκαρβοξυλικά οξέα - από μυρμηκικό οξύ έως C₁₈-οξέα - είναι παρόντα στον ζύθο αλλά, γενικά, ως δευτερεύοντα συστατικά. Η οξύτητα που οφείλεται σε πτητικές ενώσεις έχει βρεθεί ότι είναι μεγαλύτερη στον ζύθο από ότι στον μούστο, υποδηλώνοντας ότι τα οξέα

σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης (Nykänen & Suomalainen, 1983). Οργανικά οξέα, τα οποία παράγονται από τα κύτταρα της ζύμης, συντίθενται μέσω των μεταβολικών οδών βιοσύνθεσης των αμινοξέων και τον μεταβολισμό των υδατανθράκων. Συγκεκριμένα είναι παραπροϊόντα της γλυκόλυσης, του κύκλου του κιτρικού οξέος κατά την διάρκεια της ζύμωσης. Η παραγωγή των οργανικών οξέων επηρεάζεται από την έντονη ζύμωση. Οι αργές ζυμώσεις οδηγούν σε χαμηλότερα επίπεδα παραγωγής οργανικών οξέων. Η παραγωγή του πυροσταφυλικού οξέος ακολουθεί την ανάπτυξη της ζύμης. Αρχικά επιτυγχάνεται η μέγιστη παραγωγή της συγκέντρωσης του πυροσταφυλικού πριν όμως από τη μέγιστη ανάπτυξη της ζύμης και στη συνέχεια αυτή απορροφάται από τη ζύμη και μετατρέπεται σε οξικό οξύ. Το οξικό συντίθεται γρήγορα κατά τη διάρκεια της πρώιμης ζύμωσης και αργότερα επαναχρησιμοποιείται μερικώς από τη ζύμη κατά την ανάπτυξη της (Asano et al. 1999).



Εικόνα 11 : Δομή 3D καρβοξυλικού οξέος

Μερικά από αυτά τα οξέα που συμβάλουν και στο αρωματικό προφίλ του ζύθου είναι :

- Προπανοϊκό οξύ, 2-μεθυλ - (Ισοβουτυρικό οξύ)

Το ισοβουτυρικό οξύ είναι ένα ισομερές του η - βουτυρικού οξέος. Η αποπρωτονίωση ή η εστεροποίηση του ισοβουτυρικού οξέος δίνει παράγωγα που ονομάζονται ισοβουτυρικά. Το ισοβουτυρικό οξύ βρίσκεται στην ελεύθερη κατάσταση σε χαρουπιές, στη βανίλια και στη ρίζα του *Arnica dulcis* (Chisholm, 1911). Στον ζύθο σχηματίζεται από βακτήρια είτε κατά την παραγωγή του ζυθογλεύκου είτε κατά τη ζύμωση σιροπιού ζάχαρης. Υπάρχει περίπτωση να παραχθεί μέσα σε εμφιαλωμένο μπουκάλι ζύθου λόγω βακτηριακής επιμόλυνσης. Έχει μια γλυκιά αίσθηση και παρουσιάζει αρώματα φράουλας (Thegoodscentcompany, 2009) και οι αντιδράσεις παραγωγής του είναι :

- $2\text{-hydroxy-7-methyl-6-oxo-2,4-octadienoate} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow (2Z)\text{-2-hydroxypenta-2,4-dienoate} + \text{isobutanoate} + \text{H}^+$
- $\beta\text{-ketoisocaproate} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{isobutanoate} + \text{acetate} + \text{H}^+$

- Βουτανοϊκό οξύ

Το βουτανοϊκό οξύ ή βουτυρικό οξύ παράγεται από μολυσμένα βακτήρια, συνήθως από *Clostridium spp.*, στο ζυθογλεύκος. Οι γεύσεις και τα αρώματα που προσδίδει η ένωση του βουτυρικού οξέος εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το pH δηλαδή, όσο πιο χαμηλό pH τόσο πιο έντονα τα αρώματα του.

Όλες οι βουτυρικές ενώσεις παράγουν διακριτές, πικάντικες δυσάρεστες μυρωδιές. Οι τυπικές συγκεντρώσεις στον ζύθο κυμαίνονται από 0.5-1.5 mg/L ενώ το κατώφλι αντίληψης (threshold) του είναι 3 mg/L (Σεμινάριο). Οι αντιδράσεις σχηματισμού του είναι :

- butanoyl-CoA + acetate \leftrightarrow butanoate + acetyl-CoA
- 2-hydroxy-6-oxo-nona-2,4-dienoate + H₂O → butanoate + (2Z)-2-hydroxypenta-2,4-dienoate + H⁺
- 1-butanal + NADH + oxygen → butanoate + NAD⁺ + H₂O
- phorbol 12,13-dibutanoate + H₂O → butanoate + phorbol 13-butanoate + H⁺
- tributyrin + H₂O → 1,2-dibutyryn + butanoate + H⁺

- 3-μεθυλ-Βουτανοϊκό οξύ

Το 3-μεθυλ-βουτανοϊκό οξύ ή ισοβαλερικό οξύ μερικές φορές κατατάσσεται στα λιπαρά οξέα. Είναι μια ανεπιθύμητη ένωση και έχει σημαντικό αντίκτυπο στον χαρακτήρα του ζύθου. Παράγεται από τον *Brettanomyces ssp.*. Μπλέ τυρί, τυρί ροκ φορ, αρώματα λυκίσκου και μια πικρή, λιπαρή και δυσάρεστη γεύση είναι η αίσθηση που αφήνει το συγκεκριμένο οξύ. Η τυπική του συγκέντρωση είναι 0.2-1.5 mg/L και το κατώφλι αντίληψης (threshold) είναι 1 mg/L. (Σεμινάριο)

- 2-μεθυλ-Βουτανοϊκό οξύ

Το 2-μεθυλ-βουτανοϊκό οξύ ή το ενεργό βαλερικό οξύ όπως και τα άλλα καρβοξυλικά οξέα χαμηλού μοριακού βάρους, έχει δυσάρεστη οσμή. Βρίσκεται στο πολυετές ανθοφόρο φυτό βαλεριάνια (*Valeriana officinalis*), από το οποίο παίρνει το όνομά του (Riemenschneider & Wilhelm, 2002). Χρησιμοποιείται κυρίως σε παλιούς υποβαθμισμένους λυκίσκους. Στον ζύθο προσδίδει πικράδα, είναι όξινο και έχει γεύση τυριού (Thegoodscentscompany, 2009).

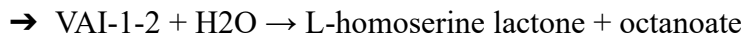
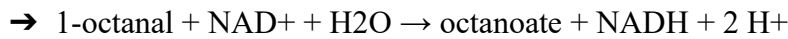
- Εξανοϊκό οξύ

Εξανοϊκό οξύ, επίσης γνωστό ως καπροϊκό οξύ. Είναι ένα από τα συστατικά της βανίλιας. Η κύρια χρήση του εξανοϊκού οξέος είναι στην κατασκευή των εστέρων του για τεχνητές γεύσεις και στην παρασκευή παραγώγων εξυλίου, όπως οι εξυλοφαινόλες (Merck, 1989). Έχει γεύση μανιταριών και γαλακτοκομικών.

- Οκτανοϊκό οξύ

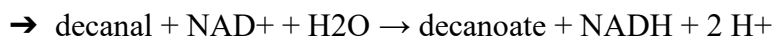
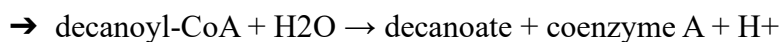
Οκτανοϊκό οξύ γνωστό και ως καπριλικό οξύ. Είναι λιπαρό οξύ μικρής αλυσίδας το οποίο πιστεύεται ότι είναι υποπροϊόν του μεταβολισμού των ζυμών και πως παράγεται κατά την σύνθεση των λιπιδίων. Τα αρώματα του είναι πιο έντονα σε χαμηλές τιμές pH. Σε ζύθους τύπου lager είναι αποδεκτά μόνο

χαμηλά ποσοστά του συγκεκριμένου οξέος. Η τυπική συγκέντρωση στον ζύθο κυμαίνεται από 2-8 mg/L και το κατώφλι αντίληψης (threshold) του από 5-10 mg/L (Σεμινάριο). Οι αντιδράσεις σχηματισμού του είναι οι εξής :



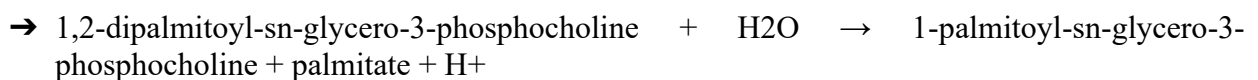
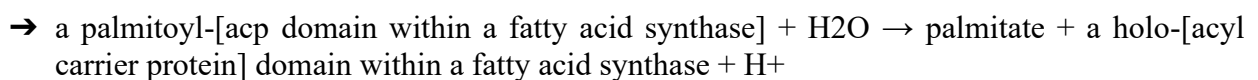
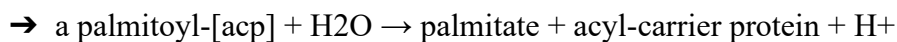
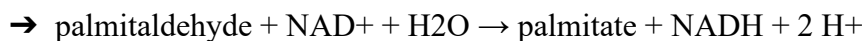
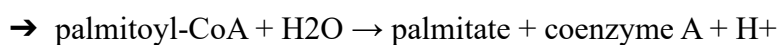
- Δεκανοϊκό οξύ

Το δεκανοϊκό οξύ, επίσης γνωστό ως καπρικό οξύ, είναι ένα κορεσμένο λιπαρό οξύ. Το δεκανοϊκό οξύ μπορεί να παρασκευαστεί από οξείδωση της πρωτοταγούς αλκοόλης δεκανόλης (McMurry & John, 2008). Το καπρικό οξύ εμφανίζεται φυσικά στο λάδι καρύδας (περίπου 10%) και στο φοινικέλαιο (περίπου 4%), αλλιώς είναι ασυνήθιστο στα τυπικά σπορέλαια (Anneken et al., 2006). Το πικρό, το όξινο και το λιπαρό είναι οι γεύσεις που αφήνει το καπρικό οξύ στο παραγόμενο προϊόν αλλά ταυτόχρονα προσδίδει και εσπεριδοειδή αρώματα (Thegoodscentcompany, 2009). Οι αντιδράσεις σχηματισμού του είναι :



- Εξαδεκανοϊκό οξύ

Το εξαδεκανοϊκό οξύ ή παλμιτικό οξύ στην ονοματολογία IUPAC, είναι το πιο κοινό κορεσμένο λιπαρό οξύ που βρίσκεται συνήθως σε ζώα, φυτά και μικροοργανισμούς (Gunstone et al., 2007). Το παλμιτικό οξύ παράγεται φυσικά από ένα ευρύ φάσμα άλλων φυτών και οργανισμών, συνήθως σε χαμηλά επίπεδα. Είναι φυσικά παρόν σε βούτυρο, τυρί, γάλα και κρέας, καθώς και βούτυρο κακάο, έλαιο σόγιας και ηλιέλαιο (Purwanto, 2010). Στον ζύθο προσφέρει μια κρεμώδες γεύση και αφήνει την αίσθηση κεριού (Thegoodscentcompany, 2009). Οι αντιδράσεις σχηματισμού το είναι οι εξής :



3.4. ΕΣΤΕΡΕΣ

Οι εστέρες είναι μία από τις πιο πτητικές ενώσεις του ζύθου και, ως εκ τούτου, επηρεάζουν σημαντικά το άρωμα του και σε μέτριες ποσότητες, μπορούν να προσδίδουν ένα ευχάριστο χαρακτήρα. Ωστόσο, όταν υπάρχουν σε υψηλές συγκεντρώσεις, προσδίδουν στο άρωμα του ζύθου μια υπερβολικά φρουτώδη διάθεση, η οποία θεωρείται ανεπιθύμητη από τους περισσότερους καταναλωτές (Gee et al., 1994). Η παρουσία διαφορετικών εστέρων μπορεί να έχει συνεργιστική επίδραση στις ατομικές γεύσεις, πράγμα που σημαίνει ότι οι εστέρες μπορούν επίσης να επηρεάσουν τη γεύση του ζύθου κάτω από τις μεμονωμένες συγκεντρώσεις κατωφλίου τους (Rodrigues et al., 2008). Οι αρωματικοί ενεργοί εστέρες αντιπροσωπεύουν μια μεγάλη ομάδα αρωματικών δραστικών ενώσεων, οι οποίες προσδίδουν ένα άρωμα λουλουδιών και φρούτων στον ζύθο (Branyik et al., 2008).

Ο σχηματισμός του εστέρα συνδέεται στενά με την ανάπτυξη ζυμομυκήτων και το μεταβολισμό των λιπιδίων και είναι προϊόν ζύμωσης. Έχουν αναγνωριστεί δύο πιθανές οδοί σχηματισμού εστέρα. Αυτές είναι οι αντιδράσεις μεταξύ αλκοόλης (όπως αιθανόλης) ή ανώτερων αλκοολών με λιπαρό ακέτυλο-CoA εστέρα και με εστεράσες που λειτουργούν σε αντίστροφη κατεύθυνση (Lodolo et al., 2008).

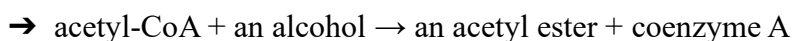
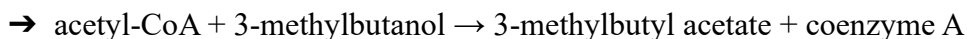


Εικόνα 12 : Η χημική αντίδραση της εστεροποίησης

Οι πιο σημαντικοί εστέρες είναι οι εξής:

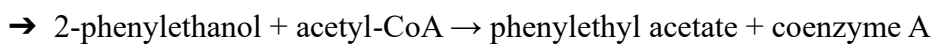
- Οξικός ισοαμυλεστέρας

Ο εστέρας αυτός παράγεται από την ισοαμυλική αλκοόλη και το οξικό οξύ και το όνομά του κατά IUPAC είναι 3-μεθύλ-1-βουτύλ-αιθανοϊκός εστέρας. Ο οξικός ισοαμυλεστέρας προέρχεται από υγιής ζύμες και είναι προϊόν αλκοολικής ζύμωσης. Τα αρώματα της μπανάνας και του αχλαδιού είναι αυτά που κυριαρχούν σε αυτόν τον εστέρα. Στον ζύθο η τυπική συγκέντρωση του κυμαίνεται από 0.8-6.6 mg/L και το κατώφλι αντίληψης (threshold) του από 1-1.5 mg/L (Σεμινάριο). Ο σχηματισμός του οξικού ισοαμυλεστέρα περιγράφεται από τις παρακάτω χημικές αντιδράσεις:



- Οξικός 2-φαινυλαιθυλεστέρας

Ο οξικός 2-φαινυλαιθυλεστέρας σχηματίζεται όταν η ακετυλομάδα του ακέτυλο-CoA μεταφέρεται σε 2-φαινυλαιθανόλη με ακετυλοτρανσφεράση αλκοόλης. Αυτή η αντίδραση αναγεννά τα επίπεδα CoA στο κύτταρο και επιτρέπει την απομάκρυνση της 2-φαινυλαιθανόλης (ένα υποπροϊόν του μεταβολισμού της φαινυλαλανίνης) από το κύτταρο ως οξικό 2-φαινυλαιθύλιο. Μπανάνα, μήλο και μέλι είναι τα αρώματα που προκύπτουν από τον συγκεκριμένο εστέρα στον ζύθο. Το όριο ανίχνευσης (detection) του είναι 0.05-0.8 mg/L (Michel et al., 2016). Η χημική αντίδραση σχηματισμού του 2-φαινυλαιθυλεστέρα είναι:

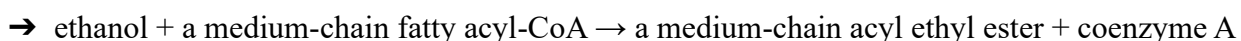


- Βουτανοϊκός αιθυλεστέρας

Ο βουτανοϊκός αιθυλεστέρας ή βουτυρικός αιθυλεστέρας είναι ένας πτητικός αιθυλεστέρας που βρίσκεται σε αλκοολούχα ποτά και παράγεται κατά τη ζύμωση με ζύμη. Οι εστέρες αιθυλίου σχηματίζονται με την αντίδραση της αιθανόλης με ένα λιπαρό οξύ. Ο βουτανοϊκός αιθυλεστέρας είναι υπεύθυνος για τα αρώματα που μοιάζουν με μήλο, τα αρώματα ανανά και τα αρώματα του μπλε τυριού. Το κατώφλι ανίχνευσης (detection) βρίσκεται από 0.1-18 mg/L (Michel et al., 2016).

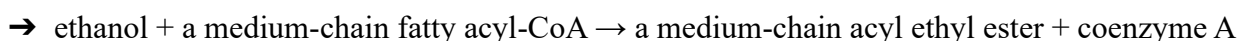
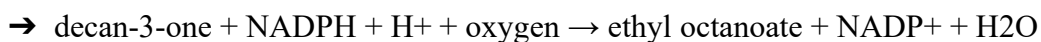
- Εξανοϊκός αιθυλεστέρας

Ο εξανοϊκός αιθυλεστέρας προέρχεται από την χημική αντίδραση της αιθανόλης και του εξανοϊκού οξέος. Ο εξανοϊκός αιθυλεστέρας είναι παρών σε όλες τους ζύθους σε διαφορετικές όμως συγκεντρώσεις και η παρουσία του έχει σημαντικό ρόλο στην συνολική ισορροπία των αρωμάτων. Σε κάποιους ζύθους τα αρώματα του είναι σχεδόν ανύπαρκτα και σε κάποιους άλλους αποτελούν μέρος των βασικών αρωμάτων του ζύθου. Σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις είναι ανεπιθύμητος. Οι τυπικές συγκεντρώσεις στον ζύθο κυμαίνονται από 0.07-0.5 mg/L και το κατώφλι αντίληψης (threshold) του είναι 5mg/L (Σεμινάριο). Η αντίδραση σχηματισμού του είναι :



- Οκτανοϊκός αιθυλεστέρας

Ο οκτανοϊκός αιθυλεστέρας, επίσης γνωστός ως καπρυλικός αιθυλεστέρας, είναι ένας εστέρας λιπαρού οξέος που σχηματίζεται από καπρυλικό οξύ και αιθανόλη. Είναι παρόν σε πολλά φρούτα και αλκοολούχα ποτά και έχει έντονη μυρωδιά φρούτων και λουλουδιών (Fahlbusch et al., 2003). Ο συγκεκριμένος εστέρας στον ζύθο αποδίδει αρώματα φρούτων όπως βερίκοκο, μπανάνα, αχλάδι. Το κατώφλι ανίχνευσης (detection) του είναι 0.04-0.58 mg/L (Thegoodscentcompany, 2009). Οι αντιδράσεις παραγωγής του είναι :



- Δεκανοϊκός αιθυλεστέρας

Ο δεκανοϊκός αιθυλεστέρας, επίσης γνωστός ως καπρικός αιθυλεστέρας ή αιθυλικό καπρικό οξύ, ανήκει στην κατηγορία οργανικών ενώσεων που είναι γνωστοί ως εστέρες λιπαρών οξέων. Αυτά είναι παράγωγα καρβοξυλικού εστέρα ενός λιπαρού οξέος. Συνήθως αφήνει την αίσθηση του κεριού (Thegoodscentcompany, 2009).

- Δωδεκανοϊκός αιθυλεστέρας

Ο δωδεκανοϊκός αιθυλεστέρας είναι γνωστός και ως λαυρινικός αιθυλεστέρας. Είναι παράγωγο καρβοξυλικών εστέρων ενός λιπαρού οξέος. Η γεύση του είναι συνήθως γλυκιά, και φρουτώδης και μερικές φορές θυμίζει σαπούνι (Thegoodscentcompany, 2009)

- Εξαδεκανοϊκός αιθυλεστέρας

Ο εξαδεκανοϊκός αιθυλεστέρας είναι γνωστός επίσης ως παλμιτικός αιθυλεστέρας. Στον ζύθο παρουσιάζει μια φρουτώδης γεύση, κρεμώδης υφή αλλά υπάρχει και έντονα η αίσθηση από το γάλα και το βάλσαμο (Thegoodscentcompany, 2009). Η αντίδραση παραγωγής του είναι :

→ a long-chain fatty acyl-CoA + ethanol → a long-chain acyl ethyl ester + coenzyme A

3.5 ΦΑΙΝΟΛΕΣ

Οι φαινόλες είναι οργανικές ενώσεις στις οποίες η μια υδροξυλομάδα (-OH) συνδέεται με έναν αρωματικό δακτύλιο υδρογονάνθρακα (που ονομάζεται επίσης δακτύλιος βενζολίου). Στον ζύθο υπάρχει ένα πολυσύνθετο μίγμα φαινολικών συστατικών σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται περίπου μεταξύ 150-350mg/L. Περίπου τα 2/3 προέρχονται από τη βύνη και το 1/3 από το λυκίσκο. Οι φαινόλες αυτές μπορεί να είναι πτητικά μονομερή όπως φαινολικά οξέα, αλκοόλες και αμίνες, μονομερείς φαινόλες όπως τα φλαβονοειδή, κατεχίνες, ανθοκυανίνες και μη πτητικά διμερή και πολυμερή των παραπάνω. Ανεπιθύμητες για το άρωμα φαινόλες μπορούν να παραχθούν από τη δράση αγρίων ζυμών ή βακτηρίων. Επίσης μεγάλο πρόβλημα δημιουργεί η οξείδωση των πολυφαινολών και ο συμπολιμερισμός τους με πρωτεΐνες δημιουργώντας θολώματα. Οι πρωτεΐνες που μπορούν να συνδεθούν με πολυφαινόλες είναι εκείνες που έχουν μεγάλη περιεκτικότητα σε προλίνη. Η παρουσία πολυφαινολών (κυρίως των 3-φλαβονολών) έχει μεγάλη σημασία στην αποφυγή κολλοειδών θολωμάτων αφού αποτελούν φυσικά αντιοξειδωτικά της βύνης και του κριθαριού (Hought et al., 1982). Οι πτητικές φαινόλες γενικά προέρχονται από τρεις διαφορετικές πηγές.

1. Νερό και καπνιστή βύνη

Στο νερό περιέχονται φαινόλες που μεταφέρονται στον ζύθο, οι οποίες δεν εξαφανίζονται κατά τη διάρκεια του βρασμού. Η καβουρδισμένη βύνη, προσθέτει φαινόλες που προσδίδουν καπνιστές, γήινες νότες που θυμίζουν τα αρώματα της φωτιάς. Όταν παρασκευάζονται καπνιστοί ζύθοι, αυτές οι φαινόλες μπορεί να είναι επιθυμητές. Ο λυκίσκος και η βύνη είναι επίσης πηγή πολυφαινολών με τη μορφή τανινών, οι οποίες γίνονται αντιληπτές περισσότερο μέσω της αίσθησης και της μυρωδιάς.

2. Χημικά

Η παρουσία του χλώριου και το βρώμιο συνοδεύουν τα υψηλά επίπεδα φαινολών και πολυφαινολών. Το χλώριο είναι συνηθισμένο στο νερό και μπορεί να υποβληθεί σε επεξεργασία πριν από την παρασκευή για απομάκρυνση. Το χλώριο μπορεί επίσης να εντοπισθεί σε εξοπλισμό που έχει καθαριστεί με προϊόντα με βάση το χλώριο και δεν ξεπλυθεί καλά. Οι φαινόλες που προέρχονται από το χλώριο και το βρώμιο τείνουν να έχουν αντισηπτικά και καυστικά χαρακτηριστικά, αντίστοιχα.

3. Ζύμες και / ή βακτήρια

Για παράδειγμα, ο χαρακτήρας του γαρύφαλλου που απαντάται συνήθως στο βαυαρικό σιτάρι και στους βέλγικους ζύθους προκαλείται από το 4-βινυλ-γουαϊκόλη, το οποίο παράγεται από την αποκαρβοξυλίωση του φερουλικού οξέος. Όταν οι ζυθοποιοί επιθυμούν περισσότερες φαινόλες που μοιάζουν με γαρίφαλο, ο στόχος είναι να αυξηθεί το φερουλικό οξύ (White & Chris, 1968).

Οι σημαντικότερες πτητικές φαινόλες είναι:

- Η 4-αιθυλ-φαινόλη με όριο ανίχνευσης 0.9 mg/L. Η ουσία αυτή προσδίδει μια έντονη μυρωδιά που θυμίζει στάβλο αλόγων.
- Η 4-αιθυλ-γουαϊκόλη, με έντονα αρώματα καπνιστού ή πικάντικου κρέατος ανιχνεύσιμο σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 0.13 mg/L.
- Η 4-βινυλ-γουαϊκόλη, προσδίδει έντονη πικράδα και ένα άρωμα που θυμίζει γαρύφαλλο και έχει όριο ανίχνευσης ίσο με 0.3 mg/L.
- Η 4-βινυλ-φαινόλη που δίνει ένα καπνιστό χαρακτήρα στην μύρα και έχει όριο ανίχνευσης 0.2 mg/L.

Οι μύρες που προκύπτουν από ζύμωση κάποιου στελέχους *S. cerevisiae* περιέχουν κυρίως βινυλ-φαινόλες (4-βινυλγουαϊκόλη και 4-βινυλφαινόλη) η παρουσία των οποίων είναι επιθυμητή μέχρι συγκεντρώσεις της τάξης των 0.4 mg/L. Αντίθετα οι αιθυλ-φαινόλες (4-αιθυλ-φαινόλη και η 4-αιθυλ-γουαϊκόλη) είναι δύο φαινόλες οι οποίες είναι χαρακτηριστικές αρωματικές ενώσεις του μικροοργανισμού *Brettanomyces* και συνήθως είναι ανεπιθύμητες (Michel et al., 2016).

3.6 ΘΕΙΟΥΧΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

Οι ενώσεις θείου έχουν γενικά ένα εξαιρετικά χαμηλό προφίλ γεύσης στον ζύθο σε μικρές συγκεντρώσεις. Οι αλλαγές όμως σε αυτές τις συγκεντρώσεις μπορεί να έχουν αισθητές επιπτώσεις στη γεύση. Τα θειούχα συστατικά που είναι τα πιο σημαντικά και παράγονται από τους ζυμομύκητες είναι το διοξείδιο του θείου και το υδρόθειο.

Το διοξείδιο του θείου παράγεται κατά τον αναβολισμό των αμινοξέων και είναι μια ένωση πολύ οικεία στους ζυθοποιούς αφού έχει πολύ σημαντικό ρόλο στη σταθερότητα του προϊόντος και ιδιαίτερα της γεύσης καθώς έχει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση στον ζύθο και αυξάνει τον χρόνο ζωής του (Michel et al., 2016). Τα επιτρεπτά όρια συγκέντρωσης είναι 10 mg/L και είναι γνωστό ότι στη συγκέντρωση αυτή δεν έχει επαρκή αντιοξειδωτική δράση. Μεγάλο ποσοστό του διοξειδίου του θείου βρίσκεται σε δεσμευμένη μορφή καθώς σχηματίζει άλλες ενώσεις όταν αντιδρά με αλδεΐδες (Yonezawa & Fushiki, 2002). Σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 25 mg/L αρχίζει και δημιουργεί θειούχες οσμές στο προϊόν γεγονός το οποίο είναι αρεστό σε μόνο σε ορισμένες βυθοζυμωτές μπίρες (Michel et al., 2016).

Όσον αφορά το υδρόθειο είναι μια ουσία η οποία είναι γνωστή για την έντονη χαρακτηριστική μυρωδιά κλούβιου αυγού και που όταν βρεθεί στον ζύθο έχει την τάση να καλύπτει τα υπόλοιπα αρωματικά στοιχεία. Παρόλα αυτά σε μικρές συγκεντρώσεις προσδίδει μια φρεσκάδα στον ζύθο. Το όριο ανίχνευσής του είναι πολύ χαμηλό, περίπου ίσο με 0.005 mg/L (Michel et al., 2016). Το σύνολο των ζυμομυκήτων παράγει αυτή την ουσία κατά τις πρώτες μέρες της ζύμωσης και στην φάση της ωρίμανσης, λόγω της μεγάλης πτητικότητάς της όμως κατά τις επόμενες μέρες μπορεί να μειωθεί σημαντικά η ποσότητά της.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Σκοπός

Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας ήταν να μελετήσουμε τις ενώσεις που παράγονται στον ζύθο και το αρωματικό προφίλ που προκύπτει ανάλογα με το εκάστοτε στέλεχος ζύμης που χρησιμοποιήθηκε και να παρατηρήσουμε πως αυτές οι ενώσεις μεταβάλλονται με την πάροδο του χρόνου.

Παραγωγή ζύθου

Η παραγωγή ζύθου έγινε με τους παρακάτω μικροοργανισμούς:

- a. *Saccharomyces cerevisiae*.
- a. *Torulaspora delbrueckii*
- b. *Metschnikowia pulcherrima*
- c. Mix *Saccharomyces cerevisiae* - *Torulaspora delbrueckii* 1:10.

Συγκεκριμένα το πείραμα αυτό επιχειρήθηκε δύο φορές, στην πρώτη περίπτωση η αρχική πυκνότητα του γλεύκους ήταν ίση με 12.6 °Plato και η ζύμωση πραγματοποιήθηκε σε μέση θερμοκρασία 24 °C (Πείραμα 1), ενώ στη δεύτερη περίπτωση πραγματοποιήθηκε ζύμωση γλεύκους με αρχική πυκνότητα 14.5 °Plato, σε μέση θερμοκρασία 20 °C (Πείραμα 2). Αρχικός σκοπός ήταν να πραγματοποιηθεί το σύνολο των ζυμώσεων σε θερμοκρασία σταθερή και ίση με 20 °C ώστε να μελετηθεί η διαφορά στα χαρακτηριστικά της ζύμωσης και κυρίως στον χρόνο ζύμωσης σε διαφορετικές αρχικές πυκνότητες γλεύκους, καθώς έχει παρατηρηθεί ότι μικρή αύξηση των βαθμών Plato του αρχικού γλεύκους αυξάνει σημαντικά τον χρόνο ζύμωσης (Michel, et al., 2016). Παρόλα αυτά λόγω υψηλής θερμοκρασίας περιβάλλοντος κατά τη διάρκεια διεξαγωγής του 1^{ου} πειράματος δεν ήταν εφικτό η θερμοκρασία να διατηρηθεί σε σταθερή τιμή και ίση με 20 °C, αλλά αντίθετα οι θερμοκρασίες μέσα σε μία ημέρα μπορεί να μεταβάλλονταν από 19 έως και 27 °C.

Διαδικασία εκχύλισης με στήλη Vigreux

Για την ανάλυση των αρωματικών με αέρια χρωματογραφία πρέπει να προηγηθεί μια διαδικασία εκχύλισης. Στην εν λόγω εργασία επιλέχθηκε η εκχύλιση με στήλη Vigreux. Κατά τη μέθοδο αυτή οι ουσίες που θέλουμε να προσδιορίσουμε μέσω της χρωματογραφίας εκχυλίζονται σε ένα μίγμα οργανικών διαλυτών. Η φάση του διαλύτη συλλέγεται ενώ η φάση που περιέχει τις πρωτεΐνες απορρίπτεται. Στην συνέχεια πραγματοποιείται συμπύκνωση του μίγματος σε στήλη Vigreux, κατά την οποία οι πιο πτητικοί διαλύτες απομακρύνονται και τελικά συλλέγεται ένα μίγμα το οποίο είναι πλούσιο σε ουσίες που σχετίζονται με το αρωματικό προφίλ του ζύθου. Το τελικό αυτό μίγμα αναλύθηκε σε GC-MS.

Μεθοδολογία:

- Σε ποτήρι ζέσεως τοποθετούνται 50 mL δείγματος 25 mL πεντάνιο και 25 mL αιθέρα.
- Το διάλυμα αφήνεται για 10 min υπό ήπια ανάδευση και στη συνέχεια τοποθετείται στη φυγόκεντρο για 10 min στις 3500 rpm.

- Μετά το πέρας των 10 min με την χρήση σιφωνίου διαχωρίζεται η οργανική φάση από το γλεύκος. Το διάλυμα των οργανικών διαλυτών που περιέχουν τις αρωματικές ενώσεις συλλέγεται.
- Στο γλεύκος προστίθεται εκ νέου μίγμα διαλυτών και πραγματοποιείται ξανά η παραπάνω διαδικασία.
- Σε διαχωριστική χοάνη τοποθετούνται οι οργανικές φάσεις που έχουν συλλεχθεί παραπάνω και προστίθενται περίπου 10 mL απιονισμένο νερό.
- Απορρίπτεται η κάτω φάση που είναι η υδατική και η οργανική τοποθετείται σε ποτήρι ζέσεως.
- Για την απορρόφηση της εναπομένουσας υγρασίας προστίθεται μικρή ποσότητα θεικού νατρίου στο δείγμα.
- Έπειτα από ήπια ανάδευση το δείγμα φιλτράρεται και τοποθετείται σε προζυγισμένη απιοειδή φιάλη.
- Η απιοειδής φιάλη συνδέεται με μία στήλη Vigreux και αφήνεται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 35-40°C για περίπου 2 h.
- Μετά το τέλος της απόσταξης το δείγμα μεταφέρεται σε δοχείο vial και προστίθενται σε αυτό 10 μ L 3-οκτανόλη, ως εσωτερικό πρότυπο.
- Τέλος το δείγμα υφίσταται ταχεία συμπίκνωση με την χρήση αέριου αζώτου μέχρι τελική μάζα περίπου ίση με 100 mg και πραγματοποιείται ένεση του δείγματος στη συσκευή GC-MS.

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

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

ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΣΧΟΛΙΑΣΜΩΝ

Στους πίνακες που ακολουθούν παρουσιάζονται συγκριτικά οι ουσίες που παράχθηκαν στους ζύθους του πειράματος 1 και 2 από τον εκάστοτε μικροοργανισμό (αλκοόλες, οξέα εστέρες), καθώς και η εξέλιξη τους στον χρόνο.

Πίνακας 1 Συγκριτικός πίνακας από τις ενώσεις που παραχθηκαν από τους τρεις διαφορετικούς μικροοργανισμούς κατά την πρώτη εβδομάδα ζύμωσης στο πείραμα 1.

Compounds (mg/l)	<i>S. cerevisiae</i>	<i>T. delbrueckii</i>	<i>M. pulcherrima</i>	Mix <i>S.cerevisiae</i> – <i>T. delbrueckii</i>
1-Butanol, 3-methyl-	4.83 ± 0.13	4.47 ± 0.06	4.89 ± 0.87	4.62 ± 0.29
1-Butanol, 2-methyl-	1.61 ± 0.04	1.59 ± 0.01	1.38 ± 0.27	1.51 ± 0.13
Butanoic acid	NOT DETECTED	NOT DETECTED	NOT DETECTED	NOT DETECTED
Butanoic acid, ethyl ester	NOT DETECTED	NOT DETECTED	NOT DETECTED	NOT DETECTED
1-Butanol, 3-methyl-, acetate	NOT DETECTED	0.03 ± 0.02	0.02 ± 0.02	NOT DETECTED
1-Propanol, 3-(methylthio)-	NOT DETECTED	0.16 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.06 ± 0.06
Hexanoic acid, ethyl ester	NOT DETECTED	NOT DETECTED	NOT DETECTED	NOT DETECTED
Hexanoic acid	0.15	0.28 ± 0.005	0.04 ± 0.06	NOT DETECTED
Phenylethyl Alcohol	14.36 ± 0.04	13.07 ± 0.47	13.43 ± 1.60	14.93 ± 0.13
Octanoic acid, ethyl ester	NOT DETECTED	NOT DETECTED	NOT DETECTED	NOT DETECTED
Octanoic acid	0.31 ± 0.006	0.44 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.21 ± 0.01
Acetic acid, 2-phenylethyl ester	NOT DETECTED	0.04 ± 0.03	0.02 ± 0.03	NOT DETECTED

2-Methoxy-4-vinylphenol	NOT DETECTED	0.38 ± 0.005	0.42 ± 0.05	NOT DETECTED
n-Decanoic acid	NOT DETECTED	NOT DETECTED	NOT DETECTED	NOT DETECTED
Decanoic acid, ethyl ester	0.04 ± 0.04	NOT DETECTED	0.09 ± 0.07	NOT DETECTED
Dodecanoic acid, ethyl ester	NOT DETECTED	NOT DETECTED	NOT DETECTED	NOT DETECTED
Dodecanoic acid	NOT DETECTED	NOT DETECTED	NOT DETECTED	NOT DETECTED
Tryptophol	6.16 ± 0.05	0.73 ± 0.08	4.21 ± 0.27	1.81 ± 0.01

Πίνακας 2 Συγκριτικός πίνακας από τις ενώσεις που παραχθηκαν από τους τρεις διαφορετικούς μικροοργανισμούς κατά τους 6 μήνες παλαίωσης στο πείραμα 1.

Compounds (mg/l)	<i>S. cerevisiae</i>	<i>T. delbrueckii</i>	<i>M. pulcherrima</i>	Mix <i>S. cerevisiae</i> – <i>T. delbrueckii</i>
1-Butanol, 3-methyl-	NOT DETECTED	6.96 ± 0.08	6.38 ± 0.19	13.86 ± 0.19
1-Butanol, 2-methyl-	NOT DETECTED	4.17 ± 0.07	3.39 ± 0.23	8.75 ± 0.20
Butanoic acid	NOT DETECTED	NOT DETECTED	0.18 ± 0.04	NOT DETECTED
Butanoic acid, ethyl ester	NOT DETECTED	NOT DETECTED	NOT DETECTED	NOT DETECTED
1-Butanol, 3-methyl-, acetate	0.21 ± 0.02	0.13 ± 0.01	0.12 ± 0.03	NOT DETECTED
1-Propanol, 3-(methylthio)-	NOT DETECTED	0.47 ± 0.03	0.31 ± 0.15	0.83 ± 0.08
Hexanoic acid, ethyl ester	0.39 ± 0.02	0.11 ± 0.01	NOT DETECTED	NOT DETECTED
Hexanoic acid	0.50 ± 0.04	0.42 ± 0.03	0.24 ± 0.03	0.69 ± 0.0003
Phenylethyl Alcohol	62.69 ± 0.73	33.65 ± 0.65	31.67 ± 0.24	76.25 ± 0.64

Octanoic acid, ethyl ester	1.43 ± 0.02	1.18 ± 0.05	NOT DETECTED	NOT DETECTED
Octanoic acid	NOT DETECTED	0.47 ± 0.06	0.56 ± 0.08	1.10 ± 0.13
Acetic acid, 2-phenylethyl ester	0.24 ± 0.006	0.15 ± 0.01	0.11 ± 0.002	0.60 ± 0.42
2-Methoxy-4-vinylphenol	0.57 ± 0.01	0.58 ± 0.05	0.37 ± 0.07	0.82 ± 0.02
n-Decanoic acid	0.11 ± 0.007	0.14 ± 0.01	0.08 ± 0.005	0.11 ± 0.005
Decanoic acid, ethyl ester	NOT DETECTED	NOT DETECTED	0.13 ± 0.01	0.08 ± 0.008
Dodecanoic acid, ethyl ester	NOT DETECTED	NOT DETECTED	NOT DETECTED	NOT DETECTED
Dodecanoic acid	NOT DETECTED	NOT DETECTED	NOT DETECTED	NOT DETECTED
Tryptophol	30.62 ± 0.13	4.02 ± 0.15	11.3 ± 0.27	NOT DETECTED

Πίνακας 3 Συγκριτικός πίνακας από τις ενώσεις που παραχθηκαν από τους τρεις διαφορετικούς μικροοργανισμούς κατά τον 1 χρόνο παλαίωσης στο πείραμα 1

Compounds (mg/l)	<i>S. cerevisiae</i>	<i>T. delbrueckii</i>	<i>M. pulcherrima</i>	Mix <i>S. cerevisiae</i> – <i>T. delbrueckii</i>
1-Butanol, 3-methyl-	7.4 ± 0.27	4.59 ± 0.07	2.32 ± 0.10	4.06 ± 0.26
1-Butanol, 2-methyl-	4.69 ± 0.007	2.70 ± 0.06	0.77 ± 0.54	8.16 ± 0.11
Butanoic acid	0.16 ± 0.006	0.14 ± 0.04	NOT DETECTED	NOT DETECTED
Butanoic acid, ethyl ester	NOT DETECTED	NOT DETECTED	NOT DETECTED	NOT DETECTED
1-Butanol, 3-methyl-, acetate	0.10 ± 0.06	0.13 ± 0.11	0.04 ± 0.02	0.12 ± 0.01
1-Propanol, 3-(methylthio)-	0.12 ± 0.007	0.15 ± 0.06	NOT DETECTED	0.14 ± 0.001

Hexanoic acid, ethyl ester	0.44 ± 0.01	0.10 ± 0.04	NOT DETECTED	NOT DETECTED
Hexanoic acid	0.49 ± 0.2	0.20 ± 0.01	0.06 ± 0.009	NOT DETECTED
Phenylethyl Alcohol	62.91 ± 3.51	20.09 ± 2.24	27.97 ± 0.05	35.14 ± 2.86
Octanoic acid, ethyl ester	1.60 ± 0.35	0.17 ± 0.03	0.08 ± 0.003	0.27 ± 0.15
Octanoic acid	0.44 ± 0.05	0.39 ± 0.28	0.21 ± 0.006	0.79 ± 0.18
Acetic acid, 2-phenylethyl ester	0.16 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.10 ± 0.003
2-Methoxy-4-vinylphenol	0.84 ± 0.26	0.36 ± 0.07	0.49 ± 0.06	0.48 ± 0.25
n-Decanoic acid	0.20 ± 0.007	0.12 ± 0.14	0.32 ± 0.23	NOT DETECTED
Decanoic acid, ethyl ester	0.25 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.08 ± 0.03	0.19 ± 0.02
Dodecanoic acid, ethyl ester	NOT DETECTED	NOT DETECTED	NOT DETECTED	NOT DETECTED
Dodecanoic acid	NOT DETECTED	NOT DETECTED	NOT DETECTED	NOT DETECTED
Tryptophol	17.86 ± 0.66	1.81 ± 0.49	10.25 ± 0.04	7.07 ± 0.13

Πίνακας 4 Συγκριτικός πίνακας από τις ενώσεις που παραχθηκαν από τους τρεις διαφορετικούς μικροοργανισμούς κατα τα 2 χρόνια παλαίωσης στο πείραμα 1

Compounds (mg/l)	<i>S. cerevisiae</i>	<i>T. delbrueckii</i>	<i>M. pulcherrima</i>	Mix <i>S.cerevisiae</i> – <i>T. delbrueckii</i>
1-Butanol, 3-methyl-	8.92 ± 0.79	7.89 ± 0.89	3.73 ± 0.31	7.76 ± 1.91
1-Butanol, 2-methyl-	4.22 ± 0.11	7.82 ± 0.55	1.90 ± 0.82	3.74 ± 0.67
Butanoic acid	NOT DETECTED	0.18 ± 0.16	0.07 ± 0.005	0.07 ± 0.0006

Butanoic acid, ethyl ester	NOT DETECTED	0,07 ± 0,02	NOT DETECTED	NOT DETECTED
1-Butanol, 3-methyl-, acetate	0.22 ± 0.12	0.14 ± 0.01	0.05 ± 0.009	0.09 ± 0.009
1-Propanol, 3-(methylthio)-	0.12 ± 0.09	0.71 ± 0.01	0.17 ± 0.04	0.36 ± 0.17
Hexanoic acid, ethyl ester	0.51 ± 0.24	0.93 ± 0.46	NOT DETECTED	0.05 ± 0.03
Hexanoic acid	0.51 ± 0.02	1.28 ± 0.05	0.10 ± 0.002	0.42 ± 0.24
Phenylethyl Alcohol	47 ± 2.63	54.05 ± 1.97	25.18 ± 1.86	53.17 ± 0.71
Octanoic acid, ethyl ester	0.68 ± 0.19	1.18 ± 0.68	0.29 ± 0.07	0.11 ± 0.009
Octanoic acid	NOT DETECTED	1.63 ± 0.08	0.24 ± 0.003	0.55 ± 0.32
Acetic acid, 2-phenylethyl ester	0.13 ± 0.01	0.57 ± 0.71	0.08 ± 0.001	NOT DETECTED
2-Methoxy-4-vinylphenol	NOT DETECTED	NOT DETECTED	0.45 ± 0.13	NOT DETECTED
n-Decanoic acid	0.23 ± 0.01	0.27 ± 0.16	0.20 ± 0.10	0.13 ± 0.08
Decanoic acid, ethyl ester	0.12 ± 0.009	0.06 ± 0.004	0.10 ± 0.01	NOT DETECTED
Dodecanoic acid, ethyl ester	NOT DETECTED	NOT DETECTED	NOT DETECTED	NOT DETECTED
Dodecanoic acid	NOT DETECTED	NOT DETECTED	0.06 ± 0.006	NOT DETECTED
Tryptophol	15.3 ± 1.04	5.18 ± 0.13	8.18 ± 0.92	9.26 ± 0.04

Από τα αποτελέσματα της αέριας χρωματογραφίας μάζας για το πείραμα 1 προκύπτει αρχικά ότι το σύνολο των μελετώμενων μικροοργανισμών παράγει σε παρόμοιες συγκεντρώσεις ισοαμυλική αλκοόλη και ενεργή αμυλική αλκοόλη, ενώσεις που προσδίδουν αρώματα ζυμέλαιου, μπανάνας και γλυκού αλκοολούχου ποτού, αλλά και φαινυλαιθυλική αλκοόλη, η οποία έχει χαρακτηριστικό άρωμα

τριαντάφυλλου. Στο πέρασμα του χρόνου παρατηρείται αύξηση και μείωση στις συγκεντρώσεις αυτών των ούσιων έτσι ώστε στα δυο χρόνια παλαίωσης η μόνη τιμή που παρατηρείται είναι, να χαμηλή είναι αυτή της *M. pulcherrima*. Η συγκέντρωση της φαινυλαιθυλικής αλκοόλης στην αρχή κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα. Με την πάροδο του χρόνου όμως κι συγκεκριμένα στους 6 μήνες και στον 1 χρόνο παλαίωσης του *S. cerevisiae* και του *Mix S.cerevisiae – T. delbrueckii* παρατηρείται ραγδαία αύξηση των τιμών.. Η μεταβολή της συγκέντρωσης της φαινυλαιθυλικής αλκοόλης στον *S. cerevisiae* και στην *Mix S.cerevisiae – T. delbrueckii* φανερώσει τον έντονο αρωματικό χαρακτήρα που προσδίδουν αυτές οι ζύμες στον ζύθο. Ακόμη στην αρχή της ζύμωσης παρατηρείται υψηλή συγκέντρωση τρυπτοφώλης (άρωμα αμυγδάλου, φρούτα) στην περίπτωση του συμβατικού ζυμομύκητα αλλά και της *M.pulcherrima*, 6.16 και 4.21 mg/L αντίστοιχα. Σε γενικό σύνολο, παρατηρείται επίσης ότι η συγκέντρωση της τρυπτοφώλης μειώνεται με την πάροδο του χρόνου χωρίς αυτό να σημαίνει ότι τα αρώματα της εξαφανίζονται από το αρωματικό προφίλ του ζύθου.

Στα οξέα που ανιχνεύθηκαν κατά την αερια χρωματογραφία, παρατηρείται ότι οι συγκεντρώσεις των περισσότερων μικροοργανισμών κυμαίνονται σε αρκετά χαμηλές τιμές σε σχέση με το όριο ανίχνευσης τους στους ζύθους. Συγκεκριμένα παρατηρείται ότι κατά την διάρκεια των 6 μηνών, το εξανοϊκό οξύ και το οκτανοϊκό οξύ στα υποστρώματα που ζυμώθηκαν από τον *S. cerevisiae* και την *T. Delbrueckii*, αυξήθηκαν αλλά βρέθηκαν σε συγκεντρώσεις που ήταν χαμηλότερες του ορίου ανίχνευσης.

Ενώ στην αρχή της ζύμωσης δεν είχαν εμφανιστεί αρκετοί εστέρες κατά το πέρασμα του χρόνου άρχισαν να ανιχνεύονται. Στα δείγματα του *S. cerevisiae* και της *T. delbrueckii* ανιχνεύθηκαν αρκετοί εστέρες οι οποίοι γενικά προσδίδουν γλυκά αρώματα φρούτων. Συγκεκριμένα ο συμβατικός μύκητας και η *T. delbrueckii* παράγουν σε συγκέντρωση υψηλότερη του ορίου ανίχνευσης καπρυλικό (βερίκοκο, μπανάνα, μπράντυ, αχλάδι) αιθυλεστέρα κατά την διάρκεια των 6 μηνών, ο συμβατικός μύκητας διατηρεί αυτή την υψηλή συγκέντρωση στον 1 χρόνο παλαίωσης ενώ η συγκέντρωση του καπρυλικού στο υπόστρωμα της *T. delbrueckii* μειώνεται . Στα 2 χρόνια παλαίωσης όμως παρατηρείται μείωση της συγκέντρωσης του καπρυλικού στο υπόστρωμα του συμβατικού μύκητα και αύξηση της συγκέντρωσης στο υπόστρωμα της *T. delbrueckii*. Αντίθετα στο υπόστρωμα που ζυμώθηκε από την *M. pulcherrima* το σύνολο των εστέρων που ανιχνεύθηκαν βρίσκονται σε αρκετά χαμηλές συγκεντρώσεις.

Πίνακας 5 Συγκριτικός πίνακας από τις ενώσεις που παραχθηκαν από τους τρεις διαφορετικούς μικροοργανισμούς κατά την μια εβδομάδα παλαίωσης στο πείραμα 2

Compounds (mg/l)	<i>S. cerevisiae</i>	<i>T. delbrueckii</i>	<i>M. pulcherrima</i>	<i>Mix S.cerevisiae – T. delbrueckii</i>
1-Butanol, 3-methyl-	6.1 ± 0.59	2.52 ± 1.87	16.15 ± 6.67	7.65
1-Butanol, 2-methyl-	NOT DETECTED	NOT DETECTED	NOT DETECTED	NOT DETECTED
Butanoic acid	NOT DETECTED	0.01 ± 0.01	0.18 ± 0.03	NOT DETECTED
Butanoic acid, ethyl ester	NOT DETECTED	NOT DETECTED	0.08 ± 0.03	NOT DETECTED

1-Butanol, 3-methyl-, acetate	NOT DETECTED	0.19 ± 0.09	0.85 ± 0.24	0.15
1-Propanol, 3-(methylthio)-	0.08 ± 0.01	0.03 ± 0.02	0.07	0.21
Hexanoic acid, ethyl ester	NOT DETECTED	0.04 ± 0.008	0.37 ± 0.06	NOT DETECTED
Hexanoic acid	0.14 ± 0.01	NOT DETECTED	0.5 ± 0.43	NOT DETECTED
Phenylethyl Alcohol	6.99 ± 0.42	4.15 ± 0.57	18.15 ± 3.29	17.61
Octanoic acid, ethyl ester	0.04 ± 0.03	0.03 ± 0.006	1.1 ± 0.84	NOT DETECTED
Octanoic acid	0.36 ± 0.01	2.08 ± 2.39	1.37 ± 1.37	0.31
Acetic acid, 2-phenylethyl ester	NOT DETECTED	NOT DETECTED	NOT DETECTED	NOT DETECTED
2-Methoxy-4-vinylphenol	NOT DETECTED	0,08 ± 0.006	0.38 ± 0.01	NOT DETECTED
n-Decanoic acid	NOT DETECTED	0.11 ± 0.05	0.63 ± 0.08	NOT DETECTED
Decanoic acid, ethyl ester	NOT DETECTED	0.006 ± 0.009	0.03 ± 0.03	NOT DETECTED
Dodecanoic acid, ethyl ester	NOT DETECTED	0.02 ± 0.01	NOT DETECTED	NOT DETECTED
Dodecanoic acid	NOT DETECTED	0,03 ± 0,01	0,05	NOT DETECTED
Tryptophol	2.51 ± 0.21	1.3 ± 0.47	1.26 ± 1.11	0.35

Πίνακας 6 Συγκριτικός πίνακας από τις ενώσεις που παραχθηκαν από τους τρεις διαφορετικούς μικροοργανισμούς κατά τους 6 μήνες παλαίωσης στο πείραμα 2

Compounds (mg/l)	<i>S. cerevisiae</i>	<i>T. delbrueckii</i>	<i>M. pulcherrima</i>	Mix <i>S.cerevisiae</i> – <i>T. delbrueckii</i>
1-Butanol, 3-methyl-	8.81 ± 0.58	2.1 ± 0.20	5.03 ± 0.11	5.68 ± 0.27

1-Butanol, 2-methyl-	2.42 ± 0.11	1 ± 0.31	2.37 ± 0.10	2.45 ± 0.07
Butanoic acid	NOT DETECTED	0.11 ± 0.01	0.25 ± 0.05	0.11 ± 0.005
Butanoic acid, ethyl ester	NOT DETECTED	0.14 ± 0.01	NOT DETECTED	0.11 ± 0.003
1-Butanol, 3-methyl-, acetate	0.29 ± 0.06	0.27 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.06 ± 0.001
1-Propanol, 3-(methylthio)-	0.38 ± 0.05	0.14 ± 0.02	0.12 ± 0.002	0.06 ± 0.003
Hexanoic acid, ethyl ester	0.22 ± 0.009	0.51 ± 0.05	0.39 ± 0.03	NOT DETECTED
Hexanoic acid	0.37 ± 0.04	NOT DETECTED	1.18 ± 0.04	NOT DETECTED
Phenylethyl Alcohol	41 ± 0.15	18 ± 0.2	31 ± 0.2	34.11 ± 0.78
Octanoic acid, ethyl ester	1.8 ± 0.02	0.51 ± 0.06	4.12 ± 0.0004	1.47 ± 0.04
Octanoic acid	NOT DETECTED	1.31 ± 0.03	2.61 ± 0.19	0.86 ± 0.02
Acetic acid, 2-phenylethyl ester	0.46 ± 0.01	0.33 ± 0.01	0.43 ± 0.03	0.14 ± 0.004
2-Methoxy-4-vinylphenol	0.36 ± 0.002	0.15 ± 0.01	1.08 ± 0.2	0.24 ± 0.004
n-Decanoic acid	0.26 ± 0.009	0.31 ± 0.003	1.38 ± 0.22	0.12 ± 0.01
Decanoic acid, ethyl ester	0.25 ± 0.02	0.37 ± 0.008	2.37 ± 0.2	NOT DETECTED
Dodecanoic acid, ethyl ester	0.13 ± 0.02	NOT DETECTED	0.38 ± 0.07	NOT DETECTED
Dodecanoic acid	NOT DETECTED	NOT DETECTED	NOT DETECTED	NOT DETECTED
Tryptophol	3.87 ± 0.34	8.81 ± 0.11	9.76 ± 0.96	18.8 ± 0.41

Πίνακας 7 Συγκριτικός πίνακας από τις ενώσεις που παραχθηκαν από τους τρεις διαφορετικούς μικροοργανισμούς κατά τον 1 χρόνο παλαίωσης στο πείραμα 2

Compounds (mg/l)	<i>S. cerevisiae</i>	<i>T. delbrueckii</i>	<i>M. pulcherrima</i>	Mix <i>S.cerevisiae</i> – <i>T. delbrueckii</i>
1-Butanol, 3-methyl-	3.3 ± 0.04	4.3 ± 2.48	7.64 ± 0.18	6.21 ± 0.4
1-Butanol, 2-methyl-	1.72 ± 0.19	1.59 ± 0.39	1.43 ± 0.01	1.95 ± 0.08
Butanoic acid	0.03 ± 0.005	NOT DETECTED	0.34 ± 0.01	0.06 ± 0.007
Butanoic acid, ethyl ester	NOT DETECTED	0.04 ± 0.02	0.07 ± 0.001	0.15 ± 0.02
1-Butanol, 3-methyl-, acetate	0.06 ± 0.005	0.14 ± 0.05	0.07 ± 0.01	0.51 ± 0.01
1-Propanol, 3-(methylthio)-	0.06 ± 0.002	0.12 ± 0.08	0.12 ± 0.07	NOT DETECTED
Hexanoic acid, ethyl ester	0.05 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.56 ± 0.37	0.22 ± 0.02
Hexanoic acid	0.15 ± 0.04	0.33 ± 0.2	0.21 ± 0.01	0.51 ± 0.03
Phenylethyl Alcohol	20.63 ± 0.38	18.71 ± 1.11	29.53 ± 1.01	40.72 ± 1.49
Octanoic acid, ethyl ester	0.51 ± 0.24	0.18 ± 0.06	2.82 ± 0.98	1.89 ± 0.38
Octanoic acid	1.51 ± 0.02	1.07 ± 0.28	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.32
Acetic acid, 2-phenylethyl ester	0.07 ± 0.003	0.25 ± 0.04	0.18 ± 0.009	0.51 ± 0.02
2-Methoxy-4-vinylphenol	0.23 ± 0.18	0.09 ± 0.05	0.67 ± 0.04	0.33 ± 0.02
n-Decanoic acid	0.12 ± 0.008	0.25 ± 0.1	1.22 ± 0.22	0.55 ± 0.01
Decanoic acid, ethyl ester	0.24 ± 0.13	0.11 ± 0.05	0.82 ± 0.05	0.46 ± 0.01

Dodecanoic acid, ethyl ester	NOT DETECTED	0.05 ± 0.01	0.13 ± 0.07	0.17 ± 0.01
Dodecanoic acid	NOT DETECTED	NOT DETECTED	NOT DETECTED	NOT DETECTED
Tryptophol	15.29 ± 0.07	7.21 ± 1.52	6.65 ± 0.6	3.48 ± 0.009

Πίνακας 8 Συγκριτικός πίνακας από τις ενώσεις που παραχθηκαν από τους τρεις διαφορετικούς μικροοργανισμούς κατά τα 2 χρόνια παλαίωσης στο πείραμα 2,

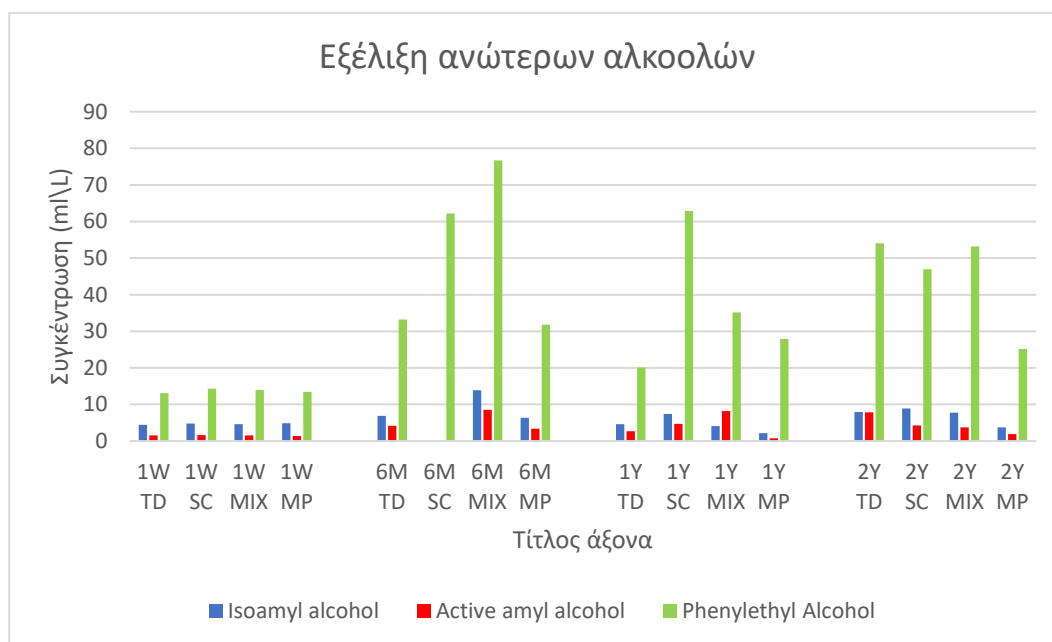
Compounds (mg/l)	<i>S. cerevisiae</i>	<i>T. delbrueckii</i>	<i>M. pulcherrima</i>	Mix <i>S.cerevisiae</i> – <i>T. delbrueckii</i>
1-Butanol, 3-methyl-	9.41 ± 0.03	9.06 ± 0.54	5.07 ± 0.07	8.16 ± 0.9
1-Butanol, 2-methyl-	2.73 ± 0.0005	1.59 ± 0.34	1.89 ± 0.06	1.52 ± 0.11
Butanoic acid	0.31 ± 0.001	0.2 ± 0.01	0.14 ± 0.03	0.23 ± 0.05
Butanoic acid, ethyl ester	NOT DETECTED	0.39 ± 0.27	0.32 ± 0.03	0.06 ± 0.01
1-Butanol, 3-methyl-, acetate	NOT DETECTED	0.41 ± 0.11	0.09 ± 0.02	0.53 ± 0.05
1-Propanol, 3-(methylthio)-	0.07 ± 0.006	0.54 ± 0.21	0.08 ± 0.02	0.6 ± 0.15
Hexanoic acid, ethyl ester	0.25 ± 0.04	NOT DETECTED	0.22 ± 0.007	0.16 ± 0.005
Hexanoic acid	0.64 ± 0.14	2.1 ± 0.08	0.96 ± 0.02	0.54 ± 0.18
Phenylethyl Alcohol	39.8 ± 0.75	39.6 ± 1.82	29.32 ± 1.2	47.23 ± 1.9
Octanoic acid, ethyl ester	1.53 ± 0.43	1.62 ± 0.54	0.84 ± 0.33	0.84 ± 0.04
Octanoic acid	1.05 ± 0.02	3.35 ± 0.12	1.41 ± 0.07	1.98 ± 0.33
Acetic acid, 2-phenylethyl ester	0.09 ± 0.01	0.49 ± 0.10	0.17 ± 0.01	0.49 ± 0.03

2-Methoxy-4-vinylphenol	0.22 ± 0.02	0.2 ± 0.03	0.44 ± 0.18	0.53 ± 0.13
n-Decanoic acid	0.12 ± 0.03	1.12 ± 0.14	0.72 ± 0.10	NOT DETECTED
Decanoic acid, ethyl ester	0.04 ± 0.002	0.23 ± 0.04	1.44 ± 0.37	NOT DETECTED
Dodecanoic acid, ethyl ester	NOT DETECTED	NOT DETECTED	NOT DETECTED	NOT DETECTED
Dodecanoic acid	NOT DETECTED	NOT DETECTED	0.31 ± 0.003	0.2 ± 0.08
Tryptophol	16.45 ± 1.13	19.46 ± 1.93	8.01 ± 0.89	4.43 ± 0.65

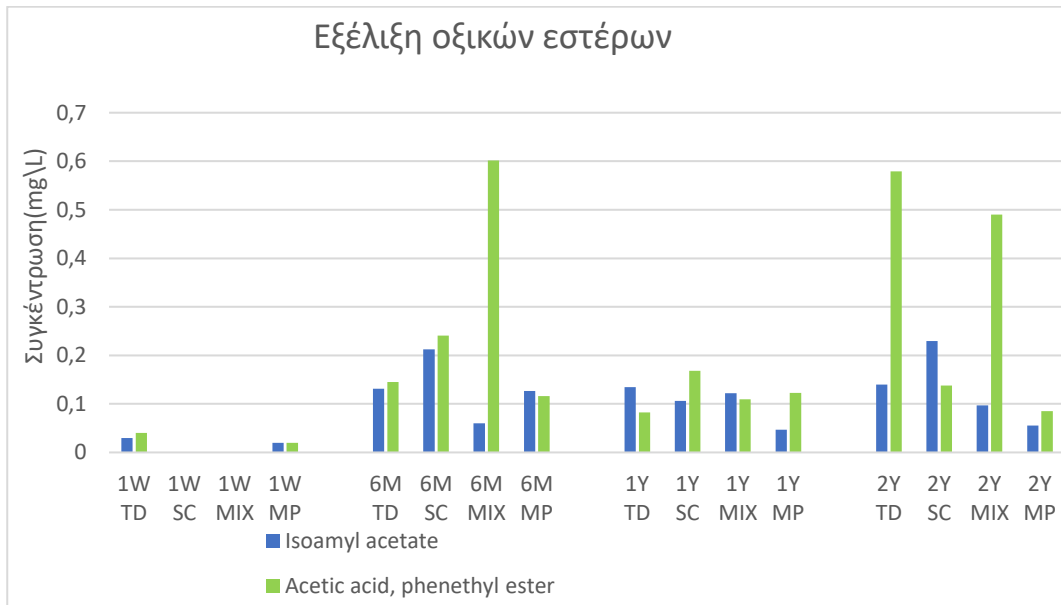
Όσον αφορά στις αλκοόλες που ανιχνεύθηκαν στους ζύθους του δεύτερου πειράματος, το αρωματικό προφίλ διαμορφώνεται κυρίως από την ισοαμυλική και την ενεργή αμυλική αλκοόλη, την φαινυλαιθυλική αλκοόλη και την τρυπτοφόλη. Υψηλότερη συγκέντρωση φαινυλαιθυλικής αλκοόλης στην 1η εβδομάδα παλαίωσης παρατηρείται στην περίπτωση του ζύθου που ζυμώθηκε από την μικτή καλλιέργεια και την *M. pulcherrima* με 17.61 και 18.15 mg/l αντίστοιχα. Κατά την διάρκεια των 6 μηνών η συγκέντρωση της φαινυλαιθυλικής αλκοόλης στο υποστρώμα που ζυμώθηκε από τον *S. cerevisiae* αυξάνεται ραγδαία ενώ κατά την διάρκεια του 1 χρόνου παλαίωσης μειώνεται και στην συνέχεια επανέρχεται σχεδόν στην ίδια συγκέντρωση που είχε στους 6 μήνες παλαίωσης. Σημαντικά υψηλές συγκεντρώσεις τρυπτοφόλης εμφανίζονται στην περίπτωση του *S. cerevisiae* και της *T. Delbrueckii* αλλά οι συγκεντρώσεις αυτές παρατηρούνται κατά τον 1 χρόνο παλαίωσης και όχι στην αρχή της ζύμωσης. Τέλος εμφανίζεται η ουσία 1-προπανόλη,3-μεθύλιο, σε συγκεντρώσεις όμως αρκετά χαμηλότερες από το όριο ανίχνευσης.

Όσον αφορά στα οξέα στο πείραμα 2 παρατηρείται και στην περίπτωση αυτή ότι το σύνολο των οξέων που ανιχνεύθηκαν βρίσκονται σε ίχνη ή σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες του ορίου ανίχνευσης. Στους ζύθους του πειράματος 2, όπως μπορεί να παρατηρηθεί στους παραπάνω πίνακες, ανιχνεύθηκε από τον αέριο χρωματογράφο ένας σημαντικός αριθμός εστέρων. Ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι συγκεντρώσεις των ουσιών, καπροϊκός αιθυλεστέρας, καρυλικός αιθυλεστέρας και οξικός φαινυλαιθυλεστέρας, στους ζύθους που παράχθηκαν από τους δύο μη συμβατικούς μύκητες, οι οποίες προσδίδουν αρώματα όπως μήλο, γλυκάνισο, βερίκοκο, μπανάνα, μπράντο, αχλάδι και μέλι. Συγκεκριμένα στην περίπτωση της *M. pulcherrima* κατά την 1η εβδομάδα παλαίωσης παρατηρείται πολύ υψηλή παραγωγή καρυλικού αιθυλεστέρα (1.1mg/L). Ακόμη σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις, αλλά χαμηλότερες του ορίου ανίχνευσης, εμφανίζεται ο οξικός ισοαμυλεστέρας στο σύνολο των δειγμάτων ο οποίος επίσης χαρακτηρίζεται από φρουτώδη αρώματα.

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ 1

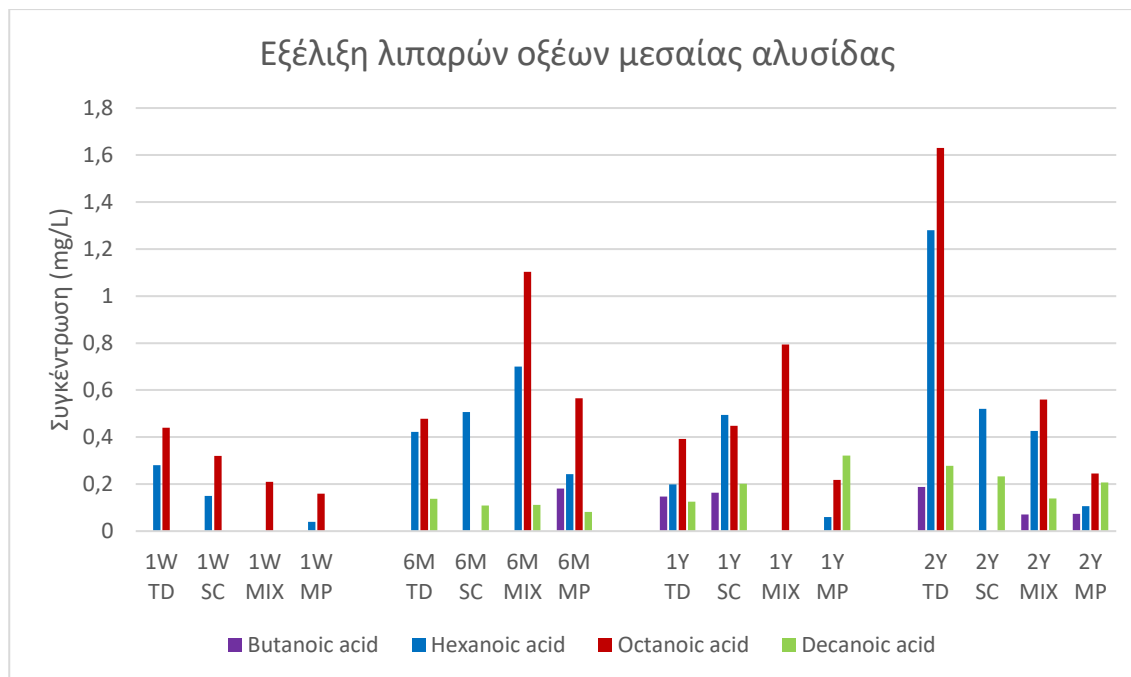


Από το παραπάνω διάγραμμα γίνεται σαφές ότι η φαινυλαιθυλική αλκοόλη είναι αυτή που βρίσκεται σε υψηλότερα ποσοστά σε σχέση με τις άλλες ανώτερες αλκοόλες και όλη την διάρκεια της παλαίωσης. Κατά την πρώτη εβδομάδα παλαίωσης η ισοαμυλική, η ενεργή αμυλική αλκοόλη έχουν την ίδια περίπου συγκέντρωση ενώσεις που προσδίδουν αρώματα ζυμελαίου, μπανάνας και γλυκού αλκοολούχου ποτού, αλλά και φαινυλαιθυλική αλκοόλη, η οποία έχει χαρακτηριστικό άρωμα τριαντάφυλλου. Στο πέρασμα του χρόνου παρατηρείται αύξηση και μείωση στις συγκεντρώσεις αυτών των ουσιών έτσι ώστε στα δυο χρόνια παλαίωσης η μόνη τιμή που παρατηρείται να είναι χαμηλή είναι αυτή της *M. pulcherrima*. Παρόλο που η συγκέντρωση της *M. Pulcherrima* κατά τα δύο χρόνια παλαίωσης είναι χαμηλή σε σχέση με τις υπόλοιπες η εξελίσσεται με σταθερό ρυθμό έχοντας την ίδια περίπου συγκέντρωση 30 mg/l. Η συγκέντρωση της φαινυλαιθυλικής αλκοόλης στην αρχή κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα. Με την πάροδο του χρόνου όμως κι συγκεκριμένα στους 6 μήνες και στον 1 χρόνο παλαίωσης του *S. cerevisiae* και του *Mix S.cerevisiae – T. delbrueckii* παρατηρείται ραγδαία αύξηση των τιμών. Η μεταβολή της συγκέντρωσης της φαινυλαιθυλικής αλκοόλης στον *S. cerevisiae* και στην *Mix S.cerevisiae – T. delbrueckii* φανερώνει τον έντονο αρωματικό χαρακτήρα που προσδίδουν αυτές οι ζύμες στον ζύθο. Οι υψηλές συγκεντρώσεις φαινυλαιθυλικής αλκοόλης κατά τα δυο χρόνια παλαίωσης φανερώνουν ότι έχουν παραχθεί ζύθοι με υψηλό αρωματικό προφίλ εμπλουτισμένοι με αρώματα φρούτων απαλλαγμένα από το έντονο άρωμα αλκοόλης λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης της ενεργής αμυλικής αλκοόλης.



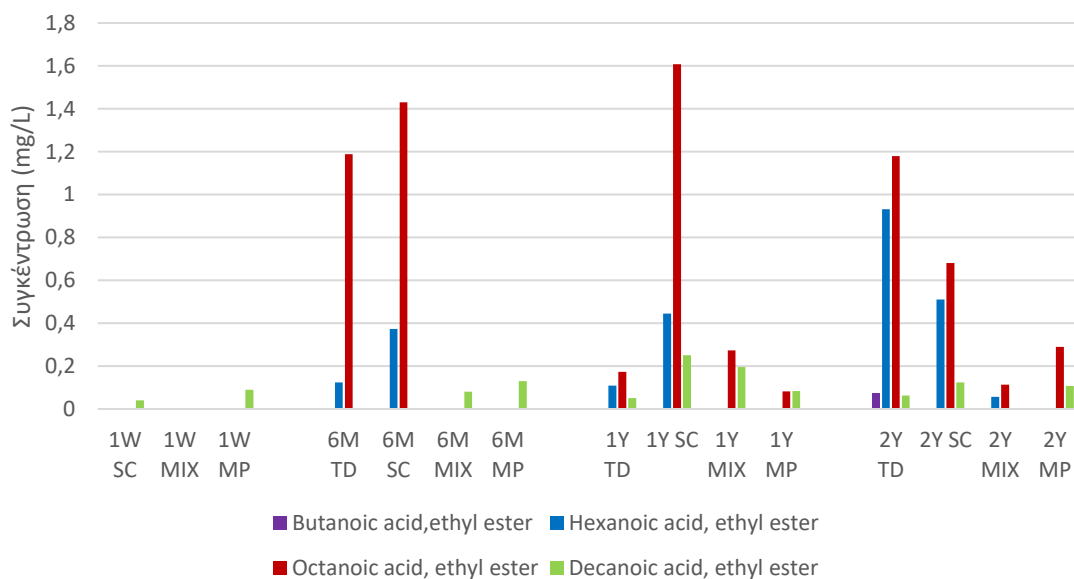
Ο οξικός ισοαμυλεστέρας και ο οξικός 2-φαινυλαιθυλεστέρας οι οποίοι προσδίδουν αρώματα μπανάνας, αχλαδιού, μελιού και μήλου κατά την πρώτη εβδομάδα παλαίωσης είναι ανύπαρκτοι στα δείγματα που ζυμώθηκαν από τον συμβατό ζυμομύκητα και την *Mix S. Cerevisiae-T. Delbrueckii*. Κατά τους 6 μήνες παλαίωσης ο οξικός 2-φαινυλαιθυλεστέρας στο δείγμα που ζυμώθηκε από την *Mix S.cerevisiae – T. Delbrueckii* φαίνεται να έχει την μεγαλύτερη συγκέντρωση σε σχέση με τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς στην ίδια περίοδο παλαίωσης. Στον ένα χρόνο παλαίωσης παρατηρούμε ότι η συγκέντρωση του οξικού ισοαμυλεστέρα κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα για όλους τους μικροοργανισμούς εκτός από την *M. Pulcherrima* όπου η συγκέντρωσή της είναι αρκετά χαμηλή. Στα δυο χρόνια παλαίωσης οι υψηλές συγκεντρώσεις του οξικού 2-φαινυλαιθυλεστέρα τόσο στην *T. Delbrueckii* όσο και στην *Mix S.cerevisiae – T. Delbrueckii* αποκαλύπτει πως ο ζύθος που πρόκειται να παραχθεί μετά τα δυο χρόνια παλαίωσης θα είναι ένας ζύθος αρωματικός, γλυκός και φρουτώδης. Ταυτόχρονα παρατηρείται και μία μείωση στην *M. pulcherrima* κατά το πέρασμα του χρόνου τόσο στον οξικό ισοαμυλεστέρα όσο και στον οξικό 2-φαινυλαιθυλεστέρα.

Εξέλιξη λιπαρών οξέων μεσαίας αλυσίδας



Στα οξέα που ανιχνεύθηκαν κατά την αέρια χρωματογραφία, παρατηρείται ότι οι συγκεντρώσεις των περισσότερων μικροοργανισμών κυμαίνονται σε αρκετά χαμηλές τιμές σε σχέση με το όριο ανίχνευσης τους στους ζύθους. Παρατηρείται ότι κατά την διάρκεια των 6 μηνών εμφανίζονται οξέα τα οποία δεν υπήρχαν στην πρώτη εβδομάδα όπως το βουτανικό και το δεκανοϊκό οξύ. Το οκτανοϊκό οξύ στο υπόστρωμα που ζυμώθηκε από την *T. Delbrueckii* φαίνεται να έχει την μεγαλύτερη συγκέντρωση στα 2 χρόνια παλαίωσης. Παράλληλα στον ένα χρόνο στον ίδιο μικροοργανισμό εμφανίζεται για πρώτη φορά το βουτανικό οξύ και στα δύο χρόνια παλαίωσης παρουσιάζει υψηλότερες συγκεντρώσεις σε όλα τα οξέα. Στον συμβατό ζυμομύκητα το βουτανικό και το δεκανοϊκό οξύ εμφανίζονται στον πρώτο χρόνο παλαίωσης. Η *Mix S.cerevisiae – T. Delbrueckii* παρουσιάζει την μέγιστη συγκέντρωση οκτανοϊκού οξέος και εξανοϊκού οξέος στους 6 μήνες και από εκεί και πέρα παρατηρείται σταδιακή μείωση στην συγκέντρωση και των δύο οξέων μέχρι να φτάσουν στα 2 χρόνια παλαίωσης. Η *M. Pulcherrima* σε γενικά πλαίσια κινείται σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξέων και ιδιαίτερα στα δύο χρόνια παλαίωσης εμφανίζει τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε όλα τα οξέα εκτός από το δεκανοϊκό σε σχέση με τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς

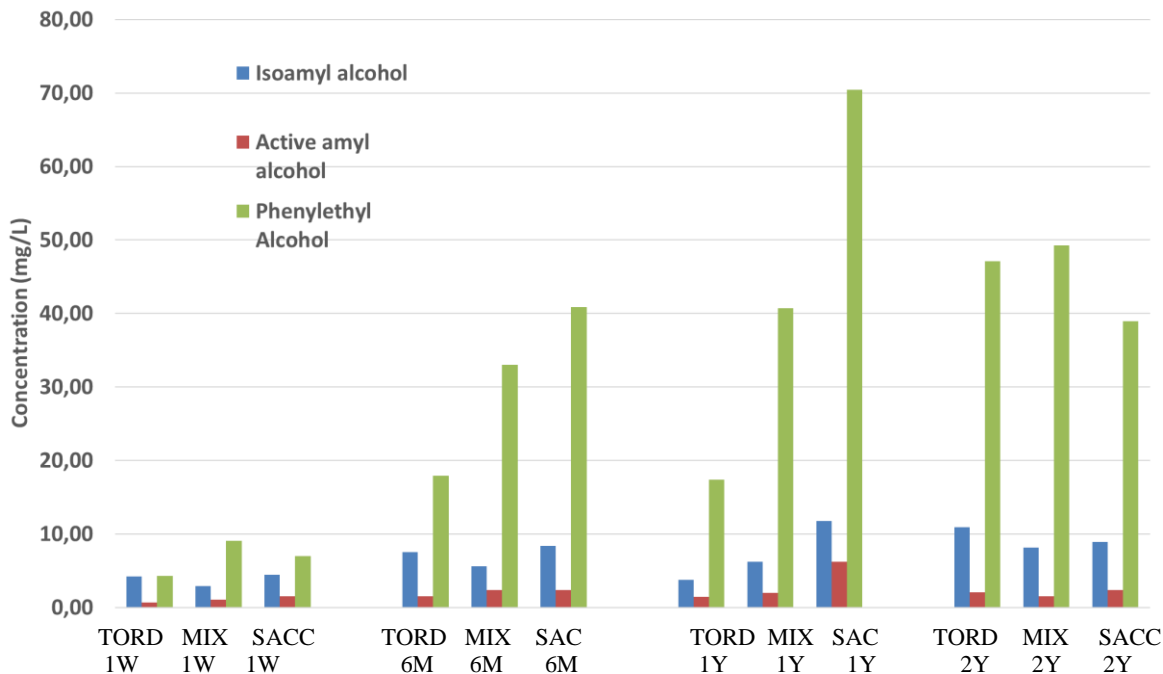
Εξέλιξη εστέρων λιπαρών οξέων μεσαίας αλυσίδας



Ενώ στην αρχή της ζύμωσης δεν είχαν εμφανιστεί εστέρες κατά το πέρασμα του χρόνου άρχισαν να ανιχνεύονται. Στους 6 μήνες παλαίωσης παρατηρείται η εμφάνιση του εξανοϊκού και δεκανοϊκού αιθυλεστέρα σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις αλλά και του οκτανοϊκού σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από τους άλλους δυο εστέρες. Στα δείγματα του *S. cerevisiae* και της *T. delbrueckii* ανιχνεύθηκαν αρκετοί εστέρες οι οποίοι γενικά προσδίδουν γλυκά αρώματα φρούτων. Συγκεκριμένα ο συμβατικός μύκητας και η *T. delbrueckii* παράγουν σε συγκέντρωση υψηλότερη του ορίου ανίχνευσης καπρυλικό (βερίκοκο, μπανάνα, μπράντι, αχλάδι) αιθυλεστέρα κατά την διάρκεια των 6 μηνών, ο συμβατικός μύκητας διατηρεί αυτή την υψηλή συγκέντρωση στον 1 χρόνο παλαίωσης ενώ η συγκέντρωση του καπρυλικού στο υπόστρωμα της *T. delbrueckii* μειώνεται. Στα 2 χρόνια παλαίωσης όμως παρατηρείται μείωση της συγκέντρωσης του καπρυλικού στο υπόστρωμα του συμβατικού μύκητα και αύξηση της συγκέντρωσης στο υπόστρωμα της *T. delbrueckii*. Ο βουτανοϊκός αιθυλεστέρας ένας εστέρας υπεύθυνος για φρουτώδη αρώματα (μήλο, ανανά) εμφανίζεται μόνο στο υπόστρωμα της *T. Delbrueckii* και σε χρονική περίοδο δυο ετών. Ο εξανοϊκός αιθυλεστέρας που έχει σημαντικό ρόλο στην συνολική ισορροπία των αρωμάτων εμφανίζεται στα υποστρώματα του *S. cerevisiae* και της *T. delbrueckii* στην διάρκεια των 6 μηνών και του ενός χρόνου βρίσκονται στις ίδιες περιπου συγκεντρώσεις και στα δυο χρόνια παλαίωσης και οι δυο παρουσιάζουν μέγιστη συγκέντρωση αλλά και στην Mix καλλιέργεια στην άροδο δύο ετών. Αντίθετα στο υπόστρωμα που ζυμώθηκε από την *M. pulcherrima* το σύνολο των εστέρων που ανιχνεύθηκαν βρίσκονται σε αρκετά χαμηλές συγκεντρώσεις.

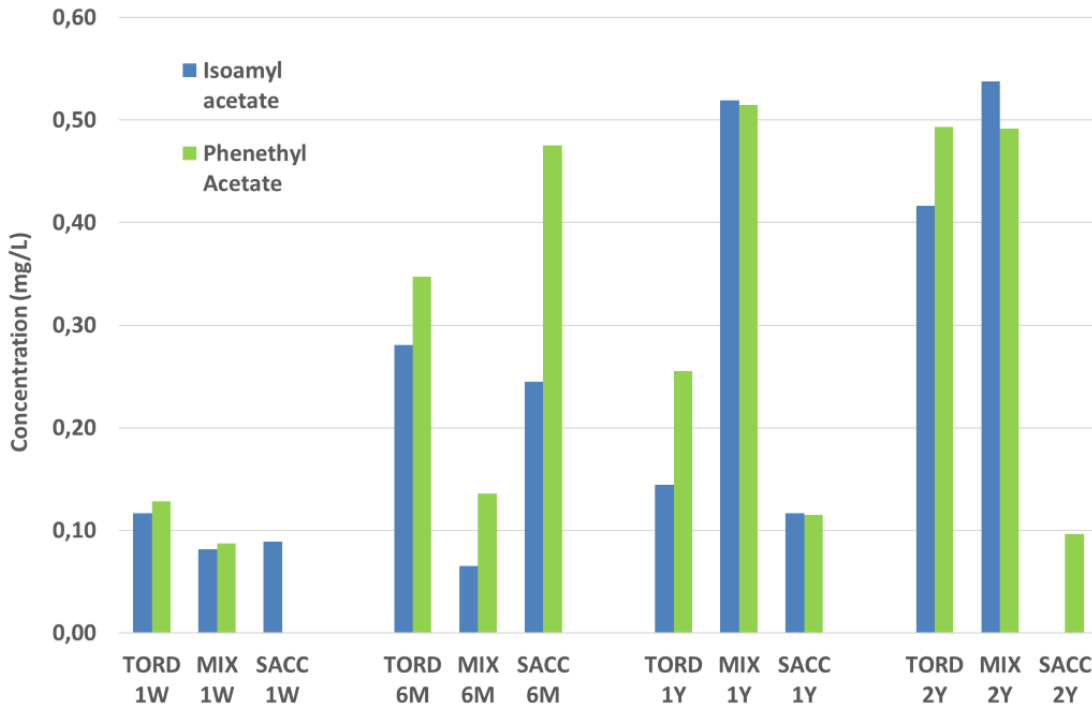
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ ΤΟΥ ΠΕΙΡΜΑΤΟΣ 2

Εξέλιξη ανώτερων αλκοολών



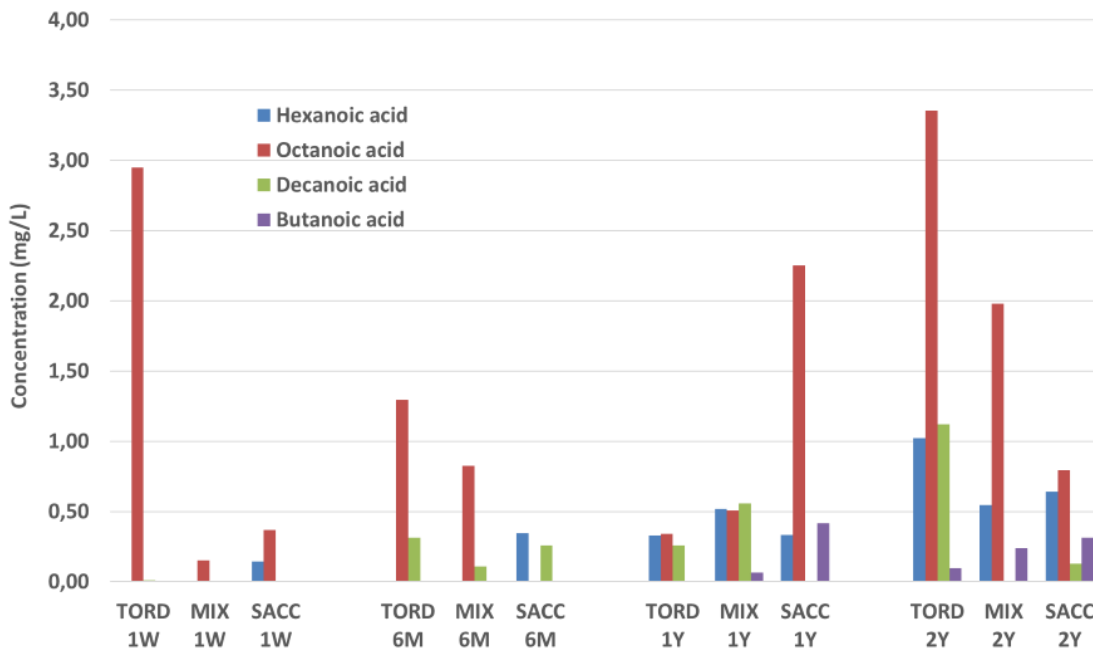
Από το πρώτο διάγραμμα προκύπτει πως οι συγκεντρώσεις όλων των ουσιών και των τριών μικροοργανισμών κατά την πρώτη εβδομάδα παλαίωσης βρίσκονται σε πολύ χαμηλά επίπεδα. Στην διάρκεια των 6 μηνών παρατηρούμε πως η συγκέντρωση της φαινυλαιθυλικής αλκοόλης, μια αλκοόλη που δίνει φρουτώδη αρώματα, είναι τριπλάσια σε σχέση με την αρχική της και στους τρεις μικροοργανισμούς. Ο *S. cerevisiae* κατά τον ένα χρόνο παλαίωσης έχει την μέγιστη συγκέντρωση σε φαινυλαιθυλική αλκοόλη 70 mg/l. Η *T. Delbrueckii* παρουσιάζει μέγιστη συγκέντρωση φαινυλαιθυλικής αλκοόλης κατά τα δυο χρόνια παλαίωσης με συγκέντρωση 48mg/l το ίδιο όμως συμβαίνει και με την mix καλλιέργεια. Στο υπόστρωμα που ζυμώθηκε από την *T. Delbrueckii* βλέπουμε ότι οι μέγιστες συγκεντρώσεις της για την ισοαμυλική, την ενεργή αμυλική και την φαινυλαιθυλική αλκοόλης καταγράφονται στα δυο χρόνια παλαίωσης

Εξέλιξη οξικών εστέρων



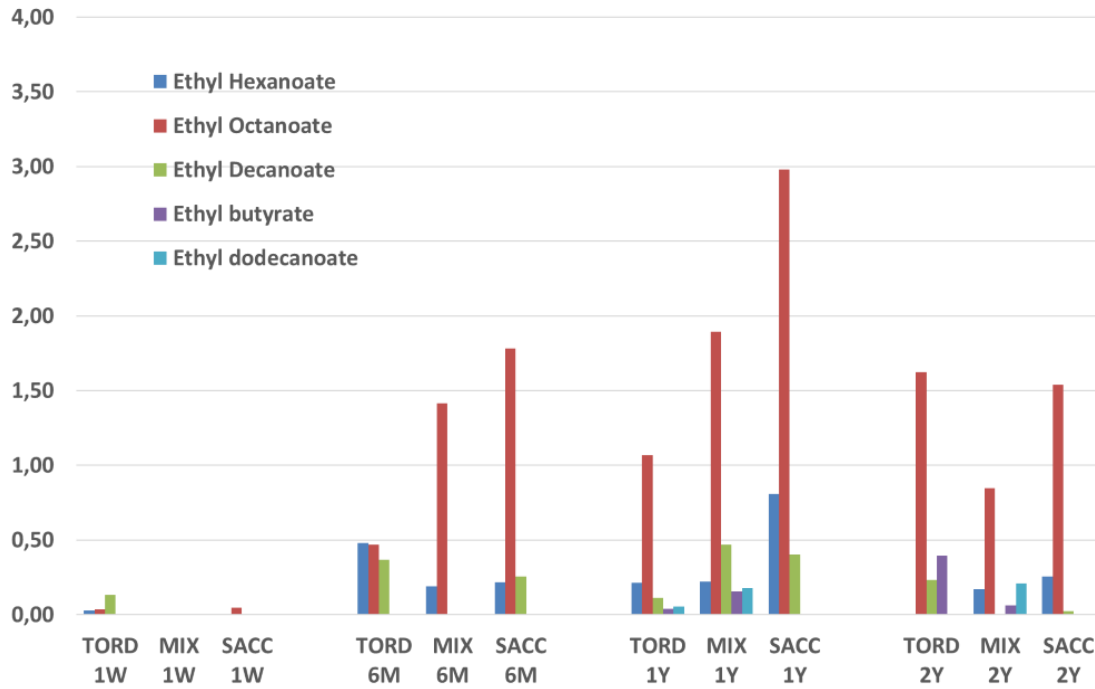
Στο παραπάνω διάγραμμα παρουσιάζονται ο οξικός ισοαμυλικός εστέρας και ο οξικός 2 φαινυλαιθυλεστέρας Εστέρες που προσδίδουν αρώματα μπανανας, και μελιου. Κατά την πρώτη εβδομάδα παλαιωσης παρατηρούμε την υψηλότερη συγκέντρωση στο υπόστρωμα που ζυμώθηκε από την *T. Delbrueckii* ενώ ο οξικός 2 φαινυλαιθυλεστέρας στον συμβατό ζυμωμνηκτη είναι ανυπαρκτος. Κατά τον ένα χρόνο και δυο χρόνια παλαιωσης έχουμε υψηλές συγκεντρώσεις στο υπόστρωμα που ζυμώθηκε από την *mix* καλλιέργεια και στην συνέχεια με λίγο χαμηλότερες συγκεντρώσεις ακολουθεί η *T. delbrueckii*. Ο *S. cerevisiae* κατά τον πρώτο χρόνο και δεύτερο χρόνο παλαιωσης παραγει σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις τους δυο αυτούς εστέρες. Επίσης η *T. delbrueckii* στα δυο χρόνια παλαιώσης έχει την μεγαλύτερη συγκέντρωση και στους δυο εστέρες σε συγκριση με τα άλλα χρονικά διαστήματα.

Εξέλιξη λιπαρών οξέων μεσαίας αλυσίδας



Κατά την 1 εβδομάδα παράγεται μόνο οκτανοϊκό οξύ και εξανοϊκό οξύ με την υψηλότερη συγκέντρωση να εντοπίζεται στην *T. delbrueckii*. Κατά τον έκτο μήνα εμφανίζεται το δεκανοϊκό οξύ και παρατηρείται μείωση στην συγκέντρωση του οκτανοϊκού οξέος στο υπόστρωμα που ζυμώθηκε από την *T. delbrueckii*. Στον ένα χρόνο έχουμε λιγότερο οκτανοϊκό και περισσότερο δεκανοϊκό και εξανοϊκό οξύ. Επίσης ένα νέο οξύ εμφανίζεται το βουτανοϊκό το οποίο βρίσκεται σε μικρότερη συγκέντρωση στην mix καλλιέργεια και σε περισσότερη συγκέντρωση στον συμβατό ζυμομύκητα. Στα δυο χρόνια έχουμε το μέγιστο σε όλες τις ουσίες σε όλους του μικροοργανισμούς με μια μικρή εξαίρεση τον *S. cerevisiae* στο οκτανοϊκό οξύ που παρουσιάζει μέγιστη συγκέντρωση στο χρόνο παλαιώσης

Εξέλιξη εστέρων λιπαρών οξέων μεσαίας αλυσίδας



Στην 1η εβδομάδα παρατηρούμε ότι έχουν παραχθεί πολύ μικρές συγκεντρώσεις εστέρων. Μετά τους 6 μήνες παλαίωσης εντοπίζουμε υψηλές συγκεντρώσεις οκτανοϊκού εστέρα στην mix καλλιέργεια και τον συμβατό ζυμομύκητα. Στον 1 χρόνο έχουμε την εμφάνιση καινούριων εστέρων του δωδεκανοϊκού και του βουτανοϊκού. Στον ένα χρόνο επίσης έχουμε τις μέγιστες συγκεντρώσεις για τον οκτανοϊκό αιθυλεστέρα σε όλους τους μικροοργανισμούς. Στα δυο χρόνια τώρα οι συγκεντρώσεις μειώνονται σε σχεδόν όλους τους μικροοργανισμούς.

ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ

Συνολικά από τα πειράματα 1 και 2 παρατηρείται ότι το σύνολο το μικροοργανισμών παράγει μεγάλες ποσότητες ισοαμυλικής, ενεργής αμυλικής και φαινυλαιθυλικής αλκοόλης. Συγκρίνοντας τις τιμές μεταξύ των δύο πειραμάτων παρατηρείται ότι και στα δυο πειράματα οι μικροοργανισμοί παράγουν υψηλές τιμές ισοαμυλικής αλκοόλης με την πάροδο του χρόνου, οδηγώντας σε πιο έντονα αρώματα ζυμέλαιου και μπανάνας. Οι συγκεντρώσεις ενεργής αμυλικής αλκοόλης είναι αντίστοιχες με αυτές του πειράματος 1, εκτός από την περίπτωση της μικτής καλλιέργειας *S. cerevisiae* – *T. delbrueckii* όπου η ένωση εμφανίζεται στα 8mg/l. Όσον αφορά στη φαινυλαιθυλική αλκοόλη μεγαλύτερη παραγωγή παρατηρήθηκε στο πείραμα 1. Ακόμη σε όλα τα δείγματα που μετρήθηκαν εμφανίζεται η ανώτερη αλκοόλη, τρυπτοφόλη. Το σύνολο το μικροοργανισμών φαίνεται να παράγει τρυπτοφόλη σε χαμηλές συγκεντρώσεις ενώ μόνο στην περίπτωση της *T. delbrueckii* ανιχνεύθηκαν χαμηλότερες συγκεντρώσεις στο πείραμα 1 και μόνο στην περίπτωση του *S. cerevisiae* παρατηρήθηκε μια υψηλή τιμή στην συγκέντρωση της τρυπτοφόλης κατά την διάρκεια των 6 μηνών.

Η παραγωγή οξέων στα δύο πειράματα βρέθηκε αρκετά χαμηλή. Συγκεκριμένα και στις δύο περιπτώσεις ανιχνεύθηκε ένας σημαντικός αριθμός οξέων αλλά σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Αν πάρουμε ως μέτρο σύγκρισης την πρώτη εβδομάδα παλαιώσης παρατηρούμε ότι τα οξέα που έχουν παραχθεί στο 2ο πείραμα για την περίπτωση της ζύμωσης με την *T. delbrueckii* είναι περισσότερα σε σχέση με αυτά του 1ου πειράματος, ενώ η μικτή καλλιέργεια έχει παράξει τον ίδιο αριθμό οξέων.

ΣΥΝΟΛΙΚΑ

Σε αντίθεση με τον συμβατικό ζυμομύκητα, η *T. delbrueckii* κατά την ζύμωση του ζυθογλεύκου παράγει σημαντικό αριθμό εστέρων όπως ο καπρικός και ο καπρυλικός αιθυλεστέρας, ο οξικός φαινυλαιθυλεστέρας. Η αυξημένη παραγωγή εστέρων από τον μύκητα αυτό προκύπτει και από την βιβλιογραφία (Canonico, et al., 2015). Παρόλο που παρατηρείται παραγωγή φαινυλαιθυλικής αλκοόλης και οξικού φαινυλαιθυλεστέρα, ουσίες με αρώματα τριαντάφυλλου, που χαρακτηρίζουν το μύκητα αυτό, οι συγκεντρώσεις τους δεν είναι ιδιαίτερα υψηλές ενώ στο πείραμα 1, κατά την πρώτη εβδομάδα παλαιώσης, στην περίπτωση της φαινυλαιθυλικής αλκοόλης η συγκέντρωσή της βρέθηκε χαμηλότερη από ότι στην περίπτωση του συμβατικού ζυμομύκητα.

Η *M. pulcherrima* όπως και η *T. delbrueckii* παράγει ένα πλήθος εστέρων οι οποίοι προσδίδουν ένα γλυκό και φρουτώδες αρωματικό προφίλ στον παραγόμενο ζύθο. Ακόμη χαρακτηριστικό των ζύθων που παράχθηκαν από την *M. pulcherrima* είναι η υψηλή συγκέντρωση φαινυλαιθυλικής, ισοαμυλικής και ενεργής αμυλικής αλκοόλης, γεγονός το οποίο προκύπτει και από την βιβλιογραφία (Padilla, et al., 2016). Το αρωματικό προφίλ που διαμορφώνει ο μύκητας αυτός συμπληρώνεται από έντονα πικρικά και φυτικά αρώματα που προκύπτουν από τον λυκίσκο και συγκεκριμένα από τις ουσίες ισοχουμουλόνη και λουλουπόνη αλλά και από αρώματα ξύλου που προέρχονται από την ένωση 2-μεθοξυ-4-βινυλοφαινόλη. Όπως έχει ήδη αναφερθεί δεν υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές για την χρήση της *M. pulcherrima* για την παραγωγή ζύθου, το αρωματικό προφίλ όμως που προκύπτει μετά την ανάλυση αέριας χρωματογραφίας στους παραγόμενες ζύθους δείχνει ότι η ζύμη αυτή έχει τη δυνατότητα να διαμορφώσει ένα ιδιαίτερο και πολύπλοκο αρωματικό προφίλ.

Τέλος όσον αφορά στον ζύθο που ζυμώθηκε με την μικτή καλλιέργεια *S.cerevisiae-T.delbrueckii* τα αρώματα που φαίνεται να κυριαρχούν προέρχονται από την ισοαμυλική, την ενεργή αμυλική και την φαινυλαιθυλική αλκοόλη, καθώς παρουσιάζει πολύ υψηλές συγκεντρώσεις. Σύμφωνα με αναφορές η παρουσία της *T.delbrueckii* σε μικτές καλλιέργειες με τον *S.cerevisiae* αυξάνει την παραγωγή οξικού φαινυλαιθυλεστέρα και καπροϊκού και καπρυλικού αιθυλεστέρα, ενώ ταυτόχρονα μειώνει την παραγωγή οξικού ισοαμυλεστέρα και φαινυλαιθυλικής αλκοόλης (Canónico, et al., 2015). Στην εν λόγω εργασία η συγκέντρωση οξικού φαινυλαιθυλεστέρα φαίνεται να αυξάνεται σε σχέση με τον συμβατικό μύκητα, παραμένοντας όμως αρκετά χαμηλή, όμως οι εστέρες καπροϊκός και καπρυλικός βρίσκονται σε ίχνη ή δεν ανιχνεύθηκαν. Ακόμη οι συγκεντρώσεις οξικού ισοαμυλεστέρα πράγματι μειώνονται στις μύρες που ζυμώθηκαν από την μικτή καλλιέργεια ενώ στην περίπτωση της φαινυλαιθυλικής αλκοόλης στο πείραμα 1 η συγκέντρωση στον ζύθο που ζυμώθηκε από την μικτή καλλιέργεια είναι σχεδόν ίση με αυτή που ζυμώθηκε από τον συμβατικό μικροοργανισμό και στο πείραμα 2 υψηλότερη.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν κάποιες από τις ενώσεις που παράγονται από την ζύμωση τριών διαφορετικών μικροοργανισμών του *S. cerevisiae*, της *T. delbrueckii*, της *M. pulcherrima* και μιας μικτής καλλιέργειας *S. cerevisiae-T. delbrueckii* σε αναλογία 1:10 τα αρώματα που παράγουν αυτοί οι μικροοργανισμοί καθώς και το πως μεταβάλλονται με το πέρασμα του χρόνου.

Συγκεκριμένα στην παρούσα εργασία μετρήθηκαν πειραματικά τα αρωματικά συστατικά των τελικών προϊόντων και η εξέλιξη που είχαν σε διάστημα μίας εβδομάδας, έξι μηνών, ενός χρόνου και δύο χρόνων. Οι αρωματικές αναλύσεις έδειξαν ότι οι μελετώμενοι μη συμβατικοί μικροοργανισμοί καθώς και η μικτή καλλιέργεια έχουν την δυνατότητα παραγωγής ενός πλήθους αρωματικών ουσιών, διαμορφώνοντας ένα πολύπλοκο αρωματικό προφίλ με ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Συγκεκριμένα οι ζύθοι που παράχθηκαν με την χρήση της *T. delbrueckii* παρουσίασαν έντονα αρώματα φρούτων χάρη στην παρουσία εστέρων όπως ο καπρικός, ο καπρυλικός αιθυλεστέρας και ο οξικός φαινυλαιθυλεστέρας με ταυτόχρονα χαρακτηριστικά αρώματα τριαντάφυλλου λόγω της παραγωγής φαινυλαιθυλικής αλκοόλης. Υψηλή παραγωγή εστέρων παρατηρήθηκε και στην *M. Pulcherrima*. Στην περίπτωση αυτή όμως τα αρώματα φρούτων που οφείλονται στους εστέρες συνδυάζονται και με πιο έντονα πικρικά αρώματα αλλά και αρώματα ζύλου που προέρχονται από την ένωση 2-μεθοξυ-4-βινυλοφαινόλη

Σύμφωνα με τα παραπάνω γίνεται σαφές ότι τα στελέχη των non-*Saccharomyces* μικροοργανισμών που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία δίνουν θετικά αποτελέσματα για την παραγωγή ζύθου με ιδιαίτερα αρωματικά χαρακτηριστικά. Σε κάθε περίπτωση, για το σχηματισμό πληρέστερης εικόνας σχετικά με τα χαρακτηριστικά των ζυμώσεων και το προφίλ των τελικών προϊόντων απαιτούνται επιπλέον μελέτες. Για μια πιο ολοκληρωμένη μελέτη των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των προϊόντων ζύμωσης των μελετώμενων μικροοργανισμών, θα είχε ενδιαφέρον η συσχέτιση των αποτελεσμάτων των αναλυτικών μεθόδων με τα σχόλια ενός έμπειρου πάνελ δοκιμαστών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Albertin, W. et al, 2014. Winemaking and bioprocesses strongly shaped the genetic diversity of the ubiquitous yeast *Torulaspora delbrueckii*.

American Industrial Hygiene Association, 2013

Asano T et al. 1999. Effect of NAD⁺-dependent isocitrate dehydrogenase gene (IDH1, IDH2) disruption of sake yeast on organic acid composition in sake mash. *J Biosci Bioeng* 88: 258–263.

Bahrman Helmut, Heinz-Dieter Hahn, Dieter Mayer (2005). "2-Ethylhexane". The Encyclopedia of Industrial Chemistry by Ullmann. Weinheim: Wiley-VCH.

Basso, R. F., Alcarde, A. R. & Barbosa, C., 2016. Could non-Saccharomyces yeasts contribute on innovative brewing fermentations?. *Food Research International*

Branyik, T. Vicente, AA, Dostalek, P., and Teixeira, JA (2008) Review of aroma formation in continuous beer fermentations, *J. Inst.*

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

Chisholm, Hugh, ed. (1911). "*Βουτυρικό οξύ*". *Encyclopædia Britannica*.4(11η έκδοση).Cambridge University Press.Π.892.

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

David J. Anneken, Sabine Both, Ralf Christoph, Georg Fieg, Udo Steinberner, Alfred Westfechtel "Fatty Acids" in the Encyclopedia of Industrial Chemistry by Ullmann, 2006, Wiley-VCH, Weinheim

Escott, C .; Del Fresno, JM. Loira, I.; Morata, A.; Tesfaye, W .; del Carmen González, M.; Suárez-Lepe, JA Formation of polymeric pigments in red wines by successive fermentation of flavanol-enriched musts with non-yeast *Saccharomyces*. *Food Chem.* 2018, 239, 975-983.

Fahlbusch, Karl-Georg; Hammerschmidt, Franz-Josef; Panten, Johannes; Pickenhagen, Wilhelm; Schatkowski, Dietmar; Bauer, Kurt; Garbe, Dorothea; Surburg, Horst (15 January 2003). Flavors and aromas. The Encyclopedia of Industrial Chemistry by Ullmann. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KG.

Fernández, M.; Ubeda, JF.Briones, AI Typing of non-yeast Saccharomyces with enzymatic activities of interest to vinification. *Int. J. Food Microbiol.* 2000

Gee, DA, and Ramirez, WF (1994) A taste model for beer fermentation, *J. Inst.*

Greig D., Leu JY, 2009. Natural history of hatching dough. *Curr. Biol.* 19: R886-R890.

Gunstone, FD, John L. Harwood και Albert J. Dijkstra. *The Lipid Handbook*, 3η έκδοση. Boca Raton: CRC Press, 2007

Ha, S.-J.και συν., 2011. Engineered *Saccharomyces cerevisiae* capable of simultaneous cellobiose and xylose fermentation.. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol.108, pp. 504-509.

Hazelwood, LA, Daran, JM, van Maris, AJA, Pronk, JT and Dickinson, JR (2008) The Ehrlich Road to Alcohol Production: A Century of Research on the Metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl. Microbiol.* 74, 2259-2266.

Hegarty PK et al. 1995. Phenyl ethanol—a factor determining lager character. *Proceedings of the European Brewery Convention Congress*, pp. 515–522

Hidalgo, C. C. και συν., 2014. Evaluation of Non-Saccharomyces yeasts for the reduction of alcohol content in wine. *Applied Environmental Microbiology* 80(5), March, pp. 1670-1678.

HOUGH, J. S.; BRIGGS, D. E.; STEVENS, R.; YOUNG, T. W.: *Malting and Brewing Science; Vol. 2. Hopped Wort and Beer*. Second edition. Chapman and Hall, New York, 1982. σελ. 420-692, 704-832.

Jolly, N. P., Augustyn , O. & Pretorius, I. S., 2006. *The Role and Use of Non-Saccharomyces Yeasts in Wine Production*.

KJ.Bauer, FF; Divol, B. The use of nitrogenous compounds with commercial non-Saccharomyces yeasts associated with wine. *Food Microbiol.* 2019, 79, 75-84.

Kobayashi, M., Nagahisa, K., Shimizu, H., and Shioya, S. (2006) Simultaneous control of concentrated extract and volatile concentrations in fermentation of low malt beer, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73, 549-558.

Kohlhaw GB. Leucine biosynthesis in fungi: entry into the metabolism through the back door. *Microbiol Mol Biol R* 2003; 67: 1-15.

Kurtzman, CP; Fell, JW *The Yeasts: A Taxonomic Study*, 4th ed .; Elsevier Science Publishers: Amsterdam, The Netherlands, 1998

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

Lodolo, EJ, Kock, JLF, Axcell, BC, and Brooks, M. (2008) The yeast *Saccharomyces cerevisiae* is the main character in brewing beer, *FEMS Yeast Res.* 8,1018-1036.

Loira, I.; Morata, A.; Bañuelos, MA; Suárez-Lepe, JA Isolation techniques, selection and identification of non-fermenting yeasts non-*Saccharomyces*. In *biotechnological progress and beverage consumption*. Volume 19: *The Science of Beverages*. Grumezescu, A., Holban, A.-M., Eds .; Elsevier Academic Press: Cambridge, MA, USA, Chapter 15, in the Press.

McMurry, John (2008). *Organic Chemistry (7th edition)*. Thompson - Brooks / Cole.p. 624.

Merck, 1989 *The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biology (11th Edition)*

Michel, M. et al, 2016. Screening for new brewing yeasts in the non-*Saccharomyces* sector with *Torulasporea delbrueckii* as model. *Yeast* 33, p. 129–144.

Michel, M. et al., 2016,b. Review: Pure non-*Saccharomyces* starter cultures for beer fermentation with a focus on secondary metabolites and practical applications. *Journal of the Institute of Brewing*

Mochizuki N., Kitabatake K. Analysis of 1- (2-furyl) propane-1,2-diol, a metabolite of furfural in beer. *J. Ferment. Bioeng.* 1997; 83: 401-403.

Mortimer RK, 2000. Evolution and change of the yeast genome (*Saccharomyces*). *Genome Res.* 10: 403-409.

Moyad, 2008. Brewer's/baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and preventive medicine: Part II.. US National Library of Medicine National Institutes of Health, 28 February

Nissen, P., Nissen, D. & Arneborg , N., 2003. Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by a cell-cell contact-mediated mechanism.. US National Library of Medicine National Institutes of Health

Nykänen, L. & Suomalainen, H. (1983) *Aroma of beer, wine and distilled spirits*, Berlin, Akademie-Verlag

Padilla, B., Gil, J. . V. & Manzanares , P., 2016. Past and Future of Non-Saccharomyces Yeasts: From Spoilage Microorganisms to Biotechnological Tool for Improving Wine Aroma Complexity. *Frontiers in Microbiology* 7, 31 May, p. 411.

Pérez-Prieto LJ, López-Roca JM, Martínez-Cutillas A., Pardo-Mínguez F., Gómez-Plaza E. Extraction and formation dynamics of volatile compounds associated with oaks from different volume barrels in wine and their behavior during bottle storage. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51: 5444-5449.

Purwanto, Y .; Munawaroh, Esti (2010). "Ethnobotani Jenis-Jenis Pandanaceae as Bahan Pangan di Indonesia" [Ethnobotanical types of Pandanaceae as food in Indonesia] (PDF). *Berkala Penelitian Hayati* (in Indonesian). 5A: 97–108 ..

Ribéreau-Gayon, P. *Handbook of Enology, Volume 1: The Microbiology of Wine and Vinifications*; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA, 2006; Volume 1, ISBN 9780470010341.

Riemenschneider, Wilhelm (2002). "Carboxylic acids, aliphatic". *Encyclopedia of Industrial Chemistry* by Ullmann. Weinheim: Wiley-VCH.

Robinson AL, Ebeler SE, Heymann H, Boss PK, Solomon PS, Trengove RD. (2009). "The interactions between the volatile compounds of the wine and the matrix components of grapes and wines affect the separation of the empty space of aroma synthesis." *J Agric Food Chem.* 2009 Nov 11 · 57 (21): 10313-22.

Rodrigues, F., Caldeira, M., and Camara, JS (2008) Development of a dynamic solid phase micro-extraction process in combination with GC-qMSD for the evaluation of chemical profile in alcoholic beverages, *Anal. Chim. Acta* 609, 82-104.

Santamauro, F.; Whiffin, FM. Scott, RJ. Chuck, CJ The production of low cost lipids from a rapeseed yeast grown in non-sterile conditions using standard waste pores. *Biotechnol. Biofuels* 2014.

Spillman PJ, Pollnitz AP, Liacopoulos D., Pardon KH, Sefton MA. Formation and degradation of furfuryl alcohol, 5-methylfurfuryl alcohol, vanillyl alcohol and their ethyl ethers in cask wines. *J. Agric. Food Chem.* 1998; 46: 657-663.

Tataridis, P., Kanellis, A., Logothetis, S. & Nerantzis, E., 2013. Use of non-Saccharomyces *Torulaspora delbrueckii* yeast strains in winemaking and brewing.. Зборник Матице српске за природне науке / Jour. Nat. Sci, Matica Srpska Novi Sad, № 124, pp. 415-426.

Thegoodscentcompany, 2009

Varela, C., 2016. The impact of non-Saccharomyces yeasts in the production.. Springer-Verlag Berlin Heidelberg Appl Microbiol Biotechnol, 100 (23), 27 October, pp. 9861-74.

White, Chris, 1968-Yeast: The Practical Guide to Beer Fermentation

Wolfe, KH. Shields, DC Molecular evidence for an ancient overlap of the entire yeast genome. Nature 1997, 387, 708-713

Xiros, C., Topakas, E. & Christakopoulos, P., 2013. Hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. WIRE Energy and Environment vol.2, pp. 663-654.

Yarrow, D. Genus 29. *Torulaspora lindneri*. In The Yeasts, A Taxonomic Study, 3rd ed.; Kreger-van Rij, NJW, Ed.; Elsevier Science: Amsterdam, The Netherlands, 1984; p. 434-439.

Yonezawa, T. & Fushiki, T., 2002. Testing for Taste and Flavor of Beer. In: J. F. Jackson & H. F. Linskens, eds. Analysis of Taste and Aroma. 2nd ed. Cham: SPRINGER, pp. 29-45.

Zhang, B.-Q.; Shen, J.-Y.; Duan, C.-Q.; Yan, G.-L. Use of native *Hanseniaspora vineae* and *Metschnikowia pulcherrima* co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* to enhance the variety of Vidal Blanc ice fragrances. Front. Microbiol. 2018, 9, 2303.

Zott, K.; Thibon, C.; Bely, M.; Lonvaud-Funel, A.; Dubourdieu, D.; Masneuf-Pomarede, I. Grape must which is not a microbial community *Saccharomyces*: Effects on volatile thiol release. Int. J. Food Microbiol. 2011, 151, 210-215.

Βαρβογλής, Α. (2005). Επίτομη Οργανική Χημεία. Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις Ζήτη.

Ευθυμίου, Μ.-Ν. Π., 2015. Μεταπτυχιακή μελέτη: Αξιολόγηση και βελτιστοποίηση της παραγωγής μεταβολικών προϊόντων με χρήση ελαιογόνων ζυμών., Αθήνα: Γεωπονικό πανεπιστήμιο Αθηνών.

Ταταρίδης, Π. & Κεχαγιά, Δ., 2010. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΥΝΟΠΟΙΗΣΗΣ – ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ-ΞΗΡΑΝΣΗ ΒΥΝΗΣ. 1η επιμ. Αθήνα: ΤΕΙ Αθήνας.

Ταταρίδης, Π. & Κεχαγιά, Δ., 2010. ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΟΓΔΟΟ ΛΥΚΙΣΚΟΣ– ΒΡΑΣΜΟΣ – ΘΕΡΜΟ & ΨΥΧΡΟ ΘΟΛΩΜΑ. Στο: ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΥΝΟΠΟΙΗΣΗΣ-ΖΥΘΟΠΟΙΗΣΗΣ. Αθήνα: ΤΕΙ Αθήνας, pp. 160-188.

Ταταρίδης, Π. & Κεχαγιά, Δ., 2010. ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ-ΞΗΡΑΝΣΗ ΒΥΝΗΣ. Στο: ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΥΝΟΠΟΙΗΣΗΣ. Αθήνα: ΤΕΙ Αθήνας, pp. 119-137.

Ταταρίδης, Π. & Κεχαγιά, Δ., 2010. Εργαστήριο Βυνοποίησης-Ζυθοποίησης. Στο: Ιστορική ανασκόπηση εξέλιξης της μύρα-Παραγωγικά στάδια. Αθήνα: ΤΕΙ Αθήνας, pp. 1-20.

Τσέκου Ιωάννης Β., 2003, Φυσιολογία Φυτών, τόμος Ι, Εκδοτικός οίκος Αδερφών Κυριακίδη α.ε., Θεσσαλονίκη.