



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
Τμήμα Επιστημών Οίνου, Αμπέλου και
Ποτών

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΖΥΘΟΥ ΜΕ ΜΗ ΣΥΜΒΑΤΙΚΕΣ ΖΥΜΕΣ

Πτυχιακή εργασία:

Τσαγκάρη Νίνα - Αικατερίνη

Επιβλέπουσα καθηγήτρια:

Δρόσου Φωτεινή

ΑΙΓΑΛΕΩ 2021

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ

Δρόσου Φωτεινή: Ακαδημαϊκή Υπότροφος.

Κουσίση Ελισάβετ: Επίκουρη Καθηγήτρια Επιστήμη
Οίνου/ Τεχνολογία Αλκοολικών Ζυμώσεων.

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

Δήλωση Συγγραφέα Πτυχιακής Εργασίας

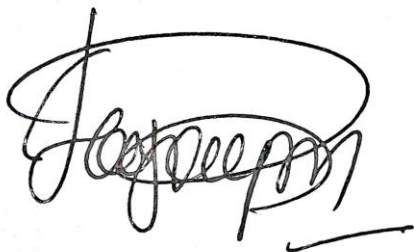
Η κάτωθι υπογεγραμμένη Τσαγκάρη Νίνα - Αικατερίνη του Παναγιώτη, με αριθμό μητρώου 718171096 φοιτήτρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστημών Οίνου, Αμπέλου και Ποτών, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«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».

Η Δηλούσα

Τσαγκάρη Νίνα – Αικατερίνη



ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ:

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την κυρία Δρόσου Φωτεινή, επιβλέπουσα της παρούσας εργασίας, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου το συγκεκριμένο θέμα. Θα ήθελα επίσης να την ευχαριστήσω για την αμέριστη υποστήριξη αλλά και καθοδήγησή της, για την υπομονή που έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας καθώς και για την παρότρυνση που μου παρείχε όλο αυτό το διάστημα για την πραγματοποίηση και ολοκλήρωση της εργασίας αυτής.

Τέλος θα ήθελα φυσικά να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους φίλους μου για την συνεχή στήριξή τους, καθώς και τους συμφοιτητές μου για τη βοήθεια τους κατά την παραγωγή του ζυθογλεύκου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια στον χώρο της ζυθοποιίας παρατηρείται μια αδιάκοπη έρευνα που αφορά στη βελτίωση και την αύξηση της αρωματικής πολυπλοκότητας των παραγόμενων προϊόντων. Κύριο αντικείμενο των ερευνών αυτών είναι οι ζυμομύκητες οι οποίοι μέσα από διαφορετικά μεταβολικά μονοπάτια είναι δυνατό να παράξουν ένα πλήθος ουσιών που επιδρούν στο αρωματικό προφίλ της μπίρας. Ένα σύνολο μικροοργανισμών που ανήκουν στην κατηγορία των non-*Saccharomyces* ζυμών μελετώνται για τις αρωματικές ενώσεις που τελικά παράγουν, με σκοπό να αντικαταστήσουν ή ακόμη και να δουλέψουν σε συνδυασμό με τον συμβατικό ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*.

Στην παρούσα εργασία επιχειρήθηκε η παραγωγή μπίρας τύπου American Pale Ale από μικτές καλλιέργειες του μη συμβατικού ζυμομύκητα *Metshnikowia pulcherrima* σε συνδυασμό με τον *Saccharomyces cerevisiae*. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκαν τέσσερις διαφορετικές ζυμώσεις του ίδιου ζυθογλεύκου. Οι ζυμώσεις διέφεραν ως προς την αναλογία των μικροοργανισμών στην καλλιέργεια και τη θερμοκρασία ζύμωσης. Έτσι πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις αναλογίας μικροοργανισμών 1:1 και 1:10 σε δύο θερμοκρασίες ζύμωσης 20 °C και 13 °C. Μελετήθηκαν πέρα από τον χρόνο ζύμωσης, τη συγκέντρωση των μη καταναλωθέντων σακχάρων, τη μεταβολή του pH, το ρυθμό κατανάλωσης του διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου και την περιεκτικότητα σε αιθανόλη, οι συγκεντρώσεις των παραγόμενων αρωματικών ενώσεων για τις διάφορες ζυμώσεις. Δείγματα για την μέτρηση των αρωματικών ενώσεων πάρθηκαν μια εβδομάδα μετά την εμφιάλωση καθώς και μετά από ένα μήνα παλαίωσης. Μελετήθηκε έτσι το αρωματικό προφίλ των διαφορετικών μπιρών. Ειδικότερα διαπιστώθηκε η έντονη παραγωγή ισοαμυλικής, ενεργής αμυλικής, τρυπτοφώλης και φαινυλαιθυλικής αλκοόλης. Σημαντικές ποσότητες οκτανοϊκού οξέος και αιθυλεστέρα οκτανοϊκού οξέος ανιχνεύθηκαν στις παραγόμενες μπίρες. Διακρήθηκαν έτσι ενδιαφέροντα στοιχεία φρούτων και λουλουδιών χωρίς τη συμβολή ουσιών με αρνητικά αρώματα (off-flavor).

Πραγματοποιήθηκε επίσης και ζύμωση καθαρής καλλιέργειας του ζυμομύκητα *Metshnikowia pulcherrima* σε δύο θερμοκρασίες (13 °C και 20 °C) για σύγκριση των αποτελεσμάτων του χρόνου ζύμωσης, της συγκέντρωσης των μη καταναλωθέντων σακχάρων, του ρυθμού κατανάλωσης του διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου, της περιεκτικότητας σε αιθανόλη και των παραγόμενων αρωματικών ενώσεων.

ABSTRACT

Nowadays the interest in using non-*Saccharomyces* yeast to ferment beer has been increased. Different yeast strains can produce beer with a unique and very complex aroma and flavour profile. Using non-conventional yeast gives brewers an unparalleled selling point to differentiate themselves. Studies have been made to find non-*Saccharomyces* yeast strains that are able to complete the fermentation in pure or mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae* in order to produce a normal gravity beer with desirable aroma features.

In this experiment mixed cultures of *Metshnikowia pulcherrima* in addition with *Saccharomyces cerevisiae* were evaluated for a Pale Ale beer production. In particular mixed cultures of *Metshnikowia pulcherrima* with the conventional yeast, in proportions 1:1 and 1:10, were used to ferment beer wort in an average temperatures of 20 °C and 13 °C. In addition to the fermentation time, the concentration of remaining sugars, the change in pH, the rate of

consumption of available ammonia nitrogen and the ethanol content, we detected the aromatic compounds of each beer. In order to study the aroma profile of the beers, samples were taken one week after bottling, and one month into aging. Moreover beers were characterized by a distinctive overall analytical and aromatic profile. Indeed, the non conventional yeast was found to be capable of producing aromatic components such as higher alcohols and esters which form a fruity and floral aromatic profile.

Fermentation of *Metshnikowia pulcherrima* pure culture was also performed at two temperatures (13 ° C and 20 ° C) in order to compare the results of fermentation time, concentration of remaining sugars, consumption rate of available ammonium content, available ammonia content and most importantly the aromatic compounds produced during the first week after bottling.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Τριμελής επιτροπή αξιολόγησης	2
Δήλωση συγγραφέα πτυχιακής εργασίας.....	3
Ευχαριστίες.....	4
Περίληψη	5
Abstract.....	5
Περιεχόμενα.....	7
Ευρετήριο εικονών	9
Ευρετήριο διαγραμμάτων	10
Ευρετήριο πινάκων	12
Εισαγωγή.....	14
Θεωρητικό μέρος	16
1.Η ιστορία της μπίρας.....	16
2.Τα βασικά στάδια παραγωγής της μπίρας.....	20
2.1 Βυνοποίηση.....	20
2.2 Ζυθοποίηση.....	21
3.Τα βασικά συστατικά της μπίρας.....	24
3.1 Η βύνη – Το κριθάρι	24
3.2 Το νερό – Τα ανόργανα συστατικά.....	25
3.3 Ο λυκίσκος	26
3.4 Οι ζύμες.....	28
3.4.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	33
3.4.2 Non- <i>Saccharomyces</i> ζύμες	35
3.4.3 <i>Metschnikowia pulcherrima</i>	37
4.Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της μπίρας.....	41
4.1 Το χρώμα	41
4.1.1 Η αντίδραση Maillard.....	41
4.1.2 Η οξειδωση των πολυφαινολών	41
4.2 Ο αφρός	41
4.3 Το θόλωμα	42
4.4 Άρωμα-γεύση (flavour)	42
4.4.1 Δευτερογενείς μεταβολίτες	43
4.4.2 Αλκοόλες.....	43

4.4.3 Οξέα.....	44
4.4.4 Εστέρες.....	45
4.4.5 Ενώσεις του θείου	46
4.4.6 Καρβονύλια-Ανεπιθύμητες ενώσεις	47
4.4.7 Φαινόλες	48
4.4.8 Εξωτερικοί παράγοντες	48
Πειραματικό μέρος	49
1. Σχεδιασμός πειραμάτων	49
2. Πειραματική διαδικασία.....	50
2.1 Αντιδραστήρια & Όργανα	50
2.2 Παρασκευή ζυθογλεύκους.....	51
2.3 Εμβολιασμός ζυθογλεύκους.....	52
3. Αναλυτικές μέθοδοι.....	53
3.1 Μέτρηση σακχάρων με πυκνόμετρο.....	53
3.2 Προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε αιθανόλη με αποσταξη.....	53
3.3 Μέτρηση διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου (FAN)	53
3.4 Ανάλυση αρωματικών	55
3.4.1 Διαδικασία εκχύλισης με στήλη Vigreux.....	55
3.4.2 Ανάλυση αρωματικών συστατικών με χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC-MS).....	55
4. Παρουσίαση αποτελεσμάτων και σχολιασμός.....	57
4.1 Πυκνότητα σακχάρων.....	57
4.2 Μεταβολή pH	62
4.3 Καμπύλες κατανάλωσης διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου.....	65
4.4 Προσδιορισμός αιθανόλης.....	70
4.5 Προσδιορισμός αρωματικού προφίλ.....	71
5. Συμπεράσματα	99
Βιβλιογραφία.....	101

Ευρετήριο εικόνων

Εικόνα 1: Ο ύμνος στη θεά της ζυθοποιίας Ninkasi (Ταταρίδης & Κεχαγιά, 2010).....	16
Εικόνα 2: Αιγυπτιακή τοιχογραφία που αναπαριστά τη διαδικασία ζυθοποίησης (Ταταρίδης & Κεχαγιά, 2010)	17
Εικόνα 3:Διάγραμμα ροής παραγωγής μπίρας.....	23
Εικόνα 4:Τα τέσσερα βασικά συστατικά της μπίρας (Pesce, 2015)	24
Εικόνα 5: Τα βασικά ζυμώσιμα σάκχαρα που προέρχονται από τη βύνη (Ταταρίδης & Κεχαγιά, 2010)	25
Εικόνα 6: Η ισομερίωση των α και β-οξέων του λυκίσκου (Lewis & Bamforth, 2006).....	26
Εικόνα 7: ο χημικός τύπος μερικών από τα πιο σημαντικά μονοτερπένια (Schönberger & Kostelecky, 2011)	28
Εικόνα 8: Καμπύλη ανάπτυξης μικροοργανισμού (Αρβανιτίδου-Βαγιωνά, 2016).....	29
Εικόνα 9: Εισροές και εκροές κατά την ζύμωση του γλεύκους (Lewis & Bamforth, 2006)	30
Εικόνα 10: Το μονοπάτι EMP (Embden-Meyerhof-Parnas) (Lewis & Bamforth, 2006)	31
Εικόνα 11: Η μετατροπή του πυροσταφυλικού οξέος σε αιθανόλη (Lewis & Bamforth, 2006)..	32
Εικόνα 12: Ο μικροοργανισμός <i>Saccharomyces cerevisiae</i> όπως φαίνεται από το μικροσκόπιο (König et al., 2009).....	33
Εικόνα 13: Ο μικροοργανισμός <i>Metschnikowi pulcherrima</i> όπως φαίνεται από το μικροσκόπιο (Fernandez et al., 2000).....	37
Εικόνα 14: Το μονοπάτι Ehrlich (Pires et al., 2014).....	44
Εικόνα 15: Η χημική αντίδραση που περιγράφει την παραγωγή του οξικού αιθυλεστέρα από αιθανόλη και οξικό οξύ (Pires et al., 2014)	46

Ευρετήριο διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1: Καμπύλη μείωσης της πυκνότητας των σακχάρων στο ζυμώμενο γλεύκος στους 13 °C με αναλογία μικροοργανισμών 1:1.....	57
Διάγραμμα 2: Καμπύλη μείωσης της πυκνότητας των σακχάρων στο ζυμώμενο γλεύκος στους 13 °C με αναλογία μικροοργανισμών 1:10	58
Διάγραμμα 3: Καμπύλη μείωσης της πυκνότητας των σακχάρων στο ζυμώμενο γλεύκος σε θερμοκρασία 20 °C με αναλογία μικροοργανισμών 1:1	58
Διάγραμμα 4: Καμπύλη μείωσης της πυκνότητας των σακχάρων στο ζυμώμενο γλεύκος σε θερμοκρασία 20 °C με αναλογία μικροοργανισμών 1:10	59
Διάγραμμα 5: Καμπύλες μείωσης της πυκνότητας των σακχάρων στο ζυμώμενο γλεύκος για τις διάφορες θερμοκρασίες και αναλογίες.....	59
Διάγραμμα 6: Καμπύλη μείωσης της πυκνότητας των σακχάρων στο ζυμώμενο γλεύκος της καθαρής καλλιέργειας <i>Metschnikowia pulcherrima</i> σε θερμοκρασία 13 °C	60
Διάγραμμα 7: Καμπύλη μείωσης της πυκνότητας των σακχάρων στο ζυμώμενο γλεύκος της καθαρής καλλιέργειας <i>Metschnikowia pulcherrima</i> σε θερμοκρασία 13 °C	60
Διάγραμμα 8: Καμπύλες μείωσης της πυκνότητας των σακχάρων στο ζυμώμενο γλεύκο της καθαρής καλλιέργειας <i>Metschnikowia pulcherrima</i> για τις διάφορες θερμοκρασίες.....	61
Διάγραμμα 9: Καμπύλη μεταβολής του pH στη μπίρα αναλογίας μικροοργανισμών 1:1 με θερμοκρασία ζύμωσης 13 °C	62
Διάγραμμα 10: Καμπύλη μεταβολής του pH στη μπίρα αναλογίας μικροοργανισμών 1:10 με θερμοκρασία ζύμωσης 13 °C	62
Διάγραμμα 11: Καμπύλη μεταβολής του pH στη μπίρα αναλογίας μικροοργανισμών 1:1 με θερμοκρασία ζύμωσης 20 °C	63
Διάγραμμα 12: Καμπύλη μεταβολής του pH στη μπίρα αναλογίας μικροοργανισμών 1:10 με θερμοκρασία ζύμωσης 20 °C	63
Διάγραμμα 13: Καμπύλες μεταβολής του pH στις μπίρες των διαφόρων αναλογιών και θερμοκρασιών.....	64
Διάγραμμα 14: Καμπύλη κατανάλωσης του διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου στη ζύμωση αναλογίας μικροοργανισμών 1:1 στη θερμοκρασία των 13 °C.....	65
Διάγραμμα 15: Καμπύλη κατανάλωσης του διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου στη ζύμωση αναλογίας μικροοργανισμών 1:10 στη θερμοκρασία των 13 °C.....	65
Διάγραμμα 16: Καμπύλη κατανάλωσης του διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου στη ζύμωση αναλογίας μικροοργανισμών 1:1 στη θερμοκρασία των 20 °C.....	66
Διάγραμμα 17: Καμπύλη κατανάλωσης του διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου στη ζύμωση αναλογίας μικροοργανισμών 1:10 στη θερμοκρασία των 20 °C.....	66
Διάγραμμα 18: Καμπύλες κατανάλωσης του διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου στις ζυμώσεις για τις διάφορες θερμοκρασίες και αναλογίες.....	67
Διάγραμμα 19: Καμπύλη κατανάλωσης του διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου στη ζύμωση της καθαρής καλλιέργειας <i>Metschnikowia pulcherrima</i> σε θερμοκρασία 13 °C	67
Διάγραμμα 20: Καμπύλη κατανάλωσης του διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου στη ζύμωση της καθαρής καλλιέργειας <i>Metschnikowia pulcherrima</i> σε θερμοκρασία 20 °C	68

Διάγραμμα 21: Καμπύλες κατανάλωσης του διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου στη ζύμωση της καθαρής καλλιέργειας <i>Metschnikowia pulcherrima</i> για τις διάφορες θερμοκρασίες.....	68
Διάγραμμα 22: Παραγόμενες αρωματικές ενώσεις κατά τη διάρκεια της πρώτης εβδομάδας από την εμφιάλωση στις μπίρες διαφορετικών αναλογιών ζυμομυκήτων και θερμοκρασιών ζύμωσης.....	78
Διάγραμμα 23: Παραγόμενες αρωματικές ενώσεις κατά τη διάρκεια της πρώτης εβδομάδας από την εμφιάλωση στις μπίρες διαφορετικών αναλογιών ζυμομυκήτων και θερμοκρασιών ζύμωσης.....	78
Διάγραμμα 24: Παραγόμενες αρωματικές ενώσεις κατά τη διάρκεια της πρώτης εβδομάδας από την εμφιάλωση στις μπίρες καθαρής καλλιέργειας <i>Metschnikowia pulcherrima</i>	79
Διάγραμμα 25: Παραγόμενες αρωματικές ενώσεις κατά τη διάρκεια της πρώτης εβδομάδας από την εμφιάλωση στις μπίρες καθαρής καλλιέργειας <i>Metschnikowia pulcherrima</i>	79
Διάγραμμα 26: Παραγόμενες αρωματικές ενώσεις κατά τη διάρκεια του πρώτου μήνα παλαίωσης στις μπίρες διαφορετικών αναλογιών ζυμομυκήτων και θερμοκρασιών ζύμωσης.....	83
Διάγραμμα 27: Παραγόμενες αρωματικές ενώσεις κατά τη διάρκεια του πρώτου μήνα παλαίωσης στις μπίρες διαφορετικών αναλογιών ζυμομυκήτων και θερμοκρασιών ζύμωσης.....	83
Διάγραμμα 28: Συγκριτικό διάγραμμα των αρωματικών ενώσεων που παράχθηκαν στη μπίρα αναλογίας 1:1 (13 °C ζύμωσης) κατά την πρώτη εβδομάδα και τον πρώτο μήνα παλαίωσης.....	88
Διάγραμμα 29: Συγκριτικό διάγραμμα των αρωματικών ενώσεων που παράχθηκαν στη μπίρα αναλογίας 1:1 (13 °C ζύμωσης) κατά την πρώτη εβδομάδα και τον πρώτο μήνα παλαίωσης.....	88
Διάγραμμα 30: Συγκριτικό διάγραμμα των αρωματικών ενώσεων που παράχθηκαν στη μπίρα αναλογίας 1:1 (13 °C ζύμωσης) κατά την πρώτη εβδομάδα και τον πρώτο μήνα παλαίωσης.....	91
Διάγραμμα 31: Συγκριτικό διάγραμμα των αρωματικών ενώσεων που παράχθηκαν στη μπίρα αναλογίας 1:1 (13 °C ζύμωσης) κατά την πρώτη εβδομάδα και τον πρώτο μήνα παλαίωσης.....	91
Διάγραμμα 32: Συγκριτικό διάγραμμα των αρωματικών ενώσεων που παράχθηκαν στη μπίρα αναλογίας 1:1 (13 °C ζύμωσης) κατά την πρώτη εβδομάδα και τον πρώτο μήνα παλαίωσης.....	94
Διάγραμμα 33: Συγκριτικό διάγραμμα των αρωματικών ενώσεων που παράχθηκαν στη μπίρα αναλογίας 1:1 (13 °C ζύμωσης) κατά την πρώτη εβδομάδα και τον πρώτο μήνα παλαίωσης.....	94
Διάγραμμα 34: Συγκριτικό διάγραμμα των αρωματικών ενώσεων που παράχθηκαν στη μπίρα αναλογίας 1:1 (13 °C ζύμωσης) κατά την πρώτη εβδομάδα και τον πρώτο μήνα παλαίωσης.....	97
Διάγραμμα 35: Συγκριτικό διάγραμμα των αρωματικών ενώσεων που παράχθηκαν στη μπίρα αναλογίας 1:1 (13 °C ζύμωσης) κατά την πρώτη εβδομάδα και τον πρώτο μήνα παλαίωσης.....	97

Ευρετήριο πινάκων

Πίνακας 1: Ποσότητες ξηρής ζύμης για τον εμβολιασμό του ζυθογλεύκους.....	52
Πίνακας 2: Περιεκτικότητα σε αιθανόλη (ABV) στις μπίρες των διαφόρων αναλογιών και θερμοκρασιών.....	70
Πίνακας 3: Το χαρακτηριστικό άρωμα και το όριο ανίχνευσης όλων των ουσιών που προέκυψαν από την αέρια χρωματογραφία μάζας	71
Πίνακας 4: Συγκριτικός πίνακας των αλκοολών που παράχθηκαν στην κάθε μπίρα κατά την πρώτη εβδομάδα από την ημέρα εμφιάλωσης	73
Πίνακας 5: Συγκριτικός πίνακας των οξέων που παράχθηκαν στην κάθε μπίρα κατά την πρώτη εβδομάδα από την ημέρα εμφιάλωσης.....	74
Πίνακας 6: Συγκριτικός πίνακας των εστέρων που παράχθηκαν στην κάθε μπίρα κατά την πρώτη εβδομάδα από την ημέρα εμφιάλωσης	75
Πίνακας 7: Συγκριτικός πίνακας των λοιπών αρωματικών ενώσεων που παράχθηκαν στην κάθε μπίρα κατά την πρώτη εβδομάδα από την ημέρα εμφιάλωσης.....	76
Πίνακας 8: Συγκριτικός πίνακας των αλκοολών που παράχθηκαν από την κάθε ζύμωση κατά τον πρώτο μήνα παλαίωσης	80
Πίνακας 9: Συγκριτικός πίνακας των οξέων που παράχθηκαν στην κάθε μπίρα κατά τον πρώτο μήνα παλαίωσης.....	80
Πίνακας 10: Συγκριτικός πίνακας των εστέρων που παράχθηκαν στην κάθε μπίρα κατά τον πρώτο μήνα παλαίωσης	81
Πίνακας 11: Συγκριτικός πίνακας των λοιπών αρωματικών ενώσεων που παράχθηκαν στην κάθε μπίρα κατά τον πρώτο μήνα παλαίωσης.....	82
Πίνακας 12: Συγκριτικός πίνακας των αλκοολών που παράχθηκαν στη μπίρα αναλογίας 1:1 (13 °C ζύμωσης) κατά την πρώτη εβδομάδα και τον πρώτο μήνα παλαίωσης	86
Πίνακας 13: Συγκριτικός πίνακας των οξέων που παράχθηκαν στη μπίρα αναλογίας 1:1 (13 °C ζύμωσης) κατά την πρώτη εβδομάδα και τον πρώτο μήνα παλαίωσης	86
Πίνακας 14: Συγκριτικός πίνακας των εστέρων που παράχθηκαν στη μπίρα αναλογίας 1:1 (13 °C ζύμωσης) κατά την πρώτη εβδομάδα και τον πρώτο μήνα παλαίωσης	87
Πίνακας 15: Συγκριτικός πίνακας των λοιπών αρωματικών ενώσεων που παράχθηκαν στη μπίρα αναλογίας 1:1 (13 °C ζύμωσης) κατά την πρώτη εβδομάδα και τον πρώτο μήνα παλαίωσης.....	87
Πίνακας 16: Συγκριτικός πίνακας των αλκοολών που παράχθηκαν στη μπίρα αναλογίας 1:10 (13 °C ζύμωσης) κατά την πρώτη εβδομάδα και τον πρώτο μήνα παλαίωσης	89
Πίνακας 17: Συγκριτικός πίνακας των οξέων που παράχθηκαν στη μπίρα αναλογίας 1:10 (13 °C ζύμωσης) κατά την πρώτη εβδομάδα και τον πρώτο μήνα παλαίωσης	89
Πίνακας 18: Συγκριτικός πίνακας των εστέρων που παράχθηκαν στη μπίρα αναλογίας 1:10 (13 °C ζύμωσης) κατά την πρώτη εβδομάδα και τον πρώτο μήνα παλαίωσης	90
Πίνακας 19: Συγκριτικός πίνακας των λοιπών αρωματικών ενώσεων που παράχθηκαν στη μπίρα αναλογίας 1:10 (13 °C ζύμωσης) κατά την πρώτη εβδομάδα και τον πρώτο μήνα παλαίωσης.....	90
Πίνακας 20: Συγκριτικός πίνακας των αλκοολών που παράχθηκαν στη μπίρα αναλογίας 1:1 (20°C ζύμωσης) κατά την πρώτη εβδομάδα και τον πρώτο μήνα παλαίωσης	92

Πίνακας 21: Συγκριτικός πίνακας των οξέων που παράχθηκαν στη μπίρα αναλογίας 1:1 (20°C ζύμωσης) κατά την πρώτη εβδομάδα και τον πρώτο μήνα παλαίωσης	92
Πίνακας 22: Συγκριτικός πίνακας των εστέρων που παράχθηκαν στη μπίρα αναλογίας 1:1 (20°C ζύμωσης) κατά την πρώτη εβδομάδα και τον πρώτο μήνα παλαίωσης	93
Πίνακας 23: Συγκριτικός πίνακας των λοιπών αρωματικών ενώσεων που παράχθηκαν στη μπίρα αναλογίας 1:1 (20°C ζύμωσης) κατά την πρώτη εβδομάδα και τον πρώτο μήνα παλαίωσης.....	93
Πίνακας 24: Συγκριτικός πίνακας των αλκοολών που παράχθηκαν στη μπίρα αναλογίας 1:10 (20°C ζύμωσης) κατά την πρώτη εβδομάδα και τον πρώτο μήνα παλαίωσης	95
Πίνακας 25: Συγκριτικός πίνακας των οξέων που παράχθηκαν στη μπίρα αναλογίας 1:10 (20°C ζύμωσης) κατά την πρώτη εβδομάδα και τον πρώτο μήνα παλαίωσης	95
Πίνακας 26: Συγκριτικός πίνακας των εστέρων που παράχθηκαν στη μπίρα αναλογίας 1:10 (20°C ζύμωσης) κατά την πρώτη εβδομάδα και τον πρώτο μήνα παλαίωσης	96
Πίνακας 27: Συγκριτικός πίνακας των λοιπών αρωματικών ενώσεων που παράχθηκαν στη μπίρα αναλογίας 1:10 (20°C ζύμωσης) κατά την πρώτη εβδομάδα και τον πρώτο μήνα παλαίωσης.....	96

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η μπίρα ανακαλύφθηκε περίπου το 3.000 π.Χ. σε περιοχές όπως η Μεσοποταμία, η Κίνα και η αρχαία Αίγυπτος. Σήμερα, τα παλαιότερα αποδεικτικά στοιχεία αναφέρονται στους Σουμέριους, οι οποίοι ανακάλυψαν τη ζύμωση κατά τύχη. Η μπίρα φαίνεται από τα αρχαία χρόνια να αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της κοινωνικής αλλά και της οικονομικής ζωής πολλών πολιτισμών.

Η λέξη μπίρα προέρχεται από την ιταλική λέξη birra, η οποία με τη σειρά της προέρχεται από τη λατινική -bibere (ελλ. ποτό), και συνδέεται με το λατινικό ρήμα -bibere (ελλ. πίνω) και από την ισπανική Cerveza που είναι μετάφραση του ονόματος της Ελληνίδας θεάς της καλλιέργειας, Δήμητρας. Η λέξη ζύθος σχετίζεται από το ρήμα ζέω, δηλαδή βράζω. Μπίρα (ζύθος) είναι ένα αλκοολούχο ποτό που προκύπτει από την εκχύλιση βυνοποιημένου κριθαριού (ή μίγματος αυτού με άλλα δημητριακά), την προσθήκη βοτάνων όπως είναι ο λυκίσκος καθώς και την αλκοολική ζύμωση των σακχάρων που προέκυψαν από τη σακχαροποίηση του αμύλου με τη χρήση ζυμομυκήτων. Το άμυλο και τα ένζυμα, που προκαλούν τη σακχαροποίηση προέρχονται, κατά κανόνα, από βυνοποιημένα δημητριακά, συνήθως βυνοποιημένο κριθάρι και βυνοποιημένο σιτάρι, μπορούν όμως να χρησιμοποιηθούν εν μέρει και άλλες πηγές σακχάρων ή αμύλου. Η βιομηχανία παραγωγής της είναι σήμερα πολύ ανεπτυγμένη περιλαμβάνοντας αρκετές και οικονομικά ισχυρές πολυεθνικές εταιρείες.

Η ποικιλομορφία της μπίρας συγκαταλέγεται στα χαρακτηριστικά της που την αναδεικνύουν ως ένα από τα πιο δημοφιλή αλκοολούχα ποτά του σύγχρονου κόσμου και ένα από τα κατεξοχήν προτερήματά της είναι το γεγονός ότι συναντάται σε πολλές διαφορετικές παραλλαγές και είδη. Η υψηλή ζήτηση από τους καταναλωτές και η ανταγωνιστικότητα μεταξύ των διαφορετικών ζυθοποιιών έχουν οδηγήσει στην ανάγκη βελτίωσης της ποιότητας της μπίρας και αύξησης της πολυπλοκότητας της. Τα αρώματα της μπίρας προέρχονται από τα τέσσερα βασικά συστατικά της, τη ζύμη, το νερό, τη βύνη και τον λυκίσκο. Από τα τέσσερα αυτά συστατικά η ζύμη είναι εκείνο το οποίο θεωρείται ότι μπορεί να επιφέρει σημαντικές αλλαγές στο αρωματικό προφίλ της μπίρας καθώς μεταβολίζοντας τα σάκχαρα του γλεύκους εκτός από αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα παράγει και πολλά αρωματικά συστατικά. Κατά συνέπεια η καινοτομία στο παραδοσιακό προϊόν θεωρείται ότι θα έρθει μέσα από την μελέτη εναλλακτικών μη συμβατικών μικροοργανισμών. Η πλειοψηφία των μη συμβατικών μικροοργανισμών που μελετώνται για τη δυνατότητά τους να μεταβολίσουν τα σάκχαρα του βυνογλεύκους προέρχονται από την βιομηχανία της οινοποίησης.

Οι βασικές κατηγορίες της μπίρας είναι οι αφροζύμωτες (ale) και οι βυθοζύμωτες (lager), οι οποίες διαφέρουν ως προς τον μικροοργανισμό ζύμωσης, τη θερμοκρασία και τον χρόνο μεταζύμωσης. Συγκεκριμένα οι αφροζύμωτες μπίρες ζυμώνονται από τον μύκητα *Saccharomyces cerevisiae* σε θερμοκρασία 15-23 °C και η μεταζύμωση διαρκεί μικρό χρονικό διάστημα. Οι βυθοζύμωτες μπίρες παράγονται από τον *Saccharomyces carlsbergensis* σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (6-12 °C) και η μεταζύμωση διαρκεί μερικούς μήνες. Ως τρίτη κατηγορία μπίρας μπορεί να θεωρηθεί η μπίρα που προέρχεται από αυθόρμητη ζύμωση (lambic), δηλαδή ζυμώνεται από μικροοργανισμούς του περιβάλλοντος σε ανοιχτά δοχεία. Παρά τα βασικά χαρακτηριστικά τα τριών αυτών ειδών μπίρας ο κάθε ζυθοποιός μπορεί με ορισμένες παραλλαγές να παρασκευάσει μπίρα με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά.

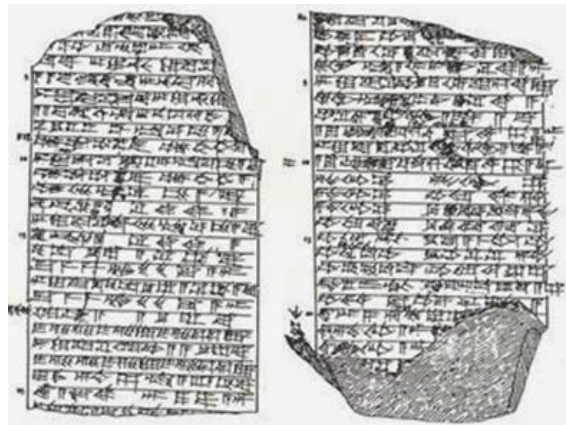
Στην παρούσα εργασία θα εξετάσουμε την πορεία της ζύμωσης καθώς και τα αρωματικά χαρακτηριστικά που προσδίδουν πολυπλοκότητα στην παραγόμενη μπίρα, χρησιμοποιώντας

τον non-*Saccharomyces* μικροοργανισμό *Metschnikowia pulcherrima* σε μικτές καλλιέργειες με τον *Saccharomyces cerevisiae*.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο Η ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΗΣ ΜΠΙΡΑΣ

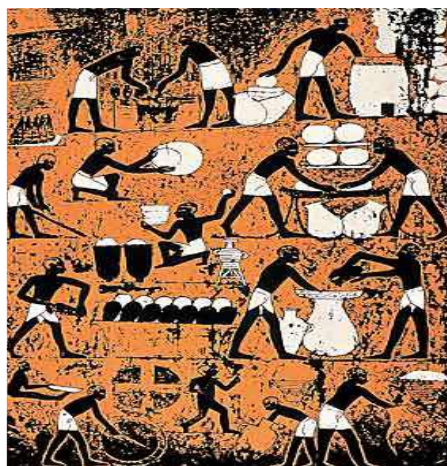
Η πρώτη απόπειρα παρασκευής μπίρας χρονολογείται μεταξύ 5500-3100π.Χ. και αποδίδεται στους Σουμέριους στην περιοχή της Μεσοποταμίας (Ταταρίδης & Κεχαγιά, 2010). Οι Σουμέριοι παρατήρησαν ότι με τη διαβροχή και έπειτα την ξήρανση του κριθαριού προέκυπτε ένα πιο γλυκό και πιο ανθεκτικό στο χρόνο προϊόν. Αυτού του είδους η επεξεργασία του κριθαριού οδηγεί σε ένα προϊόν που σήμερα είναι γνωστό ως βύνη (Basso et al., 2016). Αρχαιολογικές πηγές αναφέρουν ότι εκείνη την περίοδο η μπίρα είχε ως πρώτη ύλη κριθάρι, σιτάρι ή και τα δύο. Η έκθεση αυτών των συστατικών στον αέρα του περιβάλλοντος προκαλούσε την επιμόλυνση αυτών από μύκητες της ατμόσφαιρας με αποτέλεσμα να ξεκινήσει η ζύμωση. Ορισμένες πηγές, όπως είναι ο «Ύμνος στη Ninkasi» ο οποίος είναι ένας ύμνος στη θεά της ζυθοποιίας αλλά ταυτόχρονα αποτελεί και συνταγή μπίρας, αναφέρουν ότι πριν ξεκινήσει η ζύμωση προσέθεταν στο παραπάνω μίγμα κρασί και μέλι (Orrenheim, 1964). Η αυτοκρατορία των Σουμέριων κατάστράφηκε τη 2η χιλιετία π.Χ., την περίοδο που άρχισε να αναπτύσσεται ο πολιτισμός των Βαβυλώνιων. Οι τελευταίοι γνώριζαν πολύ καλά την τέχνη της μπίρας, αυξάνοντας τον αριθμό διαφορετικών ειδών μπίρας από 9 σε 70 χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη άσπρο δίκοκκο σιτάρι γνωστό και ως emmer και κριθάρι (Meussdoerffer & Eßlinger, 2009). Όμως οι μπίρες αυτές ήταν θολές αφιλτράριστες και αρκετά πικρές, καθώς δεν είχαν την τεχνογνωσία για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων μετά το πέρας της ζύμωσης (Lutz, 1922). Παρ' όλα αυτά, η μπίρα τους εξαγόταν ακόμη και στην Αίγυπτο που βρισκόταν 1000 χιλιόμετρα μακριά. Αναφέρεται ακόμα ότι ο Hammurabi, ένας από τους πιο σημαντικούς Βαβυλώνιους βασιλιάδες, ανάμεσα στους νόμους που συνέταξε, περιελάμβανε και έναν που καθόριζε την επιτρεπόμενη ημερήσια κατανάλωση μπίρας ανάλογα με την κοινωνική θέση του ατόμου. (Ταταρίδης & Κεχαγιά, 2010).



Εικόνα 1: Ο ύμνος στη θεά της ζυθοποιίας Ninkasi (Ταταρίδης & Κεχαγιά, 2010).

Με την πάροδο των χρόνων τα ηνία στη ζυθοποιία ανέλαβαν οι Αιγύπτιοι, και η πρώτη ιστορική αναφορά χρονολογείται περίπου το 3500 π.Χ.. Οι Αιγύπτιοι για την παρασκευή μπίρας, χρησιμοποίησαν κριθάρι, ενώ μερικές μόνο παράγονταν εξ ολοκλήρου από emmer. Στις περισσότερες αιγυπτιακές μπίρες χρησιμοποιούταν ένας ειδικός τύπος ψωμιού ή ξινής ζύμης ως πηγή ζύμης και γαλακτικού οξέος (Meussdoerffer & Eßlinger, 2009). Στα αρχαία αιγυπτιακά κείμενα, η μπίρα αναφέρεται ως ποτό, ως συστατικό φαρμάκων και ως προσφορά στους θεούς και στους νεκρούς. Ο αρχαίος Έλληνας ιστορικός Ηρόδοτος έγραψε ότι οι Αιγύπτιοι συνήθως

προσθέτανε χουρμάδες για να βελτιώσουν τη γεύση της. Το πόσο σημαντική ήταν για αυτούς φαίνεται από το γεγονός ότι έφτιαζαν ένα ιερογλυφικό αποκλειστικά για την παραγωγή μπίρας. Οι Αρχαίοι Έλληνες φαίνεται πως ήρθαν σε επαφή με τη μπίρα από τους Αιγύπτιους, και χρησιμοποιούσαν λυκίσκο στην παρασκευή της. Τη θεωρούσαν βέβαια ποτό κατώτερης ποιότητας από το κρασί, όπως συνέβαινε και στην αρχαία Ρώμη όπου ο κρασί ήταν το ποτό των θεών και έτσι θεωρούσαν την μπίρα ποτό των Βαρβάρων. Η παραγωγή της γινόταν μόνο στις επαρχίες της ρωμαϊκής αυτοκρατορίας όπου ήταν δύσκολη η καλλιέργεια ή η προμήθεια σταφυλιών. Παράλληλα η παραγωγή μπίρας διαδίδεται και σε άλλα μέρη του κόσμου όπου παράγεται από διάφορες πρώτες ύλες όπως για παράδειγμα βρίσκουμε την Changisa (μπίρα τύπου Θιβέτ), την Chichais από καλαμπόκι και την Kumis από γάλα καμήλας (Nicholson & Shaw, 2000).



Εικόνα 2: Αιγυπτιακή τοιχογραφία που αναπαριστά τη διαδικασία ζυθοποίησης (Ταταρίδης & Κεχαγιά, 2010).

Στην κεντρική Ευρώπη, όπου σήμερα χτυπά η καρδιά της μπίρας, οι Κέλτες, οι Γαλάτες και οι Γερμανοί συνέβαλαν πολύ στην εξέλιξη της ζυθοποιίας. Η αρχή της δραστηριότητας αυτών των λαών με τη μπίρα χρονολογείται περίπου πριν από 6000 χρόνια. Μεγάλη ώθηση στη ζυθοποιητική τέχνη έδωσαν οι μοναστηριακές ζυθοποιίες στη Γερμανία, πολλές δε από αυτές είχαν και τμήματα έρευνας, εκ των οποίων ένα εξελίχθηκε στο εγκυρότερο πανεπιστημιακό ινστιτούτο για την έρευνα της μπίρας (Weihenstephan) (Ταταρίδης & Κεχαγιά, 2010). Εκείνη την εποχή οι Σκανδιναβοί και οι Γερμανοί χρησιμοποιούσαν κατά την παρασκευή της μπίρας ένα μείγμα από βότανα και φυτά, ονομασμένο “gruit” το οποίο περιείχε μεταξύ άλλων γλυκάνισο, δεντρολίβανο, μούρα και σπόρους. Κάποια από αυτά τα φυτά ήταν όμως δηλητηριώδη, δίνοντας άσχημη γεύση στη μπίρα, ή δημιουργώντας παρενέργειες σε αυτούς που την έπιναν. Η εύρεση του λυκίσκου είχε ως αποτέλεσμα το πιο μεγάλο γεγονός μέχρι και σήμερα για τη μπίρα, τον πρώτο νόμο καθαρότητας που δημιουργήθηκε με την γενική επίβλεψη και υπογραφή των Γερμανών. Ο νόμος αυτός συντάχθηκε το 1516 και το περιεχόμενο του αναφέρει τα μοναδικά 4 συστατικά που επιτρέπεται να χρησιμοποιηθούν για τη δημιουργία της μπίρας τα οποία είναι το νερό, το βυνοποιημένο κριθάρι, το βυνοποιημένο σιτάρι και ο λυκίσκος (Meussdoerffer & Eßlinger, 2009). Κατά το 15^ο αιώνα καθιερώνεται η εμπορική ζυθοποιία και θεσπίζεται ο πρώτος και πιο παλιός κανονισμός που είναι ακόμα σε ισχύ. Το 1516 μ.Χ. ο δούκας της Βαυαρίας, Wilhelm IV, καθιέρωσε με νόμο (Beer Purity Law) τις προδιαγραφές που έπρεπε να έχει η γερμανική μπίρα αναφορικά με την ποιότητα, σύμφωνα με τον οποίο τα μόνα

συστατικά που επιτρέπεται να έχει είναι: νερό, λυκίσκος και βύνη κριθαριού (Der 11 Spiegel, 2008).

Βαβυλώνα: Η θεότητα της μπίρας Νιβάδα και η θεότητα του Κριθαριού, Νινούρτα αποτελούσαν τις θεότητες της ίασης.

Αίγυπτος: Η μπίρα, συνοδευτικό ποτό, "νόμισμα" ανταλλαγής, αλλά και θεραπευτικό με την προσθήκη του στα μπάνια.

Ελλάδα: Για τον Ιπποκράτη η μπίρα ήταν ένα φάρμακο κατά του πυρετού που ευνοούσε την απομάκρυνση των τοξινών.

Ρώμη: Την πρότειναν στις γυναίκες που θήλαζαν αφού βοηθούσε στην παραγωγή γάλακτος.

Γαλάτες: Η μπίρα είχε το όνομά της, Cerevisia, προς τιμήν της Θεάς της συγκομιδής. Ο ζύθος θεωρείτο δυναμωτικό ποτό.

Βίκινγκς: Διορατικοί, μετέφεραν και παρασκεύαζαν την μπίρα πάνω στα καράβια για να αποφύγουν την ανεπάρκεια βιταμινών.

Κατά τη διάρκεια της βιομηχανικής επανάστασης η παραγωγή μπίρας εξελίχθηκε από μικρής κλίμακας παραγωγή σε βιομηχανική παραγωγή και η εγχώρια παραγωγή έπαψε να είναι σημαντική μέχρι το τέλος του 19^{ου} αιώνα (Cornell & Martyn, 2003). Στη σύγχρονη εποχή και συγκεκριμένα στις αρχές του 19^{ου} αιώνα δύο επαναστατικές ανακαλύψεις συμβάλουν στην παραγωγή της μπίρας. Η πρώτη ήταν η ατμομηχανή του James Watt, που είχε σαν αποτέλεσμα να πάρει η μπίρα το δρόμο της βιομηχανοποίησης και η δεύτερη ήταν η τεχνητή ψύξη από τον Carl von Linde με αποτέλεσμα να μπορεί η μπίρα να παράγεται όλο τον χρόνο (Meusssdoerffer & Eßlinger, 2009), με αποτέλεσμα η βιομηχανία να επεκτείνεται από τα τοπικά ζυθοποιεία, με μεγάλες ζυθοποιείες να δημιουργούνται στην Ευρώπη και σε νέες αναπτυσσόμενες χώρες όπως η Αμερική. Μια ακόμη ανακάλυψη ήταν του Louis Pasteur ο οποίος διαπίστωσε ότι ενώ η επιθυμητή παραγωγή της αλκοόλης γινόταν από τις ζύμες, ανεπιθύμητα προϊόντα της ζύμωσης οφείλονταν στη δράση άλλων μικροοργανισμών, όπως τα βακτήρια. Σαν λύση στο πρόβλημα πρότεινε τη θέρμανση του ζύθου σε υψηλές θερμοκρασίες, έτσι ώστε να θανατωθούν τα ανεπιθύμητα βακτήρια (pasteurization). Μια άλλη μεγάλη ανακάλυψη σχετικά με τη μπίρα έγινε από τον Christian Hansen, στα εργαστήρια της Carlsberg, ο οποίος απομόνωσε με επιτυχία ένα κύτταρο ζύμης, με το οποίο παρήγαγε καθαρή καλλιέργεια ζυμών. Με τον τρόπο αυτό η ζύμωση της μπίρας βελτιώθηκε και η γεύση της τελειοποιήθηκε. Η τελευταία συμβολή για την παραγωγή της μπίρας όπως την ξέρουμε σήμερα έγινε το 1964 όταν τα ξύλινα βαρέλια αντικαταστάθηκαν από μεταλλικά διευκολύνοντας έτσι το καθάρισμα, το γέμισμα, το κλείσιμο και το σφράγισμα (Ταταρίδης & Κεχαγιά, 2010).

Μεσαίωνας: Η μπίρα αποτελούσε προστασία κατά των επιδημιών. Ο St. Arnould νίκησε τη χολέρα με τη βοήθεια της μπίρας.

Αναγέννηση: Χάρη στις θεραπευτικές ικανότητες της μπίρας, οι ζυθοποιοί θεωρούνται εξαιρετικοί φαρμακοποιοί.

18^{ος} αιώνας: Το 1842 στο Pilsen της Βοημίας παρασκευάζεται η πρώτη διαυγής μπίρα (pils).

19^{ος} αιώνας: Χάρη στις διατριβές που έγιναν πάνω στην μπίρα, ο Pasteur ανακάλυψε τη διαδικασία ζύμωσης και ανέπτυξε την έρευνα πάνω στα ένζυμα.

20^{ος} αιώνας: Οι διαιτολόγοι "ανακαλύπτουν" ξανά τις αρετές της μπίρας, ως πηγή βιταμινών, γλυκιδίων και μεταλλικών στοιχείων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο ΤΑ ΒΑΣΙΚΑ ΣΤΑΔΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΗΣ ΜΠΙΡΑΣ

Κατά το πρώτο στάδιο το κριθάρι καθαρίζεται, διαβρέχεται και αφήνεται να βλαστήσει ώσπου εμφανίζονται τα ένζυμα που διασπούν το άμυλο. Ακολουθεί ξήρανση με θερμό αέρα με αποτέλεσμα την παραγωγή της βύνης. Στη συνέχεια, κατά τη ζυθοποίηση, η βύνη αρχικά αλέθεται, μετά εκχυλίζεται με ζεστό νερό και στο τέλος γίνεται διήθηση του εκχυλίσματος και παραλαβή του ζυθογλεύκους. Ακολουθεί ψύξη του ζυθογλεύκους και προσθήκη της ζύμης. Επιτυγχάνεται η αλκοολική ζύμωση και παραγωγή αλκοόλης και CO₂. Έπειτα ο ζύθος αποθηκεύεται για να ωριμάσει και πριν την εμφιάλωση και τη διάθεση στον καταναλωτή γίνεται το φιλτράρισμα της μπίρας. Η παραγωγική διαδικασία για τη δημιουργία της μπίρας ακολουθεί κάποια βασικά στάδια ανεξάρτητα από τη χώρα κατάγωγής της, τον ειδικό τύπο της και το εκάστοτε ζυθοποιείο. Τα στάδια αυτά είναι:

2.1 ΒΥΝΟΠΟΙΗΣΗ:

Η βυνοποίηση, είναι η διαδικασία παραγωγής της βύνης. Κύριος στόχος της διαδικασίας αυτής είναι ο σχηματισμός των ενζύμων (α-αμυλάση, β-αμυλάση, πρωτεάσες κ.ά.) στους σπόρους των δημητριακών. Είναι δηλαδή η μετατροπή του κριθαριού σε βύνη. Τα παραγωγικά στάδια της βυνοποίησης αποτελούνται από τα εξής, την παραλαβή, τη διαβροχή, τη βλάστηση και τη φρύξη/ξήρανση.

- Κατά την παραλαβή και διαλογή της πρώτης ύλης πραγματοποιείται έλεγχος των προδιαγραφών καταλληλότητας του κριθαριού για βυνοποίηση. Στο στάδιο αυτό παραλαμβάνονται οι σπόροι κριθαριού και στη συνέχεια ακολουθούν μηχανικές και χημικοτεχνικές αναλύσεις αυτού ώστε να διαπιστωθεί η καταλληλότητά του για παραγωγή βύνης (Ταταρίδης & Κεχαγιά, 2010). Αφού η πρώτη ύλη κριθεί κατάλληλη, πραγματοποιείται καθαρισμός αυτής από ξένες ύλες, με τη βοήθεια απορροφητήρων και ταξινόμηση των σπόρων κατά μέγεθος με τη χρήση παλλόμενων κόσκινων (Gurta et al., 2010). Στο σημείο αυτό, γίνεται μακροσκοπική εξέταση, μηχανικές, χημικοτεχνικές αναλύσεις του κριθαριού και ζύγιση του σπόρου.
- Ακολουθεί το στάδιο της διαβροχής κατά την οποία οι σπόροι διαβρέχονται με νερό έως ότου φτάσουν σε μια αρχική υγρασία 30% όπου αρχίζει η βλάστηση τους. Με την πάροδο του χρόνου όμως τα επίπεδα υγρασίας πρέπει να φτάσουν περίπου 40-48% ώστε να γίνουν οι επιθυμητές μετατροπές των πολύτιμων ουσιών (άμυλο) που περιέχει ο σπόρος. Ταυτόχρονα ο σπόρος πρέπει να τροφοδοτείται και με οξυγόνο ώστε να αποφευχθεί ο αναερόβιος μεταβολισμός του (Ταταρίδης & Κεχαγιά, 2010).
- Στη φάση της εκβλάστησης του σπόρου ο στόχος του βυνοποιού είναι η ενεργοποίηση και ο σχηματισμός ενζύμων (αμυλάσες, πρωτεάσες, γλυκανάσες, πεντοζανάσες, φωσφατάσες κ.ά.) με τη μικρότερη δυνατή απώλεια σε αποθησαυριστικές ουσίες του σπόρου. Απαραίτητη προϋπόθεση γι' αυτό είναι συνθήκες αερόβιου μεταβολισμού του σπόρου (Gurta et al., 2010). Η συνηθέστερη θερμοκρασία βλάστησης είναι 15-18 °C. Όταν η υγρασία φτάσει σε ποσοστό 40-48%, το κριθάρι μεταφέρεται σε μεγάλα οριζόντια δωμάτια και αφήνεται για λίγες ημέρες να βλαστήσει.
- Το τελικό στάδιο της βυνοποίησης είναι η ξήρανση-φρύξη με ατμό και η αποθήκευση της βύνης. Όταν το μήκος του ριζιδίου φτάσει περίπου το μέγεθος του σπόρου, διοχετεύεται

θερμός αέρας (φρύξη) που ξηραίνει τους σπόρους και σταματά τη βλάστηση. Η ξήρανση της βύνης έχει ως στόχο την αδρανοποίηση των ενζύμων που παράχθηκαν χωρίς όμως την κατάστροφη αυτών. Ακόμη στη φάση αυτή η βύνη αποκτά γεύση, αρώματα και χρώμα που θα συναντήσουμε στη μπίρα. Το ξηρό προϊόν των διαδικασιών αυτών λέγεται βύνη (Ταταρίδης & Κεχαγιά, 2010). Η βύνη είναι εύθρυπτη και εύγευστη, περιέχει υγρασία περίπου 4% και μπορεί να αποθηκευτεί χωρίς φόβο μικροβιακών αλλοιώσεων. Έχει διαπιστωθεί ότι η θερμοκρασία ξήρανσης επηρεάζει την ποιότητα της μπίρας και καθορίζει το ιδιαίτερο χρώμα της. Η διάρκεια της φρύξης καθώς και οι θερμοκρασίες που θα εφαρμοστούν, εξαρτώνται από τον τύπο βύνης που θέλουμε να παράγουμε. Οι πιο γνωστοί τύποι είναι η ανοιχτόχρωμη βύνη (pale malt), η κρυσταλλική ή βύνη καραμέλας (crystal, caramel malt), η σκούρα βύνη, η καβουρδισμένη βύνη και η μαύρη (Lewis & Young, 2001).

2.2 ΖΥΘΟΠΟΙΗΣΗ:

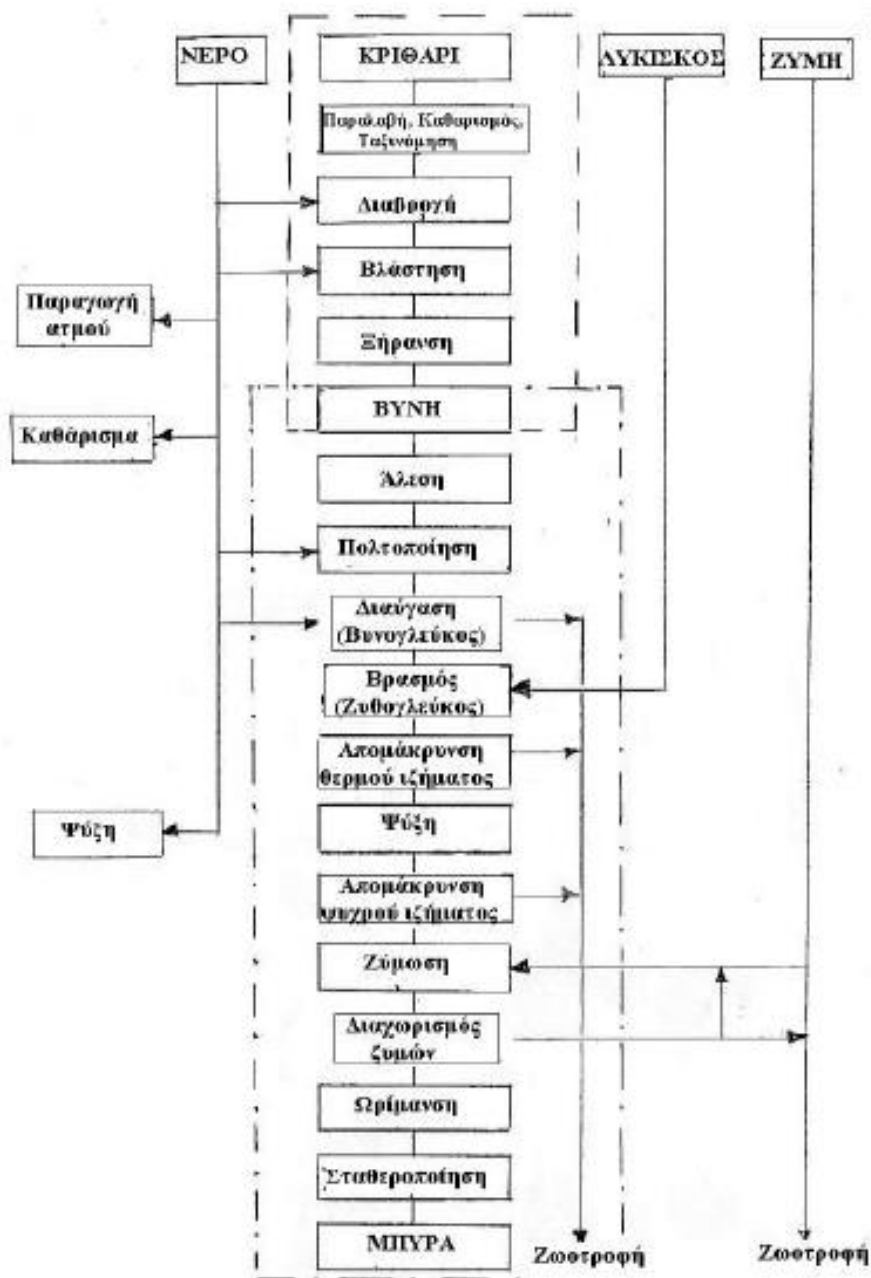
Στη ζυθοποίηση υπάρχουν αρκετές διαφοροποιήσεις στα στάδια της, ανάλογα με τον τύπο της παραγόμενης μπίρας αλλά και τις παραδοσιακές τεχνικές μιας χώρας. Τα βασικά στάδια όμως είναι τα εξής:

- Πρώτο είναι το στάδιο της άλεσης των κόκκων της βύνης, με σκοπό να αυξηθεί η ειδική επιφάνεια αυτών. Με την αύξηση της ειδικής επιφάνειας δίνεται η δυνατότητα δράσης των ενζύμων αλλά και αυξάνεται ο βαθμός εκχυλισιμότητας των ουσιών που περιέχονται σε αυτή (Ταταρίδης & Κεχαγιά, 2010). Με τη διαδικασία της άλεσης διαχωρίζεται ο φλοιός από τον σπόρο, ο οποίος θραύεται σε μικρότερα κομμάτια και τελικά παραλαμβάνεται το βυνάλευρο.
- Ακολουθεί το στάδιο της πολτοποίησης κατά τη διάρκεια του οποίου τα ένζυμα αποικοδομούν το άμυλο και τις πρωτεΐνες και τα μετατρέπουν σε ζυμώσιμα συστατικά. Συγκεκριμένα όσον αφορά την παραγωγή των σακχάρων, πρώτη δρα η β-αμυλάση (67 °C) στα άκρα των μορίων του αμύλου και παράγει μαλτόζες και δεξτρίνες (σάκχαρα υψηλού μοριακού βάρους) και στη συνέχεια η α-αμυλάση (72 °C) και οι γλυκοζιδάσες που διασπούν τα περισσότερα μόρια μεγάλου μοριακού βάρους παράγοντας κυρίως μαλτόζη, φρουκτόζη και γλυκόζη. Ταυτόχρονα δρουν και πρωτεάσες που διασπούν τις πρωτεΐνες, συνεισφέροντας στα αρωματικά στοιχεία του τελικού προϊόντος. Όταν πια αποικοδομηθεί όλη η ποσότητα αμύλου (ελέγχεται με τεστ ιωδίου) η θερμοκρασία στη δεξαμενή πολτοποίησης ρυθμίζεται σε θερμοκρασία μεγαλύτερη των 78 °C ώστε να κατάστραφούν τα παραπάνω ένζυμα.
- Το επόμενο στάδιο είναι η εκχύλιση ή διαύγαση, που αποτελεί την απομάκρυνση των στερεών υπολειμμάτων της βύνης. Στο στάδιο αυτό προστίθεται νερό στο πολτοποιημένο γλεύκος το οποίο περνά διαμέσου των υπολειμμάτων της βύνης, με σκοπό να εκχυλίσει από αυτά συστατικά, τα οποία είναι χρήσιμα για το τελικό προϊόν (Ταταρίδης & Κεχαγιά, 2010). Ένας ακόμη στόχος στο στάδιο αυτό είναι η προσθήκη κατάλληλης ποσότητας νερού, ώστε να παραληφθεί βυνογλεύκος με την επιθυμητή συγκέντρωση σακχάρων.
- Το βυνογλεύκος στη συνέχεια εισέρχεται στο στάδιο του βρασμού με ταυτόχρονη προσθήκη πικρικού ή/και αρωματικού λυκίσκου. Σκοπός του βρασμού είναι η αποστείρωση του γλεύκους, η συμπύκνωσή του στην επιθυμητή αρχική πυκνότητα, η μετατροπή των

πικρικών ουσιών του λυκίσκου και η αύξηση του βαθμού διαλυτότητάς τους και η δημιουργία και ολοκληρωτική απομάκρυνση του θερμού ιζήματος το οποίο είναι ένα σύμπλοκο πρωτεϊνών. Όταν ολοκληρωθεί ο βρασμός, τα υπολείμματα του λυκίσκου και οι πρωτεΐνες απομακρύνονται από το βρασμένο ζυθογλεύκος στο δοχείο φυγοκέντρισης όπου κατάκάθονται (Fix, 1999). Ακόμα προστίθενται διαυγαστικές ουσίες όπως οι κ-καραγενάνες, οι οποίες δημιουργούν ένα πλέγμα στο οποίο εγκλωβίζονται οι πρωτεΐνες και απομακρύνονται ευκολότερα από το ζυθογλεύκος με καθίζηση, μετά το βρασμό. Με το βρασμό επιτυγχάνεται η αποστείρωση του ζυθογλεύκους καθώς και η εκχύλιση όλων των γευστικών, αρωματικών και συντηρητικών συστατικών του λυκίσκου. Διαλύονται οι ρητίνες και μειώνεται ο όγκος του νερού ώστε να παραχθεί η επιθυμητή ισχύς αλκοολικής ζύμωσης.

- Τελικά το ζυθογλεύκος ψύχεται σε θερμοκρασία εμβολιασμού (20 °C), προστίθεται αέρας και απομακρύνεται μερικώς το ψυχρό θόλωμα.
- Το ψυχρό γλεύκος εμβολιάζεται σε αποστειρωμένες συνθήκες με κατάλληλη ποσότητα ζύμης. Στη φάση της ζύμωσης αναπτύσσονται οι μικροοργανισμοί καταναλώνοντας το ζυμώσιμο εκχύλισμα και παράγοντας κυρίως αιθανόλη, διοξείδιο του άνθρακα αλλά και άλλους δευτερογενείς μεταβολίτες (επιθυμητούς και μη) οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της μπίρας. Η θερμοκρασία ζύμωσης εξαρτάται από το είδος της μπίρας (Ταταρίδης & Κεχαγιά, 2010).
- Όταν κριθεί ότι η ζύμωση έφτασε στο τέλος της έρχεται η ώρα της ωρίμανσης, η οποία πραγματοποιείται συνήθως παρουσία ζυμών σε θερμοκρασία μικρότερη των 0 °C και περιλαμβάνει τον σχηματισμό επιθυμητών αρωματικών ενώσεων, την αποικοδόμηση μη επιθυμητών και την αύξηση της γευστικής αρμονίας της μπίρας. Δηλαδή η ωρίμανση αποτελεί ένα στάδιο φυσικής σταθεροποίησης (Rosa, 2010). Πλήρης ζύμωση του εναπομείναντος ζυμώσιμου εκχυλίσματος και φυσικός κορεσμός της μπίρας με CO₂.
- Ένα από τα τελικά στάδια είναι η σταθεροποίηση που περιλαμβάνει 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). Όταν η ζυθοποίηση δε γίνεται βάσει του νόμου της καθαρότητας, μπορεί να γίνει προσθήκη ασκορβικού οξέος, πολυαμιδίων και PVPP, πρωτεολυτικών ενζύμων, προσροφητικών ουσιών. Η παστερίωση έχει ως σκοπό την επιμήκυνση του χρόνου διατήρησης, αλλάζει όμως σημαντικά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της μπίρας. Κατά την παστερίωση η μπίρα θερμαίνεται για σύντομο χρονικό διάστημα σε υψηλή θερμοκρασία προκειμένου να αδρανοποιηθούν οι μικροοργανισμοί που επέζησαν από την ζύμωση. Παρ' όλα αυτά η υψηλή θερμοκρασία προκαλεί φυσικοχημικές αντιδράσεις στα συστατικά της με αποτέλεσμα την διαφοροποίηση του αρώματος και της γεύσης. Η χαμηλή θερμοκρασία αποθήκευσης επιμηκύνει την διάρκεια ζωής της μπίρας η οποία μπορεί και να διπλασιαστεί από 6 σε 12 μήνες αν αποθηκευτεί μακριά από το φως το οποίο την οξειδώνει και την υψηλή θερμοκρασία που επιταχύνει την αύξηση των αλλοιογόνων μικροοργανισμών.

- Ακολουθεί απολάσπωση, δηλαδή η απομάκρυνση του ιζήματος που αποτελείται από ζύμες και υπολείμματα βύνης και λυκίσκου, του σταθεροποιημένου τελικού προϊόντος και τέλος η εμφιάλωση αυτού. Το τελικό στάδιο λοιπόν αποτελεί η εμφιάλωση της παραγόμενης μπίρας, όπου οδηγείται προς το τμήμα εμφιαλώσεως και συσκευασίας, όπου συσκευάζεται σε τρεις μορφές: φιάλη, αλουμινένιο κουτί και βαρέλι.



Εικόνα 3:Διάγραμμα ροής παραγωγής μπίρας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο ΤΑ ΒΑΣΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΗΣ ΜΠΙΡΑΣ



Εικόνα 4:Τα τέσσερα βασικά συστατικά της μπίρας (Pesce, 2015).

Οι πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή μπίρας είναι το κριθάρι που γίνεται βύνη, το νερό, ο λυκίσκος, οι ζύμες και άλλα σημαντικά συστατικά σε μικρότερες αναλογίες.

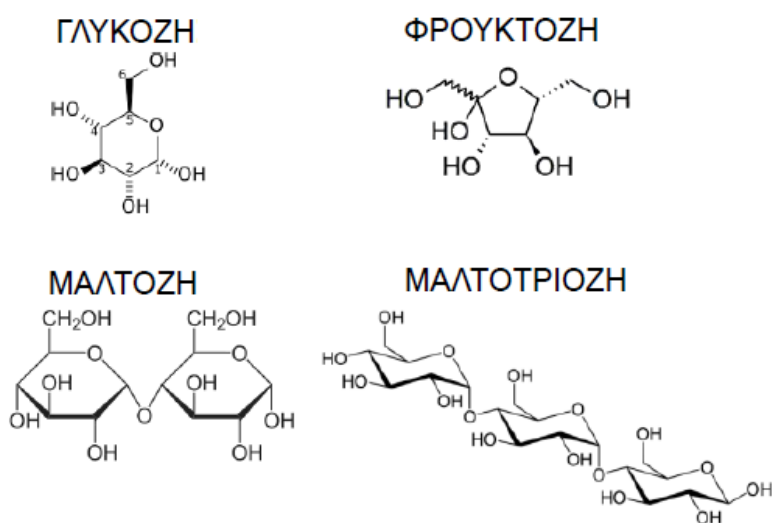
3.1 Η ΒΥΝΗ – ΤΟ ΚΡΙΘΑΡΙ:

Η βύνη όπως έχει ήδη αναφερθεί είναι προϊόν που προκύπτει με κατεργασία του κριθαριού ή άλλων δημητριακών ενώ χρησιμοποιείται και για την παραγωγή άλλων τροφίμων πέρα από τη μπίρα. Οι κυριότερες πρώτες ύλες για την παραγωγή βύνης είναι το κριθάρι, το σιτάρι, η βρώμη, το καλαμπόκι και το ρύζι (Varela, 2016). Η βύνη από κριθάρι όμως είναι η πιο διαδεδομένη επειδή η περιεκτικότητα της σε ένζυμα είναι μεγαλύτερη σε σχέση με τα άλλα δημητριακά και ακόμη δεν είναι τόσο επιρρεπής σε ανεπιθύμητα βακτήρια (Ταταρίδης & Κεχαγιά, 2010). Το κριθάρι που προορίζεται για ζυθοποίηση, είναι δημητριακό που ανήκει στην οικογένεια των Graminae, περιλαμβάνει ποικιλίες διαφορετικές από εκείνο που προορίζεται για ζωτροφή και πρέπει να ικανοποιεί συγκεκριμένες προδιαγραφές που αφορούν τη σύστασή του, τη φυσιολογία του και τις αγρονομικές του ιδιότητες. Το κριθάρι ως πρώτη ύλη τρυγιέται το φθινόπωρο και συσκευάζεται κατάλληλα ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή βύνης καθ' όλη τη διάρκεια του χρόνου. Το κριθάρι που χρησιμοποιείται για την παρασκευή βύνης πρέπει να πληροί ορισμένες προϋποθέσεις όπως χαμηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες (11%-13%), να είναι απαλλαγμένο από ξένα υλικά, να έχει μεγάλη βιωσιμότητα δηλαδή υψηλή ενεργότητα των ενζύμων τα οποία είναι υπεύθυνα για την εκβλάστηση του σπόρου (τουλάχιστον 96%), να είναι αρκετά χαμηλό σε υγρασία (12%-14%) (Lewis & Bamforth, 2006) και να είναι ελεύθερο ασθενειών, ζιζανίων και σκόνης (Lewis και Young, 1995). Για τη βελτίωση της ποιότητας της μπίρας οι έρευνες σήμερα προσανατολίζονται στην επιλογή νέων ποικιλιών κριθαριού και στη γενετική βελτίωση των ήδη υπαρχόντων.

Η βύνη χωρίζεται σε δύο κατηγορίες. Αποτελείται από τη βύνη βάσης, που είναι το κύριο μέρος της βύνης το οποίο είναι πλούσιο σε ένζυμα, τα οποία μετατρέπουν το άμυλο σε ζυμώσιμα σάκχαρα, αλλά και σε μη σακχαρούχα, θρεπτικά για τη ζύμη συστατικά όπως αμινοξέα, βιταμίνες και μέταλλα. Εκτός από τη βύνη βάσης, έχουμε και τις συμπληρωματικές βύνες που είναι υπεύθυνες για τη γεύση, το χρώμα αλλά και την υφή της μπίρας (Lewis & Bamforth, 2006).

Η βύνη εκτός του ότι παρέχει τα βασικά ζυμώσιμα σάκχαρα (γλυκόζη, φρουκτόζη, μαλτόζη, μαλτοτριόζη) προσδίδει μερικά από τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά της μπίρας, όπως είναι το

χρώμα και η γεύση. Συγκεκριμένα κατά την ξήρανση της βύνης αλλά και κατά την διάρκεια του βρασμού λαμβάνουν χώρα όλες οι χημικές αντιδράσεις που έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή του χαρακτηριστικού χρώματος και αρώματος της βύνης δηλαδή της κόρας του ψωμιού, του κέικ, του καβουρδισμένου καφέ και των ξηρών καρπών. Κατά το στάδιο αυτό αποκτά επίσης το χαρακτηριστικό χρώμα της. Διαφορετικοί συνδυασμοί χρόνου, θερμοκρασίας και pH δημιουργούν αυτό το εύρος αρωμάτων (Mosher, 2006). Η βασική αντίδραση που λαμβάνει χώρα κατά το στάδιο της ξήρανσης και του βρασμού είναι η αντίδραση μη ενζυμικού μαυρίσματος (αντίδραση Maillard) που όπως έχει ήδη αναφερθεί οδηγεί μέσα από πολλά στάδια στην παραγωγή σκουρόχρωμων προϊόντων (Τζιά et al., 2008). Η βύνη περιέχει ακόμη δεξτρίνες που είναι μη ζυμώσιμοι ολιγοσακχαρίτες οι οποίοι συμβάλουν στη δημιουργία ενός πλούσιου και ισορροπημένου σώματος (βελτίωση ιξώδους). Τέλος στη βύνη περιέχονται πρωτεϊνικά συστατικά τα οποία σχηματίζουν και διατηρούν τον χαρακτηριστικό αφρό που σχηματίζεται στη μπίρα (Lewis & Bamforth, 2006).



Εικόνα 5: Τα βασικά ζυμώσιμα σάκχαρα που προέρχονται από τη βύνη (Ταταρίδης & Κεχαγιά, 2010).

3.2 ΤΟ ΝΕΡΟ – ΤΑ ΑΝΟΡΓΑΝΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ:

Η ποιότητα του νερού που χρησιμοποιείται κατά τη ζυθοποίηση είναι πολύ σημαντικός παράγοντας που διαμορφώνει τον χαρακτήρα του τελικού προϊόντος. Το νερό αποτελεί περίπου το 90-95% της μπίρας. Έτσι, οι φυσικές ιδιότητες και η σύστασή του σε μεταλλικά στοιχεία, οργανικές ενώσεις και κατάλοιπα άλλων ουσιών, έχουν ιδιαίτερη σημασία για την ποιότητα του προϊόντος. Στο παρελθόν μάλιστα η μεταλλικότητά του νερού επηρέαζε σε μεγάλο βαθμό τη γεύση της μπίρας καθώς και αποτύπωνε το στίγμα του εδάφους της κάθε περιοχής από όπου προερχόταν. Σήμερα σχεδόν κάθε τύπος νερού μπορεί να επεξεργαστεί για να οδηγήσει στον επιθυμητό τύπο μπίρας (Rosa, 2010). Η ρύθμιση της σύστασης του νερού γίνεται από τις βιομηχανίες μπίρας ώστε να διατηρείται σταθερή η ποιότητα της παραγόμενης μπίρας και να πληρούνται οι προδιαγραφές του προϊόντος.

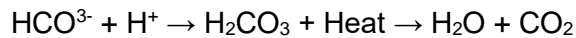
Τα βασικά συστατικά του νερού που αφορούν έναν ζυθοποιό είναι τα ιόντα νατρίου, θείου, χλωρίου, ασβεστίου, μαγνησίου και όξινο ανθρακικό. Τα ιόντα αυτά εκτός του ότι επηρεάζουν το pH του γλεύκους, μπορούν να δώσουν και διαφορετικά στοιχεία στη γεύση της μπίρας ανάλογα

με τη συγκέντρωσή τους στο νερό (Lewis & Bamforth, 2006). Από τα παραπάνω ιόντα αυτά που σχετίζονται με το pH είναι τα ιόντα ασβεστίου, μαγνησίου και τα όξινα ανθρακικά.

Το ασβέστιο και το μαγνήσιο προκαλούν μείωση του pH καθώς αντιδρούν με όξινο φωσφορικό ανιόν και παράγονται ιόντα υδρογόνου:



Ενώ το όξινο ανθρακικό ιόν κατά τη διάρκεια του βρασμού αντιδρά με υδρογονοκατιόντα σχηματίζοντας ανθρακικό οξύ με αποτέλεσμα να αυξηθεί το pH.



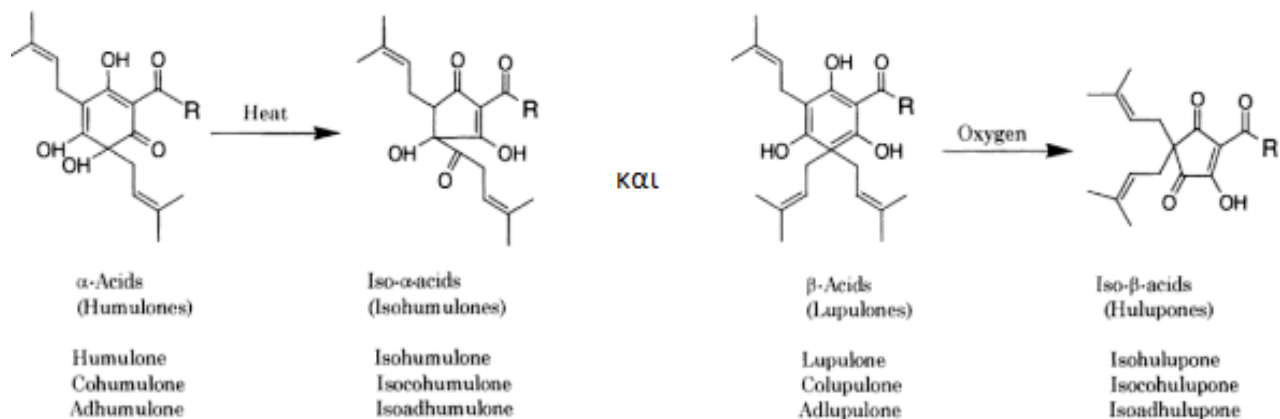
Η τιμή του pH στο γλεύκος είναι πολύ σημαντική κατά τη δράση των ενζύμων που μετατρέπουν το άμυλο σε ζυμώσιμα σάκχαρα. Τα ένζυμα αυτά δρουν βέλτιστα σε pH από 5,2 έως 5,6. Ακόμη το πόσο όξινο ή αλκαλικό είναι το νερό επηρεάζει σημαντικά την εκχυλισσιμότητα των ταννικών και φαινολικών ουσιών από τον φλοιό της βύνης. Ένα ακόμη στάδιο της ζυθοποίησης το οποίο εξαρτάται από το pH είναι ο βρασμός, επειδή οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια του, καθορίζουν το χρώμα, τα αρωματικά στοιχεία και την ενσωμάτωση του λυκίσκου, ευνοούνται σε σχετικά υψηλές τιμές pH. Κατά κανόνα όταν η τιμή του pH κυμαίνεται μεταξύ 5 και 6 οι παραπάνω διεργασίες πραγματοποιούνται κανονικά (Lewis, 1997). Όλα τα υπόλοιπα ιόντα σχετίζονται με το σώμα, την ξηρότητα και τη γεύση της μπίρας. Όσον αφορά τη γεύση τα ιόντα αυτά ανάλογα με τη συγκέντρωσή τους μπορούν να προσδώσουν πολύ γλυκά ή ακόμη και πολύ πικρά αρώματα (Lewis, 1997).

3.3 Ο ΛΥΚΙΣΚΟΣ:

Ο λυκίσκος είναι το πολυετές αναρριχητικό φυτό *Humulus lupulus* που ανήκει στην οικογένεια των Κνιδωδών (Urticaceae-Cannabaceae). Είναι ένα φυτό που καλλιεργείται στην Κεντρική Ευρώπη την Ασία και σε μερικές περιοχές της Βόρειας Αμερικής. Το μέρος του φυτού που χρησιμοποιείται για την παραγωγή μπίρας είναι τα άνθη του, τα οποία έχουν το μέγεθος του αντίχειρα ή είναι λίγο μικρότερα. Μόνο τα θηλυκά άνθη χρησιμοποιούνται στη ζυθοποίηση, ενώ τα αρσενικά δεν παρουσιάζουν κανένα εμπορικό ενδιαφέρον και χρησιμοποιούνται μόνο για τη γονιμοποίηση των θηλυκών.

Κανένα άλλο από τα βασικά συστατικά της μπίρας δεν έχει μελετηθεί και αναπτυχθεί τόσο όσο ο λυκίσκος ο οποίος θεωρείται ένα από τα βασικότερα αρωματικά και γευστικά συστατικά της μπίρας. Παρ' όλα αυτά έχει ταυτόχρονα εξαιρετική δράση και ως αντιμικροβιακός παράγοντας, δηλαδή δρα ως συντηρητικό στη μπίρα (Schönberger & Kostelecky, 2011). Δύο είναι οι κατηγορίες λυκίσκου που χρησιμοποιούνται στη ζυθοποιία ο αρωματικός και ο πικρικός λυκίσκος όπου και οι δύο μπορούν να προστεθούν κατά την παραγωγική διαδικασία είτε στον βρασμό ή ακόμη και μετά τη ζύμωση. Η ποιότητα του λυκίσκου που θα χρησιμοποιηθεί στην παρασκευή μπίρας είναι πολύ σημαντική για έναν ζυθοποιό και για τον λόγο αυτό χρησιμοποιούνται σήμερα ως επί το πλείστον επεξεργασμένα προϊόντα σε μορφή εκχυλίσματος ή σφαιριδίων. Το πλεονέκτημα αυτών των σκευασμάτων είναι το γεγονός ότι είναι ανθεκτικά στην οξείδωση, πιο συμπαγή, μπορούν να αποθηκευτούν και είναι πιο τυποποιημένα ως προς τη σύστασή τους (π.χ. όσον αφορά την περιεκτικότητα σε α-οξύ και το γεγονός ότι μπορεί να περιέχουν περισσότερες από μία ποικιλίες λυκίσκου σε συγκεκριμένες αναλογίες) (Lewis & Bamforth, 2006).

Η βασική πικράδα που ανιχνεύεται στην μπίρα προέρχεται από τα- και β-οξέα (Olaniran et al., 2017) τα οποία είναι τα βασικά συστατικά του λυκίσκου και η διαφορά μεταξύ τους είναι ότι τα β-οξέα έχουν μια πλευρική αλυσίδα φαινυλίου στην κάτω θέση αντί μιας ομάδας υδροξυλίου γεγονός που διαφοροποιεί πολύ την συμπεριφορά των δύο ομάδων κατά την ζυθοποίηση (Schönberger & Kosteletzky, 2011). Τα α-οξέα που είναι πολύ λίγο διαλυτά σε κρύο νερό (3ppm), κατά την διάρκεια του βρασμού του γλεύκους ισομεριώνονται σε ισο-α-οξέα. Αυτή η θερμική μετατροπή είναι απαραίτητη όχι μόνο για την αύξηση της διαλυτότητας, αλλά και για την ενεργοποίηση της πικράδας από τον λυκίσκο, καθώς τα ισο-α-οξέα είναι εννιά φορές πιο πικρά από τα α-οξέα (Lewis & Bamforth, 2006).



Εικόνα 6: Η ισομερίωση των α και β-οξέων του λυκίσκου (Lewis & Bamforth, 2006).

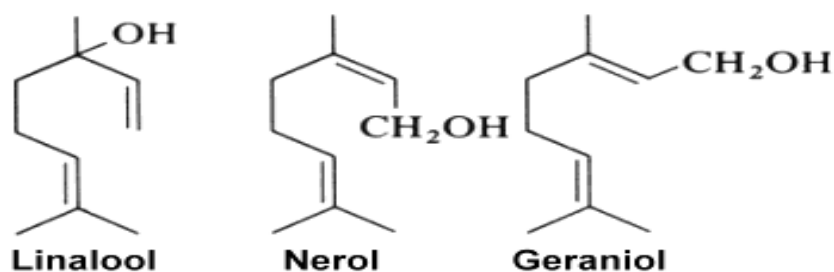
Τα α και β-οξέα οξειδώνονται κατά την διάρκεια της αποθήκευσης σε άλλα πιο διαλυτά συστατικά. Μεταξύ αυτών βρέθηκε ότι τα ισο-α-οξέα, είναι αυτά που προσδίδουν την πιο έντονη πικράδα με όριο ανίχνευσης ίσο με 4ppm και στα οποία οφείλεται περίπου το 67% της πικράδας μια μπίρας (Michel, et al., 2016,b). Τα ισο-α-οξέα είναι υδρόφοβα μόρια και λόγω αυτού τείνουν να μεταναστεύουν στις φυσαλίδες του αφρού όπου σχηματίζουν σύμπλοκα με επιφανειοδραστικές πρωτεΐνες οι οποίες σταθεροποιούν τον αφρό. Λόγω αυτού το πιο πικρό μέρος μιας μπίρας είναι πάντα ο αφρός της (Yonezawa & Fushiki, 2002).

Τα ποσοστά πικράδας μιας μπίρας όμως εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό και από τα υπόλοιπα τρία βασικά συστατικά της και σε σημαντικό μάλιστα βαθμό από το νερό, καθώς σχετίζονται άμεσα με το πόσο όξινο ή βασικό είναι το γλεύκος (Ταταρίδης & Κεχαγιά , 2010). Σε χαμηλότερες τιμές pH η πικράδα είναι λιγότερο έντονη ενώ ταυτόχρονα αυξάνονται οι αντιμικροβιακές ικανότητες των ισο-α-οξέων, υπό την προϋπόθεση ότι υπάρχουν σε επαρκή ποσότητα. Με αύξηση του pH και ιδιαίτερα παρουσία κατιόντων ασβεστίου (Ca²⁺) οι αντιδράσεις ισομερίωσης επιταχύνονται με αποτέλεσμα την παραγωγή μεγαλύτερης ποσότητας α-ίσο-οξέων, παράλληλα όμως υποβαθμίζεται σημαντικά το χρώμα και η πικράδα της μπίρας. Για τον λόγο αυτό σε μαύρες και stout μπίρες μπορούν να ρυθμιστούν υψηλότερα pH (Lewis & Bamforth, 2006).

Όσον αφορά τα αρώματα που δίνει ο λυκίσκος στην μπίρα, αυτά προέρχονται από ενώσεις οι οποίες ονομάζονται μονοτερπένια. Οι ουσίες αυτές προέρχονται από φυτά και προσδίδουν έντονα αρώματα λουλουδιών στην μπίρα, αλλά και στο κρασί (King & Dickinson, 2000). Οι

κυριότερες από αυτές τις ουσίες είναι η λιναλόλη (5μg/L, άρωμα λεβάντας), η α-τερπινεόλη (2mg/L άρωμα πασχαλιάς), η β-κιτρονελλόλη (8μg/L, άρωμα λεμονιού και λάιμ), η γερανιόλη (6μg/L άρωμα τριαντάφυλλου και η νερόλη (0.5mg/L, άρωμα τριαντάφυλλου και κίτρου) (Michel, et al., 2016,b). Οι ζυμομύκητες μπορούν να μετασχηματίσουν αυτές τις ενώσεις και να αλλάξουν τις αναλογίες μεταξύ αυτών των πέντε βασικών μονοτερπενίων, αλλάζοντας έτσι εντελώς το αρωματικό προφίλ της μπίρας (Yonezawa & Fushiki, 2002).

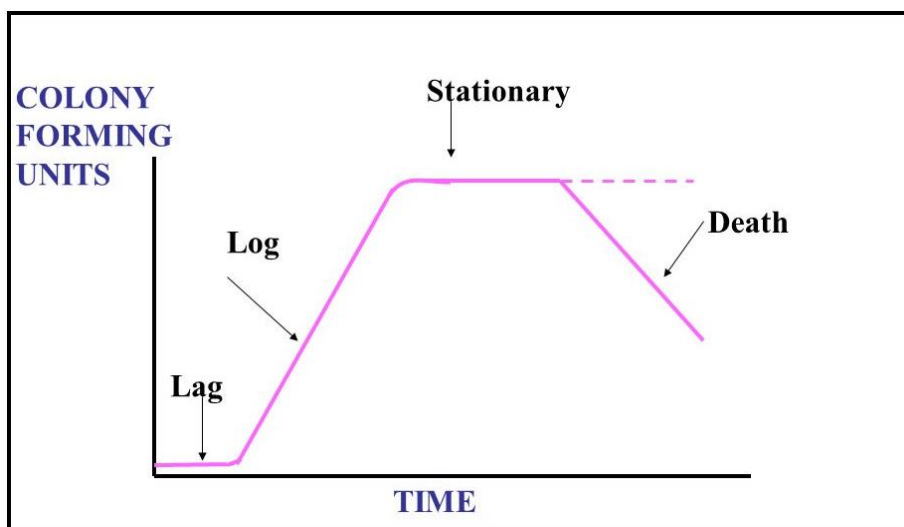
Έχει βρεθεί ότι ένα ανεπιθύμητο άρωμα που μπορεί να συναντήσει κάποιος στη μπίρα οφείλεται στον λυκίσκο. Συγκεκριμένα αν ο λυκίσκος είναι σχετικά παλιός τότε τα α-οξέα παύουν να προσδίδουν πικράδα αλλά αντίθετα μετατρέπονται σε ενώσεις οι οποίες έχουν μια χαρακτηριστική μυρωδιά τυριού. Το οξύ που σχηματίζεται ονομάζεται ισοβαλερικό οξύ και αποτελεί και μια από τις χαρακτηριστικές χημικές ενώσεις που παράγει ο βρετανομύκητας. Το άρωμα αυτό μπορεί να είναι αποδεκτό σε κάποια είδη μπίρας αλλά όχι σε όλα (Carr, 2016).



Εικόνα 7: ο χημικός τύπος μερικών από τα πιο σημαντικά μονοτερπένια (Schönberger & Kostelecky, 2011).

3.4 ΟΙ ΖΥΜΕΣ:

Οι ζύμες μπορούν να οριστούν ως μονοκύτταροι μύκητες που έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν τη ζάχαρη σε CO₂ και νερό με την παρουσία αέρα ή σε αλκοόλη και CO₂ με απουσία αέρα. Για το δεύτερο αυτό χαρακτηριστικό τους χρησιμοποιούνται στις ζυμώσεις. Η μπίρα παράγεται με τη βοήθεια της αλκοολικής ζύμωσης. Οι μονοκύτταροι αυτοί οργανισμοί χωρίζονται σε ασκομύκητες και βασιδιομύκητες και αναπαράγονται με εκβλάστηση ή σχάση. Σήμερα είναι γνωστό ότι υπάρχουν 100 γένη τέτοιων μυκήτων που περιλαμβάνουν περισσότερα από 700 είδη (Jolly et al., 2006). Οι μικροοργανισμοί αυτοί δεν προκύπτουν στη φύση τυχαία, αλλά μπορεί κανείς να τους βρει σε συγκεκριμένους βιότοπους, όπου διάφορα είδη αναπτύσσουν κοινότητες (Lachance & Starmer, 1998). Η ανάπτυξη των διαφόρων ειδών ζύμης ακολουθεί περίπου την ίδια εξέλιξη, δηλαδή αποτελείται από τέσσερις φάσεις, τη λανθάνουσα φάση, τη φάση εκθετικής ανάπτυξης, τη στατική φάση και τη φάση θανάτου, όπως φαίνεται στην εικόνα 8 (Nissen et al., 2003).



Εικόνα 8: Καμπύλη ανάπτυξης μικροοργανισμού (Αρβανιτίδου-Βαγιωνά, 2016).

Το βυνογλεύκος είναι η πρώτη ύλη στην οποία θα προστεθεί η ζύμη και μέσω της διαδικασίας της ζύμωσης αυτό το γλυκό και αρκετά ήπιο υγρό θα μετατραπεί σε ένα ποτό που έχει λατρευτεί από την ανθρωπότητα εδώ και χιλιετίες, τη μπίρα. Τέσσερις είναι οι αλλαγές που καθορίζουν αυτή τη μετατροπή:

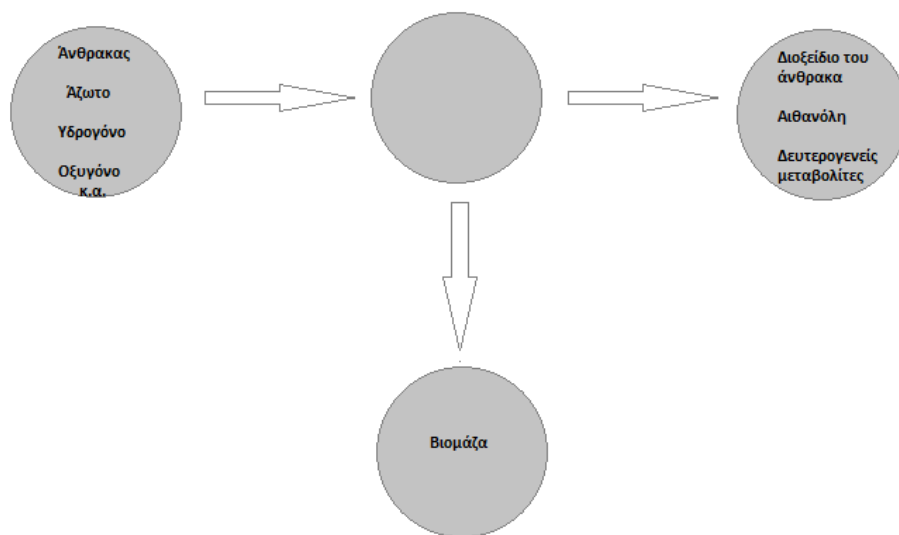
- Η απομάκρυνση της γλυκύτητας του γλεύκους, καθώς η ζύμη καταναλώνει τα σάκχαρα με ταυτόχρονη παραγωγή αιθανόλης.
- Η παραγωγή οξέων από τους ζυμομύκητες, που έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του pH.
- Η ενανθράκωση του γλεύκους που οφείλεται στην παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα.
- Ο σχηματισμός ενός πλήθους μεταβολικών ουσιών που προκύπτουν κατά τη διαδικασία της ζύμωσης. Οι μεταβολικές αυτές ουσίες προκύπτουν σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις σε σχέση με τα βασικά παράγωγα της ζύμωσης.

Γίνεται λοιπόν σαφές ότι τα αρώματα της βύνης και του λυκίσκου που καθορίζουν το βυνογλεύκος μετατρέπονται σε ένα πολύ πιο σύνθετο μίγμα ουσιών και οι υπεύθυνοι για αυτό είναι οι ζυμομύκητες. Τα διάφορα είδη ζύμης που χρησιμοποιούνται παραδοσιακά στη ζυθοποιία ανήκουν όλα στην ευρύτερη κατηγορία του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*. Η κυριότερη διάκριση μεταξύ των ζυμών ζυθοποίησης είναι η ιδιότητα της καταβύθισης ή επίπλευσης τους μετά το τέλος της ζύμωσης. Η διαφορά ανάμεσα στα δύο είδη στελεχών δεν εστιάζεται μόνο στις υδρόφιλες ή υδρόφοβες ιδιότητες του κυτταρικού τους τοιχώματος, αλλά και στη θερμοκρασία που πραγματοποιούν τη ζύμωση και την ποιότητα της παραγόμενης μπίρας. Έτσι οι ζυθοποιοί επιλέγουν εμπειρικά ονόματα για τα δοκιμασμένα στελέχη, όπως ζύμη ale και ζύμη lager, ή αφροζύμη και βυθοζύμη (Lewis & Bamforth, 2006).

Στη ζυθοποιία οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται κάτω από πολύ συγκεκριμένες συνθήκες στις οποίες έχει βρεθεί ότι παράγουν ένα προϊόν με τα επιθυμητά συστατικά. Οι συνθήκες αυτές είναι, η σχετικά χαμηλή θερμοκρασία η οποία σε μεγάλο βαθμό εξαρτάται και από το είδος της μπίρας, η απουσία οξυγόνου (περιβάλλον διοξειδίου λόγω ζύμωσης) και οι πρακτικές ανακύκλωσης (Ταταρίδης & Κεχαγιά, 2010). Επιπλέον πολύ σημαντικός παράγοντας είναι τα

θρεπτικά συστατικά που προσφέρει η βύνη στους ζυμομύκητες. Όπως είναι γνωστό δεν αρκεί ένα απλό διάλυμα σακχάρων για να πραγματοποιηθεί ζύμωση, καθώς η ζύμη για την ανάπτυξή της χρειάζεται άζωτο. Σε συνθήκες περιβάλλοντος (παρουσία οξυγόνου) η ζύμωση μπορεί να πραγματοποιηθεί απλά σε ένα διάλυμα ζάχαρης, αμμωνίας και ορισμένων ανόργανων αλάτων. Στην περίπτωση όμως της αναερόβιας ζύμωσης έχει βρεθεί ότι η ζύμη αναπτύσσεται καλύτερα όταν προστίθενται στο διάλυμα βιταμίνες και αμινοξέα σαν πηγή αζώτου. Ο ακριβής καθορισμός των συνθηκών ζύμωσης και της ποιότητας των ζυμών επιτρέπει στους ζυθοποιούς την παραγωγή ενός προϊόντος σταθερής ποιότητας (Lewis & Bamforth, 2006). Οι φυσικοχημικές συνθήκες (χρόνος, θερμοκρασία) της ζύμωσης επηρεάζουν καθοριστικά την χημική και μικροβιολογική σταθερότητα της μπίρας και έτσι η αλλοίωση παρεμποδίζεται σημαντικά καθώς οι μικροοργανισμοί δεν επιζούν σε χαμηλό pH και υψηλή συγκέντρωση αλκοόλης. Παρ' όλα αυτά ορισμένα είδη (*Enterobacteriaceae*) είναι ιδιαίτερα ανθεκτικά και μπορούν να επιζήσουν με αποτέλεσμα την παραγωγή ανεπιθύμητων οσμών (νιτροζαμίνων).

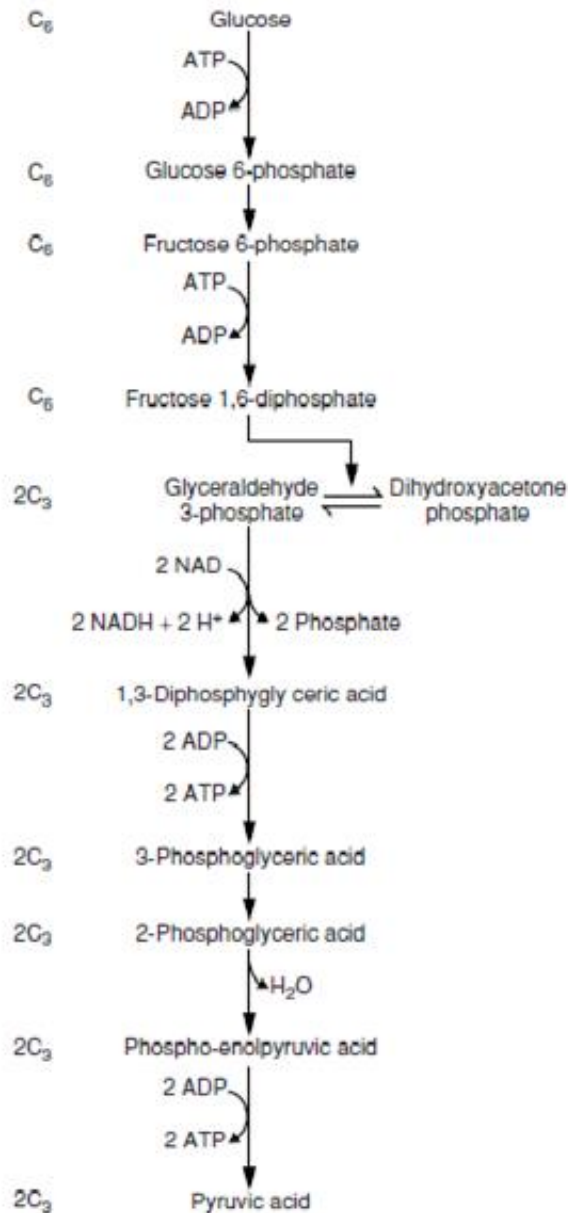
Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης λοιπόν ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται και πολλαπλασιάζεται καταναλώνοντας τα θρεπτικά συστατικά και τα σάκχαρα του υποστρώματος και παράγει αιθανόλη, διοξείδιο του άνθρακα και δευτερογενείς μεταβολίτες. Ταυτόχρονα πραγματοποιούνται δύο βιοχημικές διαδικασίες: (α) Ο πληθυσμός των ζυμών εξαπλασιάζεται και (β) το pH της μπίρας μειώνεται σημαντικά. Η πτώση αυτή του pH έχει ως αποτέλεσμα την αδρανοποίηση βακτηρίων (*Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Micrococcus*) τα οποία αλλοιώνουν τη μπίρα. Ο πολλαπλασιασμός των ζυμών έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της οπτικής πυκνότητας του προϊόντος (θόλωση) το οποίο φιλτράρεται προκειμένου να αφαιρεθούν τα κύτταρα τους και να γίνει διαυγέστερο. Στο σχήμα που ακολουθεί παρουσιάζονται τα συστατικά που εισρέουν και εκρέουν από το σύστημα κατά τη διάρκεια της ζύμωσης:



Εικόνα 9: Εισροές και εκροές κατά την ζύμωση του γλεύκους (Lewis & Bamforth, 2006).

Οι ζυμομύκητες της μπίρας χρησιμοποιούν τα ζυμώσιμα σάκχαρα (γλυκόζη, φρουκτόζη, μαλτόζη και μαλτοτριόζη) σαν πηγή ενέργειας (ATP) για τη γλυκόλυση ή μονοπάτι EMP (Embden-Meyerhof-Parnas) το οποίο οδηγεί στη διάσπαση της γλυκόζης σε δύο μόρια πυροσταφυλικού οξέος. Το πρώτο βήμα της γλυκόλυσης είναι η φωσφορυλίωση της γλυκόζης σε 6-φωσφορική γλυκόζη (G-6P) από το ένζυμο εξωκινάση. Το μονοπάτι αυτό είναι υπεύθυνο

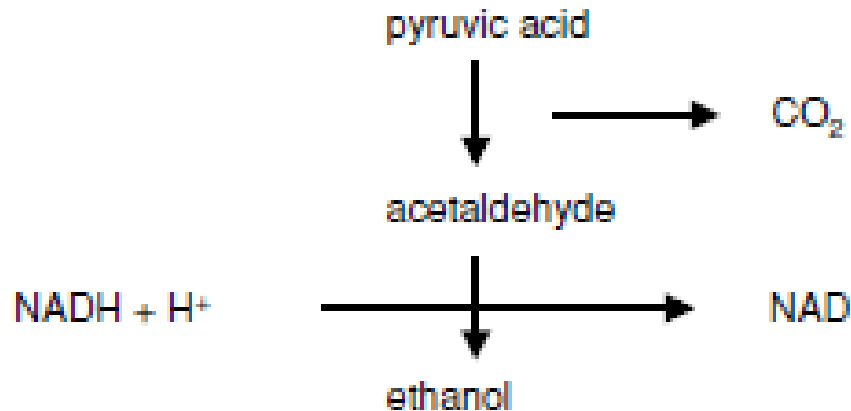
για τα τρία βασικά προϊόντα της ζύμωσης, την αιθανόλη το διοξείδιο του άνθρακα και τη γλυκερόλη (Χίρος et al., 2013). Τα προϊόντα αυτά δεν είναι ενδιάμεσα του μονοπατιού, αντίθετα παράγονται όταν ένας σημαντικός μεταβολίτης το NADH, που σχηματίζεται από την οξείδωση και τη φωσφορυλίωση της 3-φωσφορικής 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 10: Το μονοπάτι EMP (Embden-Meyerhof-Parnas) (Lewis & Bamforth, 2006).

Για τους αναερόβιους ή προαιρετικά αναερόβιους οργανισμούς, όπως είναι και οι αιθανολοπαραγωγοί μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται στη ζυθοποιία, οι οποίοι δεν χρησιμοποιούν μοριακό οξυγόνο και είναι σε θέση να αυξάνονται και να διαιρούνται χωρίς

οξυγόνο, η κύρια πηγή ATP είναι η γλυκόλυση. Σε αυτές τις αναερόβιες συνθήκες, το πυροσταφυλικό και τα ηλεκτρόνια του NADH παραμένουν στο κυτταροδιάλυμα. Το πυροσταφυλικό μετατρέπεται σε αιθανόλη και αποβάλλεται 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).

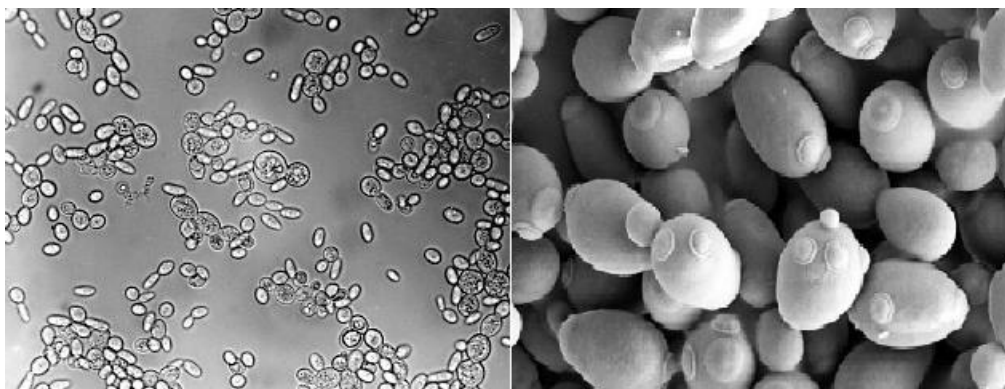


Εικόνα 11: Η μετατροπή του πυροσταφυλικού οξέος σε αιθανόλη (Lewis & Bamforth, 2006).

Από διαφορετικές μεταβολικές οδούς παράγονται μερικά από τα βασικότερα συστατικά που σχετίζονται με τα αρώματα της μπίρας που οφείλονται στον ζυμομύκητα. Περιλαμβάνουν αλκοόλες, οξέα, εστέρες, αλδεΐδες, κετόνες κλπ. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι σε όλες τις περιπτώσεις το στέλεχος ζύμης αποτελεί καθοριστικό παράγοντα των τελικών προϊόντων του μεταβολισμού που παραμένουν στο προϊόν. Επομένως, η κατάλληλη επιλογή ζύμης είναι πάντα σημαντική και ορίζει ένα βασικό πλαίσιο στο οποίο θα βρίσκονται τα αρωματικά στοιχεία της μπίρας (Ταταρίδης & Κεχαγιά, 2010). Δεν έχει επιτευχθεί η συσχέτιση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών με την ανάπτυξη των αρωματικών ενώσεων. Παρ' όλα αυτά προσεγγιστικά έχει βρεθεί ότι τα αρωματικά στοιχεία εμφανίζονται στα μισά της περιόδου ζύμωσης και διαταραχές στην ανάπτυξη των ζυμών έχουν ως αποτέλεσμα να εμφανιστούν διαταραχές και στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της μπίρας (Lewis & Bamforth, 2006).

3.4.1 *Saccharomyces cerevisiae*:

Ο *Saccharomyces cerevisiae* είναι ο κατ' εξοχήν μικροοργανισμός που χρησιμοποιείται για την ζύμωση της μπίρας και γενικότερα όλων των αλκοολούχων ποτών.



Εικόνα 12: Ο μικροοργανισμός *Saccharomyces cerevisiae* όπως φαίνεται από το μικροσκόπιο (König et al., 2009).

Ο *Saccharomyces cerevisiae* είναι ένας μονοκύτταρος ευκαρυωτικός μικροοργανισμός ο οποίος χρησιμοποιείται ευρέως στην επιστημονική έρευνα και ανήκει στο είδος των ασκομύκητων (*Phylum Ascomycota*). Το σχήμα των κυττάρων του είναι σχετικά μεγάλο και στρογγυλό. Έχει σφαιρικό σχήμα με πολυπολική εκκόλαψη, είναι μια τελεμορφική ζύμη με τετραεδρική σπορία και μπορεί να αναπτυχθεί σε οξικό άγαρ (Callejo et al., 2017). Ο *Saccharomyces cerevisiae* είναι ένας μικροοργανισμός ο οποίος συχνά επιλέγεται για έρευνα από την επιστημονική κοινότητα για την κατανόηση των κυτταρικών και μοριακών διεργασιών στα ευκαρυωτικά κύτταρα, λόγω του ότι έχει βρεθεί το γονιδίωμά του και είναι πλήρως κατανοητός ο τρόπος λειτουργίας του. Συγκεκριμένα το γονιδίωμα του είναι περίπου 12 Mb, οργανωμένο σε 16 χρωμοσώματα. Αυτός ο μονοκύτταρος οργανισμός παίζει σημαντικό ρόλο στη βιομηχανία, όπου χρησιμοποιείται για την παρασκευή ψωμιού, μπίρας, κρασιού, ενζύμων και φαρμακευτικών προϊόντων. Η ζύμη του ζυθοποιού, όπως είναι γνωστή, χρησιμοποιείται συχνά ως διατροφικό συμπλήρωμα πρωτεΐνης, ενέργειας, ως ανοσοενισχυτής ή φορέας στον οποίο μπορούν να εισαχθούν άλλες ενώσεις για να δημιουργηθεί ένα εμπορικό προϊόν υγείας (Moyad, 2008). Ο μικροοργανισμός αυτός μπορεί να βρεθεί στην επιφάνεια των φρούτων και των φυτών, στο έδαφος, στο γαστρεντερικό σύστημα των ζώων και στην επιφάνεια του δέρματος τους (Padilla et al., 2016 ; Αναστασάκου-Παρασκευοπούλου 2018).

Ο άνθρωπος εδώ και χιλιετίες χρησιμοποιεί τις ζύμες για τη ζύμωση και διατήρηση τροφίμων και ποτών. Από τα αρχαία χρόνια ο *Saccharomyces cerevisiae* είναι αδιαμφισβήτητα η πιο γνωστή ζύμη για την παραγωγή ψωμιού, μπίρας, κρασιού αλλά και διαφόρων οينوπνευματώδων ποτών. Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει γνωστή και η χρήση του ζυμομύκητα αυτού για την παραγωγή βιοαιθανόλης (Albertin et al., 2014). Ο *Saccharomyces cerevisiae* έχει την ικανότητα να μεταβολίζει μονοσακχαρίτες όπως είναι η γλυκόζη, η φρουκτόζη, η γαλακτόζη και η μαννόζη και μερικούς δισακχαρίτες όπως η μαλτόζη και η σακχαρόζη. Επίσης είναι σε θέση να χρησιμοποιήσει το τρισακχαρίτη ραφινοσάση. Ορισμένα στελέχη μπορούν να μεταβολίζουν περισσότερο από 300 g/L σακχάρων με τα ποσοστά σε αιθανόλη να φτάνουν το 18% (v/v) σε ορισμένα αλκοολούχα ποτά όπως το κρασί. Ως πηγή αζώτου μπορεί να χρησιμοποιήσει το καρβαμίδιο, την αμμωνία καθώς και διάφορα αμινοξέα. Χρειάζεται επίσης

φωσφορικά, βιοτίνη και άλλους συμπαραγόντες και μικροθρεπτικά συστατικά. (Callejo et al., 2017).

Τον 17^ο αιώνα άρχισαν οι επιστήμονες να κατανοούν τι πραγματικά συμβαίνει κατά τη ζύμωση και τότε καθιερώθηκε και επίσημα η ζύμη αυτή ως η κυρίαρχη για την παραγωγή μπίρας (Basso et al., 2016). Μετά από χρόνια μελέτης, οι ζυθοποιοί σήμερα έχουν κατάφέρει να έχουν απολυτή γνώση του τρόπου λειτουργίας, των συνθηκών ζύμωσης, του χρόνου ζύμωσης και των μονοπατιών μεταβολισμού των σακχάρων και των αμινοξέων όσον αφορά τον *Saccharomyces cerevisiae*. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μπορούν να παράγουν ένα προϊόν σταθερής ποιότητας με τα επιθυμητά χαρακτηριστικά, πολύ εύκολα και σε μικρό χρόνο (Michel et al., 2016,b). Αυτό συμβαίνει λόγω ορισμένων χαρακτηριστικών, απαραίτητων για τη διαδικασία της ζυθοποίησης, όπως είναι η υψηλή αποδοχή σε παραγωγή αιθανόλης, ο μεταβολισμός των σακχάρων ακολουθώντας το μεταβολικό μονοπάτι του φαινομένου Crabtree, καθώς και η ικανότητά του να αντιστέκεται σε πολλών ειδών περιβαλλοντικού stress (π.χ. παρουσία αιθανόλης). Η παραγωγή μιας ποιοτικής μπίρας όμως δε βασίζεται μόνο στις ζυμωτικές ικανότητες του μικροοργανισμού αλλά και στην συμβολή του για ένα ευχάριστο και επιθυμητό αρωματικό και γευστικό προφίλ στη μπίρα (Capece et al., 2018).

Οι ζυμομύκητες που χρησιμοποιούνται, όπως αναφέραμε, για την παραγωγή αιθανόλης, κρασιού, μπίρας και ψωμιού ανήκουν, σχεδόν χωρίς εξαίρεση, στο γένος *Saccharomyces*. Παρόλο που έχουν πραγματοποιηθεί κάποιες έρευνες σχετικά με τη γενετική σύνθεση άλλων στελεχών, οι πιο εμπειριστατωμένες μελέτες έγιναν στους ζυμομύκητες τύπου lager. Ο *Saccharomyces cerevisiae* είναι ένας από τους καλύτερους γενετικά χαρακτηρισμένους ζυμομύκητες καθώς το γονιδίωμα του είναι πλήρως αλληλουχισμένο και έχει αναλυθεί διεξοδικά (Olaniran et al., 2017).

Οι ζυμομύκητες που χρησιμοποιούνται σήμερα στα ζυθοποιεία χωρίζονται κατά κανόνα σε δύο κύριες κατηγορίες, στους ζυμομύκητες κορυφής και στους ζυμομύκητες πυθμένα (Olaniran et al., 2017). Η μπίρα επομένως, είναι διαιρεμένη σε δύο πολύ ευρείες κατηγορίες, στις μπίρες τύπου ale και στις μπίρες τύπου lager. Η ζύμη lager, γνωστή ως *Saccharomyces pastorianus* ή *Saccharomyces carlsbergensis*, εκτελεί τη ζύμωση σε κρύες θερμοκρασίες όπου αναπτύσσεται αργά και καθιζάνει στον πυθμένα της δεξαμενής. Οι ζύμες αυτές είναι γνωστές ως ζύμες που ζυμώνουν στο κάτω μέρος (Olaniran et al., 2017; Callejo et al., 2017). Οι μπίρες τύπου lager, που παράγονται από τους ζυμομύκητες πυθμένα, είναι το πιο κοινό είδος μπίρας σε όλο τον κόσμο (Olaniran et al., 2017). Το αρωματικό και γευστικό προφίλ της μπίρας εξαρτάται πολύ από το στέλεχος που χρησιμοποιείται. Μερικές διάσημες lager είναι οι Pilsners, Dortmunders, Märzen, Bocks, και τα αμερικανικά ποτά βύνης (Callejo et al., 2017).

Ο *Saccharomyces cerevisiae* χρησιμοποιείται κυρίως για την παραγωγή αφροζύμωντων μπιρών (ale), κατά την ζύμωση των οποίων οι ζυμομύκητες κροκιδώνονται ή συσσωματώνονται και στη συνέχεια προσκολλώνται στο διοξείδιο του άνθρακα που παράγεται με αποτέλεσμα να επιπλέουν στην κορυφή του γλεύκους. Το γεγονός αυτό δίνει τη δυνατότητα στους ζυθοποιούς να συλλέξουν τη ζύμη και να δημιουργήσουν περισσότερες αποικίες τι οποίες θα χρησιμοποιήσουν για την παραγωγή άλλων μπιρών (Olaniran et al., 2017). Θεωρούνται ζυμομύκητες με υψηλή ζυμωτική ικανότητα, οι οποίοι σχηματίζουν υψηλές ποσότητες εστέρων που παράγουν το χαρακτηριστικό αισθητήριο προφίλ των ale μπιρών όπως είναι οι ales, porters, stouts, Altbier, Kölsch, και οι μπίρες σιταριού (Callejo et al., 2017). Τα στελέχη ale χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερη ποικιλομορφία από τα στελέχη lager (Capece et al., 2018).

Το γευστικό προφίλ της μπίρας μπορεί κατά κύριο λόγο να αποδοθεί στις διεργασίες που συμβαίνουν εντός του κυττάρου του ζυμομύκητα, κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, όπου τα σάκχαρα του γλεύκους μετατρέπονται σε αιθανόλη και σε πτητικές ενώσεις (όπως υψηλότερες αλκοόλες και εστέρες), τα οποία είναι και τα υποπροϊόντα του μεταβολισμού των ζυμών. Αυτές οι πτητικές ενώσεις όμως δεν είναι όμοιες με αυτές της βύνης και του λυκίσκου. Οι ενώσεις αυτές έχουν σημαντικό αντίκτυπο στο άρωμα και στη γέυση της μπίρας (Olaniran et al., 2017).

Σε μια έρευνα οι King and Dickinson (2000), έδειξαν ότι ο *Saccharomyces cerevisiae* έχει την ικανότητα να μετασχηματίζει ένα φάσμα μονοτερπενικών αλκοολών, χρησιμοποιώντας μια σειρά αντιδράσεων. Καθώς αυτές οι ενώσεις υπάρχουν τόσο στον λυκίσκο όσο και στα σταφύλια, οι αντιδράσεις αυτές είναι πιθανόν να επιρρεάσουν τις οργανοληπτικές ιδιότητες του οίνου και της μπίρας. Οι τροποποιήσεις των τερπενοειδών μπορεί όχι μόνο να αλλάξουν τον τύπο του αρώματος, αλλά και την ένταση (King & Dickinson, 2000). Εμπορικά στελέχη *Saccharomyces* εμβολιάζονται συνήθως για να ζυμωθούν αλκοολούχα ποτά λόγω της ικανότητάς τους να μετατρέπουν όλα τα ζυμώσιμα σάκχαρα σε αιθανόλη. Ωστόσο, οι σύγχρονες τάσεις στην οινοποίηση έχουν στραφεί προς τα λιγότερο γνωστά, non-*Saccharomyces* είδη ζυμών (Benito, 2018).

3.4.2 Non-*Saccharomyces* ζύμες:

Ο *Saccharomyces* δεν είναι ο μόνος ζυμομύκητας που μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη ζυθοποιία. Οι ζυμώσεις που προκύπτουν από καθάρες καλλιέργειες συμβατικών ζυμομυκήτων δίνουν περιορισμένη περιπλοκότητα στην μπίρα (Toh et al., 2018). Πολλά παραδοσιακά ποτά σε όλο τον κόσμο φτιάχνονται από ζυμομύκητες που δεν ανήκουν στο γένος αυτό σε συνδυασμό με τον συμβατικό αυτόν ζυμομύκητα. Αυτές οι ζυμώσεις που προκύπτουν από τέτοιου είδους μικτών καλλιιεργειών, δίνουν διάφορα αποτελέσματα με διαφορετικά αρώματα (Vanderhaegen et al., 2003). Η αποτελεσματικότητα των ζυμομυκήτων στις μικτές καλλιέργειες καθορίζεται από διάφορες παραμέτρους, όπως είναι η διαθεσιμότητα σε θρεπτικές ουσίες, ο ρυθμός ζύμωσης αλλά και ο χρόνος εμβολιασμού του κάθε μικροοργανισμού. Όλα αυτά επηρεάζουν την ανταγωνιστικότητα των ζυμών προς την άλλη (Holt et al., 2018).

Επιλεγμένα στελέχη ζυμών *Saccharomyces* χρησιμοποιούνται εδώ και τουλάχιστον 150 χρόνια για την παραγωγή μπίρας και κρασιού. Παρ' όλο που η χρήση στελεχών *Saccharomyces* εξασφαλίζει μεγάλη ασφάλεια και σιγουριά τόσο για τη ζύμωση όσο και για το τελικό προϊόν, τα τελευταία χρόνια η συζήτηση για τη χρήση ζυμών non-*Saccharomyces* γίνεται όλο και πιο έντονη (Tataridis et al., 2013)

Παρατηρείται πλέον μείωση στο ενδιαφέρον των καταναλωτών για τις παραδοσιακές μπίρες, καθώς συνεχώς παράγονται καινούργια αλκοολούχα ποτά με ιδιαίτερες γεύσεις (Capece et al., 2018). Οι ζυθοποιοί για να ανατρέψουν αυτή την τάση προσπαθούν να βρουν τρόπους βελτίωσης των ποιοτικών χαρακτηριστικών της μπίρας δίνοντας στο τελικό προϊόν μεγαλύτερη πολυπλοκότητα και νέα αρώματα (Michel et al., 2016). Τα αρωματικά στοιχεία που χαρακτηρίζουν τα διάφορα είδη μπίρας προέρχονται από το κριθάρι, τη βύνη και τον λυκίσκο. Παρ' όλα αυτά τον κυρίαρχο ρόλο στη ζυθοποίηση τον παίζει η ζύμη όπου, μεταβολίζοντας τα σάκχαρα του γλεύκους παράγει αιθανόλη, διοξείδιο του άνθρακα και διάφορα αρωματικά συστατικά (εστέρες, ανώτερες αλκοόλες, αλδεΐδες και οργανικά οξέα). Κατά συνέπεια η επιλογή νέων ζυμών μπορεί να επιφέρει την επιθυμητή αλλαγή στο παραδοσιακό προϊόν (Canonica et al., 2015). Η χρήση άγριων και μη συμβατικών στελεχών non-*Saccharomyces* ζυμών μπορούν να προσφέρουν διαφορετικά αρώματα και γεύσεις και να έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή εναλλακτικών τύπων μπίρας (Varela, 2016). Παρά το γεγονός ότι δεν έχουμε πλήρως

κατανοήσει τη λειτουργία αυτών των ζυμών, φαίνεται να προσφέρουν πολλές ευκαιρίες στους ζυθοποιούς (Capece et al., 2018). Η χρήση ζυμομυκήτων non-*Saccharomyces* επιτρέπει νέες δυνατότητες βελτίωσης και καινοτομίας στο αισθητήριο προφίλ των μπιρών αλλά και τεχνολογικά πλεονεκτήματα καθώς και νέους τρόπους ωρίμανσης. Αρκετά άρθρα αναφέρουν τη σημασία των non-*Saccharomyces* ζυμών στη μπίρα και σε άλλα ποτά που έχουν υποστεί ζύμωση.

Παρά το γεγονός ότι οι μη συμβατικοί ζυμομυκήτες συχνά συνδέονται με μικροβιολογικές αλλοιώσεις, υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν το αντίθετο (Jolly et al., 2006). Στα πλεονεκτήματα των non-*Saccharomyces* ζυμών, εκτός από την αύξηση της πολυπλοκότητας του ποτού, συγκαταλέγεται και η μεγαλύτερη παραγωγή γλυκερίνης η οποία ενισχύει την αίσθηση στο στόμα (σώμα) (Varela, 2016). Ένα ακόμη θετικό χαρακτηριστικό αυτών των ζυμών είναι ότι μερικά από τα στελέχη non-*Saccharomyces* έχουν μεγάλη περιεκτικότητα σε ορισμένα ένζυμα τα οποία σχετίζονται με την παραγωγή μονοτερπενίων. Τα μονοτερπένια σχετίζονται με τα αρώματα του λυκίσκου, χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιων ουσιών είναι η λιναλόλη και το λιμονένιο. Τέλος η χρήση εναλλακτικών στελεχών δίνει ακόμη τη δυνατότητα παραγωγής μπίρας χαμηλού αλκοολικού περιεχομένου (low-alcohol beer 0.5-1.2%) και μπίρα χωρίς αλκοόλη (alcohol-free beer <0.5%), γεγονός πολύ θετικό, καθώς στη σύγχρονη κοινωνία ο άνθρωπος ολοένα και περισσότερο στρέφεται στην υγιεινή ζωή (Michel et al., 2016,b).

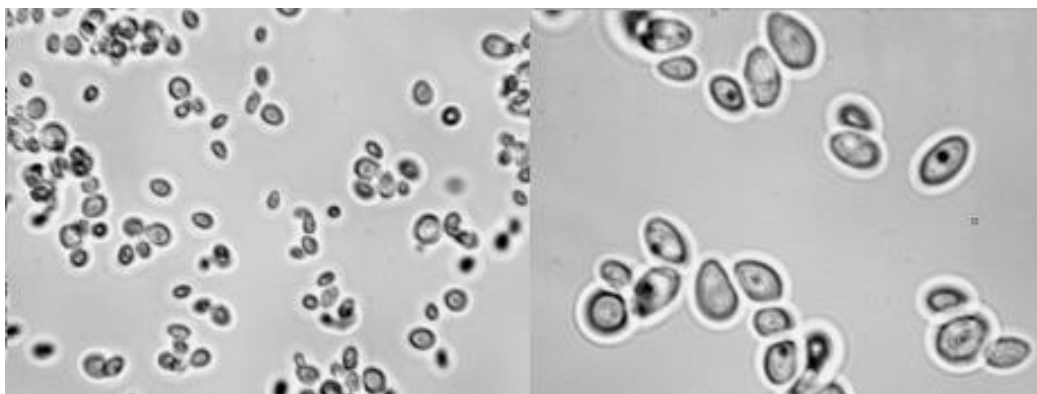
Παρ' όλα αυτά, η πορεία της ζύμωσης που ακολουθούν τα non-*Saccharomyces* είδη διαφοροποιείται αρκετά σε αντίθεση με τα καθιερωμένα στελέχη *Saccharomyces*, των οποίων οι συνθήκες ζύμωσης είναι γνωστές και η σύσταση του παραγόμενου προϊόντος είναι απολύτως ελεγχόμενη. Πιο συγκεκριμένα στην περίπτωση των συμβατικών ζυμών οι συνθήκες ζύμωσης (π.χ. θερμοκρασία, pH) και ο χρόνος που απαιτείται για αυτήν είναι πλέον αυτοματοποιημένες. Ακόμη υπάρχει απόλυτη κατανόηση των μεταβολικών μονοπατιών των σακχάρων και των αμινοξέων καθώς και της παραγωγής των αρωματικών συστατικών. Αντίθετα για την ταυτοποίηση των χαρακτηριστικών των non-*Saccharomyces* ζυμών απαιτείται εκτενής έρευνα καθώς η διαφοροποίηση αυτών είναι μεγάλη (Michel et al., 2016,b). Για παράδειγμα μερικοί non-*Saccharomyces* μικροοργανισμοί παράγουν ανεπιθύμητους δευτερογενείς μεταβολίτες όπως είναι το οξικό οξύ (acetic acid), ο οξικός αιθυλεστέρας (ethyl acetate), ethyl phenols, οι αλδεΐδες και η ακετόνη (acetoin) (Dutraive et al., 2019) και φαινολικές οσμές (off-flavours) οι οποίες είναι ανεπιθύμητες τόσο στην παραγωγή κρασιού όσο και στη μπίρα. Αυτά τα φαινολικά αρώματα παράγονται από την αποκαρβοξυλίωση ορισμένων οξέων τα οποία υπάρχουν στο βυνογλεύκος, όπως το φερουλικό οξύ, το κουμαρικό οξύ και το κιναμωμικό οξύ (Varela, 2016). Από τη στιγμή που οι ζυμομυκήτες παίζουν ρόλο στο σχηματισμό και την απελευθέρωση των αρωματικών ενώσεων κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης τότε υπάρχει πιθανότητα να παίζουν ρόλο στην ποσότητα αλλά και ποιότητα αυτών των αρωμάτων (Dutraive et al., 2019) Παρά το γεγονός ότι τα είδη non-*Saccharomyces* έχουν μεγάλες ικανότητες όσον αφορά την παραγωγή ποικίλων αρωματικών προφίλ στην παραγωγή αλκοολούχων ποτών, οι δυνατότητες των ζυμών αυτών δεν έχουν μελετηθεί επαρκώς στην παραγωγή μπίρας σε συνδυασμό με τον *Saccharomyces cerevisiae*. Ακόμα, παρά τη μεγάλη τους δυνητικότητα στη παραγωγή αρωμάτων, μόνο λίγα είδη μη συμβατικών ζυμομυκήτων έχουν αξιολογηθεί στις ζυμώσεις μπίρας (Holt et al., 2018).

Επιπλέον, δεν μπορούν όλα τα στελέχη μη συμβατικών ζυμομυκήτων να ολοκληρώσουν μια αλκοολική ζύμωση. Η πλειοψηφία αυτών, αδρανοποιείται κατά τη διάρκεια των πρώτων σταδίων μιας έντονης ζύμωσης. Αυτό μπορεί να οφείλεται, στην αργή ανάπτυξή τους και στην αναστολή τους από ένα συνδυασμό αποτελεσμάτων όπως αυτό του διοξειδίου του θείου, του

χαμηλού pH, της υψηλής περιεκτικότητας σε αιθανόλη αλλά και της έλλειψης οξυγόνου. Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι μερικές ζύμες non-*Saccharomyces*, μπορούν να επιβιώσουν και σε ένα μεταγενέστερο στάδιο της ζύμωσης (έως και 12 ημέρες) από ότι ήταν αρχικά πιστευτό (Jolly et al., 2006).

Το οινολογικό ενδιαφέρον αυτών των ζυμών στη βιομηχανία του κρασιού, είναι ακόμα μικρότερο, λόγω των χαμηλών επιδόσεών τους στις ζυμώσεις αλλά και στην ευαισθησία τους προς το διοξείδιο του θείου. Ωστόσο, από τη στιγμή που οι κλιματικές αλλαγές επηρεάζουν την περιεκτικότητα του σταφυλιού σε σάκχαρα, οι non-*Saccharomyces* ζύμες έχουν γίνει αρκετά γνωστές για την ικανότητά τους να μειώνουν τα επίπεδα της αιθανόλης καθώς και να παράγουν κρασία με μεγαλύτερη πολυπλοκότητα και ενισχυμένα αρώματα (Dutraive et al., 2019).

3.4.3 *Metschnikowia pulcherrima*:



Εικόνα 13: Ο μικροοργανισμός *Metschnikowia pulcherrima* όπως φαίνεται από το μικροσκόπιο (Fernandez et al., 2000).

Το γένος *Metschnikowia* αποτελεί ένα καλά τεκμηριωμένο γένος τελομορφικών ζυμών της τάξης *Ascomycete* (Kurtzman, 1998). Το φύλο *Ascomycota* αποτελεί ένα ευρύτατο άθροισμα 18.000 σαπροφυτικών και παρασιτικών ειδών και περιλαμβάνει έναν εξίσου μεγάλο αριθμό (περίπου 14.000) ειδών που δημιουργούν λειχήνες (Μακρή, 2011). Από την πρώτη κατάγραφή του γένους *Metschnikowia*, περισσότερα από 40 είδη έχουν ενταχθεί σε αυτό, συμπεριλαμβανομένων αρκετών ειδών *Candida*. Η αναμορφική μορφή του μικροοργανισμού αυτού ονομάζεται *Candida pulcherrima* (Morata et al., 2019). Τα είδη του γένους *Metschnikowia* χαρακτηρίζονται από τον σχηματισμό μακρών βελονοειδών ασκοσπορίων. Το όνομα *Metschnikowia* εισήχθη αργότερα από τον Kamienski το 1899 (Ευθυμίου, 2015).

Η *Metschnikowia pulcherrima* είναι μια ζύμη με σφαιρικό/ελλειπτικό σχήμα που δεν μπορεί να διακριθεί από τον *Saccharomyces cerevisiae* με μικροσκόπιο. Υπό συνθήκες περιβαλλοντικού stress, όπως είναι η έλλειψη αζώτου, ο ζυμομύκτης αυτός εμφανίζει ένα στρώμα λίπους στο εσωτερικό του κυττάρου κατά την παραγωγή σπορίων, γεγονός που τον κάνει να αναγνωρίζεται εύκολα με τη χρήση οπτικού μικροσκόπιου. Η *Metschnikowia pulcherrima* είναι μια ευρέως διαδεδομένη ζύμη που έχει βρεθεί στα σταφύλια, τα φρούτα (φρέσκα και αλλοιωμένα), τα φυτά, το νέκταρ και τα δέντρα. Πολλά έντομα μπορούν να λειτουργήσουν ως φορείς της ζύμης αυτής (Morata et al., 2019).

Έχει τη δυνατότητα να αναπτύσσεται κανονικά είτε σε θρεπτικό μέσο YPD είτε L-λυσίνης και μπορεί επίσης να χρησιμοποιήσει την αρβουτίνη ως πηγή άνθρακα, υποδεικνύοντας τη

δραστικότητα της β-γλυκοσιδάσης. Όταν πρόκειται για θρεπτικό υλικό από νιτρικό άγαρ ο ζυμομύκητας εμφανίζει από πολύ μικρή έως καθόλου ανάπτυξη. Αδυναμία ανάπτυξης εμφανίζει επίσης όταν τοποθετηθεί σε θρεπτικό υλικό YPD στην θερμοκρασία των 37 °C όμως. Προσφάτως, αξιολογήθηκε η απαίτηση του ζυμομύκητα σε άζωτο και παρατηρήθηκε ότι καταναλώνει το αμμώνιο με βραδύτερους ρυθμούς σε σύγκριση με άλλα γένη ζυμών. Αυτή η αργή πρόσληψη του αζώτου είναι ενδεικτική της χαμηλής ικανότητάς της να ζυμώσει (Ribéreau-Gayon, 2006). Μπορεί να χρησιμοποιήσει τη γλυκόζη, τη φρουκτόζη και τη γαλακτόζη ως πηγές άνθρακα αλλά δείχνει αδυναμία στην κατανάλωση της λακτόζης. Μπορεί να αναπτυχθεί σε συνθήκες χαμηλής θερμοκρασίας (15-20 °C) και pH (3-6) (Morata et al., 2019).

Χαρακτηρίζεται από τη δραστηριότητα των ακόλουθων ενζύμων: πηκτινάση, πρωτεάση, γλυκανάση, λυφενάση, β-γλυκοσιδάση, κυτταρινάση, ξυλανάση, αμυλάση, αναγωγάση θειώδους, λιπάση και β-λυάση. Αυτό συμβαίνει επειδή η *Metschnikowia pulcherrima* είναι ένας από τους μη συμβατικούς ζυμομύκητες που μπορεί να εκφράσει περισσότερα εξωκυτταρικά υδρολυτικά ένζυμα. Η υψηλή πρωτεολυτική της δραστηριότητα την καθιστά ένα πολύ ενδιαφέρον ζυμωτικό συνεργάτη για τον *Saccharomyces cerevisiae*, δεδομένου ότι τα απελευθερούμενα αμινοξέα μπορούν να χρησιμεύσουν ως πηγή θρεπτικών ουσιών για τον *Saccharomyces cerevisiae*. Επιπλέον, η έντονη δραστηριότητα της γλυκοσιδάσης, που είναι υψηλότερη υπό αερόβιες συνθήκες, προωθεί την απελευθέρωση των ποικιλιακών αρωμάτων από το σταφύλι με την υδρόλυση δεσμευμένων μονοτερπενίων. Η ένταση της ενζυμικής δραστηριότητας όμως δεν εξαρτάται μόνο από το είδος, αλλά και από το στέλεχος (Morata et al., 2019).

Είναι επίσης γνωστή για την παραγωγή κόκκινης χρωστικής (πουλχεριμίνη) που σχηματίζεται από την μη αναστρέψιμη σύνδεση του πουλχεριμικού οξέος και του περιβαλλοντικού σιδήρου. Το γεγονός αυτό αποτρέπει την ανταγωνιστική μικροχλωρίδα να έχει πρόσβαση στον σίδηρο, και αποτελεί βάση για τη χρήση της ζύμης ως βιο-μυκητοκτόνο για τον έλεγχο ασθενειών που προκύπτουν μετά τη συγκομιδή (Santamauro et al., 2014). Η πουλχεριμίνη επίσης έδειξε αποτελεσματική ανασταλτική δράση έναντι πολλών ζυμών, όπως είναι οι: *Candida tropicalis* και *Candida albicans*, καθώς και στα γένη *Brettanomyces/Dekkera*, *Hanseniaspora* και *Pichia* καθώς και έναντι των μυκήτων: *Botrytis cinerea*, *Penicillium*, *Alternaria* και *Monilia*. Ωστόσο, ο *Saccharomyces cerevisiae* φαίνεται να μην επηρεάζεται από αυτήν την αντιμικροβιακή δράση (Morata et al., 2019). Ως εκ τούτου, η εν λόγω ζύμη μελετήθηκε περαιτέρω από τους ερευνητές, με σκοπό τη δυνητική καλλιέργεια χαμηλού κόστους σε μη αποστειρωμένες συνθήκες, ως παράγοντας βιολογικού ελέγχου, λόγω της έκκρισης ισχυρών αντιμικροβιακών ενώσεων, (πουλχεριμικό οξύ και 2-φαινυλαιθανόλη) καθώς και της ανθεκτικότητάς της στην υψηλή σχετικά οξύτητα (Santamauro et al., 2014). Επιπλέον εμφανίζει ακόμα, έναν ευρύ παράγοντα killer εναντίον ορισμένων ζυμών αλλοίωσης, από τις οποίες η *C.glabrata* έδειξε τη μεγαλύτερη ευαισθησία στις παραγόμενες τοξίνες του μικροοργανισμού αυτού (Morata et al., 2019).

Η ζύμη *Metschnikowia pulcherrima*, είναι γνωστό ότι περιορίζει σημαντικά την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών στο φυσικό περιβάλλον και κατά συνέπεια χρησιμοποιείται στο εμπόριο ως παράγοντας ελέγχου μετά τη συγκομιδή (Savini et al., 2013; Santamauro et al., 2014). Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης της στην επιφάνεια των σταφυλιών η *Metschnikowia pulcherrima* θεωρείται ότι καταβολίζει συστατικά του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος, καθώς και σάκχαρα προερχόμενα από το εσωτερικό των σταφυλιών. Η ιδιότητα αυτή υποδεικνύει ένα βαθμό

μεταβολικής προσαρμοστικότητας που ενδείκνυται για βιομηχανικές εφαρμογές στην οινολογία. (Santamauro et al., 2014). Η εν λόγω ζύμη ευδοκimei στο γλεύκος, παρά την υψηλή οξύτητα (pH 3 έως 4) και τη συγκέντρωση σακχάρων (>100 g/L) και αντιστέκεται στην ανταγωνιστική μικροχλωρίδα του γλεύκους (Ευθυμίου, 2015).

Στην περίπτωση του οινογλεύκους είναι αναγκαία η χρήση της *Metschnikowia pulcherrima* μαζί με άλλες ζύμες με υψηλή ζυμωτική ισχύ όπως είναι ο *Saccharomyces cerevisiae* ή ο *Schizosaccharomyces pombe* για την πλήρη αποζύμωση των σακχάρων του σταφυλιού. Η ζυμωτική ισχύς της *Metschnikowia pulcherrima* σε σχέση με άλλους μη συμβατικούς ζυμομύκητες είναι χαμηλή, με πολλά στελέχη να φτάνουν το 4% v/v σε αιθανόλη (Comitini et al., 2011), αν και προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει την περιεκτικότητα σε αιθανόλη να φτάνει μέχρι 6-7% v/v (Comбина et al., 2005). Όσον αφορά την πτητική οξύτητα η περιεκτικότητα κυμαίνεται από 0.3 έως 0.4 g/L εκφρασμένη σε οξικό οξύ (Comitini et al., 2011). Ο ρόλος λοιπόν της *Metschnikowia pulcherrima* στην παραγωγή κρασιού είναι να ξεκινήσει τη ζύμωση του γλεύκους, όταν ακόμη ο ζυμομύκητας *Saccharomyces* βρίσκεται στη φάση ανάπτυξης, κατάστέλλοντας ταυτόχρονα την ανάπτυξη άλλων μη επιθυμητών μικροοργανισμών (Oro et al., 2016). Ο συγκεκριμένος non-*Saccharomyces* μικροοργανισμός έχει τη δυνατότητα ζύμωσης του γλεύκους έως ότου η περιεκτικότητα σε αλκοόλ φθάσει το 5%, όπου η ευαισθησία του στην αιθανόλη αποτρέπει περαιτέρω μεταβολισμό και προκαλεί την εξάλειψη όλων των ειδών ζύμης εκτός από τον *Saccharomyces*. Ο *Saccharomyces* στη συνέχεια θα ζυμώσει το κρασί όταν η περιεκτικότητα σε αιθανόλη υπερβεί το 5%. Εκτός της αντιμικροβιακής της δράσης η συγκεκριμένη ζύμη συχνά επιλέγεται και σε περιπτώσεις που επιθυμείται η παραγωγή ενός οίνου με χαμηλότερη συγκέντρωση αιθανόλης (Hidalgo et al., 2014; Varela, 2016). Αυτό συνδέεται με τους αερόβιους αναπνευστικούς μεταβολισμούς της *Metschnikowia pulcherrima* που, σε κατάλληλες συνθήκες αερισμού, μπορεί να μεταβολίζει αερόβια περισσότερο από το 40% των σακχάρων, μειώνοντας έτσι σημαντικά την αποδοχή της αιθανόλης (Morata et al., 2019). Στην περίπτωση αυτή πάλι η *Metschnikowia pulcherrima* ξεκινά την ζύμωση και στην συνέχεια επιλέγεται ένα συμβατικό στέλεχος ζυμομύκητα. Η διαδοχική αυτή ζύμωση έχει εφαρμοστεί στην παραγωγή Chardonnay και Shiraz και είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή κρασιού με 0.9 και 1.6% v/v λιγότερη αιθανόλη αντίστοιχα αλλά και στην ταυτόχρονη αύξηση της συγκέντρωσης εστέρων και ανώτερων αλκοολών (Oro et al., 2016). Χαμηλότερη περιεκτικότητα σε αιθανόλη και ακεταλδεΐδη, με παραγωγή υψηλότερων ποσοστών γλυκερόλης παρατηρήθηκε όταν χρησιμοποιήθηκαν επιλεγμένα στελέχη *Metschnikowia pulcherrima* στην οινοποίηση λευκών κρασιών Verdejo. Παρατηρήθηκε επίσης βελτίωση του αρωματικού προφίλ συγκεκριμένων λευκών οίνων (όπως είναι τα κρασιά Verdejo αλλά και άλλων σχετικά παρόμοιων κρασιών από ποικιλίες σταφυλιών Sauvignon Blanc και Chardonnay) (Ruiz et al., 2018)

Η απλή χρήση της *Metschnikowia pulcherrima* οδήγησε σε υπερβολική παραγωγή οξικού αιθυλεστέρα, ολικών εστέρων και ολικών ανώτερων αλκοολών (Ivit & Kemp, 2018), με αρνητικές οργανοληπτικές επιπτώσεις. Ωστόσο, η χρήση μικτών καλλιέργειών της *Metschnikowia pulcherrima* μειώνει την παραγωγή του οξικού αιθυλεστέρα στους παραγόμενους οίνους, ευνοώντας τον σχηματισμό 2-φαινυλαιθανόλης και οξικού 2-φαινυλαιθυλεστέρα (Morata et al., 2019; Ivit & Kemp, 2018), προσφέροντας αρώματα φρούτων και λουλουδιών (Escribano et al., 2018).

Στους αφρώδεις οίνους η παραγωγή της β-γλυκοσιδάσης από τον ζυμομύκητα *Metschnikowia pulcherrima* είναι υψηλή και η παρουσία του σε μικτές καλλιέργειες μπορεί να μειώσει την

πτητική οξύτητα, να αυξήσει την παραγωγή λιπαρών οξέων μέσης αλυσίδας (MCFA), καθώς και την παραγωγή αλκοόλης, εστέρων, τερπενολών και γλυκερόλης. Έχει λοιπόν αναγνωρισθεί η συνεισφορά του ζυμομύκητα στο αρωματικό προφίλ των οίνων αυτών καθώς και στη βελτίωση του αφρού (Ivit & Kemp, 2018).

Η ζύμη *Metschnikowia pulcherrima* έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή κρασιού από μάνγκο (Li et al., 2012a; Li et al., 2012b; Sadineni et al., 2012). Μάλιστα τα κρασιά αυτά που ζυμώθηκαν από μικτές καλλιέργειες ζυμών *Metschnikowia pulcherrima* με *Saccharomyces cerevisiae* προτιμήθηκαν περισσότερο από εκείνα που ζυμώθηκαν αποκλειστικά από τον *Saccharomyces cerevisiae* (Sadineni et al., 2012; Varela, 2016).

Συνοψίζοντας η πολυχρησιμότητα της *Metschnikowia pulcherrima* έγκειται στην ικανότητά της να ζυμώνει σε συνδυασμό με άλλους ζυμομύκητες καθώς και να ρυθμίζει τη σύνθεση των δευτερογενών μεταβολιτών της ζύμωσης για τη βελτίωση του αισθητικού προφίλ του κρασιού. Χαρακτηρίζεται από μια μέτρια δύναμη ζύμωσης και μια υψηλή ενζυματική ικανότητα για την απελευθέρωση αρωματικών προδρόμων από το σταφύλι (Morata et al., 2019).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο ΤΑ ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΜΠΙΡΑΣ

4.1 ΤΟ ΧΡΩΜΑ:

Το χρώμα είναι ένα από τα πιο βασικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της μπίρας, καθώς είναι η πρώτη εντύπωση που δημιουργείται στον καταναλωτή σχετικά με το προϊόν. Το χρώμα καθορίζεται αρχικά από την επιλογή των πρώτων υλών και ιδιαίτερα της βύνης και όχι μόνο από το είδος της βύνης αλλά και από τον βαθμό άλεσης και ξήρανσης αυτής. Στην συνέχεια της διαδικασίας η ένταση του χρώματος μπορεί να αυξηθεί κατά το στάδιο του βρασμού. Συγκεκριμένα δύο είναι οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στο στάδιο αυτό και σχετίζονται με το χρώμα της μπίρας.

4.1.1 Η ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ MAILLARD:

Η αντίδραση Maillard ή αλλιώς μη ενζυμικό μαύρισμα, όπως έχει ήδη αναφερθεί είναι μια πολύπλοκη αντίδραση που συμβαίνει στα τρόφιμα. Τα αντιδρώντα αυτής είναι τα σάκχαρα και τα αμινοξέα που υπάρχουν στη μπίρα, ενώ τα προϊόντα είναι μελανοϊδίνες. Ο ρυθμός της αντίδρασης μη ενζυμικού μαυρίσματος εξαρτάται σημαντικά από τη θερμοκρασία και το pH του τροφίμου. Συγκεκριμένα η αύξηση της θερμοκρασίας και του pH έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του ρυθμού της αντίδρασης. Ακόμη η αντίδραση εξαρτάται και από το είδος των σακχάρων που παίρνουν μέρος σε αυτήν καθώς τα σάκχαρα μεγαλύτερου μοριακού βάρους είναι πιο δραστικά (Τζιά et al., 2008). Γίνεται λοιπόν κατανοητό ότι η επιλογή της πρώτης ύλης και των συνθηκών πολτοποίησης θα επηρεάσει σε μεγάλο βαθμό το χρώμα της μπίρας. Τα σκουρόχρωμα προϊόντα της αντίδρασης Maillard είναι σύνθετες ενώσεις οι οποίες παρά το γεγονός ότι περιέχουν άζωτο, δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν από τις ζύμες ως θρεπτικό υλικό κατά τη ζύμωση (Lewis & Bamforth, 2006).

4.1.2 Η ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ:

Η δεύτερη αντίδραση που επηρεάζει το χρώμα της μπίρας είναι η οξειδωση των πολυφαινολών. Η αντίδραση αυτή τις περισσότερες φορές καταλύεται από ένζυμα και συγκεκριμένα από το πολύ θερμοάντοχο ένζυμο περοξειδάση. Παρά την υψηλή θερμοκρασία κατά το στάδιο του βρασμού οι πολυφαινόλες οξειδώνονται προς ο-κινόνες παρουσία του ενζύμου περοξειδάση. Οι ο-κινόνες είναι αρωματικές δικετόνες με χαρακτηριστική οσμή και έντονο κίτρινο ή και κόκκινο χρώμα. Παρ' όλα αυτά οι ουσίες αυτές είναι δυνατό να μειωθούν κατά τη ζύμωση του γλεύκους καθώς θα χρησιμοποιηθούν ως πηγή αζώτου από του ζυμομυκητες (Lewis & Bamforth, 2006).

4.2 Ο ΑΦΡΟΣ:

Μετά την παρατήρηση του χρώματος, ο αφρός είναι ένα από τα επόμενα χαρακτηριστικά που παρατηρεί κάποιος στη μπίρα πριν την καταναλώσει. Η ποιότητα του αφρού της μπίρας χαρακτηρίζεται από τη σταθερότητα, την προσκόλλησή του στο γυαλί και την υφή του. Η σταθερότητα του αφρού εξαρτάται από ορισμένες επιφανειοδραστικές, υδρόφοβες ουσίες όπως είναι οι πρωτεΐνες, τα ίσο-α-οξέα και ορισμένα μεταλλικά ιόντα. Οι πρωτεΐνες προέρχονται από τη βύνη και κατά τη ζυθοποίηση μετατρέπονται σε πολυπεπτίδια τα οποία είναι εξαιρετικά υδρόφοβα (Evans & Sheehan, 2002). Οι υδρόφοβες αυτές ουσίες έχουν την τάση να εισέρχονται στις φυσαλίδες που δημιουργούν τα αέρια που περιέχονται στη μπίρα (κυρίως διοξείδιο του άνθρακα αλλά και άζωτο και οξυγόνο) μέσω του φαινομένου της πυρήνωσης. Οι φυσαλίδες ανεβαίνουν στην επιφάνεια του υγρού και σχηματίζουν τον γνωστό αφρό. Οι υδρόφοβες αυτές ουσίες έχουν την ιδιότητα να συγκρατούνται μεταξύ τους και κατά συνέπεια να σταθεροποιούν τον αφρό. Στη σταθεροποίηση συνεισφέρουν και ορισμένα πολυπεπτίδια τα

οποία έχουν ένα υδρόφιλο και ένα υδρόφοβο άκρο και έτσι μπορούν να βρίσκονται στη διαχωριστική επιφάνεια μεταξύ υγρού και αφρού. Κατά συνέπεια για την παραγωγή μιας μπίρας με σταθερό και κρεμώδη αφρό είναι σημαντική η χρήση βύνης με υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και λυκίσκου πλούσιου σε α-οξέα. Ένας ακόμη παράγοντας που επηρεάζει τον αφρό είναι η περιεκτικότητα της μπίρας σε λιπίδια τα οποία είναι υδρόφιλα και έχουν αρνητική επίδραση στη σταθεροποίηση του αφρού. Τα λιπίδια μπορεί να προέρχονται από τη βύνη αλλά το μεγαλύτερο ποσοστό αυτών προκύπτει από τον μεταβολισμό των ζυμών. Γλεύκος με υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα αυξάνει την οσμωτική πίεση με αποτέλεσμα ο μικροοργανισμός να έρθει σε κατάσταση στρες και έτσι θα παράξει μεγαλύτερη ποσότητα λιπιδίων. Για τον λόγο αυτό μπίρες υψηλού αλκοόλ δεν εμφανίζουν σταθερό και πλούσιο αφρό. Ένας ακόμη παράγοντας που επηρεάζει τον αφρισμό του ποτού είναι το πόσο άφρισε κατά τη ζύμωση και τη μεταφορά, καθώς κατά τον αφρισμό απομακρύνονται από τη μπίρα τα υδρόφοβα συστατικά της τα οποία σταθεροποιούν τον αφρό (Lewis & Bamforth, 2006).

4.3 ΤΟ ΘΟΛΩΜΑ:

Ένα ακόμη χαρακτηριστικό της μπίρας που απασχολεί τον καταναλωτή είναι το πόσο διαυγής είναι η μπίρα. Η πιο κοινή μορφή σχηματισμού θολώματος ή κολλοειδούς αστάθειας στη συσκευασμένη μπίρα είναι η συσσωμάτωση πρωτεϊνών και πολυφαινολικών ενώσεων. Η πηγή πρωτεϊνών στη μπίρα είναι η βύνη, παρ' όλα αυτά το μεγαλύτερο ποσοστό αυτών μετουσιώνεται κατά την πολτοποίηση και το βρασμό. Τα πολυτεππίδια που προκύπτουν μπορούν επίσης να προκαλούν θόλωμα, όμως με τη βοήθεια του βρασμού, της ζύμωσης και της ωρίμανσης οι πρωτεΐνες και τα παράγωγά τους μπορούν να απομακρυνθούν επαρκώς από τη μπίρα. Αντίστοιχα οι πολυφαινόλες προέρχονται από τη βύνη και τον λυκίσκο. Οι πρωτεΐνες και οι πολυφαινόλες σε συγκεκριμένες συνθήκες (παρουσία οξυγόνου) μπορούν να σχηματίσουν σύμπλοκα τα οποία να αναπτυχθούν σε κολλοειδές μέγεθος, οδηγώντας έτσι στο θόλωμα της μπίρας. Άλλες αιτίες θολώματος της μπίρας είναι από ανόργανα υλικά τα οποία προκύπτουν από ανεπαρκείς συνθήκες υγιεινής του ζυθοποιείου, από μη επαρκή απομάκρυνση ή κατάκλιση των ζυμών, από τον σχηματισμό κρυστάλλων οξαλικού ασβεστίου (αντίδραση μεταξύ οξαλικού οξέος που υπάρχει στη βύνη και ασβεστίου που προέρχεται από το νερό), ή ακόμη και από βακτηριακή μόλυνση (Steiner et al., 2010). Ανάλογα όμως με τον τύπο μπίρας, η μικρή διαύγεια του προϊόντος είναι επιθυμητή.

4.4 ΑΡΩΜΑ-ΓΕΥΣΗ (FLAVOUR):

Όπως έχει ήδη αναφερθεί τα βασικά συστατικά της μπίρας είναι τέσσερα, η βύνη, το νερό, ο λυκίσκος και η ζύμη. Κάθε ένα από τα συστατικά αυτά συνεισφέρουν και αλληλεπιδρούν για να διαμορφώσουν το τελικό αρωματικό προφίλ της παραγόμενης μπίρας. Το τελικό αρωματικό και γευστικό προφίλ της μπίρας οφείλεται σε ένα σύνολο εκατοντάδων flavour-active ενώσεων, οι οποίες παράγονται καθ' όλη τη διάρκεια της παραγωγής μπίρας. Το μεγαλύτερο μέρος των ενώσεων αυτών είναι ουσίες του μεταβολισμού των ζυμομυκήτων. Παράγονται κατά τη ζύμωση του ζυθογλεύκου και αποτελούνται από ενδιάμεσα ζύμωσης (fermentation intermediates) ή υποπροϊόντα (μεταβολίτες). Οι ανώτερες αλκοόλες, οι εστέρες, vicinal diketones (VDK's), κάποια καρβονύλια και ενώσεις του θείου είναι οι κύριες ενώσεις που παράγονται από τις ζύμες και είναι αυτές (μαζί με ουσίες του λυκίσκου) που καθορίζουν την τελική ποιότητα της μπίρας, ιδιαίτερα όταν είναι φρέσκια. Οι ανώτερες αλκοόλες και οι εστέρες είναι επιθυμητές πτητικές ουσίες με μερικές εξαιρέσεις. Μαζί με αυτές τις ενώσεις, ο μεταβολισμός των ζυμών συνεισφέρει στη βιοσύνθεση τριών ακόμα ομάδων από flavour-active ενώσεων όπως είναι τα οργανικά οξέα, οι ενώσεις του θείου (οργανικές και ανόργανες) και οι αλδεΐδες. Παρά το γεγονός ότι η

αιθανόλη, το διοξείδιο του άνθρακα και η γλυκερίνη είναι τα κύρια προϊόντα των ζυμών κατά τη ζύμωση, επηρεάζουν λίγο το γευστικό και αρωματικό προφίλ της μπίρας. Η ισοροπία του γευστικού και αρωματικού προφίλ της μπίρας επηρεάζεται όμως από τον τύπο και τη συγκέντρωση των παραπάνω ενώσεων. Υπάρχουν όμως πολλοί παράγοντες που μπορούν να αλλάξουν αυτήν την ισοροπία όπως είναι το στέλεχος της χρησιμοποιούμενης ζύμης, το είδος της βύνης, οι θερμοκρασίες ζύμωσης, το πρόγραμμα ζύμωσης, το pH του ζυθογλεύκου, κ.ά..

Στο παρόν κεφάλαιο θα αναπτυχθούν οι αρωματικές ενώσεις που παράγονται από τους ζυμομύκητες και οι οποίες ως επί το πλείστον αποτελούν δευτερογενείς μεταβολίτες της ζύμωσης. Επιπλέον θα γίνει αναφορά σε ορισμένες ανεπιθύμητες αρωματικές ουσίες οι οποίες είναι πιθανό να προκληθούν από ανεπαρκή εργοστασιακό εξοπλισμό, καθώς και από κακές συνθήκες συσκευασίας και μεταφοράς του προϊόντος.

4.4.1 ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΕΙΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ:

Η πλειοψηφία των χημικών ενώσεων που σχετίζονται με τα αρώματα της μπίρας εμφανίζονται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις και προκύπτουν ως προϊόντα από μεταβολικές οδούς που οδηγούν στην ανάπτυξη της ζύμης (αναβολισμός).

Πολλές από αυτές τις ουσίες είναι κυριολεκτικά τα τελικά προϊόντα του μεταβολισμού που δεν έχουν περαιτέρω χρησιμότητα στη ζύμη, μερικές απλώς διαρρέουν από το μεταβολικό μονοπάτι επειδή εμφανίζονται σε περίσσεια ενώ άλλες είναι προϊόντα μεταβολισμού που υποβαθμίζονται ώστε να είναι λιγότερο τοξικές για το κύτταρο και / ή να απεκκρίνονται ευκολότερα (Lewis & Bamforth, 2006).

4.4.2 ΑΛΚΟΟΛΕΣ:

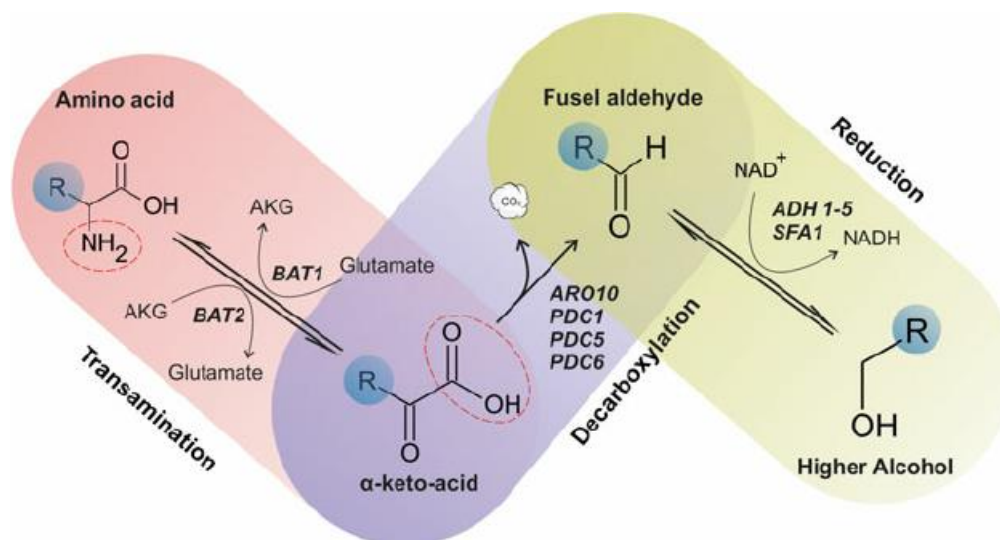
Μια από τις κύριες αλκοόλες που εμφανίζονται στη μπίρα είναι η αιθανόλη (Vanderhaegen et al., 2006). Η αιθανόλη είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη οργανική ένωση η δραστηριότητα της οποίας βασίζεται κυρίως στην ομάδα υδροξυλίου που φέρει (Riitonen et al., 2013). Αποτελεί πολικό διαλύτη με υψηλή διαλυτότητα στο νερό και έχει σημείο ανάφλεξης στους 55°F (13 °C). Παρουσιάζει μικρότερη τοξικότητα από άλλες αλκοόλες όπως, η μεθανόλη, ενώ ταυτόχρονα διαλύματα καθαρής αιθανόλης δεν περιλαμβάνουν καρκινογόνες ενώσεις.

Σε μικρότερες αλλά σημαντικές ποσότητες υπάρχουν και οι ανώτερες αλκοόλες οι οποίες συνεισφέρουν σημαντικά στα αρώματα της μπίρας. Χαρακτηριστικά αρώματα των ανώτερων αλκοολών είναι τα φυτικά, φρουτώδη και τα αρώματα βοτάνων, τα οποία εξαρτώνται από το πώς αλληλεπιδρούν με τα άλλα αρωματικά συστατικά της μπίρας (Yonezawa & Fushiki, 2002). Από τις πιο σημαντικές ανώτερες αλκοόλες που υπάρχουν στη μπίρα είναι οι:

- Η n-προπανόλη όπου έχει το υψηλότερο όριο ανίχνευσης ίσο με 600 mg/L και η οποία προσδίδει αρώματα από γλυκό και αλκοολικό.
- Η ίσο-βουτανόλη και η αμυλική αλκοόλη οι οποίες προσδίδουν το ίδιο άρωμα που θυμίζει διαλύτη αλλά γίνονται ανιχνεύσιμες σε διαφορετικές τιμές 100 και 50-70 mg/L αντίστοιχα.
- Η ισοαμυλική αλκοόλη και η φαινυλαιθυλική αλκοόλη που είναι γνωστές για τα αρώματα φρούτων και συγκεκριμένα η ισοαμυλική αλκοόλη δίνει έντονα αρώματα μπανάνας. Οι δύο αυτές ανώτερες αλκοόλες έχουν όριο ανίχνευσης ίσο με 5-6.5 mg/L. Ενώ η φαινυλαιθυλική αλκοόλη σε τιμή 4 mg/L προσδίδει αρώματα που θυμίζουν τριαντάφυλλο και ζελεδάκια (gummy bears).

Ωστόσο περισσότερες από 40 ακόμα αλκοόλες έχουν αναγνωρισθεί. Η βιοσύνθεση των ανωτέρων αλκοολών είναι περίπλοκη αφού μπορεί να προέκυψαν είτε ως υποπροϊόντα μεταβολισμού των αμινοξέων είτε από το πυροσταφυλικό που παρήχθη από το μεταβολισμό υδατανθράκων (Stewart, 2017).

Συγκεκριμένα κατά τον καταβολισμό τα αμινοξέα μέσω μιας διαδικασίας τρανσαμίνωσης μετατρέπονται σε ανώτερες αλκοόλες, με ενδιάμεση παραγωγή ενός α-κετό οξέος. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται μονοπάτι Ehrlich (Lewis & Bamforth, 2006). Ο μεταβολισμός των αμινοξέων ξεκινά από έναν υδρογονάνθρακα ο οποίος μετατρέπεται σε α-κετο οξύ. Το οξύ αυτό στη συνέχεια μετατρέπεται στο αντίστοιχο αμινοξύ και τελικά παράγονται ανώτερες αλκοόλες μέσω της αποκαρβοξυλίωσης και της μείωσης αυτών των α-κετο οξέων (Lewis & Bamforth, 2006).



Εικόνα 14: Το μονοπάτι Ehrlich (Pires et al., 2014).

4.4.3 ΟΞΕΑ:

Το διοξείδιο του άνθρακα είναι αυτό που δίνει την αφρώδη αίσθηση στο στόμα, η οποία συναντάται στη μπίρα. Υπάρχει μια μεγάλη ομάδα οργανικών και ανόργανων οξέων που συνεισφέρουν σημαντικά στο αρωματικό προφίλ και στην τελική οξύτητα της μπίρας. Τα οργανικά οξέα μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες, στην κατηγορία των πτητικών και των μη πτητικών οξέων. Όταν όμως τα οξέα των δύο κατηγοριών βρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες μπορούν να χαρακτηρισθούν ως ανεπιθύμητα αρώματα (Yonezawa & Fushiki, 2002) όπως αυτά του τυριού και του ιδρώτα (Michel et al., 2016,b; Callejo et al., 2017).

Τα βασικά πτητικά οργανικά οξέα είναι:

- Το οξικό οξύ το οποίο έχει το χαρακτηριστικό άρωμα του ξυδιού και έντονη οξύτητα, είναι ανιχνεύσιμο σε τιμή ίση με 175 mg/L.
- Το καπριλικό οξύ με όριο ανίχνευσης 15 mg/L το οποίο προσδίδει ένα κατσικίσιο άρωμα.
- Το καπρικό οξύ το οποίο δίνει μια λιπαρή αίσθηση και έχει όριο ανίχνευσης ίσο με 10 mg/L.

Το βουτυρικό οξύ (βουτανικό οξύ) όπως προδίδεται από το όνομά του έχει αρώματα βουτύρου και τυριού τα οποία γίνονται αντιληπτά στον άνθρωπο σε συγκεντρώσεις της τάξης των 2 mg/L (Kennedy, 1997).

Τα βασικά μη πτητικά οξέα που σχετίζονται με την γεύση και τα αρώματα της μπίρας είναι:

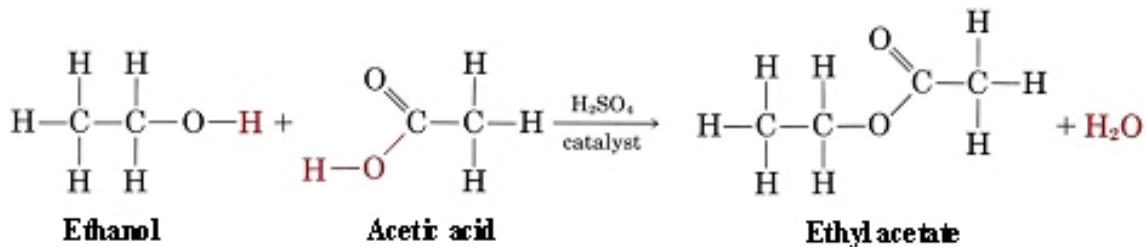
- Το οξαλικό οξύ με όριο ανίχνευσης τα 500 mg/L. Το μη πτητικό αυτό οξύ αν βρίσκεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις δίνει μια αλμυρή και οξειδωμένη αίσθηση στη μπίρα.
- Το κιτρικό οξύ που δίνει μια ξινή γεύση αν ξεπεράσει η συγκέντρωσή του τα 400 mg/L.
- Το μηλικό οξύ με όριο ανίχνευσης ίσο με 700 mg/L και γεύση μήλου.
- Το φουμαρικό οξύ το οποίο χαρακτηρίζεται από οξύτητα και γίνεται ανιχνεύσιμο σε τιμή ίση με 400 mg/L.
- Το σουκινικό οξύ το οποίο αυξάνει την οξύτητα, με όριο ανίχνευσης 220 mg/L.
- Το γαλακτικό οξύ που δίνει μια αίσθηση ξινίλας σε τιμές μεγαλύτερες του 400 mg/L.
- Το πυροσταφυλικό οξύ που προσδίδει μια αίσθηση ζωοτροφής ανιχνεύεται σε τιμή 300 mg/L.

Η παραγωγή των παραπάνω οξέων εξαρτάται από το είδος της ζύμης και τα περισσότερα από αυτά είναι παραπροϊόντα της γλυκόλυσης, του κύκλου του κιτρικού οξέος και του μεταβολισμού των αμινοξέων και των λιπαρών οξέων (Michel et al., 2016,b).

4.4.4 ΕΣΤΕΡΕΣ:

Πέρα από τις ανώτερες αλκοόλες, ακόμα δύο σημαντικές πτητικές ενώσεις που προσφέρουν στο αρωματικό προφίλ της μπίρας είναι οι εστέρες και οι οξικοί εστέρες (Verstrepen et al., 2003b; Lettisha et al., 2013; Renger et al., 1992). Οι εστέρες παρόλο που βρίσκονται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις στη μπίρα, είναι μια από τις πιο ενεργές ομάδες αρωματικών ουσιών με χαρακτηριστικά αρώματα φρούτων. Οι εστέρες που υπάρχουν στη μπίρα μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες (Yonezawa & Fushiki, 2002).

Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν οι οξικοί εστέρες οι οποίοι σχηματίζονται είτε από ανώτερες αλκοόλες ή από την αιθανόλη και το οξικό οξύ (Michel et al., 2016,a), τα οποία βρίσκονται σε μεγάλες σχετικά ποσότητες στην μπίρα. Η παραγωγή οξικών εστέρων είναι μεγαλύτερη σε μπίρες όπου η αρχική πυκνότητα σακχάρων είναι μεγάλη, καθώς αυτό έχει ως άμεσο αποτέλεσμα τη μεγάλη συγκέντρωση αλκοολών. Σε τέτοιες συνθήκες ο σχηματισμός εστέρων είναι ένας μηχανισμός αποτοξίνωσης για το σύστημα (Michel et al., 2016,b). Από αυτήν την κατηγορία εστέρων αυτός που βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση είναι ο οξικός αιθυλεστέρας ο οποίος σχηματίζεται από την ένωση αιθανόλης και οξικού οξέος. Το οξικό οξύ είναι διαθέσιμο σε ενεργή μορφή ως ακετυλο-συνένζυμο-A, το οποίο σχηματίζεται κατά τη φάση ανάπτυξης των ζυμών και η αιθανόλη είναι η αλκοόλη που βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στη μπίρα (Lewis & Bamforth, 2006).



Εικόνα 15: Η χημική αντίδραση που περιγράφει την παραγωγή του οξικού αιθυλεστέρα από αιθανόλη και οξικό οξύ (Pires et al., 2014).

Οι πιο σημαντικοί από τους εστέρες της πρώτης κατηγορίας είναι :

- Ο οξικός αιθυλεστέρας, ο οποίος σε αντίθεση με την πλειοψηφία των εστέρων που θεωρείται ότι αυξάνουν τα φρουτένια αρώματα, όταν βρίσκεται σε επαρκή ποσότητα (όριο ανίχνευσης 33 mg/L) δίνει ένα αρνητικό άρωμα που θυμίζει διαλύτη.
- Ο ισοαμυλεστέρας και ο ισοστέρας με όριο ανίχνευσης 1.6 mg/L και χαρακτηριστικά αρώματα γλυκών φρούτων. Συγκεκριμένα ο ισοαμυλεστέρας θυμίζει μπανάνα.
- Το οξικό φαινυλαιθύλιο που προσδίδει αρώματα μπανάνας, μήλου και μελιού με όριο ανίχνευσης τα 3.8 mg/L (Michel et al., 2016,b)

Στην δεύτερη κατηγορία ανήκουν οι αιθυλεστέρες μέσης αλύσου οι οποίοι σχηματίζονται από την ένωση λιπαρών οξέων μέσης αλύσου με μία ρίζα αιθανόλης. Δύο ενώσεις από αυτή την ομάδα εστέρων συμβάλουν σημαντικά στο αρωματικό προφίλ της μπύρας. Ο καπρικός αιθυλεστέρας ο οποίος παράγει γλυκά αρώματα φρούτων, όπως για παράδειγμα μήλο αλλά και αρώματα γλυκάνισου. Ο δεύτερος εστέρας αυτής της κατηγορίας είναι ο οκτανοϊκός αιθυλεστέρας που παράγει πιο ξινά αρώματα όπως αυτό του ξινόμηλου. Τα όρια ανίχνευσης των δύο αυτών ενώσεων είναι 0.23 και 0.9 mg/L αντίστοιχα (Lewis & Bamforth, 2006).

4.4.5 ΕΝΩΣΕΙΣ ΤΟΥ ΘΕΙΟΥ:

Οι ενώσεις του θείου γενικά προσφέρουν ένα εξαιρετικά χαμηλό αρωματικό κατώφλι στην μπύρα. Μικρές αλλαγές όμως στη συγκέντρωση αυτών μπορεί να επιφέρουν αξιοσημείωτες αλλαγές στο αρωματικό της προφίλ (Callejo et al., 2017; Vanderhaegen et al., 2006).

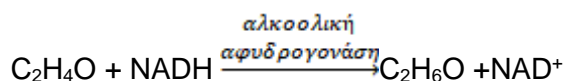
Τα σημαντικότερα θειούχα συστατικά που παράγονται από τους ζυμομύκητες είναι το διοξειδίο του θείου και το υδρόθειο.

Το διοξειδίο του θείου παράγεται κατά τον αναβολισμό των αμινοξέων και είναι μια ένωση πολύ οικεία στους ζυθοποιούς καθώς παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη σταθερότητα του προϊόντος και ιδιαίτερα της γεύσης καθώς δρα ως ισχυρό αντιοξειδωτικό στη μπύρα αυξάνοντας τον χρόνο ζωής της (Michel et al., 2016,b). Τα επιτρεπτά όρια συγκέντρωσης είναι 10 mg/L και θεωρείται ότι στη συγκέντρωση αυτή η αντιοξειδωτική του δράση δεν είναι επαρκής. 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 μόνο σε ορισμένες βυθοζύμωτες μπύρες (Michel et al., 2016,b).

Όσον αφορά το υδρόθειο είναι μια ουσία η οποία είναι γνωστή για την έντονη μυρωδιά κλούβιου αυγού και όταν βρεθεί στη μπίρα έχει την τάση να καλύπτει τα υπόλοιπα αρωματικά στοιχεία. Παρ' όλα αυτά σε μικρές συγκεντρώσεις μπορεί να προσδώσει φρεσκάδα στην μπίρα. Το όριο ανίχνευσής του είναι πολύ χαμηλό, περίπου ίσο με 0.005 mg/L (Michel et al., 2016,b). Το σύνολο των ζυμομύκητων 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.

4.4.6 ΚΑΡΒΟΝΥΛΙΑ-ΑΝΕΠΙΘΥΜΗΤΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ:

Στην κατηγορία αυτή συγκαταλέγονται πάνω από 200 καρβονυλικές ενώσεις (Stewart, 2017). Οι πιο σημαντικές ενώσεις σε αυτή την κατηγορία είναι η ακεταλδεΐδη και οι vicinal diketones (VDKs). Η ακεταλδεΐδη παράγεται κατά τη φάση ανάπτυξης των μικροοργανισμών ως αποτέλεσμα του μεταβολισμού των σακχάρων. Στην συνέχεια της ζύμωσης το μεγαλύτερο ποσοστό αυτής μετατρέπεται σε αιθανόλη σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Η παρουσία ακεταλδεΐδης στη μπίρα προσδίδει ένα ανεπιθύμητο άρωμα που θυμίζει πράσινο μήλο ή ακόμη και γρασίδι με όριο ανίχνευσης τα 10 mg/L (Yonezawa & Fushiki, 2002).

Όσον αφορά τις vicinal diketones, παράγονται με φυσικό τρόπο κατά τη διαδικασία της ζύμωσης και μόνο μέσω του αναβολικού μονοπατιού (Inês Ferreira & Luís Guido, 2018). Η παρακολούθηση των επιπέδων VDK έχει μεγάλη σημασία καθώς η συγκέντρωση αυτών των ενώσεων μπορεί να μεταβάλει σημαντικά τη γεύση ενός ποτού. Τα VDKs παράγουν μια γεύση σαν βούτυρο ή ακόμη και σαν καραμέλα στο ποτό και λόγω αυτού είναι ανεπιθύμητες σε ελαφριές μπίρες που χαρακτηρίζονται από καθαρή και ελαφριά γεύση. Οι πιο συχνά εμφανιζόμενες ενώσεις VDKs είναι η 2,3-βουτανοδιόνη που είναι επίσης γνωστή και ως διακετύλιο και η 2,3-πεντανοδιόνη, επίσης γνωστή ως ακετυλοπροπιονυλο. Οι ενώσεις αυτές είναι ενδιάμεσα προϊόντα του αναβολισμού των αμινοξέων βαλίνη και ισολευκίνη στα μιτοχόνδρια των κυττάρων της ζύμης. Η παρουσία διακετυλίου στη μπίρα μπορεί σε ορισμένες περιπτώσεις να προδίδει τη μόλυνση του προϊόντος από βακτήρια. Το διακετύλιο, κατά την ωρίμανση της μπίρας, μετατρέπεται από τη ζύμη σε 2,3-βουτανοδιόλη η οποία δεν έχει κάποιο ανεπιθύμητο άρωμα. Το όριο ανίχνευσης των δύο αυτών ουσιών VDK είναι 0.1-0.15 και 0.9 mg/L αντίστοιχα (Andrew James, 2015).

Στην κατηγορία των ανεπιθύμητων οργανικών ενώσεων μπορούν να προστεθούν μερικές ακόμη αλδεΐδες. Γενικά έχει βρεθεί ότι οι ακόρεστες αλδεΐδες που αποτελούνται από πολλά άτομα άνθρακα (7-10) παρουσιάζουν χαμηλά όρια ανίχνευσης και αρκετά δυσάρεστα αρώματα, ενώ για τις αλδεΐδες με μικρότερη αλυσίδα ισχύει το αντίθετο (Yonezawa & Fushiki, 2002). Χαρακτηριστικά παραδείγματα αλδεϊδών με ανεπιθύμητα αρώματα είναι η νοναλδεΐδη και η trans-2-νοναλδεΐδη με όρια ανίχνευσης 0.018 και 0.00011 mg/L αντίστοιχα και αρώματα που θυμίζουν χαρτόνι, χαρτί κ.λ.π.. Συγκεκριμένα τα έντονα αρώματα της trans-2-νοναλδεΐδης συχνά προκύπτουν από την αποθήκευση της μπίρας σε υψηλές θερμοκρασίες και θεωρείται χαρακτηριστική μυρωδιά οξειδωσης (Michel et al., 2016,b).

4.4.7 ΦΑΙΝΟΛΕΣ:

Οι πτητικές φαινόλες που σχετίζονται με το αρωματικό προφίλ της μπίρας παράγονται από τους ζυμομύκητες και για τα περισσότερα ήδη μπίρας τα αρωματικά χαρακτηριστικά που προσδίδουν είναι ανεπιθύμητα. Παρ' όλα αυτά σε ορισμένες κατηγορίες μπίρας όπως είναι η Belgian Lambic, η Belgian Abbey-like και η German wheat beer τα φαινολικά αρώματα είναι επιθυμητά στοιχεία. Τα πιο συνηθισμένα φαινολικά αρώματα είναι αυτά που θυμίζουν κλούβιο αυγό, πικάντικο, καμένο, και ακόμη προσδίδουν μια αίσθηση που θυμίζει φάρμακο. Η παραγωγή τέτοιων ουσιών εξαρτάται από το είδος της ζύμης και από την αρχική σύσταση του γλεύκους. Η παρουσία φαινολικών οξέων που προέρχονται από την βύνη, όπως είναι το φερούλικό, το κουμαρικό και το κιναμωμικό οξύ, στο γλεύκος επηρεάζει σημαντικά την παραγωγή φαινολών (Lewis & Bamforth, 2006).

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 αρώματα από σιτάρι και φαγόπυρο. Έχει όριο ανίχνευσης 0.2 mg/L.

Οι μπίρες που προκύπτουν από ζύμωση στελεχών του *Saccharomyces 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,b).

4.4.8 ΕΞΩΤΕΡΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ:

Ακόμη το αρωματικό προφίλ της μπίρας μπορεί να επηρεαστεί και από άλλους εξωτερικούς παράγοντες όπως είναι η μεταφορά, η συσκευασία και η αποθήκευση.

- Ο θειικός σίδηρος ο οποίος προσδίδει ένα μεταλλικό άρωμα οφείλεται στην επαφή του προϊόντος με μεταλλικά υλικά κατά την παραγωγή, τη συσκευασία ή και τη μεταφορά του. Ακόμη μπορεί να οφείλεται σε αυξημένη περιεκτικότητα του νερού σε μεταλλικά ιόντα. Το όριο ανίχνευσής του θειικού σιδήρου είναι περίπου 1-1.5 mg/L.
- Η 2,4,6-τριχλωροανισόλη (TCA) η οποία δίνει στην μπίρα μια αίσθηση μούχλας και έχει πολύ χαμηλό όριο ανίχνευσης (<10-25 ng/L). Η παραγωγή TCA συνήθως οφείλεται σε κακή ποιότητα πρώτων υλών αλλά και σε ακατάλληλο εξοπλισμό (Carr, 2016).
- Η μερκαπτάνη η οποία είναι ένα από τα πιο συνηθισμένα ανεπιθύμητα αρώματα στην μπίρα (μούχλα, θείο). Έχει όριο ανίχνευσης 4 ng/L και μπορεί να παραχθεί κατά την έκθεση της μπίρας στον ήλιο, όπου τα α-οξέα διασπώνται και αντιδρούν με το υδρόθειο που παράγει η ζύμη. Μπίρες με σκούρο χρώμα ή ειδικά επεξεργασμένο λυκίσκο ο οποίος περιέχει μόνο α-ίσο-οξέα δεν εμφανίζουν αυτό το ανεπιθύμητο άρωμα (Breandán Kearney, 2015).

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν να διερευνηθεί η δυνατότητα παραγωγής μπίρας με διαφοροποιημένα αρωματικά χαρακτηριστικά με χρήση εναλλακτικών non-*Saccharomyces* ζυμομυκήτων σε διαφορετικές αναλογίες σε συνδυασμό με το συμβατικό ζυμομύκητα καθώς και σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας κατά τη ζύμωση.

Ο ζυμομύκητας *Metschnikowia pulcherrima* επιλέχθηκε βάση του ότι έχει την ικανότητα να μεταβολίσει βασικά σάκχαρα του ζυθογλεύκου (γλυκόζη, φρουκτόζη) με αποτέλεσμα και την παραγωγή αιθάνολης. Επιπλέον αφού έχει δώσει ενθαρρυντικά αποτελέσματα στην αλκοολική ζύμωση οينوγλεύκου και από τη στιγμή που η βιομηχανία της μπίρας εξελίσσεται συνεχώς, αναζητώντας την πολυπλοκότητα στο προϊόν της, περαιτέρω έρευνα απαιτείται στην αλκοολική ζύμωση ζυθογλεύκου με τον επιλεγμένο non-*Saccharomyces* μικροοργανισμό για τις δυνατότητές της.

Πραγματοποιήθηκαν τέσσερις ζυμώσεις σε γλεύκος όμοιας σύστασης με τη χρήση μικτών καλλιεργειών του επιλεγμένου μη συμβατικού ζυμομύκητα *Metschnikowia pulcherrima* σε συνδυασμό με το συμβατικό *Saccharomyces cerevisiae*. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκαν δύο ζυμώσεις στους 20 °C και δύο στους 13 °C σε αναλογία μικροοργανισμών 1:1 και 1:10 (*Saccharomyces cerevisiae* : *Metschnikowia pulcherrima*) αντίστοιχα σε κάθε θερμοκρασία. Στην παρούσα εργασία σκοπός είναι η ανάδειξη των διαφορετικών αρωματικών στοιχείων που προσδίδει ο ζυμομύκητας, για το λόγο αυτό επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί βύνη τύπου American Pale Ale η οποία είναι ελαφρώς ψημένη και χαρακτηρίζεται γενικά από ήπια αρώματα. Ακόμη παρόλο που οι μπίρες τύπου American Pale Ale γενικά χαρακτηρίζονται από έντονα αρωματικά στοιχεία που προέρχονται από τον λυκίσκο (εσπεριδοειδή, φυτικά αρώματα, πεύκου, φρούτα όπως μούρο ή πεπόνι) στην συγκεκριμένη περίπτωση το χαρακτηριστικό αυτό δεν ήταν επιθυμητό για να μην επικαλύψει τις διαφορές των αρωμάτων των διαφορετικών ζυμώσεων, και για τον λόγο αυτό προστέθηκε μόνο μικρή ποσότητα πικρικού λυκίσκου. Επιπλέον πραγματοποιήθηκαν άλλες δύο ζυμώσεις από καθαρή καλλιέργεια του χρησιμοποιούμενου μη συμβατικού ζυμομύκητα σε θερμοκρασίες 13 °C και 20 °C.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

2.1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ:

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω όργανα:

- Φυγόκεντρος HERMLE Z 200 A
- ARE Heating Magnetic Stirrer VELP. SCIENTIFICA
- Πλατόμετρο 2510 Standard-Saccharimeter (Measuring range 0-10oP) FUNKE GERBER
- Πλατόμετρο 2510 Standard-Saccharimeter (Measuring range 10-20oP) FUNKE GERBER
- Σπεκτροφωτόμετρο UV mini 1240 Shimadzu
- Αλκοολόμετρο 174000 Alcoholmeter 0-10 Class II in 1/10 DS laboratories DUJARDIN-SALLERON
- Μηχανικό shaker Labline 3525 Incubator Shaker LabX
- Χρωματόμετρο Minolta CR-200

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια:

- *Saccharomyces cerevisiae* (Safale US-05)
- *Metschnikowia pulcherrima* (FLAVIA MP 346)
- Κυανό του μεθυλενίου
- NaOH Sodium hydroxide pellets pure <99% MERCK
- Δινιτροσαλικυλικό οξύ (3,5-Dinitrosalicylic acid) 98% SIGMA-ALDRICH
- Potassium sodium tartrate tetrahydrate 99% SIGMA-ALDRICH
- Ένυδρο όξινο φωσφορικό νάτριο (di-Sodium hydrogen phosphate dehydrate) >99.5 MERCK
- Ιωδικό κάλιο (Potassium iodate) >99.7-100% MERCK
- Αιθανόλη (Ethanol) 99.8% ACROS ORGANICS
- Γλυκίνη (Glycine) 98.5 - 101.0 %SERVA
- n-Πεντάνιο (n-Pentane) CARLO ERBA
- Διαιθυλαιθέρας (Diethylether) >99.5% FERAK
- Θειικό νάτριο (Sodium Sulfate, anh. a.r.) Chem-Lab NV
- 3-οκτανόλη
- HCl 3N
- Ισοοκτάνιο Uvasol Isooctane for spectroscopy >99.8% SIGMA-ALDRICH
- Φρουκτόζη (D-FRUCTOSE) >98.5% Duchefa Biochemies

2.2 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΖΥΘΟΓΛΕΥΚΟΥΣ:

Για την παρασκευή του βυνογλεύκου (100 L) χρησιμοποιήθηκαν 24 kg βύνης τύπου pale ale (ΒΕΡΓΙΝΑ Ζυθοποιία Μακεδονίας Θράκης Α.Ε.) η οποία πριν την πολτοποίηση αλέστηκε σε μικρό βαθμό (1.2 mm). Τα στάδια παρασκευής είναι τα ακόλουθα:

- Η αλεσμένη βύνη προστέθηκε στην δεξαμενή πολτοποίησης μαζί με 63 L νερό θερμοκρασίας 65 °C. Τα στάδια της πολτοποίησης που ακολουθήθηκαν είναι τρία.
- Κατά το πρώτο στάδιο η θερμοκρασία διατηρείται στους 65 °C για 1 h περίπου, στο στάδιο αυτό δρα το ένζυμο β-αμυλάση.
- Στην συνέχεια η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72 °C όπου και διατηρείται για 15 min ώστε να δράσει η α-αμυλάση.
- Μετά το πέρας των 15 min λαμβάνεται μικρή ποσότητα δείγματος στο οποίο προστίθενται μερικές σταγόνες ιωδίου για να διαπιστωθεί αν έχει διασπαστεί όλο το άμυλο (αν το χρώμα του δείγματος γίνει μπλε σημαίνει ότι υπάρχει ακόμη άμυλο στο γλεύκος).
- Αφού διαπιστωθεί ότι όλη η ποσότητα αμύλου έχει διασπαστεί, τότε η θερμοκρασία της δεξαμενής ρυθμίζεται στους 78 °C για 5 min ώστε να αδρανοποιηθούν τα ένζυμα.
- Στην συνέχεια ακολουθεί η εκχύλιση-διαύγαση του μίγματος. Το μίγμα μεταφέρεται στην δεξαμενή εκχύλισης κατά την οποία απομακρύνονται τα στερεά υπολείμματα βύνης και προστίθεται ποσότητα νερού τόση ώστε ο τελικός όγκος του καθαρού γλεύκου πριν τον βρασμό να είναι περίπου ίσος με 120 L.
- Ακολουθεί ο βρασμός του γλεύκου για περίπου 1 h στους 100 °C. Κατά την αρχή του βρασμού προστίθενται 50 g λυκίσκου (Magnum [12,00%]) και το μίγμα βράζεται για 60 min, έπειτα προστίθενται ακόμη 50 g και το μίγμα βράζεται για 50 min ακόμη.
- Μετά το πέρας του βρασμού η συνολική ποσότητα γλεύκου είναι περίπου 132 L και έχει πυκνότητα 12,2 °Plato.
- Ακολουθεί ψύξη του γλεύκου μέχρι η θερμοκρασία του να φτάσει τους 20 °C.

2.3 ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΣ ΖΥΘΟΓΛΕΥΚΟΥΣ:

Για τον εμβολιασμό κάθε παρτίδας ζυθογλεύκου (20 L) προετοιμάσθηκαν εμβόλια με ποσότητες ξηρής ζύμης όπως φαίνονται στον Πίνακα 1, σύμφωνα με την ακόλουθη μεθοδολογία:

- Σε τέσσερις κωνικές φιάλες των 250 mL προστίθενται 100mL νερού και τοποθετούνται σε χύτρα για να αποστειρωθούν.
- Μετά το πέρας της αποστείρωσης οι κωνικές φιάλες τοποθετούνται σε υδατόλουτρο ώστε η θερμοκρασία τους να μειωθεί στους 20 °C περίπου.
- Οι ποσότητες ξηρής ζύμης προστίθενται με ασηπτικές συνθήκες στις αποστειρωμένες κωνικές φιάλες και αφήνονται περίπου 10 min σε ηρεμία.
- Στην συνέχεια αναδεύονται ελαφρά και προστίθεται σε αυτές ποσότητα (100 mL) αποστειρωμένου γλεύκου. Σκοπός αυτού είναι να δοθεί ένα χρονικό διάστημα προσαρμογής των ζυμών σε ένα θρεπτικό περιβάλλον έτσι ώστε όταν προστεθούν στο συνολικό γλεύκος να βρίσκονται ήδη στην εκθετική φάση ανάπτυξης.
- Μετά από μερικές ώρες εμβολιάζεται η συνολική ποσότητα βυνογλεύκου η οποία έχει μοιραστεί σε τέσσερις ίσες ποσότητες (15-17 L).

Πίνακας 1: Ποσότητες ξηρής ζύμης για τον εμβολιασμό του ζυθογλεύκου.

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

Η επιλογή της ποσότητας της ξηρής ζύμης στην περίπτωση αυτή έγινε με βάση την μάζα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΑΚΧΑΡΩΝ ΜΕ ΠΥΚΝΟΜΕΤΡΟ:

Στην περίπτωση του ζυμωμένου γλεύκους οι μετρήσεις των σακχάρων έγιναν έμμεσα με βάση την πυκνότητα του γλεύκους. Οι μετρήσεις πραγματοποιούνταν σε καθημερινή βάση με χρήση πλατόμετρου.

Μεθοδολογία:

- Παραλαμβάνονται 100 mL δείγματος, αφαιρείται το διοξείδιο του άνθρακα με ανάδευση και στη συνέχεια τοποθετείται σε ογκομετρικό κύλινδρο των 100 mL.
- Το πυκνόμετρο βυθίζεται στο δείγμα και καταγράφεται η ένδειξη. Το αποτέλεσμα δίνεται σε βαθμούς Plato.
- Η ένδειξη του πυκνόμετρου αφορά την σχετική πυκνότητα του δείγματος σε θερμοκρασία 20 °C. Αν η θερμοκρασία το δείγματος είναι διαφορετική τότε η τιμή του πρέπει να διορθωθεί.

3.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΕΡΙΕΚΤΗΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΑΙΘΑΝΟΛΗ ΜΕ ΑΠΟΣΤΑΞΗ:

Η μέθοδος αυτή είναι εξίσου ακριβής αλλά απαιτεί μεγαλύτερη ποσότητα δείγματος και για τον λόγο αυτό επιλέχθηκε να εφαρμοσθεί μόνο στα τελικά δείγματα, με σκοπό να συγκριθεί η ακρίβεια των αποτελεσμάτων των δύο μεθόδων και όχι για την δημιουργία καμπυλών παραγωγής αιθανόλης.

Μεθοδολογία:

- Αρχικά ποσότητα δείγματος >100 mL φιλτράρεται με διηθητικό χαρτί με σκοπό την απομάκρυνση του διοξειδίου του άνθρακα.
- 100 mL δείγματος απαλλαγμένου από CO₂ τοποθετούνται σε απιοειδή φιάλη στην οποία επίσης προστίθεται αντιαφριστικό διάλυμα.
- Τα δείγματα αποστάζονται έως ότου το αποσταγμα να γεμίσει μια ογκομετρική φιάλη των 100ml περίπου μέχρι τα 2/3.
- Η ογκομετρική φιάλη πληρώνεται μέχρι την χαραγή με απιονισμένο νερό.
- Τελικά το δείγμα μετράται με αλκοολόμετρο στους 20 °C, ή γίνεται διόρθωση αν μετρηθεί σε άλλη θερμοκρασία.

3.3 ΜΕΤΡΗΣΗ ΔΙΑΘΕΣΙΜΟΥ ΑΜΜΩΝΙΑΚΟΥ ΑΖΩΤΟΥ (FAN):

Η μέτρηση του αμμωνιακού αζώτου πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την επίσημη μέθοδο νινυδρίνης όπως περιγράφεται από το ASBC Methods of Analysis.

Παρασκευή αντιδραστηρίων:

Για την μέτρηση διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου πρέπει πρώτα να παρασκευαστούν τα παρακάτω αντιδραστήρια:

- Αντιδραστήριο νινυδρίνης: Σε κωνική φιάλη των 100 mL προστίθενται 10 g Na₂HPO₄ · 12H₂O, 6.0 g KH₂PO₄, 0.5 g νινυδρίνης και 0.3 g φρουκτόζης. Στην συνέχεια η κωνική φιάλη συμπληρώνεται με απιονισμένο νερό μέχρι την χαραγή.

- Διάλυμα αραιώσης: Ζυγίζονται 2 g KIO₃ και διαλύονται σε 600 mL απιονισμένου νερού και στη συνέχεια προστίθενται 400 mL αιθανόλης (96%). Αποθήκευση στους 5 °C.
- Πρότυπο πυκνό διάλυμα γλυκίνης (stock solution): Ζυγίζονται 107.2 g γλυκίνης και διαλύονται σε 100 mL απιονισμένου νερού. Αποθήκευση στους 0 °C.
- Πρότυπο αραιό διάλυμα γλυκίνης: 1 mL από το διάλυμα c. διαλύεται σε 100 mL απιονισμένου νερού. Το πρότυπο αυτό διάλυμα περιέχει 2 mg αμμωνιακού αζώτου/L.

Μεθοδολογία:

- Αρχικά για κάθε ένα από τα δείγματα πραγματοποιείται κατάλληλη αραιώση με απιονισμένο νερό.
- Σε δοκιμαστικούς σωλήνες μεταφέρονται 2 mL αραιωμένου δείγματος, 2 mL πρότυπου διαλύματος γλυκίνης και 2 mL απιονισμένου νερού. Για κάθε ένα από τα παραπάνω η μέθοδος πραγματοποιείται εις τριπλούν.
- Στη συνέχεια σε κάθε έναν από τους δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθεται 1 mL από το αντιδραστήριο νινυδρίνης που έχει ήδη παρασκευασθεί.
- Οι δοκιμαστικοί σωλήνες σφραγίζονται καλά, ώστε να αποφευχθεί η εξάτμιση και θερμαίνονται σε νερό που βράζει για 16 min.
- Μετά από ακριβώς 16 min τα δείγματα απομακρύνονται από το θερμό μέσο και αφήνονται να κρυώσουν για 20 min σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 20 °C.
- Στη συνέχεια σε κάθε έναν από τους δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθενται 5 mL από το διάλυμα αραιώσης.
- Ρυθμίζεται το φωτόμετρο στα 570 nm και μετά τον μηδενισμό του με απιονισμένο νερό διάλυμα πραγματοποιείται η μέτρηση των δειγμάτων.

Υπολογισμοί:

- Υπολογίζεται ο μέσος όρος απορρόφησης των τριών επαναλήψεων κάθε δείγματος.
- Στην συνέχεια ο μέσος όρος των ενδείξεων του φωτόμετρου για το τυφλό διάλυμα αφαιρείται τόσο από τους μέσους όρους των δειγμάτων γλεύκουσ όσο και από το πρότυπο διάλυμα γλυκίνης.
- Τελικά υπολογίζεται το ελεύθερο αμμωνιακό άζωτο σύμφωνα σε mg/L με την παρακάτω σχέση:

$$FAN = \frac{\text{απορρόφηση δείγματος}}{\text{απορρόφηση του πρότυπου γλυκίνης}} \times 2 \times \text{βαθμός αραιώσης}$$

3.4 ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ:

3.4.1 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΜΕ ΣΤΗΛΗ 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 της μπίρας. 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 θειικού 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 αποσταξης το δείγμα μεταφέρεται σε δοχείο vial και προστίθενται σε αυτό 10 μL 3-οκτανόλη, ως εσωτερικό πρότυπο.
- Τέλος το δείγμα υφίσταται ταχεία συμπύκνωση με την χρήση αέριου αζώτου μέχρι τελική μάζα περίπου ίση με 100 mg και πραγματοποιείται ένεση του δείγματος στη συσκευή GC-MS.

3.4.2 ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΜΕ ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ-ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ (GC-MS):

Για τον προσδιορισμό του αρωματικού προφίλ χρησιμοποιήθηκε σε αέριο χρωματογράφο-φασματομέτρο 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 × 0.32 mm × 0.25 μm ενώ ως φέρον αέριο χρησιμοποιείται ήλιο (He) με παροχή 1mL/min. . Ποσότητα 1μl από κάθε εκχύλισμα εγχέεται στο

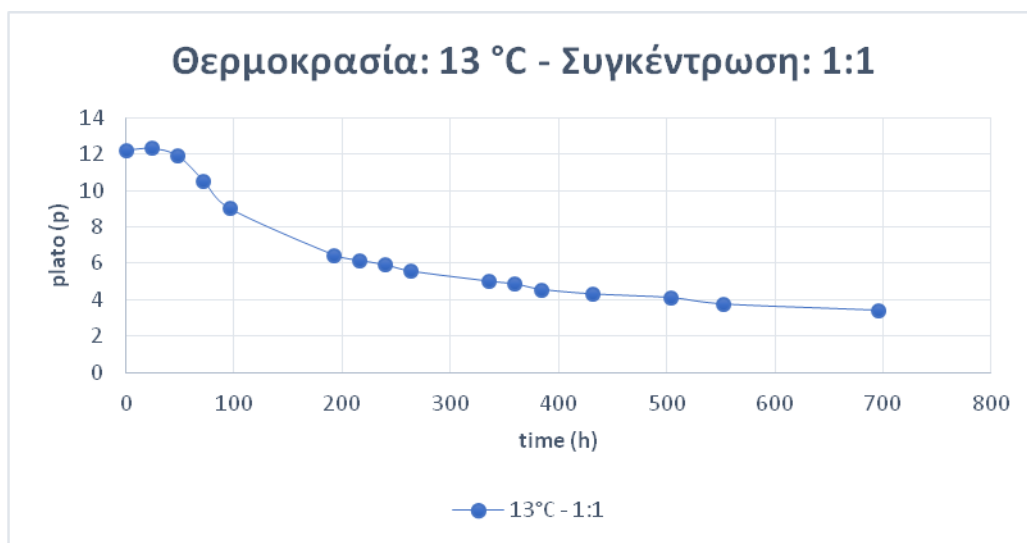
χρωματογράφο με split ratio 100:1. Η θερμοκρασία της γραμμής μεταφοράς είναι 38 °C. Στο φασματόμετρο μάζας τα ηλεκτρόνια παράγονται στον θάλαμο ιονισμού από θερμαινόμενο μεταλλικό νήμα και έχουν δυναμικό της τάξεως των 70 eV στα 40-550 amu. Τέλος η ανάλυση των αποτελεσμάτων γίνεται με το λογισμικό HP Chemstation rev.A.06.03.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ

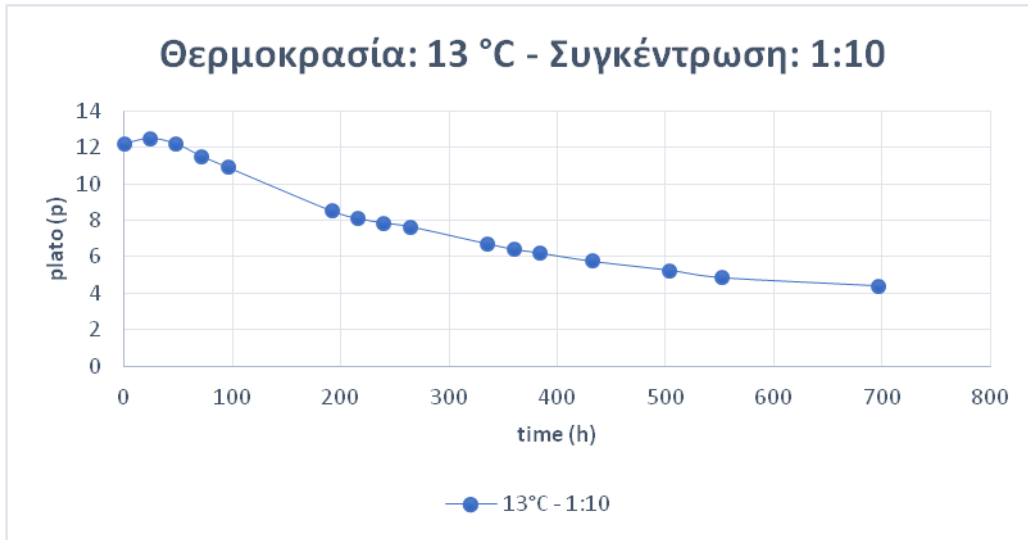
Στο πείραμα πραγματοποιήθηκαν τέσσερις ζυμώσεις διαφορετικών αναλογιών της μικτής καλλιέργειας ζυμομυκήτων που χρησιμοποιήθηκε, σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας. Παρατηρήθηκε έτσι η ανάπτυξη του μη συμβατικού ζυμομύκητα *Metschnikowia pulcherrima* σε συνδυασμό με τον *Saccharomyces cerevisiae* σε αναλογία 1:1 και αναλογία 1:10 (*Saccharomyces cerevisiae* : *Metschnikowia pulcherrima*). Οι ζυμώσεις αυτές πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασίες 13 °C και 20 °C αντίστοιχα. Εξετάζουμε με αυτόν τον τρόπο την ανθεκτικότητα και αποδοση του *Metschnikowia pulcherrima* σε συνθήκες περιβάλλοντος και ψυγείου. Στις ίδιες θερμοκρασίες (13 °C και 20 °C) πραγματοποιήθηκαν και οι ζυμώσεις της καθαρής καλλιέργειας του ζυμομύκητα *Metschnikowia pulcherrima*.

4.1 ΠΥΚΝΟΤΗΤΑ ΣΑΚΧΑΡΩΝ:

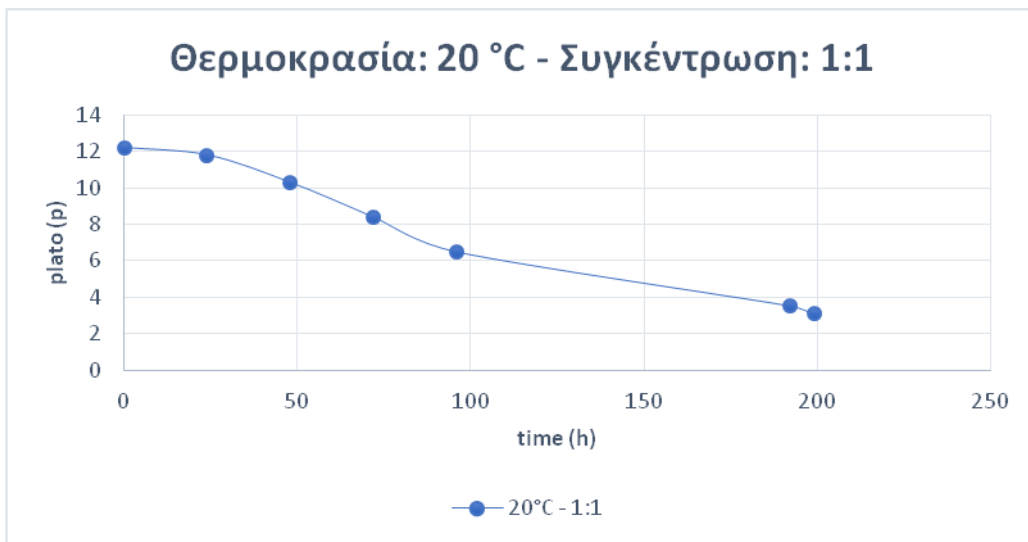
Για την ημερήσια μέτρηση της συγκέντρωσης των μη καταναλωθέντων σακχάρων χρησιμοποιήθηκε πυκνόμετρο βαθμονομημένο σε βαθμούς Plato. Στα διαγράμματα 1-5 που ακολουθούν παρουσιάζεται η μείωση των τιμών Plato κατά την διάρκεια της ζύμωσης για τις τέσσερις διαφορετικές ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν καθώς και διάγραμμα σύγκρισης των καμπυλών αναφοράς. Στη συνέχεια παρουσιάζεται η κατανάλωση των σακχάρων και για τις καθαρές καλλιέργειες του μη συμβατικού ζυμομύκητα για τις θερμοκρασίες των 13 °C και 20 °C, όπως και διάγραμμα σύγκρισης των καμπυλών αυτών.



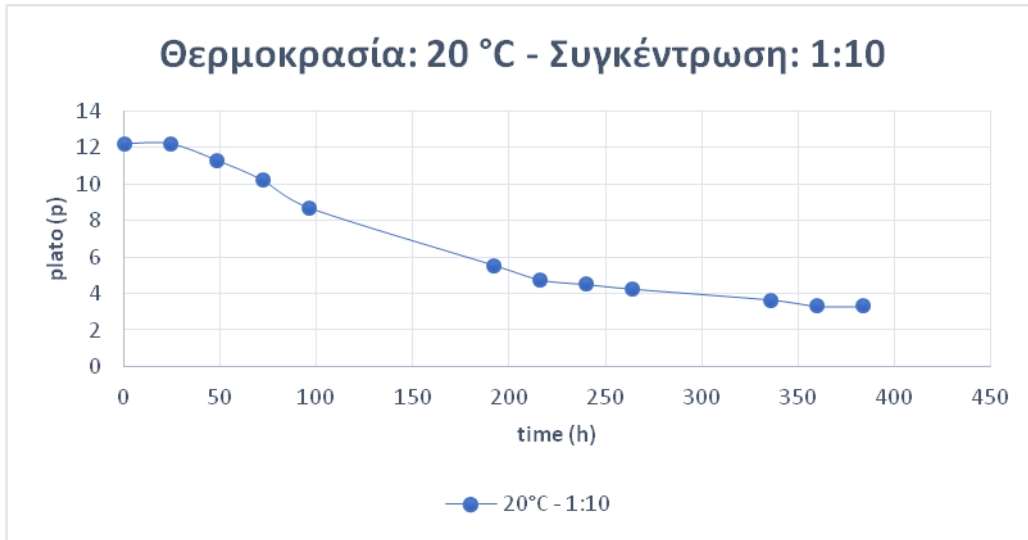
Διάγραμμα 1: Καμπύλη μείωσης της πυκνότητας των σακχάρων στο ζυμώμενο γλεύκος στους 13 °C με αναλογία μικροοργανισμών 1:1.



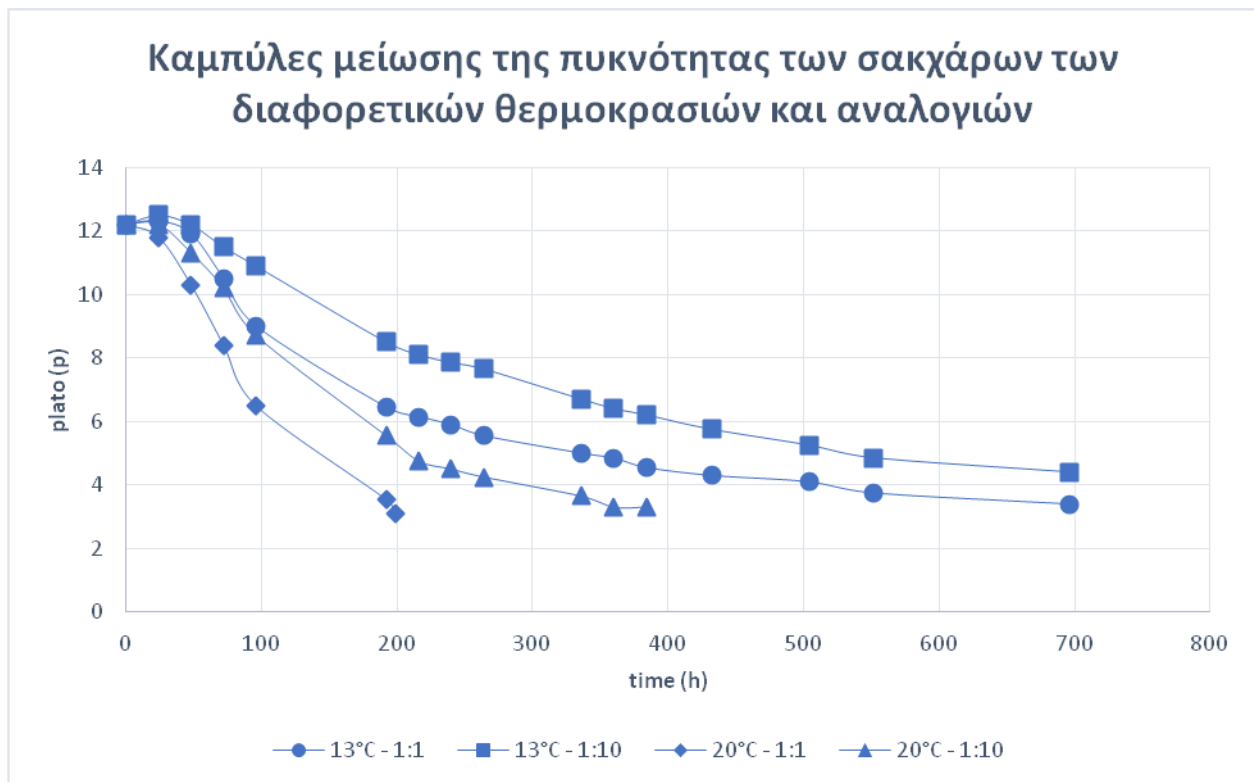
Διάγραμμα 2: Καμπύλη μείωσης της πυκνότητας των σακχάρων στο ζυμώμενο γλεύκος στους 13 °C με αναλογία μικροοργανισμών 1:10.



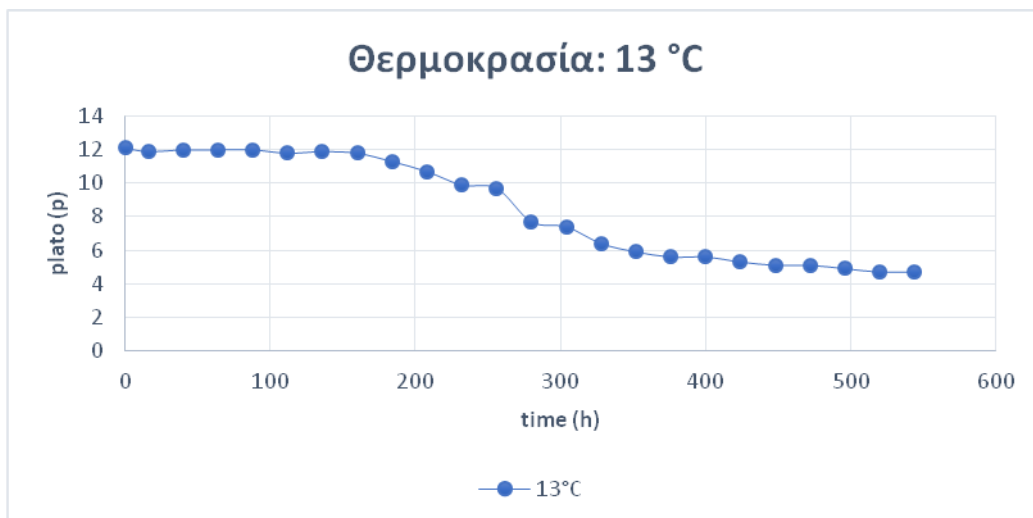
Διάγραμμα 3: Καμπύλη μείωσης της πυκνότητας των σακχάρων στο ζυμώμενο γλεύκος σε θερμοκρασία 20 °C με αναλογία μικροοργανισμών 1:1.



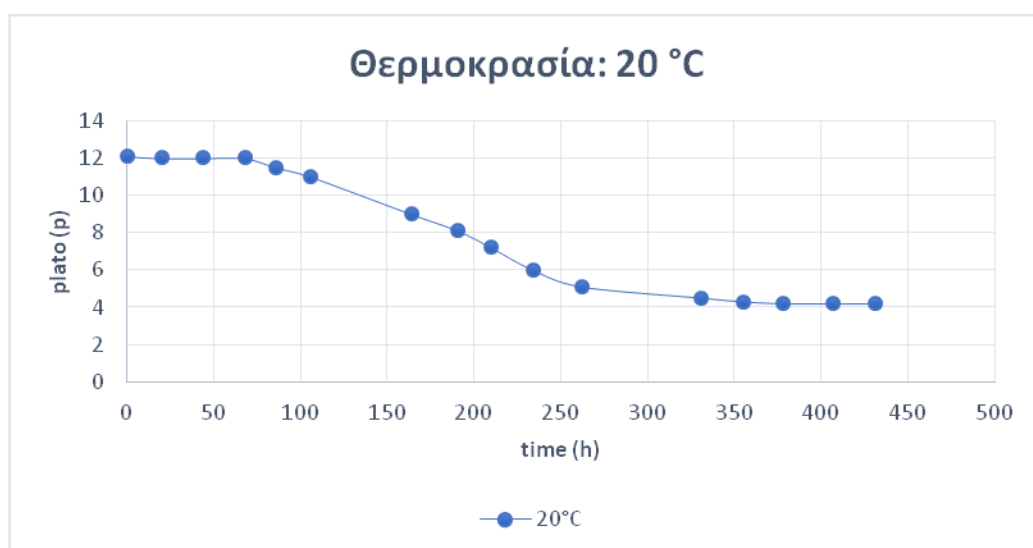
Διάγραμμα 4: Καμπύλη μείωσης της πυκνότητας των σακχάρων στο ζυμώμενο γλεύκος σε θερμοκρασία 20 °C με αναλογία μικροοργανισμών 1:10.



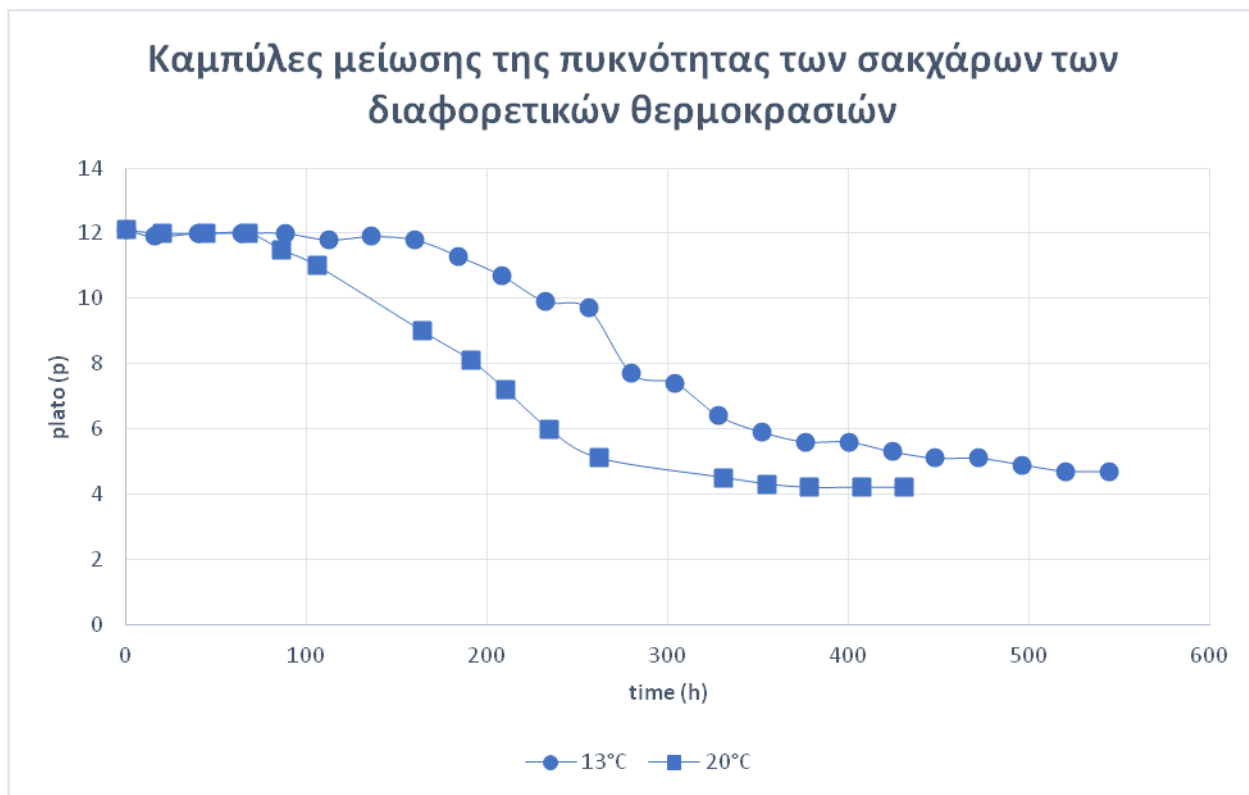
Διάγραμμα 5: Καμπύλες μείωσης της πυκνότητας των σακχάρων στο ζυμώμενο γλεύκος για τις διάφορες θερμοκρασίες και αναλογίες.



Διάγραμμα 6: Καμπύλη μείωσης της πυκνότητας των σακχάρων στο ζυμώμενο γλεύκος της καθαρής καλλιέργειας *Metschnikowia pulcherrima* σε θερμοκρασία 13 °C.



Διάγραμμα 7: Καμπύλη μείωσης της πυκνότητας των σακχάρων στο ζυμώμενο γλεύκος της καθαρής καλλιέργειας *Metschnikowia pulcherrima* σε θερμοκρασία 20 °C.



Διάγραμμα 8: Καμπύλες μείωσης της πυκνότητας των σακχάρων στο ζυμώμενο γλεύκος της καθαρής καλλιέργειας *Metschnikowia pulcherrima* για τις διάφορες θερμοκρασίες.

Αρχική μέτρηση Plato γλεύκους: 12.2 °Plato.

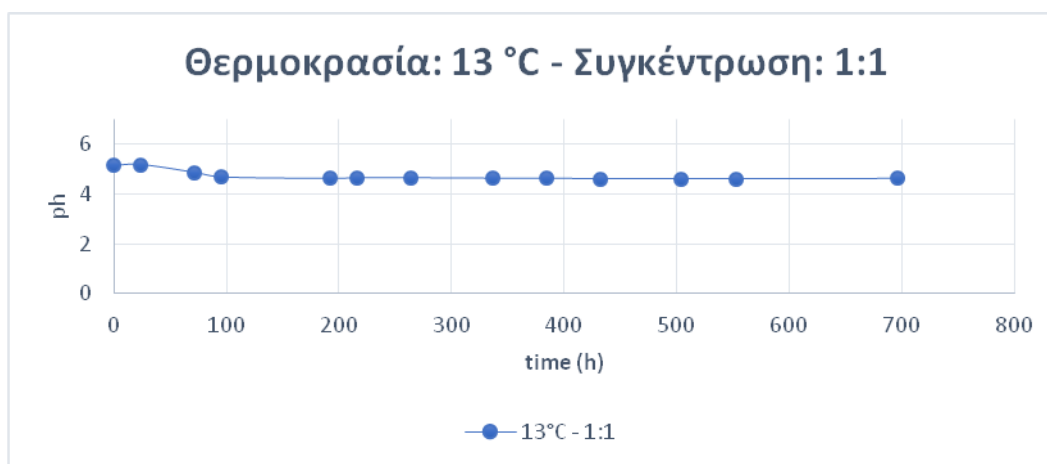
Από τα διαγράμματα προκύπτει ότι οι ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν στους 20 °C ολοκληρώθηκαν σε μικρότερο χρονικό διάστημα από αυτές των 13 °C. Συγκεκριμένα παρατηρούμε ότι σε θερμοκρασία 20 °C και αναλογία 1:1 η ζύμωση ολοκληρώθηκε σε μικρότερο χρονικό διάστημα από όλες τις ζυμώσεις, με τα λιγότερα εναπομείναντα αζύμωτα σάκχαρα σε μόλις 9 ημέρες με 3.1 °Plato και σε 17 ημέρες φαίνεται να ολοκληρώθηκε η ζύμωση αναλογίας 1:10 με 3.3 °Plato. Σε θερμοκρασία 13 °C η ζύμωση ολοκληρώνεται και για τις δύο περιπτώσεις στις 30 ημέρες με τη 1:1 αναλογία να βρίσκεται στα 3.4 °Plato και την 1:10 στα 4.4 °Plato, παρατηρώντας μάλιστα στη ζύμωση αναλογίας 1:10 χαμηλότερο ρυθμό στην κατανάλωση των σακχάρων. Συνολικά φαίνεται η ζύμωση με αναλογία 1:1 και στις δύο θερμοκρασίες να ολοκληρώνεται ταχύτερα με μικρότερα ποσοστά αζύμωτων σακχάρων, αφού συγκεκριμένα βλέπουμε σε θερμοκρασία 13 °C και συγκέντρωση 1:10 αδυναμία αποζύμωσης του γλεύκους (4.4 °Plato). Αυτό ίσως οφείλεται στο γεγονός ότι στην αναλογία 1:1 υπάρχει μεγαλύτερη συγκέντρωση του *Saccharomyces cerevisiae* σε σχέση με την αναλογία 1:10 όπου κυρίαρχο ρόλο παίζει ο ζυμομύκητας *Metschnikowia pulcherrima* ο οποίος χαρακτηρίζεται από μικρή αντοχή απέναντι στην αιθανόλη. Πρέπει να σημειωθεί ότι οι δύο ζυμώσεις των 13 °C διακόπηκαν χωρίς να τους δοθεί η δυνατότητα να φτάσουν στο μέγιστο τελικό βαθμό Plato, αν ίσως η ζύμωση κρατούσε κάποιες μέρες παραπάνω να μας δινόντουσαν αποτελέσματα με σημαντικά μικρότερα ποσοστά αζύμωτων σακχάρων.

Όσον αφορά τη ζύμωση που έγινε από καθαρή καλλιέργεια ζυμομύκητα *Metschnikowia pulcherrima* παρατηρούμε τα περισσότερα αζύμωτα σάκχαρα συγκριτικά με όλες τις ζυμώσεις.

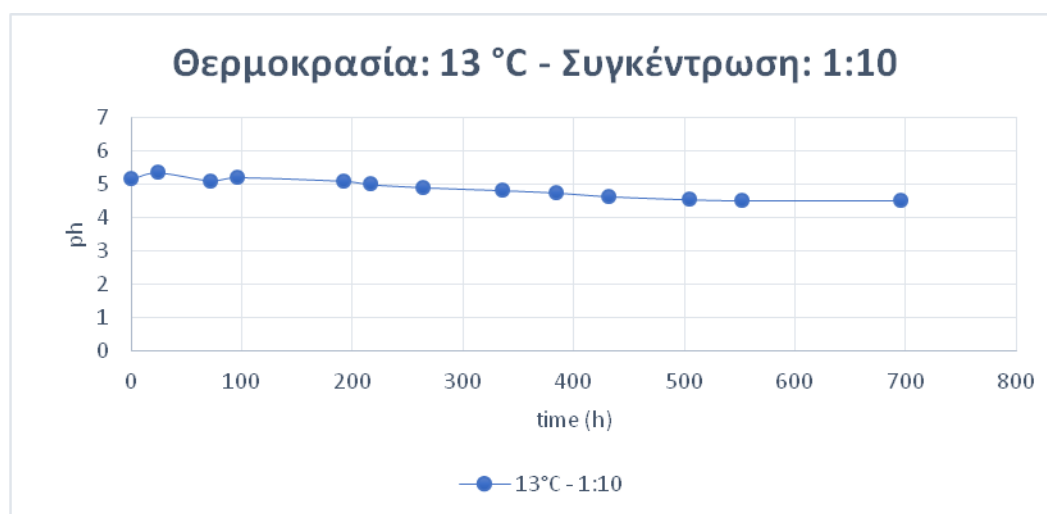
Στους 13 °C η ζύμωση καθυστέρησε να ξεκινήσει περισσότερο από κάθε άλλη ζύμωση, ολοκληρώθηκε όμως σε μικρότερο χρονικό διάστημα από τις μικτές καλλιέργειες στην αντίστοιχη θερμοκρασία με 4.7 °Plato. Στους 20 °C υπάρχει και εδώ καθυστέρηση στην έναρξη, ολοκληρώνοντας όμως τη ζύμωση σε χρονικό διάστημα μικρότερο από την αντίστοιχη καθαρή καλλιέργεια του μικροοργανισμού στους 13 °C με 4.2 °Plato. Συμπαιρένεται λοιπόν μια αδυναμία αποζύμωσης του γλεύκους όταν η ζύμωση πραγματοποιείται μόνο από το μη συμβατικό ζυμομύκητα.

4.2 ΜΕΤΑΒΟΛΗ pH:

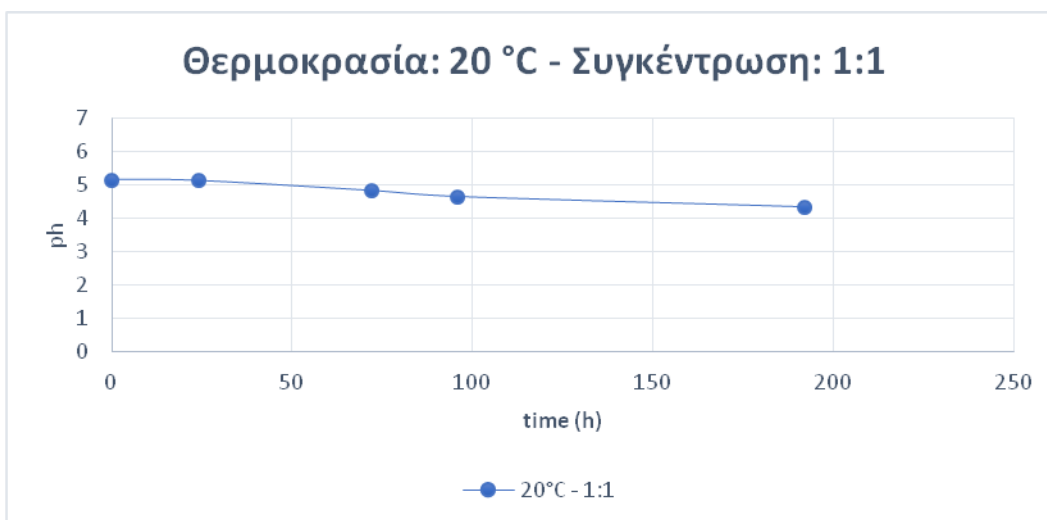
Στα διαγράμματα 9-13 παρουσιάζονται οι μεταβολές του pH κατά την διάρκεια της ζύμωσης στις τέσσερις διαφορετικές συνθήκες ζυμώσεων.



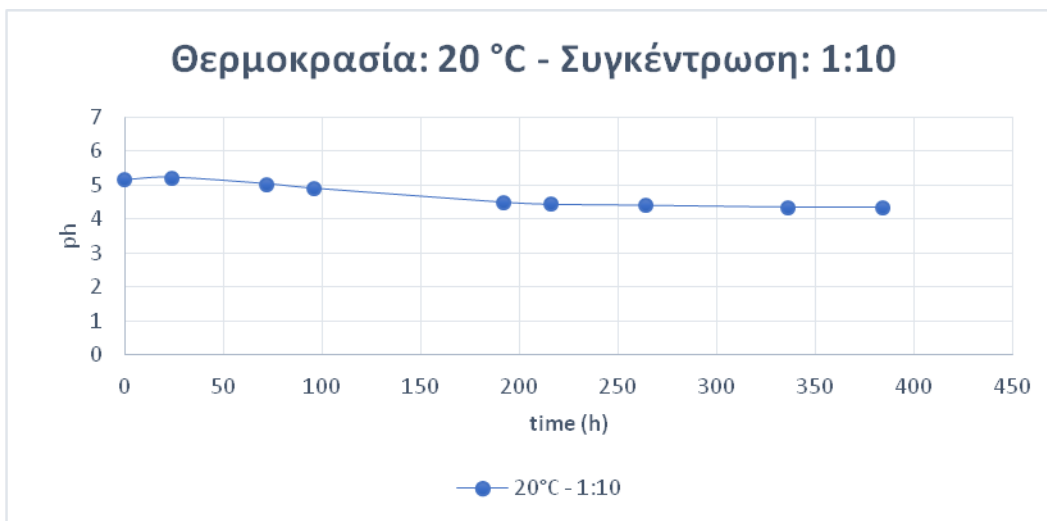
Διάγραμμα 9: Καμπύλη μεταβολής του pH στη μπύρα αναλογίας μικροοργανισμών 1:1 με θερμοκρασία ζύμωσης 13 °C.



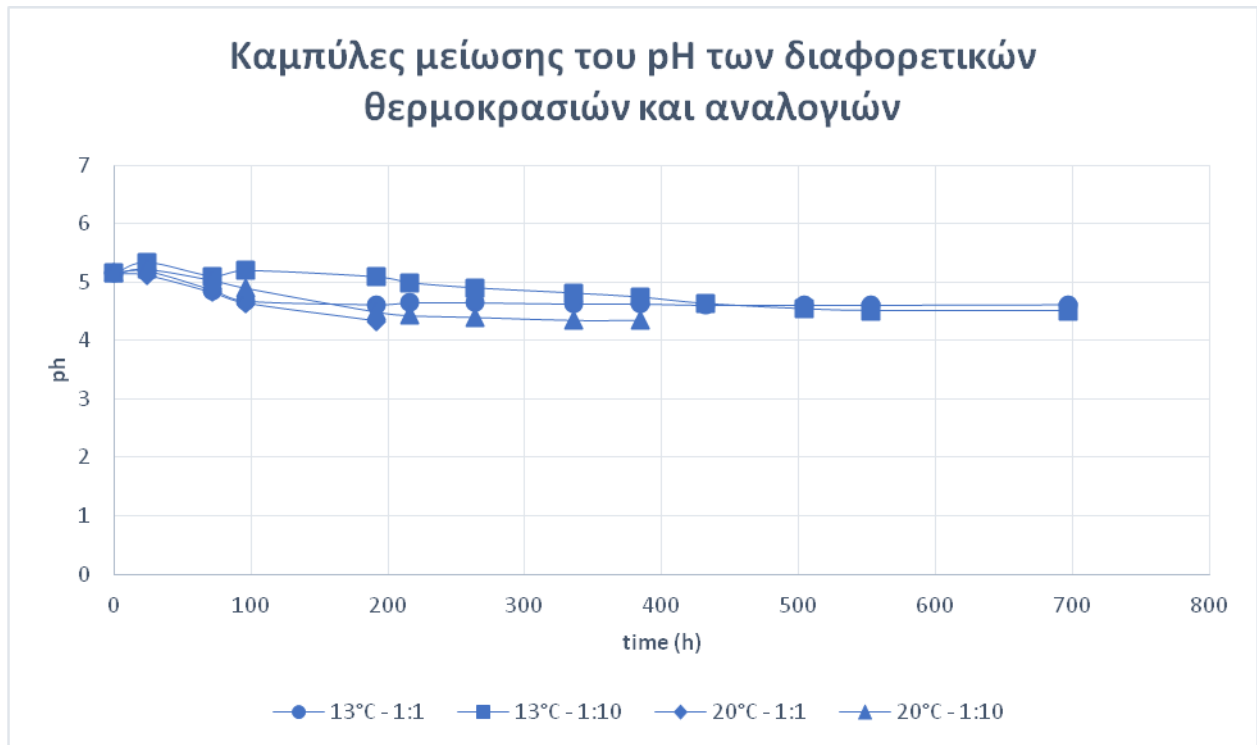
Διάγραμμα 10: Καμπύλη μεταβολής του pH στη μπύρα αναλογίας μικροοργανισμών 1:10 με θερμοκρασία ζύμωσης 13 °C.



Διάγραμμα 11: Καμπύλη μεταβολής του pH στη μπίρα αναλογίας μικροοργανισμών 1:1 με θερμοκρασία ζύμωσης 20 °C.



Διάγραμμα 12: Καμπύλη μεταβολής του pH στη μπίρα αναλογίας μικροοργανισμών 1:10 με θερμοκρασία ζύμωσης 20 °C.



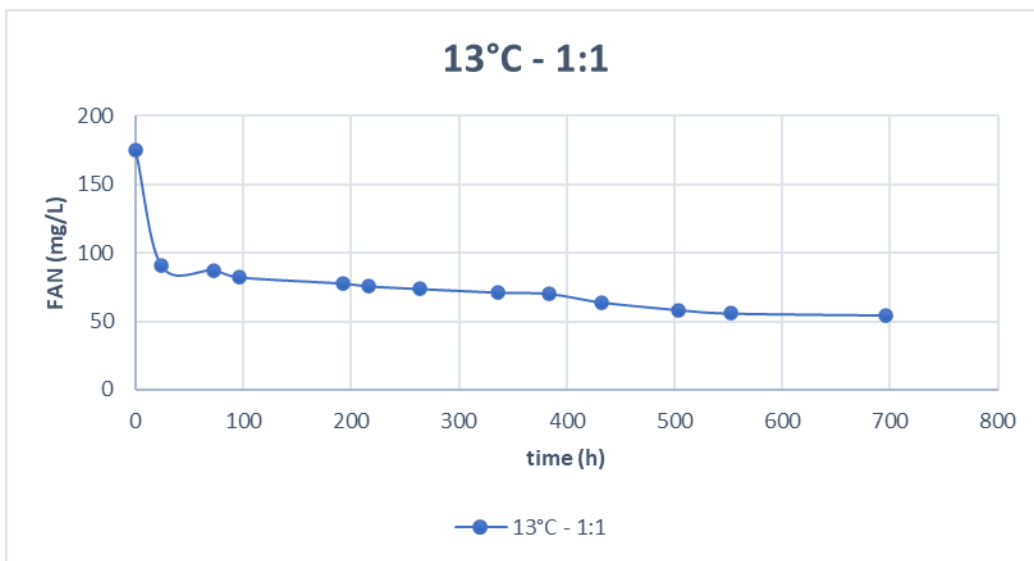
Διάγραμμα 13: Καμπύλες μεταβολής του pH στις μπίρες των διαφόρων αναλογιών και θερμοκρασιών.

Αρχική τιμή pH γλεύκους: 5.15.

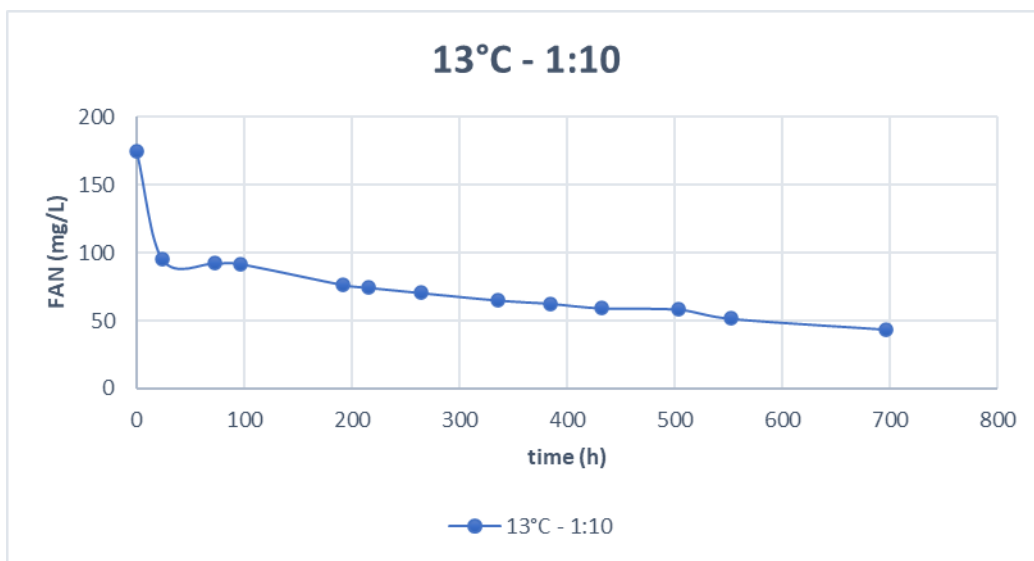
Παρατηρώντας τις καμπύλες των διαγραμμάτων τις χαμηλότερες τιμές pH φαίνεται να έχουν οι ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν στους 20 °C, έχοντας μικρή αποκλιση στα αποτελέσματα. Ειδικότερα η συγκέντρωση αναλογίας 1:1 έχει ως τελικό pH 4.33 και η 1:10 έχει 4.35 η οποία μέτρηση φαίνεται να έχει σταθεροποιηθεί τις 3 τελευταίες μέρες της ζύμωσης. Μεγαλύτερη τιμή pH κατέχει η ζύμωση των 13 °C με αναλογία συγκέντρωσης 1:1 και στη συνέχεια η 1:10 με αποτελέσματα 4.62 και 4.51 αντίστοιχα. Και εδώ βλέπουμε μια πιο ομαλή σταθεροποίηση των μετρήσεων στις 2-3 τελευταίες μέρες της ζύμωσης, και κυρίως στη ζύμωση με ίση αναλογία *Metschnikowia pulcherrima* και *Saccharomyces cerevisiae*. Επιπλέον στους 13 °C παρατηρούμε μικρή αύξηση του pH τη δεύτερη ημέρα ζύμωσης και στη συνέχεια απότομη πτώση κατά τις επόμενες τρεις ημέρες.

4.3. ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗΣ ΔΙΑΘΕΣΙΜΟΥ ΑΜΜΩΝΙΑΚΟΥ ΑΖΩΤΟΥ:

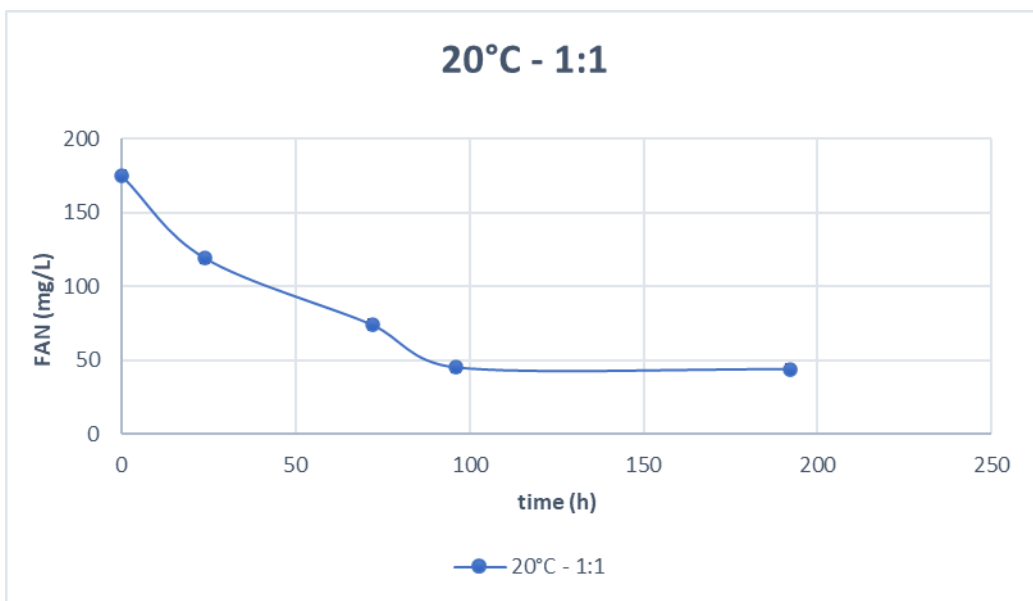
Στα διαγράμματα 14-21 που ακολουθούν παρουσιάζεται ο ρυθμός κατανάλωσης του διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου σε κάθε πείραμα, αλλά και διαγράμματα σύγκρισης των αποτελεσμάτων του ρυθμού κατανάλωσης του διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου.



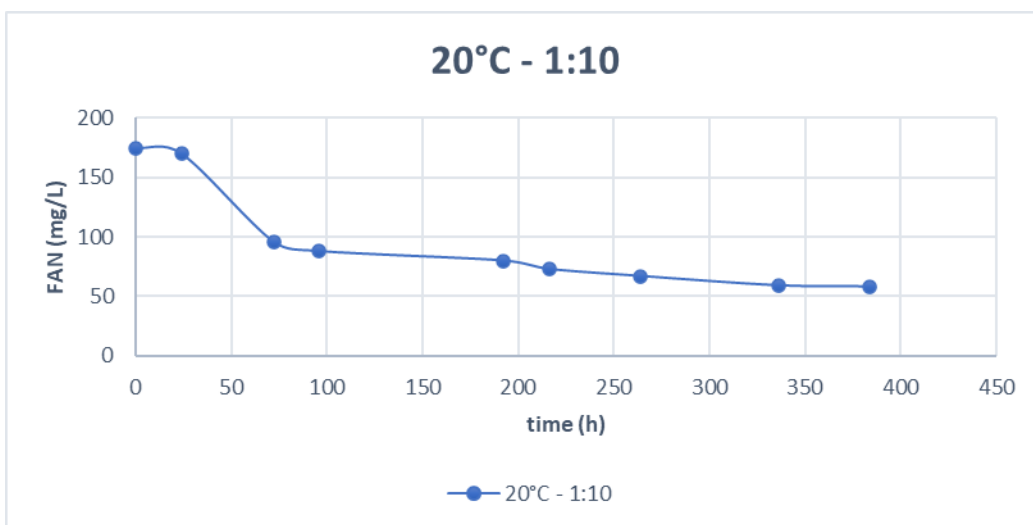
Διάγραμμα 14: Καμπύλη κατανάλωσης του διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου στη ζύμωση αναλογίας μικροοργανισμών 1:1 στη θερμοκρασία των 13 °C.



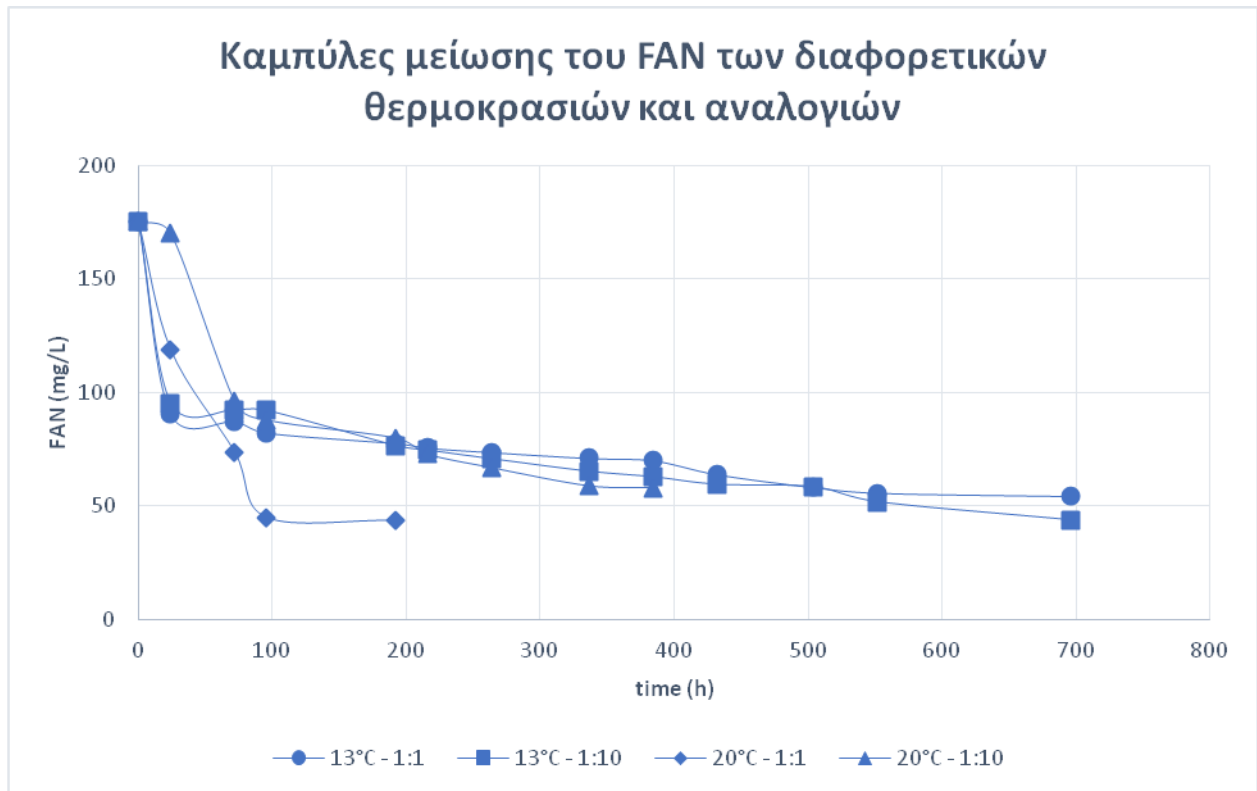
Διάγραμμα 15: Καμπύλη κατανάλωσης του διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου στη ζύμωση αναλογίας μικροοργανισμών 1:10 στη θερμοκρασία των 13 °C.



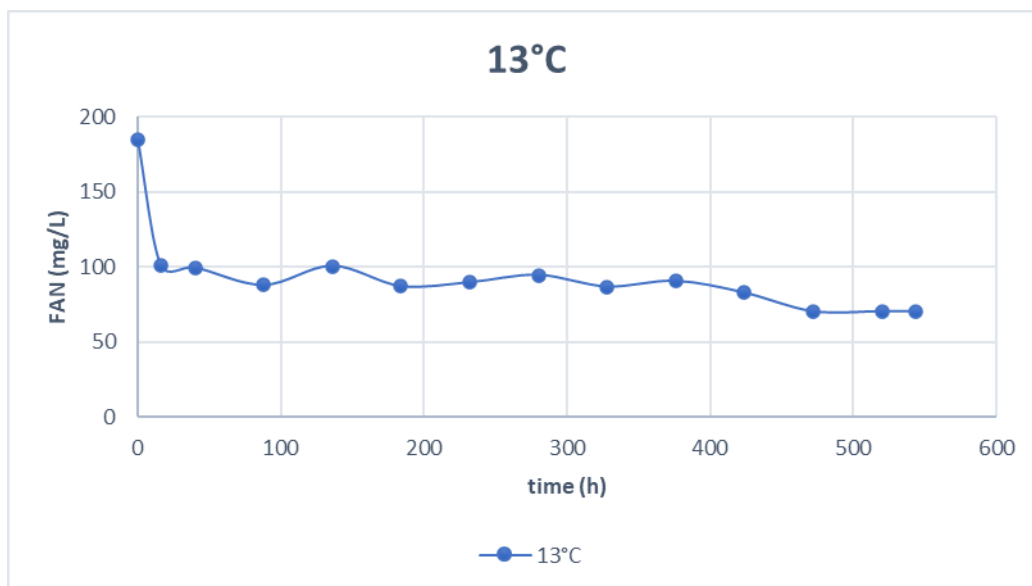
Διάγραμμα 16: Καμπύλη κατανάλωσης του διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου στη ζύμωση αναλογίας μικροοργανισμών 1:1 στη θερμοκρασία των 20 °C.



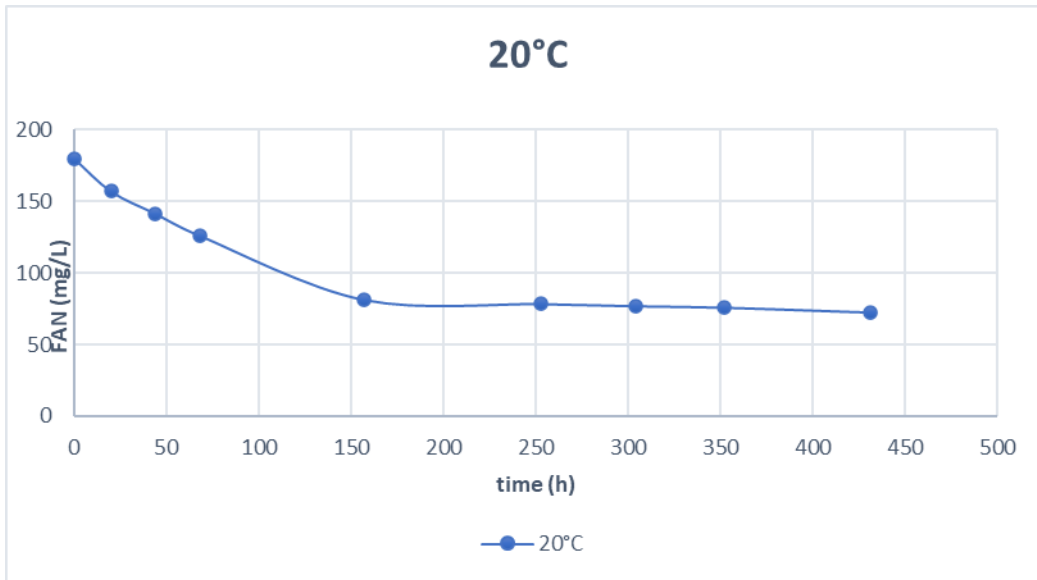
Διάγραμμα 17: Καμπύλη κατανάλωσης του διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου στη ζύμωση αναλογίας μικροοργανισμών 1:10 στη θερμοκρασία των 20 °C.



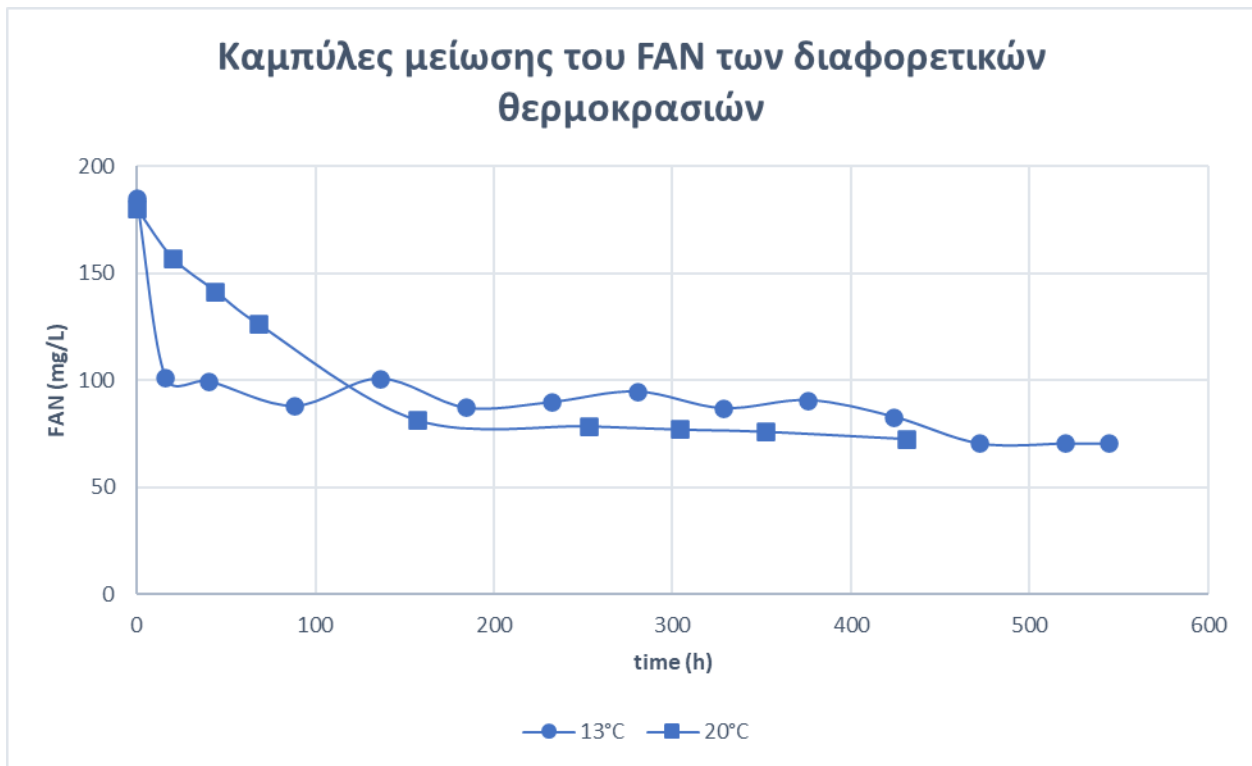
Διάγραμμα 18: Καμπύλες κατανάλωσης του διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου στις ζυμώσεις για τις διάφορες θερμοκρασίες και αναλογίες.



Διάγραμμα 19: Καμπύλη κατανάλωσης του διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου στη ζύμωση της καθαρής καλλιέργειας *Metschnikowia pulcherrima* σε θερμοκρασία 13 °C.



Διάγραμμα 20: Καμπύλη κατανάλωσης του διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου στη ζύμωση της καθαρής καλλιέργειας *Metschnikowia pulcherrima* σε θερμοκρασία 20 °C.



Διάγραμμα 21: Καμπύλες κατανάλωσης του διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου στη ζύμωση της καθαρής καλλιέργειας *Metschnikowia pulcherrima* για τις διάφορες θερμοκρασίες.

Η ζύμωση με τη μεγαλύτερη τελική κατανάλωση διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου παρουσιάζεται να είναι εκείνη που πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 20 °C και συγκέντρωση ζυμομυκήτων 1:1. Αυτή είναι και η ζύμωση που ολοκληρώθηκε στο μικρότερο χρονικό διάστημα. Μεγαλύτερη κατανάλωση αζώτου όμως κατά την πρώτη μέρα της ζύμωσης έχουν οι δύο μικτές καλλιέργειες μικροοργανισμών που έγιναν στους 13 °C (1:1 και 1:10 αντίστοιχα), δηλαδή κατά τη φάση προσαρμογής και πολλαπλασιασμού των μικροοργανισμών στη χαμηλή αυτή θερμοκρασία, με την κατανάλωση στη συνέχεια να παραμένει σχετικά σταθερή. Ειδικότερα την πρώτη μέρα η μικτή καλλιέργεια ζυμομυκήτων με αναλογία 1:1 κατανάλωσε λίγο περισσότερο αμμωνιακό άζωτο σε σχέση με την αναλογία 1:10. Αυτό ίσως οφείλεται στο ότι στην αναλογία αυτή υπάρχει μεγαλύτερη συγκέντρωση του συμβατικού ζυμομύκητα, σε σχέση με την άλλη καλλιέργεια, με αποτέλεσμα την γρηγορότερη έναρξη της ζύμωσης. Φαίνεται όμως ότι στο τέλος της ζύμωσης μεγαλύτερη κατανάλωση έχει η καλλιέργεια 1:10, όπου ο ζυμομύκητας *Metschnikowia pulcherrima* βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση από τον *Saccharomyces cerevisia*. Όσον αφορά τη ζύμωση αναλογίας 1:10 που πραγματοποιήθηκε στους 20 °C παρατηρούμε πολύ μικρή κατανάλωση του διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου κατά την πρώτη ημέρα της ζύμωσης και σημαντικά μεγάλη κατανάλωση τη δεύτερη με τρίτη ημέρα της ζύμωσης. Παρατηρούμε και έδω όπου ο μη συμβατικός ζυμομύκητας βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση από τον *Saccharomyces cerevisia* μια μικρή καθυστέρηση στην έναρξη της ζύμωσης. Έτσι, ίσως και η μεγάλη τελική κατανάλωση αζώτου από τη ζύμωση στους 20 °C σε αναλογία 1:1 οφείλεται στο παραπάνω γεγονός, ότι δηλαδή ο μύκητας *Metschnikowia pulcherrima* ξεκινά τη ζύμωση με καθυστέρηση. Ίσως όμως η μεγαλύτερη κατανάλωση αμμωνιακού αζώτου στις ζυμώσεις στους 20 °C να οφείλεται και στο γεγονός ότι πραγματοποιήθηκαν σε δωμάτιο (άρα δηλαδή να υπήρχαν διακυμάνσεις στη θερμοκρασία) και όχι σε ψυγείο σταθερής και συγκεκριμένης θερμοκρασίας, όπως οι ζυμώσεις στους 13 °C. Όποτε η μεγάλη κατανάλωση να οφείλεται σε ένα είδους στρες που υποβλήθηκαν οι μικροοργανισμοί λόγω αδυναμίας διατήρησης σταθερής και συγκεκριμένης θερμοκρασίας στο δωμάτιο απαιτώντας έτσι, μεγαλύτερη κατανάλωση θρεπτικού υλικού για τον πολλαπλασιασμό τους.

Μεγαλύτερη κατανάλωση αζώτου κατά την πρώτη μέρα της ζύμωσης, και τη στιγμή της ολοκλήρωσης της, έχει η ζύμωση των 13 °C παρατηρώντας κατά τη διάρκεια της ζύμωσης κάποιες αυξήσεις στις μετρήσεις. Παρατηρούμε και έδω αυξημένη κατανάλωση αζώτου, κατά την αρχική περίοδο της ζύμωσης, στις συνθήκες των 13 °C. Στις ζυμώσεις από τις καθαρές καλλιέργειες παρατηρείται η μικρότερη κατανάλωση σε σχέση με αυτές που ζυμώθηκαν από συνδυασμό συμβατικού και μη συμβατικού ζυμομύκητα.

4.4 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ:

Οι τιμές της περιεκτικότητας των τελικών προϊόντων σε αιθανόλη προσδιορίστηκαν με την μέθοδο της αποσταξης. Τα αποτελέσματα των ζυμώσεων παρουσιάζονται στον πίνακα 2:

Πίνακας 2: Περιεκτικότητα σε αιθανόλη (ABV) στις μπύρες των διαφόρων αναλογιών και θερμοκρασιών.

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

Μια τυπική μπύρα τύπου American Pale Ale έχει περιεκτικότητα σε αιθανόλη 4.5-6.2% v/v.

Παρατηρούμε ότι τη μικρότερη τιμή αιθανόλης έδωσε η ζύμωση στους 13 °C με αναλογία συγκέντρωσης συμβατικού και μη συμβατικού ζυμομύκητα 1:10, όπου κατά αντιστοιχία παρατηρήθηκε και η μεγαλύτερη ποσότητα αζύμωτων σακχάρων (4.4 °Plato). Αμέσως επόμενη μικρότερη τιμή αιθανόλης έδωσε η ζύμωση στους 20 °C με αναλογία συγκέντρωσης 1:1. Ενώ αυτή η ζύμωση έδωσε συγκριτικά τα λιγότερα αζύμωτα σάκχαρα (3.1 °Plato), ήταν και η ζύμωση που ολοκληρώθηκε στο λιγότερο χρόνο. Τη μεγαλύτερη τιμή αιθανόλης έδωσε η ζύμωση στους 20 °C με αναλογία συγκέντρωσης 1:10 (3.3 °Plato) και την αμέσως επόμενη μεγαλύτερη τιμή, με πολύ μικρή διαφορά από την προηγούμενη, έδωσε η αναλογία ζύμωσης 1:1 στους 13 °C (3.4 °Plato). Βιβλιογραφικά δε βρέθηκαν αναφορές για σύγκριση και περαιτέρω ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Ο ζυμομύκητας *Metschnikowia pulcherrima* έδωσε τις μικρότερες τιμές αιθανόλης, στα όρια της περιεκτικότητας της μπύρας American Pale Ale. Στους 13 °C η καθαρή ζύμωση έδωσε τα περισσότερα αζύμωτα σάκχαρα (4.7 °Plato) για αυτό και έχει τη μικρότερη περιεκτικότητα σε αιθανόλη. Το ίδιο συμβαίνει και για την αντίστοιχη ζύμωση στους 20 °C (4.2 °Plato), δίνοντας λίγο περισσότερη αιθανόλη.

4.5 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΡΩΜΑΤΙΚΟΥ ΠΡΟΦΙΛ:

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζεται συνοπτικά το σύνολο των ουσιών που προέκυψαν από την αέρια χρωματογραφία μάζας καθώς και το άρωμα και το όριο ανίχνευσης της κάθε μίας όπως προέκυψαν από την βιβλιογραφία.

Πίνακας 3: Το χαρακτηριστικό άρωμα και το όριο ανίχνευσης όλων των ουσιών που προέκυψαν από την αέρια χρωματογραφία μάζας.

	Ενώσεις	Άρωμα	Όριο ανίχνευσης (mg/L)	Αναφορές
Αλκοόλες	Isoamyl alcohol	Ζυμέλαιο, οινοπνευματώδες ποτό, ούισκι, μπανάνα	5-6.5	(Mas et al., 2017)
	Active amyl alcohol	Γλυκό, αλκοολούχο	0.045-0.83 ×10 ⁻³	(Mas et al., 2017)
	2-Furanmethanol	-	-	-
	Methionol (1-Propanol, 3-(methyl)-)	Ανανάς, φράουλα, τσάι, μέλι	1	(American Industrial Hygiene Association, 2013)
	Tyrosol	Δυσάρεστη ταγγισμένη οσμή, λιπαρό, κερώδες	Δεν είναι διαθέσιμο	(Thegoodscentcompany, 2009)
	Tryptophol	Αμύγδαλο, ήπια φρουτώδες	Δεν είναι διαθέσιμο	(Thegoodscentcompany, 2009)
	1-Hexanol, 2-ethyl-	Εσπεριδοειδή, γλυκό, λουλούδια, λιπαρό	Δεν είναι διαθέσιμο	(Thegoodscentcompany, 2009)
	Phenylethyl alcohol	Τριαντάφυλλο, ζελεδάκια	4	(Burdock, 2016)
Οξέα	Isobutyric acid	Γλυκό, φράουλα	0.23	(Tao & Zhang, 2010)
	Butyric acid	Κεράσι, ανανάς, τυρί (blue cheese)	2-3	(Simpson & Mairs, 2005)
	Isovaleric acid (Butanoic acid, 3-methyl)	Τυρί, όξινο, πικάντικο, λιπαρό, ποδαρίλα	1	(Simpson & Mairs, 2005)
	Active valeric acid (Butanoic acid, 2-methyl)	Πικράδα, τυρί, όξινο	Δεν είναι διαθέσιμο	(Burdock, 2016)
	Hexanoic acid (Caproic acid)	Γεώδες, μανιτάρι, γαλακτοκομικά	8	(Mas et al., 2017)
	Octanoic acid (Caprylic acid)	Λιπαρό, σαπούνι	4-6	(Simpson & Mairs, 2005)
	Decanoic acid	Πικρό, όξινο,	10	(Mas et al., 2017)

	(Capric acid)	λιπαρό, εσπεριδοειδή		
	Dodecanoic acid (Lauric acid)	Λιπαρό, καρύδα	10	(Mas et al., 2017)
	Hexadecanoic acid (Palmitic acid)	Κρεμώδες, κερι	10	(Mas et al., 2017)
Εστέρες	Isoamyl acetate	Γλυκό, μπανάνα, αχλάδι	1.4	(Simpson & Mairs, 2005)
	Hexanoic acid ethyl ester (Ethyl caproate)	Μήλο, γλυκάνισος	0.2	(Simpson & Mairs, 2005)
	Octanoic acid ethyl ester (Ethyl caprylate)	Φρουτώδες, βερίκοκο, μπανάνα, μπράντυ, αχλάδι	0.04-0.58	(Laskin et al., 2005)
	Phenyl ethyl acetate (Acetic acid, 2-phenylethyl ester)	Μπανάνα, μήλο, μέλι	0.05-3.8	(Laskin et al., 2005)
	Decanoic acid ethyl ester (Ethyl caprate)	Κερι	0.51-1.1	(Mas et al., 2017)
	Dodecanoic acid ethyl ester (Ethyl laurate)	Γλυκό, κηρώδες, φρουτώδες, σαπούνι	50	(Mas et al., 2017)
	1H-Indole-3-ethanol, acetate (ester)	Ζωικό, κοπριά	Δεν είναι διαθέσιμο	(Thegoodscentcompany, 2009)
	Ethyl butyrate	Ανανάς, φρουτώδες, κρεμώδες	0.1-18	(Laskin et al., 2005)
	Palmitic acid ethyl ester (Ethyl palmitate)	Κηρώδες, φρουτώδες, κρεμώδες, γάλα, βάλσαμο	2-30	(Zhao et al., 2016)
	Ethyl oleate	Λιπαρό, γάλα, κερι	Δεν είναι διαθέσιμο	(Burdock, 2016)
	Isopropyl disulfide	-	-	-
	2-methoxy-4-vinylphenol	σιτάρι, φαγόπυρο	0.2	(Langos & Granvogl, 2016)
	Disulfide, isopropyl propyl	Κρεμμύδι, κρέας, λάχανο	Δεν είναι διαθέσιμο	(Burdock, 2016)
	Disulfide dimethyl	Μαγειρεμένο λαχανικό, λάχανο, σκόρδο	0.029	(Burdock, 2016)

Αρωματικές ενώσεις	Methyl ethyl disulfide	Θείο	Δεν είναι διαθέσιμο	(Mas et al., 2017)
	p-Xylene	Γλυκό	0.47	(Leonardos et al., 2012)
	4-Vinylguaiacol	Πικράδα, σκόρδο	0.25 ; 0.3	(Simpson & Mairs, 2005)
	Caryophyllene	Ξύλο, πικάντικο, γλυκό (προέρχεται από τον λυκίσκο)	0.0005	(Mas et al., 2017)
	Humulene	Ξύλο, λυκίσκος	2.3	(Thegoodscentcompany, 2009)
	Isohumulone	Πικράδα, λυκίσκος	Δεν είναι διαθέσιμο	(Laskin et al., 2005)
	Lupulon	Πικράδα, εσπεριδοειδή, φυτικά, λυκίσκος	Δεν είναι διαθέσιμο	(Laskin et al., 2005)
	2-Methoxy vinylguaiacol	Καμμένο, φάρμακο	0.2	(Callemien & Collin, 2009)

Στους πίνακες που ακολουθούν παρουσιάζονται συγκριτικά οι ουσίες που παράχθηκαν στις μπίρες κατά τη διάρκεια της πρώτης εβδομάδας εμφιάλωσης για την εκάστοτε ζύμωση, χωρισμένες σε κατηγορίες ενώσεων.

Πίνακας 4: Συγκριτικός πίνακας των αλκοολών που παράχθηκαν στην κάθε μπίρα κατά την πρώτη εβδομάδα από την ημέρα εμφιάλωσης.

COMPOUNDS	Συγκέντρωση (mg/L)					
	13 °C - 1:1	13 °C - 1:10	20 °C - 1:1	20 °C - 1:10	13 °C 100%mp	20 °C 100%mp
Isoamyl alcohol	2.29 ± 0.17	1.26 ± 0.25	1.63 ± 0.21	1.40 ± 0.05	3.89 ± 1.41	4.89 ± 0.87
Active amyl alcohol	0.76 ± 0.20	0.37 ± 0.13	0.42 ± 0.07	0.52 ± 0.01	1.69 ± 0.75	1.38 ± 0.27
2-Furanmethanol	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.01	ND	ND
Methionol (1-Propanol, 3-(methyl)-)	0.05 ± 0.02	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.02	0.11 ± 0.01
Tyrosol	0.12 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.11 ± 0.00	0.16 ± 0.01	ND	0.26 ± 0.04
Phenyl ethanol	7.57 ± 2.35	8.82 ± 2.26	7.19 ± 0.54	8.27 ± 2.65	8.25 ± 2.38	13.43 ± 1.60
Tryptophol	0.21 ± 0.02	0.30 ± 0.15	0.77 ± 0.15	0.77 ± 0.39	ND	4.22 ± 0.47
1-Hexanol, 2-ethyl-	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00	ND	ND

* ND= NOT DETECTED

Τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ισοαμυλικής αλκοόλης (αρώματα ζυμέλαιου ,μπανάνας, αλκοολούχου ποτού) τις συναντάμε στις ζυμώσεις από καθαρές καλλιέργειες καθώς και στη ζύμωση που έγινε στους 13 °C σε αναλογία 1:1. Για την ενεργή αμυλική αλκοόλη (αρώματα γλυκού αλκοολούχου ποτού) παρατηρούμε και εδώ τι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στις καθαρές καλλιέργειες. Η 2-Furanmethanol (αρώματα γλυκού, καραμέλας, ψωμιού, καφέ, του μπαγιάτικου, καθώς και χημικών και του αλκοόλ) εμφανίζει μικρές και παρόμοιες συγκεντρώσεις, εκτός από τις καθαρές ζυμώσεις από *Metschnikowia pulcherrima* που δεν ανιχνεύεται. Στη μεθιονόλη (αρώματα κρέατος) και στη φαινυλαιθυλική αλκοόλη (αρώματα γαρδένιας και υακίνθου) τη μεγαλύτερη συγκέντρωση βρίσκουμε σε θερμοκρασία 20 °C από την καθαρή καλλιέργεια. Η τυροσόλη (άρωμα λιπαρό και κερώδες,δυσάρεστη ταγγισμένη οσμή) δεν ανιχνεύεται στη καθαρή ζύμωση από *Metschnikowia pulcherrima* στους 13 °C. Η τρυπτοφόλη (αρώματα αμυδάλου και φρούτων) εμφανίζει τις μεγαλύτερες τιμές στις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν στους 20 °C ενώ δεν ανιχνεύεται στη ζύμωση καθαρής καλλιέργειας στους 13 °C. Τέλος για τη 1-Hexanol, 2-ethyl- (αρώματα γλυκά, ελαιώδη, φρέσκα, εσπεριδοειδών και ανθέων) παρατηρούμε πολύ μικρές και παρόμοιες συγκεντρώσεις σε όλες τις περιπτώσεις. Δεν ανιχνεύεται στις ζυμώσεις από καθαρές καλλιέργειες.

Πίνακας 5: Συγκριτικός πίνακας των οξέων που παράχθηκαν στην κάθε μπίρα κατά την πρώτη εβδομάδα από την ημέρα εμφιάλωσης.

COMPOUNDS	Συγκέντρωση (mg/L)					
	13 °C - 1:1	13 °C - 1:10	20 °C - 1:1	20 °C - 1:10	13 °C 100%mp	20 °C 100%mp
Isobutyric acid	0.03 ± 0.04	0.03 ± 0.04	0.03 ± 0.00	0.07 ± 0.02	ND	0.09 ± 0.02
Butyric acid	0.08 ± 0.02	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.02	ND	ND
Isovaleric acid (Butanoic acid, 3-methyl)	0.07 ± 0.02	0.06 ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.00	0.07 ± 0.03	0.11 ± 0.02
Active valeric acid (Butanoic acid, 2-methyl)	0.04 ± 0.02	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.01	ND	ND
Hexanoic acid (Caproic acid)	0.15 ± 0.05	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.14 ± 0.01	ND	0.04 ± 0.06
Octanoic acid (Caprylic acid)	0.34 ± 0.18	0.86 ± 0.24	0.18 ± 0.04	0.55 ± 0.46	0.84 ± 0.05	0.16 ± 0.01
Decanoic acid (Capric acid)	0.06 ± 0.06	0.07 ± 0.02	0.03 ± 0.02	0.04 ± 0.02	0.20 ± 0.01	ND
Dodecanoic acid (Lauric acid)	0.01 ± 0.02	ND	ND	0,01 ± 0,00	ND	ND
Hexadecanoic acid (Palmitic acid)	0.15 ± 0.04	0.25 ± 0.02	0.14 ± 0.06	0.49 ± 0.26	ND	ND

acid)						
-------	--	--	--	--	--	--

* ND= NOT DETECTED

Το ισοβουτυρικό οξύ (άρωμα φράουλας και γλυκού) βρίσκεται σε παρόμοιες συγκεντρώσεις με μεγαλύτερη εκείνη της αναλογίας 1:10 στους 20 °C και στη μονοκαλλιέργεια στους 20 °C. Δεν ανιχνεύεται στη ζύμωση που έγινε μόνο από την *Metschnikowia pulcherrima* στους 13 °C. Και το βουτυρικό οξύ (άρωμα ανανά, κεράσι, blue cheese) δεν ανιχνεύεται στις ζυμώσεις καθαρών καλλιέργειών, παρατηρούμε παρόμοιες συγκεντρώσεις με μεγαλύτερες τιμές να είναι των ζυμώσεων στους 13 °C. Το ισοβαλερικό οξύ (άρωμα τυριού, πικάντικου, όξινο και λιπαρό) παρατηρείται σε μικρότερες συγκεντρώσεις στην περίπτωση των ζυμώσεων από μικτές καλλιέργειες στους 20 °C. Το ενεργό βαλερικό οξύ (άρωμα τυριού, πικράδας, όξινο) δεν ανιχνεύεται στις ζυμώσεις από καθαρή καλλιέργεια του ζυμομύκητα. Στην περίπτωση του εξανοϊκού οξέος (άρωμα τυριού, κεριού, τράγου) εμφανίζει μεγαλύτερη συγκέντρωση στην ζύμωση των 13 °C αναλογίας 1:1. Δεν ανιχνεύεται στη θερμοκρασία 13 °C στη ζύμωση από καθαρή καλλιέργεια. Για το οκτανοϊκό οξύ (άρωμα ταγγού) παρατηρούνται οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ανάμεσα στις ενώσεις, με τις μεγαλύτερες τιμές να είναι της ζύμωσης αναλογίας 1:10 στους 13 °C και σε εκείνης που έγινε μόνο από τη ζύμη *Metschnikowia pulcherrima* στην ίδια θερμοκρασία. Τη μεγαλύτερη συγκέντρωση στο δεκανοϊκό οξύ (άρωμα ιδρώτα και κατσίκας) βρίσκουμε στη ζύμωση από καθαρή καλλιέργεια στους 13 °C ενώ στους 20 °C δεν εντοπίζεται. Το δωδεκανοϊκό οξύ (άρωμα σαπουνιού και ελαίου δάφνης) ανιχνεύθηκε μόνο στην περίπτωση της αναλογίας 1:1 του 13 °C. Όσον αφορά το εξαδεκανοϊκό οξύ (άρωμα λιπαρό και ελαφρώς κερώδες), μεγαλύτερες συγκεντρώσεις έχει η αναλογία ζυμωσης 1:10 και στις δύο θερμοκρασίες, με μεγαλύτερη στην θερμοκρασία των 20 °C. Δεν ανιχνεύεται στις ζυμώσεις από καθαρές καλλιέργειες.

Πίνακας 6: Συγκριτικός πίνακας των εστέρων που παράχθηκαν στην κάθε μπίρα κατά την πρώτη εβδομάδα από την ημέρα εμφιάλωσης.

COMPOUNDS	Συγκέντρωση (mg/L)					
	13 °C - 1:1	13 °C - 1:10	20 °C - 1:1	20 °C - 1:10	13 °C 100%mp	20 °C 100%mp
Isoamyl acetate	0.04 ± 0.03	0.02 ± 0.00	0.04 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.12 ± 0.03	0.02 ± 0.02
Hexanoic acid ethyl ester (Ethyl caproate)	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.00	0.05 ± 0.01	0.03 ± 0.00	0.18 ± 0.03	ND
Octanoic acid ethyl ester (Ethyl caprylate)	0.24 ± 0.07	0.30 ± 0.06	0.26 ± 0.08	0.11 ± 0.15	0.30 ± 0.15	ND
Phenyl ethyl acetate (Acetic acid, 2-phenylethyl ester)	0.06 ± 0.02	0.04 ± 0.00	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.02	0.06 ± 0.00	0.02 ± 0.03
Decanoic acid ethyl ester (Ethyl caprate)	0.11 ± 0.05	0.07 ± 0.04	0.07 ± 0.02	0.06 ± 0.02	0.14 ± 0.02	0.09 ± 0.07

Dodecanoic acid ethyl ester (Ethyl laurate)	0.18 ± 0.04	ND	0.06 ± 0.02	ND	0.03 ± 0.04	ND
1H-Indole-3-ethanol, acetate (ester)	0.26 ± 0.03	0.25 ± 0.02	ND	ND	ND	ND
Ethyl butyrate	ND	ND	ND	ND	0.04 ± 0.02	ND
Palmitic acid ethyl ester (Ethyl palmitate)	ND	ND	ND	ND	ND	0.16 ± 0.02
Ethyl oleate	ND	ND	ND	ND	ND	0.37 ± 0.23

* ND= NOT DETECTED

Σε παρόμοιες τιμές σε όλες τις ζυμώσεις, με μεγαλύτερη τιμή στη ζύμωση των 13 °C μόνο από *Metschnikowia pulcherrima* εμφανίζεται ο οξεικός ισοαμλεστέρας (άρωμα μπανάνας και αχλαδιού). Ο εξανοϊκός αιθυλεστέρας (άρωμα ανανά) δεν ανιχνεύεται στη ζύμωση από καθαρή καλλιέργεια *Metschnikowia pulcherrima* στους 20 °C ενώ στους 13 °C βρίσκεται η μεγαλύτερη συγκεντρωση του. Ο αιθυλεστέρας οκτανοϊκού οξέος (άρωμα από άνθη και φρούτα) βρίσκεται σε μικρότερη συγκέντρωση στην αναλογία 1:10 στους 20 °C ζύμωσης. Δεν ανιχνεύεται όμως στους 20 °C ζύμωσης από την καθαρή καλλιέργεια. Στην περίπτωση του οξικού αιθυλεστέρα (άρωμα μπανάνας, μήλου, μελιού) και του αιθυλεστέρα δεκανοϊκού οξέος (άρωμα κεριού) παρατηρούμε παρόμοιες τιμές στις ζυμώσεις. Ο αιθυλεστέρας δωδεκανοϊκού οξέος (άρωμα καθαρο, σαπουνιού, κεριού, γλυκό, λουλουδιών) ανιχνεύεται μόνο στην αναλογία 1:1 στις διάφορες θερμοκρασίες ζύμωσης (13 °C και 20 °C) και από τις καθαρές καλλιέργειες βρίσκεται μόνο στη ζύμωση στους 13 °C. Η 1H-Indole-3-ethanol, acetate (ester) (άρωμα ζωικό και κοπριάς) ανιχνεύεται μόνο στις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν στους 13 °C (αναλογία 1:1 και 1:10). Όσον αφορά τις καθαρές καλλιέργειες του ζυμομύκητα *Metschnikowia pulcherrima* ανιχνεύθηκαν και οι ενώσεις Palmitic acid ethyl ester (Ethyl palmitate) και Ethyl oleate στη θερμοκρασία ζύμωσης 20 °C.

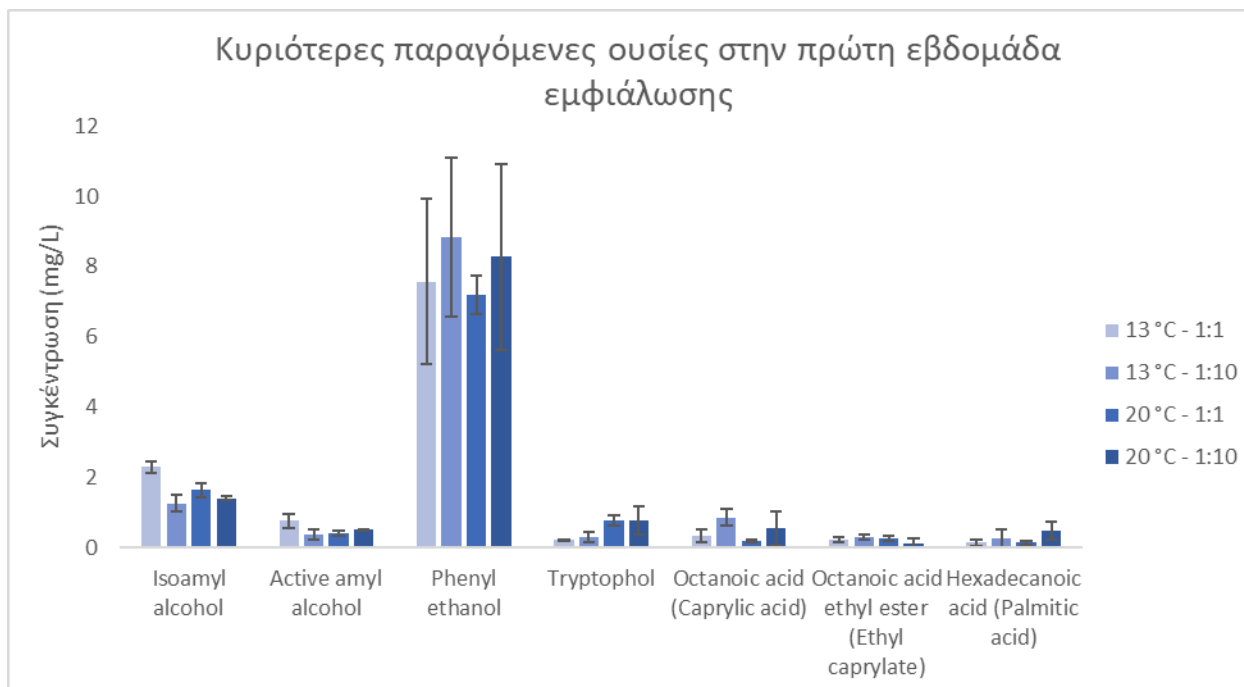
Πίνακας 7: Συγκριτικός πίνακας των λοιπών αρωματικών ενώσεων που παράχθηκαν στην κάθε μπίρα κατά την πρώτη εβδομάδα από την ημέρα εμφιάλωσης.

COMPOUNDS	Συγκέντρωση (mg/L)					
	13 °C - 1:1	13 °C - 1:10	20 °C - 1:1	20 °C - 1:10	13 °C 100%mp	20 °C 100%mp
Isopropyl disulfide	0.06 ± 0.02	0.02 ± 0.00	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.01	ND	ND
2-methoxy-4-vinylphenol	ND	ND	ND	ND	0.09 ± 0.00	ND
Disulfide, isopropyl propyl	ND	ND	ND	ND	0.06 ± 0.02	ND
Disulfide dimethyl	ND	ND	ND	ND	ND	0.02 ± 0.02
Methyl ethyl	ND	ND	ND	ND	ND	0.06 ±

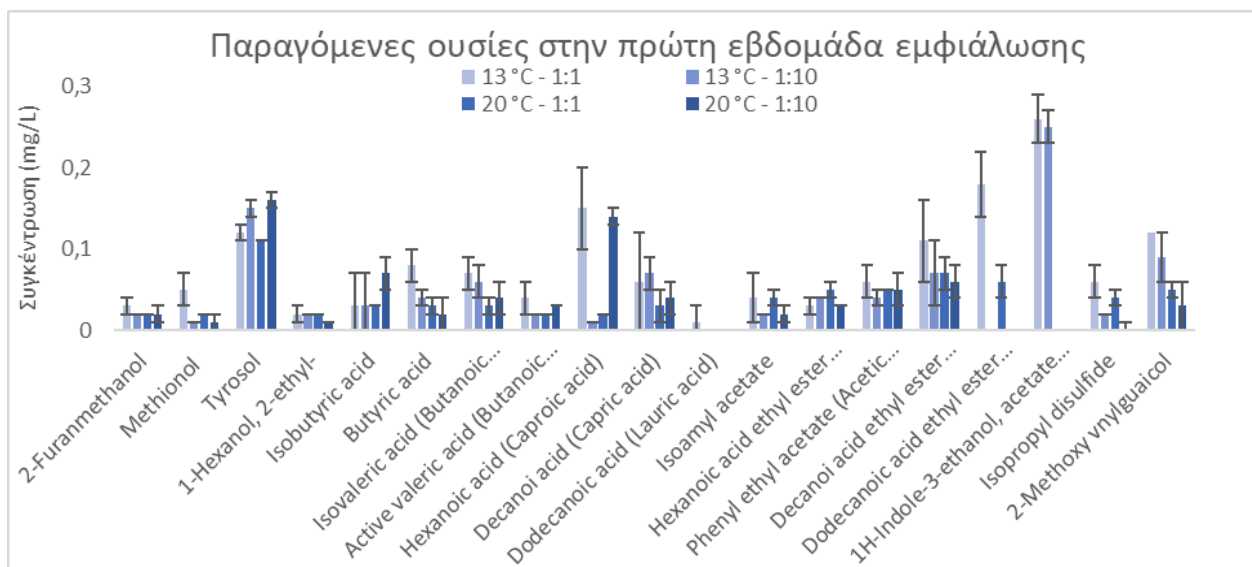
disulfide						0.01
p-Xylene	ND	ND	ND	ND	ND	0.06 ± 0.01
4-Vinylguaiacol	ND	ND	ND	ND	ND	0.42 ± 0.05
Caryophyllene	ND	ND	ND	ND	ND	0.01 ± 0.01
Humulene	ND	ND	ND	ND	ND	0.23 ± 0.03
Isohumulone	ND	ND	ND	ND	ND	1.26 ± 0.48
Lupulon	ND	ND	ND	ND	ND	0.90 ± 0.18
2-Methoxy vinylguaiacol	0.12 ± 0.05	0.09 ± 0.03	0.05 ± 0.01	0.08 ± 0.03	ND	ND

* ND= NOT DETECTED

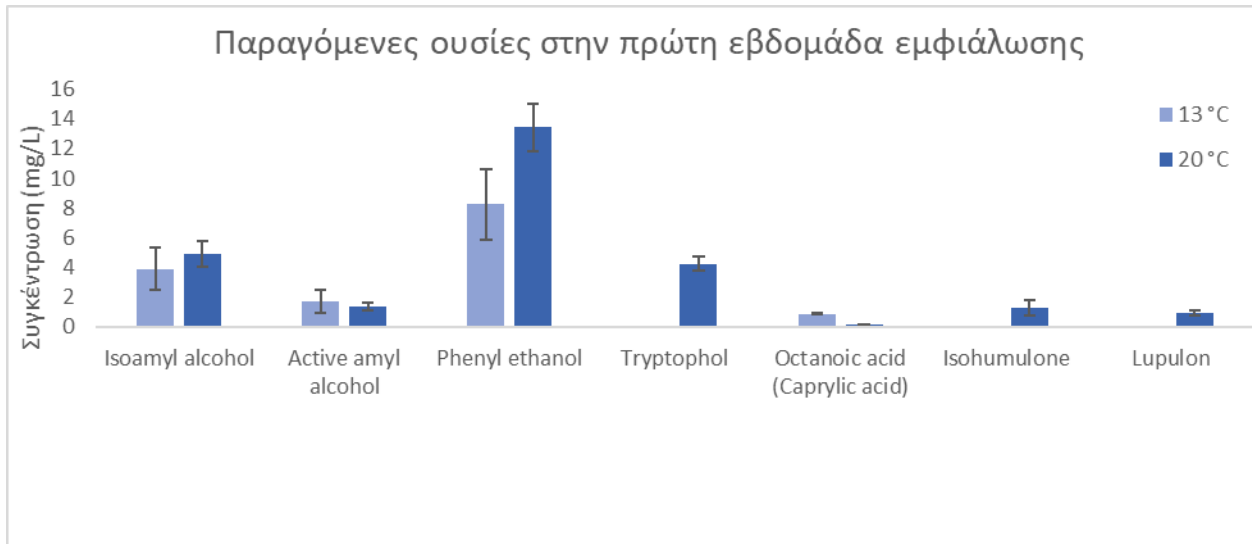
Παρατηρούμε τη μεγαλύτερη συγκέντρωση για το ισοπρότυλο δισουλφίδιο (άρωμα κρεμμυδιού, λάχανου, κρέατος και θειικό) στους 13 °C στην αναλογία ζύμωσης 1:1. Μεγαλύτερες συγκεντρώσεις 2-μέθοξυ-βινυλ-γουαϊκόλης (άρωμα καμμένου και φαρμάκου) έχουν οι ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν με αναλογία ζυμομυκήτων 1:10. Όσον αφορά τις καθαρές καλλιέργειες του ζυμομύκητα *Metschnikowia pulcherrima* στους 13 °C ανιχνεύθηκαν οι ουσίες 2-methoxy-4-vinylphenol και Disulfide, isopropyl propyl ενώ στους 20 °C ανιχνεύθηκαν οι Disulfide dimethyl, Methyl ethyl disulfide, p-Xylene, Diethyl disulfide, γ-Undecalactone, Caryophyllene, Humulene, Isohumulone, Lupulon



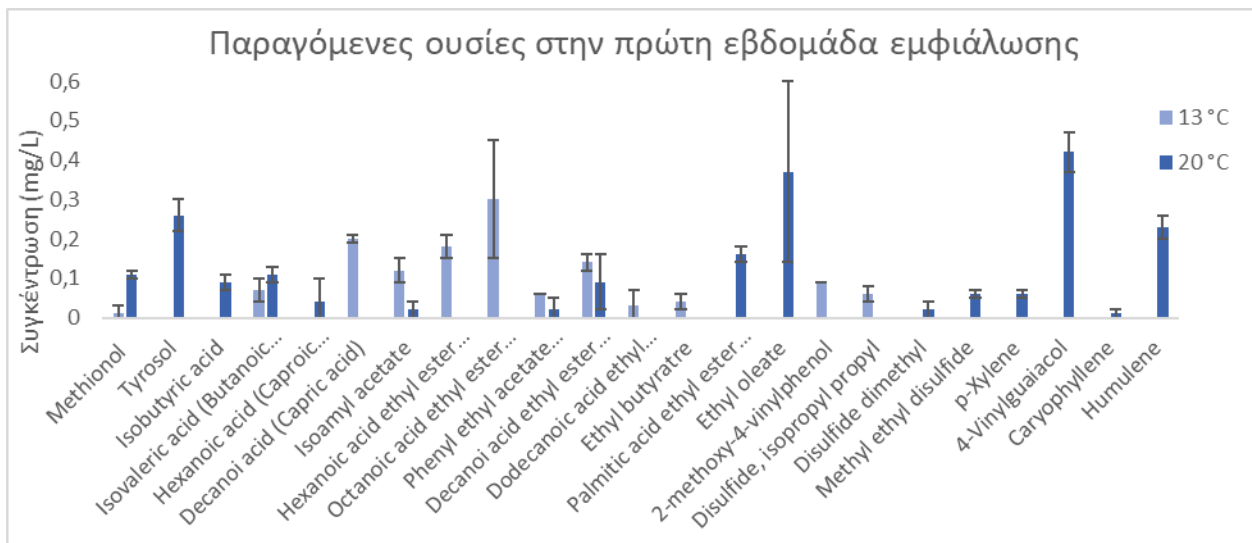
Διάγραμμα 22: Παραγόμενες αρωματικές ενώσεις κατά τη διάρκεια της πρώτης εβδομάδας από την εμφιάλωση στις μπύρες διαφορετικών αναλογιών ζυμομυκήτων και θερμοκρασιών ζύμωσης.



Διάγραμμα 23: Παραγόμενες αρωματικές ενώσεις κατά τη διάρκεια της πρώτης εβδομάδας από την εμφιάλωση στις μπύρες διαφορετικών αναλογιών ζυμομυκήτων και θερμοκρασιών ζύμωσης.



Διάγραμμα 24 : Παραγόμενες αρωματικές ενώσεις κατά τη διάρκεια της πρώτης εβδομάδας από την εμφιάλωση στις μπύρες καθαρής καλλιέργειας *Metschnikowia pulcherrima*.



Διάγραμμα 25 : Παραγόμενες αρωματικές ενώσεις κατά τη διάρκεια της πρώτης εβδομάδας από την εμφιάλωση στις μπύρες καθαρής καλλιέργειας *Metschnikowia pulcherrima*.

Στους πίνακες που ακολουθούν παρουσιάζονται συγκριτικά οι ουσίες που παράχθηκαν στις μπίρες κατά τη διάρκεια του πρώτου μήνα παλαίωσης για την εκάστοτε ζύμωση, χωρισμένες σε κατηγορίες ενώσεων.

Πίνακας 8: Συγκριτικός πίνακας των αλκοολών που παράχθηκαν από την κάθε ζύμωση κατά τον πρώτο μήνα παλαίωσης.

COMPOUNDS	Συγκέντρωση (mg/L)			
	13 °C - 1:1	13 °C - 1:10	20 °C - 1:1	20 °C - 1:10
Isoamyl alcohol	1.89 ± 0.67	9.64 ± 3.03	1.25 ± 0.51	1.78 ± 0.00
Active amyl alcohol	0.76 ± 0.29	0.46 ± 0.66	0.47 ± 0.28	0.83 ± 0.10
2-Furanmethanol	0.07 ± 0.04	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.05 ± 0.02
Methionol (1-Propanol, 3-(methyl)-)	0.02 ± 0.01	0.04 ± 0.00	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.00
Tyrosol	0.20 ± 0.05	1.48 ± 0.76	0.23 ± 0.04	0.08 ± 0.05
Phenyl ethanol	8.05 ± 2.00	11.23 ± 2.15	7.47 ± 2.22	11.59 ± 0.69
Tryptophol	ND	0.16 ± 0.00	0.88 ± 0.29	0.53 ± 0.23
1-Hexanol, 2-ethyl-	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.03 ± 0.01

* ND= NOT DETECTED

Στα αποτελέσματα της ισοαμυλικής αλκοόλης (αρώματα ζυμέλαιου, μπανάνας, αλκοολούχου ποτού) η μόνη ζύμωση με συγκέντρωση που ξεπερνάει το όριο ανίχνευσης είναι εκείνη που ζυμώθηκε στους 13 °C σε αναλογία μικροοργανισμών 1:10. Οι υπόλοιπες ζυμώσεις έχουν αρκετά μικρότερες συγκεντρώσεις. Στην ενεργή αμυλική αλκοόλη (αρώματα γλυκού αλκοολούχου ποτού) παρατηρούμε παρόμοιες συγκεντρώσεις σε όλες τις ζυμώσεις με την μεγαλύτερη της ζύμωσης 1:10 σε θερμοκρασία 20 °C. Για την 2-Furanmethanol (αρώματα γλυκού, καραμέλας, ψωμιού, καφέ, του μπαγιάτικου, καθώς και χημικών και του αλκοόλ) μεγαλύτερη συγκέντρωση έχει η ζύμωση 1:1 στους 13 °C. Η μεθιονόλη (αρώματα κρέατος) και η 1-Hexanol, 2-ethyl- (αρώματα γλυκά, ελαιώδη, φρέσκα, εσπεριδοειδών και ανθέων) βρίσκονται σε παρόμοιες συγκεντρώσεις σε όλες τις ζύμες. Τη μεγαλύτερη συγκέντρωση σε τυροσόλη (άρωμα λιπαρό και κερώδες, δυσάρεστη ταγγισμένη οσμή) κατέχει η αναλογία 1:10 στους 13 °C και την εμφανώς μικρότερη η ζύμωση αναλογίας 1:10 στους 20 °C. Για τη φαινυλαιθυλική αλκοόλη (αρώματα γαρδένιας και υακίνθου) τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις παρατηρούμε στις ζυμώσεις αναλογίας 1:10 (13 °C και 20 °C). Η τρυπτοφόλη (αρώματα αμυγδαλού και φρούτων) εμφανίζεται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στις ζυμώσεις στους 20 °C (αναλογία 1:1 και 1:10), δεν ανιχνεύεται στη ζύμωση 1:1 στους 13 °C.

Πίνακας 9: Συγκριτικός πίνακας των οξέων που παράχθηκαν στην κάθε μπίρα κατά τον πρώτο μήνα παλαίωσης.

COMPOUNDS	Συγκέντρωση (mg/L)			
	13 °C - 1:1	13 °C - 1:10	20 °C - 1:1	20 °C - 1:10
Isobutyric acid	0.06 ± 0.03	0.07 ± 0.07	0.04 ± 0.05	0.04 ± 0.01
Butyric acid	0.04 ± 0.00	0.08 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.04 ± 0.02
Isovaleric acid (Butanoic acid, 3-methyl)	0.03 ± 0.04	0.07 ± 0.00	0.05 ± 0.02	0.05 ± 0.01

Active valeric acid (Butanoic acid, 2-methyl)	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.00	0.02 ± 0.03	0.06 ± 0.03
Hexanoic acid (Caproic acid)	0.22 ± 0.06	0.22 ± 0.05	0.15 ± 0.02	0.20 ± 0.01
Octanoic acid (Caprylic acid)	0.39 ± 0.20	2.56 ± 1.89	0.41 ± 0.10	0.51 ± 0.12
Decanoic acid (Capric acid)	0.01 ± 0.01	ND	0.01 ± 0.01	0.04 ± 0.01
Dodecanoic acid (Lauric acid)	ND	ND	ND	ND
Hexadecanoic acid (Palmitic acid)	0.25 ± 0.03	ND	0.12 ± 0.01	0.17 ± 0.04

* ND= NOT DETECTED

Το ισοβουτυρικό οξύ (άρωμα φράουλας και γλυκού) δίνεται σε παρόμοιες συγκεντρώσεις (κατώτερες του ορίου ανίχνευσης) με μεγαλύτερη εκείνη της αναλογίας 1:10 στους 13 °C. Το βουτυρικό οξύ (άρωμα ανανά, κεράσι, blue cheese) παρατηρείται σε παρόμοιες συγκεντρώσεις (κατώτερες του ορίου ανίχνευσης) με μεγαλύτερες των ζυμώσεων 1:10 στους 13 °C και 1:1 στους 20 °C. Για το ισοβαλερικό οξύ (άρωμα τυριού, πικάντικου, όξινο και λιπαρό) παρατηρούμε ίδιες συγκεντρώσεις στις ζυμώσεις των 20 °C, στους 13 °C μεγαλύτερη είναι της αναλογίας 1:10 και μικρότερη της 1:1. Στο ενεργό βαλερικό οξύ (άρωμα τυριού, πικράδας, όξινο) υπάρχουν ίδιες συγκεντρώσεις στους 13 °C, στους 20 °C η μεγαλύτερη βρίσκεται στην αναλογία 1:10 και μικρότερη στην 1:1. Το εξανοϊκό οξύ (άρωμα τυριού, κεριού, τράγου) ανιχνεύεται σε παρόμοιες συγκεντρώσεις, με την ζύμωση 1:1 στους 20 °C να έχει τη μικρότερη. Μεγαλύτερη συγκέντρωση οκτανοϊκό οξέος (άρωμα ταγγού) παρατηρείται στη ζύμωση αναλογίας 1:10 στους 13 °C. Για το δεκανοϊκό οξύ (άρωμα ιδρώτα και κασίκας) παρατηρούμε παρόμοιες τιμές στις ζυμώσεις. Όσον αφορά το δωδεκανοϊκό οξύ (άρωμα σαπουνιού και ελαίου δάφνης), δεν ανιχνεύεται στις μετρήσεις δείγματος των διαφορετικών ζυμώσεων κατά τον ένα μήνα παλαίωσης. Τέλος το εξαδεκανοϊκό οξύ (άρωμα λιπαρό και ελαφρώς κερώδες) μεγαλύτερη συγκέντρωση έχει η αναλογία ζυμωσης 1:1 σε θερμοκρασία 13 °C. Για την ίδια θερμοκρασία, αλλά αναλογία 1:10, δεν ανιχνεύεται.

Πίνακας 10: Συγκριτικός πίνακας των εστέρων που παράχθηκαν στην κάθε μπίρα κατά τον πρώτο μήνα παλαίωσης.

COMPOUNDS	Συγκέντρωση (mg/L)			
	13 °C - 1:1	13 °C - 1:10	20 °C - 1:1	20 °C - 1:10
Isoamyl acetate	0.04 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.04 ± 0.02	0.06 ± 0.03
Hexanoic acid ethyl ester (Ethyl caproate)	0.04 ± 0.01	0.02 ± 0.02	0.02 ± 0.03	0.03 ± 0.01
Octanoic acid ethyl ester (Ethyl caprylate)	0.45 ± 0.39	1.83 ± 1.09	0.10 ± 0.14	0.30 ± 0.03
Phenyl ethyl acetate (Acetic acid, 2-phenylethyl ester)	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.04 ± 0.02	0.07 ± 0.01
Decanoic acid ethyl	ND	ND	ND	0.03 ± 0.02

ester (Ethyl caprate)				
Dodecanoic acid ethyl ester (Ethyl laurate)	ND	ND	ND	0.03 ± 0.04
1H-Indole-3-ethanol, acetate (ester)	ND	ND	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.02

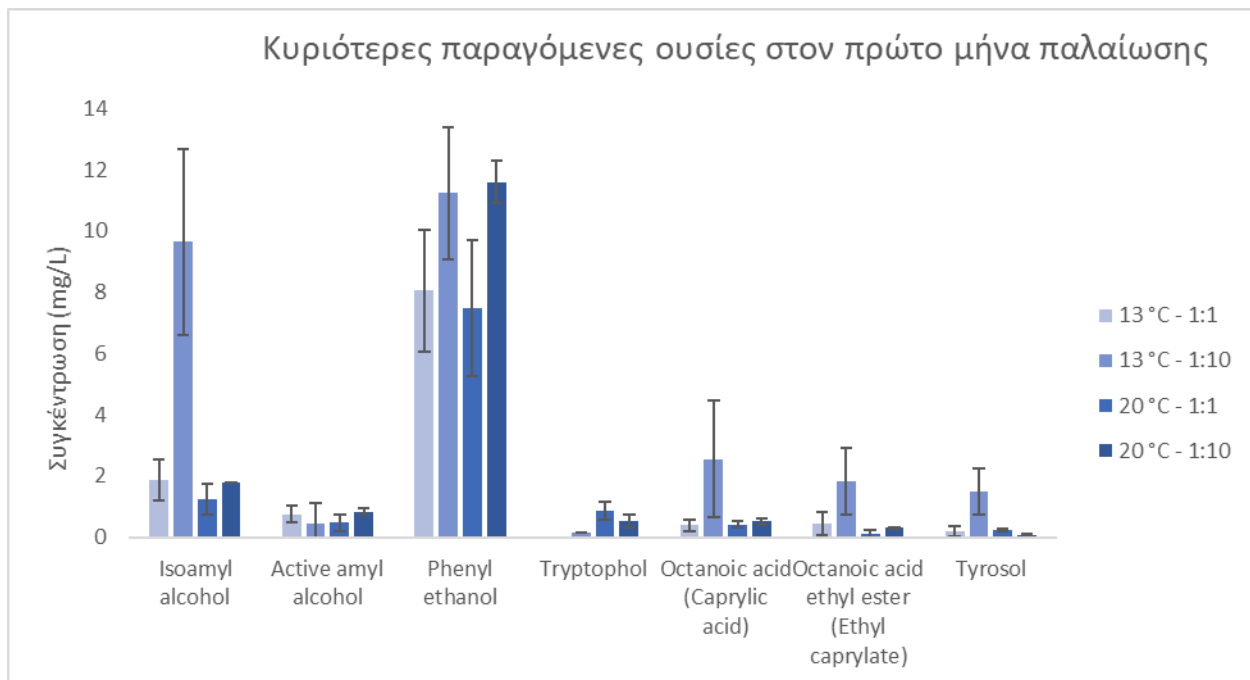
* ND= NOT DETECTED

Για τον οξικό ισοαμλεστέρα (άρωμα μπανάνας και αχλαδιού) βλέπουμε ίδιες τιμές για τις ζυμώσεις αναλογίας 1:1 και τους 13 °C και στους 20 °C. Όσον αφορά την αναλογία 1:10 η μεγαλύτερη τιμή ανιχνεύεται στους 20 °C και η μικρότερη στους 13 °C. Ο εξανοϊκός αιθυλεστέρας (άρωμα ανανά) βρίσκεται σε παρόμοιες συγκεντρώσεις σε όλες τις ζυμώσεις. Ο αιθυλεστέρας οκτανοϊκού οξέος (άρωμα από άνθη και φρούτα) παρουσιάζει μεγάλες τιμές στις συγκεντρώσεις του εστέρα αυτού. Η μεγαλύτερη είναι στη αναλογία 1:10 στους 13 °C και η μικρότερη στη 1:1 στους 20 °C. Ο οξικός αιθυλεστέρας (άρωμα μπανάνας, μήλου, μελιού) έχει μεγαλύτερη συγκέντρωση στη ζύμωση στους 20 °C αναλογίας 1:10, οι υπόλοιπες ζυμώσεις έχουν σχετικά παρόμοιες τιμές. Στην περίπτωση του αιθυλεστέρα δεκανοϊκού οξέος (άρωμα κεριού) και του αιθυλεστέρα δωδεκανοϊκού οξέος (άρωμα καθαρο, σαπουνιού, κεριού, γλυκό, λουλουδιών), ανιχνεύονται μόνο στη ζύμωση αναλογίας 1:10 σε θερμοκρασία 20 °C. Η 1H-Indole-3-ethanol, acetate (ester) (άρωμα ζωικό και κοπριάς) ανιχνεύεται, με ίδια συγκέντρωση, στις διαφορετικές αναλογίες ζυμομυκήτων στους 20 °C.

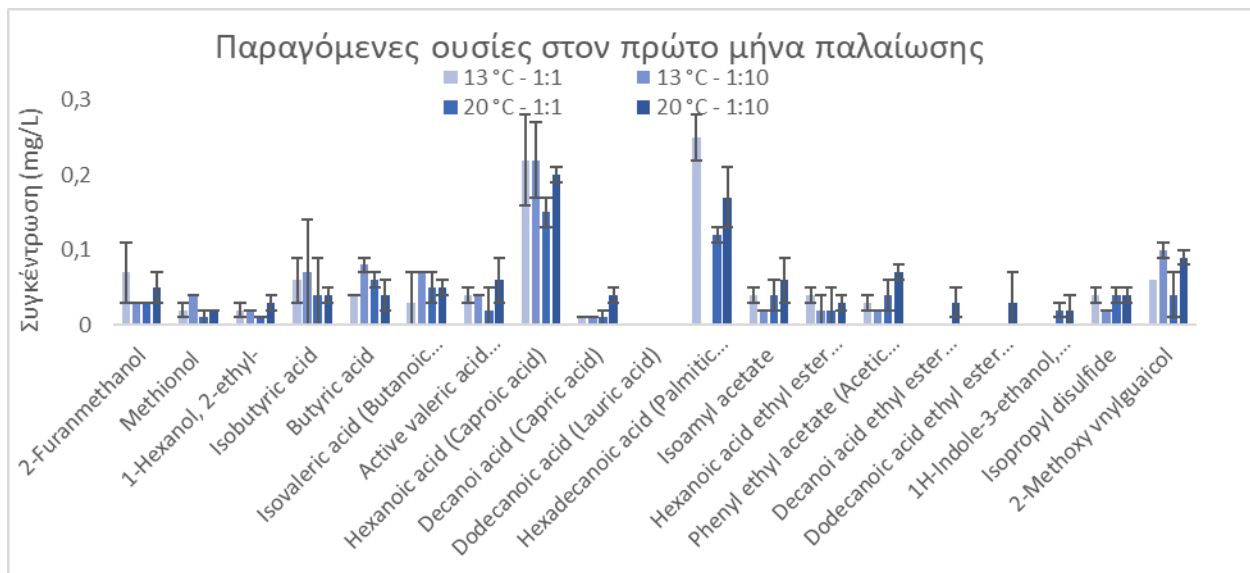
Πίνακας 11: Συγκριτικός πίνακας των λοιπών αρωματικών ενώσεων που παράχθηκαν στην κάθε μπίρα κατά τον πρώτο μήνα παλαίωσης.

COMPOUNDS	Συγκέντρωση (mg/L)			
	13 °C - 1:1	13 °C - 1:10	20 °C - 1:1	20 °C - 1:10
Isopropyl disulfide	0.04 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01
2-Methoxy vinylguaiacol	0.06 ± 0.02	0.10 ± 0.01	0.04 ± 0.03	0.09 ± 0.01

Το ισοπρόπυλο δισουλφίδιο (άρωμα κρεμμυδιού, λάχανου, κρέατος και θειικό) εμφανίζεται σε ίδιες συγκεντρώσεις σε όλες τις ζυμώσεις εκτός εκείνης που πραγματοποιήθηκε στους 13 °C σε αναλογία 1:10. Για τη 2-μέθοξυ-βινυλ-γουαϊκόλη (άρωμα καμμένου και φαρμάκου), η μικρότερη τιμή ανιχνεύεται στη ζύμωση 1:1 στους 20 °C και η μεγαλύτερη στη ζύμωση 1:10 στους 13 °C.



Διάγραμμα 26: Παραγόμενες αρωματικές ενώσεις κατά τη διάρκεια του πρώτου μήνα παλαίωσης στις μπίρες διαφορετικών αναλογιών ζυμομυκήτων και θερμοκρασιών ζύμωσης.



Διάγραμμα 27: Παραγόμενες αρωματικές ενώσεις κατά τη διάρκεια του πρώτου μήνα παλαίωσης στις μπίρες διαφορετικών αναλογιών ζυμομυκήτων και θερμοκρασιών ζύμωσης.

ΣΥΝΟΛΙΚΑ:

Συνολικά από όλες τις ζυμώσεις παρήχθησαν σε μεγαλύτερες ποσότητες η ισοαμυλική αλκοόλη, η ενεργή αμυλική αλκοόλη, η φαινυλαιθυλική αλκοόλη και η τρυπτοφόλη. Συγκεκριμένα για την ισοαμυλική αλκοόλη οι μεγαλύτερες τιμές (μεταξύ των ζυμώσεων για τα δείγματα από την πρώτη εβδομάδα μετά την εμφιάλωση) παρουσιάζονται στη ζύμωση που έγινε στους 13 °C σε αναλογία μικροοργανισμών 1:1. Στην περίπτωση των ζυμώσεων από καθαρές καλλιέργειες *Metschnikowia pulcherrima* εκείνη που πραγματοποιήθηκε στους 20 °C είχε συγκέντρωση μεγαλύτερη (συγκριτικά με όλες τις ζυμώσεις). Το ίδιο ισχύει και στην περίπτωση τη ενεργής αμυλικής αλκοόλης, αλλά στη θερμοκρασία των 13 °C. Η ζύμωση από καθαρή καλλιέργεια *Metschnikowia pulcherrima* σε θερμοκρασία 20 °C έδωσε τις μεγαλύτερες τιμές για τις συγκεντρώσεις της φαινυλαιθυλικής αλκοόλης και της τρυπτοφόλης. Όσον αφορά τα αποτελέσματα των δειγμάτων από τον ένα μήνα παλαίωσης, η μπίρα που ζυμώθηκε στους 13 °C σε αναλογία 1:10 έδωσε τη μεγαλύτερη τιμή για την ισοαμυλική αλκοόλη. Γενικότερα η φαινυλαιθυλική αλκοόλη δίνει τα μεγαλύτερα αποτελέσματα μεταξύ των δειγμάτων (μιας εβδομάδας από την εμφιάλωση και ενός μήνα παλαίωσης) στην περίπτωση της αναλογίας όπου ο ζυμομύκητας *Metschnikowia pulcherrima* βρίσκεται σε μεγαλύτερη αναλογία από τον *Saccharomyces cerevisiae* (αναλογία 1:10) και στην περίπτωση των 13 °C και των 20 °C.

Η παραγωγή οξέων στα δύο πειράματα βρέθηκε αρκετά χαμηλή. Συγκεκριμένα και στις δύο περιπτώσεις ανιχνεύθηκε ένας σημαντικός αριθμός οξέων αλλά σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις.

Το οκτανοϊκό οξύ βρέθηκε σε μεγαλύτερη περιεκτικότητα (όσον αφορά τα δείγματα που λήφθηκαν στην πρώτη εβδομάδα από την εμφιάλωση) στην περίπτωση ζύμωσης στους 20 °C σε αναλογία 1:10 αλλά και στη περίπτωση της μονοκαλλιέργειας. Στα δείγματα από τον ένα μήνα παλαίωσης η μεγαλύτερη συγκέντρωση ανιχνεύθηκε, και εδώ, στη ζύμωση αναλογίας 1:10 στους 20 °C.

Για την ίδια αναλογία (1:10) και για τις δύο θερμοκρασίες όμως (13 °C και 20 °C) ο εστέρας με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση φάνηκε να είναι ο αιθυλεστέρας οκτανοϊκού οξέος τόσο ανάμεσα στα δείγματα από την πρώτη εβδομάδα μετά την εμφιάλωση, όσο ανάμεσα και σε αυτά της παλαίωσης ενός μήνα.

Το αρωματικό προφίλ που διαμορφώνει ο μύκητας *Metschnikowia pulcherrima* συμπληρώνεται από έντονα πικρικά και φυτικά αρώματα που προκύπτουν από τον λυκίσκο και συγκεκριμένα από τις ουσίες ισοχουμουλόνη και λουλουπόνη αλλά και από αρώματα σιταριού που προέρχονται από την ένωση 2-μέθοξυ-4-βινυλοφαινόλη. Ακόμη ο μη συμβατικός αυτός ζυμομύκητας έχει την δυνατότητα να μετατρέπει τις μονοτερπινικές αλκοόλες του λυκίσκου σε α-τερπινεόλη, γερανιόλη και νερόλη (Padilla et al., 2016). Παρόλο που στην εν λόγω εργασία δεν υπήρχε η δυνατότητα μετρήσεις των ουσιών αυτών, μια τέτοια μελέτη θα παρουσίαζε ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Όπως έχει ήδη αναφερθεί δεν υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές για την χρήση της *Metschnikowia pulcherrima* για την παραγωγή μπίρας, το αρωματικό προφίλ όμως που προκύπτει μετά την ανάλυση αέριας χρωματογραφίας στις παραγόμενες μπίρες δείχνει ότι η ζύμη αυτή έχει τη δυνατότητα να διαμορφώσει ένα ιδιαίτερο και πολύπλοκο αρωματικό προφίλ. Η χρήση της *Metschnikowia pulcherrima* στην παραγωγή κρασίου σε μικτές καλλιέργειες σε συνδυασμό με τον *Saccharomyces cerevisiae*, σε διαδοχικές ζυμώσεις με τον *Saccharomyces cerevisiae* αλλά και σε καθαρές ζυμώσεις με διάφορα στελέχη του εν λόγω ζυμομύκητα, έδωσαν αποτελέσματα θετικά βελτιώνοντας το αρωματικό προφίλ των παραγόμενων κρασιών.

Σε πείραμα που έγινε από τους Ruiz et al. (2018), για το πως επηρεάζει ο ζυμομύκητας *Metschnikowia pulcherrima* τις πτητικές ενώσεις λευκών κρασιών ποικιλίας Verdejo, αποδείχθηκε η βελτίωση του αρωματικού προφίλ των παραγόμενων κρασιών. Τα

αποτελέσματα έδειξαν ότι στις ζυμώσεις που χρησιμοποιήθηκε ο μη συμβατικός ζυμομύκητας *Metschnikowia pulcherrima* οι ανώτερες αλκοόλες υπάρχουν σε μικρότερη ποσότητα εκτός από την περίπτωση της φαινυλαιθυλικής αλκοόλης. Ίδια αποτελέσματα αναφέρθηκαν και από τους Varela et al. (2016) σε ζυμώσεις χρησιμοποιώντας σταφύλια ποικιλίας Shiraz. Οι Benito et al. (2015) σε προηγούμενες μελέτες τους έδειξαν επίσης ότι κρασιά που ζυμώθηκαν από το ζυμομύκητα *Metschnikowia pulcherrima* είχαν μειωμένη συγκέντρωση στο σύνολο των ανώτερων αλκοολών. Αναφορές για την ικανότητα της *Metschnikowia pulcherrima* να παράγει αξιοσημείωτες ποσότητες φαινυλαιθυλικής αλκοόλης έγιναν και από τους Clemente-Jiménez et al. (2004), τους Sadoudi et al. (2012), τους Escribano et al. (2018) καθώς και από τους Ivit and Kemp (2018). Από την άλλη, οι Sadoudi et al. (2012), παρατήρησαν αύξηση της ποσότητας των ανωτέρων αλκοολών σε ζυμώσεις από μικτές καλλιέργειες της *Metschnikowia pulcherrima* σε συνδυασμό με τον *Saccharomyces cerevisiae*. Τα αποτελέσματα αυτά δεν παρατηρήθηκαν όμως στις ζυμώσεις από καθαρές καλλιέργειες του μη συμβατικού ζυμομύκητα αυτού.

Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν στα λιπαρά οξέα, συγκεκριμένα υπήρξε μικρή διαφορά στις συγκεντρώσεις των πτητικών λιπαρών οξέων, με τις μικρότερες τιμές να υπάρχουν στις ζυμώσεις με τον ζυμομύκητα *Metschnikowia pulcherrima*. Στην περίπτωση του οκτανοϊκού οξέος όμως, βλέπουμε αύξηση της συγκέντρωσης (Ruiz et al., 2018).

Στις ζυμώσεις στις οποίες χρησιμοποιήθηκε ο ζυμομύκητας *Metschnikowia pulcherrima* παρατηρήθηκε επίσης η χαμηλότερη συγκέντρωση των εστέρων εκτός του οξικού αιθυλεστέρα (Escribano et al., 2018; Ivit & Kemp (2018); Ruiz et al., 2018). Οι Benito et al. (2015) ανέφεραν ακόμη την αύξηση του αιθυλεστέρα οκτανοϊκού οξέος σε ζυμώσεις όπου συμμετείχε η *Metschnikowia pulcherrima*. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση του αιθυλεστέρα οκτανοϊκού οξέος έχει αναφερθεί επίσης και από έρευνες των Clemente-Jiménez et al. (2004) και των Lambrechts and Pretorius (2000).

Επιπλέον όταν ο ζυμομύκητας *Metschnikowia pulcherrima* χρησιμοποιήθηκε σε μικτές καλλιέργειες με τον *Saccharomyces cerevisiae* κατά τη διάρκεια της πρώτης ζύμωσης για την παραγωγή αφρώδους οίνου, τα αποτελέσματα έδειξαν διαφοροποιήσεις σε διάφορες πτητικές αρωματικές ενώσεις σε σχέση με κρασιά που ζυμώθηκαν μόνο από τον *Saccharomyces cerevisiae*. Η ισοαμυλική αλκοόλη είναι μια από τις ανώτερες αλκοόλες που βρέθηκε σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στη μικτή καλλιέργεια. Στη μικτή καλλιέργεια των ζυμομυκήτων που χρησιμοποιήθηκαν βρέθηκαν σε μικρότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με την καθαρή καλλιέργεια του *Saccharomyces cerevisiae* ενώσεις όπως η μεθιονόλη, ο αιθυλεστέρας οκτανοϊκού οξέος και ο αιθυλεστέρας δεκανοϊκού οξέος (Ivit & Kemp, 2018).

ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΣΕ ΒΑΘΟΣ ΧΡΟΝΟΥ ΑΝΑ ΖΥΜΩΣΗ:

Πίνακας 12: Συγκριτικός πίνακας των αλκοολών που παράχθηκαν στη μπίρα αναλογίας 1:1 (13 °C ζύμωσης) κατά την πρώτη εβδομάδα και τον πρώτο μήνα παλαίωσης.

COMPOUNDS	13 °C - 1:1	
	ΕΒΔΟΜΑΔΑ	ΜΗΝΑΣ
Isoamyl alcohol	2.29 ± 0.17	1.89 ± 0.67
Active amyl alcohol	0.76 ± 0.20	0.76 ± 0.29
2-Furanmethanol	0.03 ± 0.01	0.07 ± 0.04
Methionol (1-Propanol, 3-(methyl)-)	0.05 ± 0.02	0.02 ± 0.01
Tyrosol	0.12 ± 0.01	0.20 ± 0.05
Phenyl ethanol	7.57 ± 2.35	8.05 ± 2.00
Tryptophol	0.21 ± 0.02	ND
1-Hexanol, 2-ethyl-	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01

* ND= NOT DETECTED

Πίνακας 13: Συγκριτικός πίνακας των οξέων που παράχθηκαν στη μπίρα αναλογίας 1:1 (13 °C ζύμωσης) κατά την πρώτη εβδομάδα και τον πρώτο μήνα παλαίωσης.

COMPOUNDS	13 °C - 1:1	
	ΕΒΔΟΜΑΔΑ	ΜΗΝΑΣ
Isobutyric acid	0.03 ± 0.04	0.06 ± 0.03
Butyric acid	0.08 ± 0.02	0.04 ± 0.00
Isovaleric acid (Butanoic acid, 3-methyl)	0.07 ± 0.02	0.03 ± 0.04
Active valeric acid (Butanoic acid, 2-methyl)	0.04 ± 0.02	0.04 ± 0.01
Hexanoic acid (Caproic acid)	0.15 ± 0.05	0.22 ± 0.06
Octanoic acid (Caprylic acid)	0.34 ± 0.18	0.39 ± 0.20
Decanoic acid (Capric acid)	0.06 ± 0.06	0.01 ± 0.00
Dodecanoic acid (Lauric acid)	0.01 ± 0.02	ND
Hexadecanoic acid (Palmitic acid)	0.15 ± 0.09	0.25 ± 0.03

* ND= NOT DETECTED

Πίνακας 14: Συγκριτικός πίνακας των εστέρων που παράχθηκαν στη μπίρα αναλογίας 1:1 (13 °C ζύμωσης) κατά την πρώτη εβδομάδα και τον πρώτο μήνα παλαίωσης.

COMPOUNDS	13 °C - 1:1	
	ΕΒΔΟΜΑΔΑ	ΜΗΝΑΣ
Isoamyl acetate	0.04 ± 0.03	0.04 ± 0.01
Hexanoic acid ethyl ester (Ethyl caproate)	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.01
Octanoic acid ethyl ester (Ethyl caprylate)	0.24 ± 0.07	0.45 ± 0.39
Phenyl ethyl acetate (Acetic acid, 2-phenylethyl ester)	0.06 ± 0.02	0.03 ± 0.01
Decanoic acid ethyl ester (Ethyl caprate)	0.11 ± 0.05	ND
Dodecanoic acid ethyl ester (Ethyl laurate)	0.18 ± 0.04	ND
1H-Indole-3-ethanol, acetate (ester)	0.26 ± 0.03	ND

* ND= NOT DETECTED

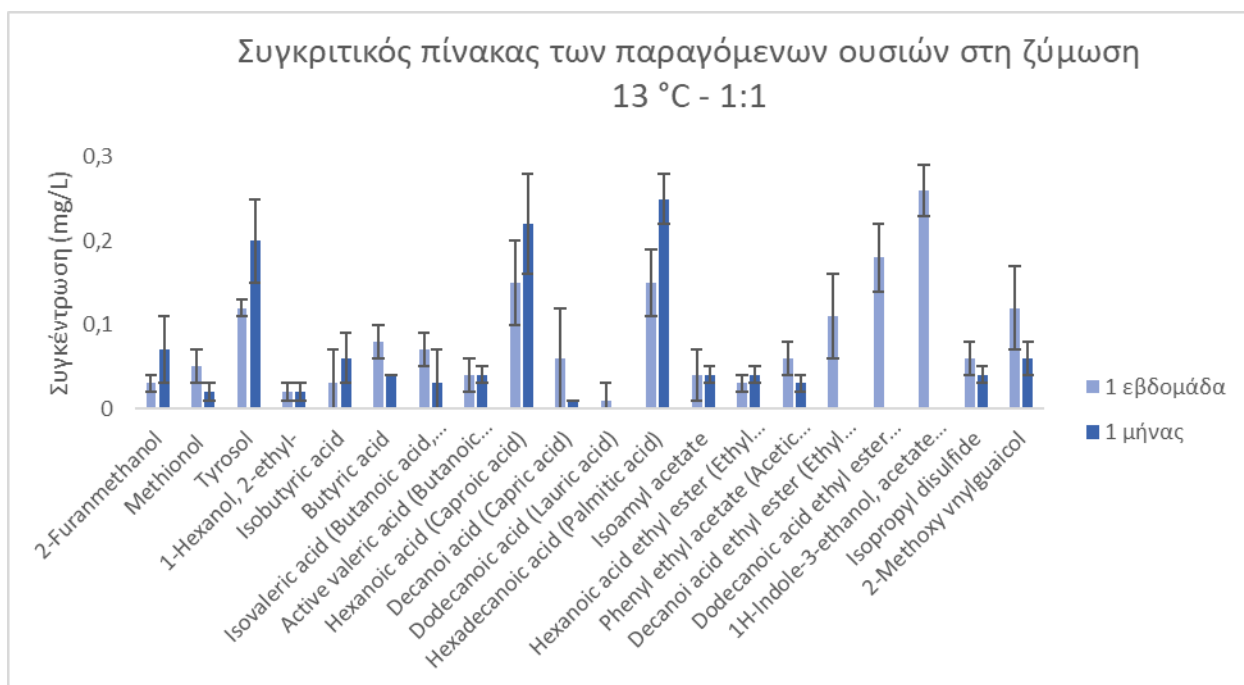
Πίνακας 15: Συγκριτικός πίνακας των λοιπών αρωματικών ενώσεων που παράχθηκαν στη μπίρα αναλογίας 1:1 (13 °C ζύμωσης) κατά την πρώτη εβδομάδα και τον πρώτο μήνα παλαίωσης.

COMPOUNDS	13 °C - 1:1	
	ΕΒΔΟΜΑΔΑ	ΜΗΝΑΣ
Isopropyl disulfide	0.06 ± 0.02	0.04 ± 0.01
2-Methoxy vinylguaicol	0.12 ± 0.05	0.06 ± 0.02

Τις μεγαλύτερες αλλαγές στις συγκεντρώσεις παρατηρούμε στην περίπτωση της ισοαμυλικής αλκοόλης (μείωση), της τυροσόλης (αύξηση), της φαινυλαιθυλικής αλκοόλης (αύξηση) και της τρυπτοφόλης η οποία στον ένα μήνα παλαίωσης δεν ανιχνεύεται πλέον. Οι συγκεντρώσεις των υπόλοιπων ενώσεων είτε δεν άλλαξαν είτε μεταβλήθηκαν ελάχιστα. Όσον αφορά τα οξέα, δεν παρατηρούνται μεγάλες μεταβολές στις συγκεντρώσεις. Στην περίπτωση του εξαδεκανοϊκού και εξανοϊκού οξέος βλέπουμε μια σχετικά μεγαλύτερη αύξηση και στην περίπτωση του δωδεκανοϊκού οξέος δεν ανιχνεύεται μετά το πέρας του χρόνου. Εστέρες όπως ο αιθυλεστέρας δεκανοϊκού οξέος, το δωδεκανοϊκό αιθύλιο και η 1H-Indole-3-ethanol, acetate στον ένα μήνα παλαίωσης παύουν να ανιχνεύονται. Στον αιθυλεστέρα οκτανοϊκού οξέος παρατηρούμε αύξηση της συγκέντρωσης ενώ μείωση βλέπουμε στον οξικό αιθυλεστέρα. Μείωση της συγκέντρωσης επίσης παρατηρούμε στο ισοπρόπυλο δισουλφίδιο και στην 2-μέθοξυ-βινυλ-γουαϊκόλη.



Διάγραμμα 28: Συγκριτικό διάγραμμα των αρωματικών ενώσεων που παράχθηκαν στη μπύρα αναλογίας 1:1 (13 °C ζύμωσης) κατά την πρώτη εβδομάδα και τον πρώτο μήνα παλαίωσης.



Διάγραμμα 29: Συγκριτικό διάγραμμα των αρωματικών ενώσεων που παράχθηκαν στη μπύρα αναλογίας 1:1 (13 °C ζύμωσης) κατά την πρώτη εβδομάδα και τον πρώτο μήνα παλαίωσης.

Πίνακας 16: Συγκριτικός πίνακας των αλκοολών που παράχθηκαν στη μπίρα αναλογίας 1:10 (13 °C ζύμωσης) κατά την πρώτη εβδομάδα και τον πρώτο μήνα παλαίωσης.

COMPOUNDS	13 °C - 1:10	
	ΕΒΔΟΜΑΔΑ	ΜΗΝΑΣ
Isoamyl alcohol	1.26 ± 0.25	9.64 ± 3.03
Active amyl alcohol	0.37 ± 0.13	0.46 ± 0.66
2-Furanmethanol	0.02 ± 0.00	0.03 ± 0.00
Methionol (1-Propanol, 3-(methyl)-)	0.01 ± 0.00	0.04 ± 0.00
Tyrosol	0.15 ± 0.01	1.48 ± 0.76
Phenyl ethanol	8.82 ± 2.26	11.23 ± 2.15
Tryptophol	0.30 ± 0.15	0.16 ± 0.00
1-Hexanol, 2-ethyl-	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00

Πίνακας 17: Συγκριτικός πίνακας των οξέων που παράχθηκαν στη μπίρα αναλογίας 1:10 (13 °C ζύμωσης) κατά την πρώτη εβδομάδα και τον πρώτο μήνα παλαίωσης.

COMPOUNDS	13 °C - 1:10	
	ΕΒΔΟΜΑΔΑ	ΜΗΝΑΣ
Isobutyric acid	0.03 ± 0.04	0.07 ± 0.07
Butyric acid	0.04 ± 0.01	0.08 ± 0.01
Isovaleric acid (Butanoic acid, 3-methyl)	0.06 ± 0.02	0.07 ± 0.00
Active valeric acid (Butanoic acid, 2-methyl)	0.02 ± 0.00	0.04 ± 0.00
Hexanoic acid (Caproic acid)	0.01 ± 0.00	0.22 ± 0.05
Octanoic acid (Caprylic acid)	0.86 ± 0.24	2.56 ± 1.89
Decanoic acid (Capric acid)	0.07 ± 0.02	ND
Dodecanoic acid (Lauric acid)	ND	ND
Hexadecanoic acid (Palmitic acid)	0.25 ± 0.02	ND

* ND= NOT DETECTED

Πίνακας 18: Συγκριτικός πίνακας των εστέρων που παράχθηκαν στη μπίρα αναλογίας 1:10 (13 °C ζύμωσης) κατά την πρώτη εβδομάδα και τον πρώτο μήνα παλαίωσης.

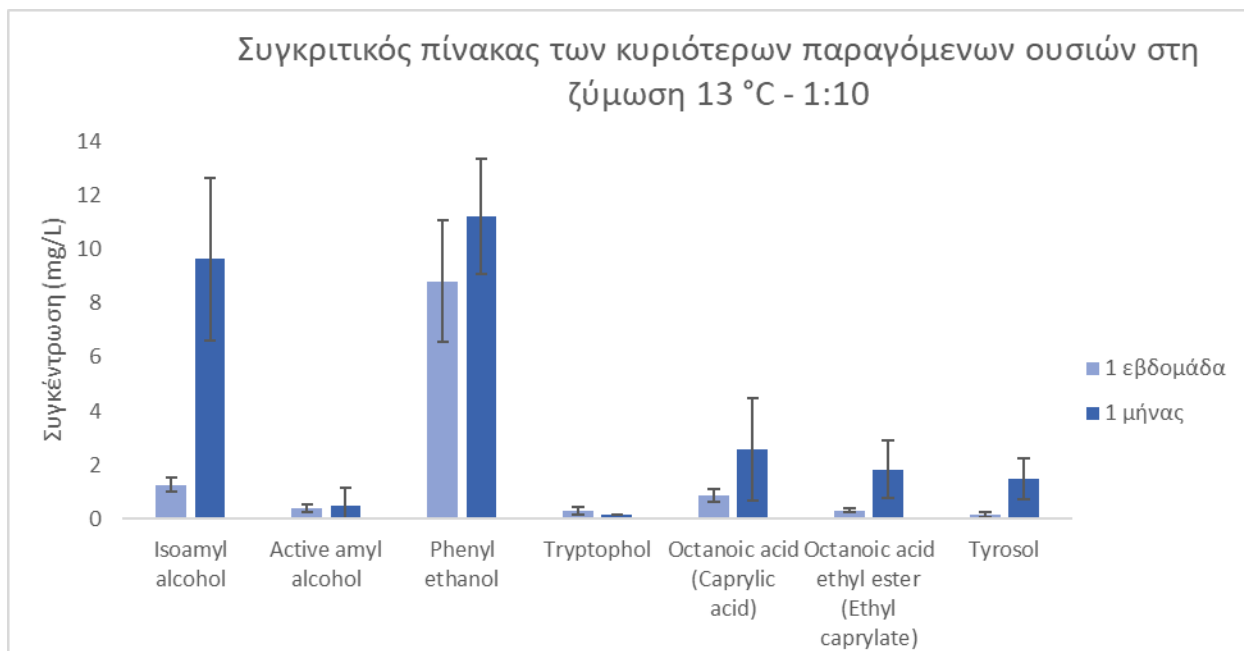
COMPOUNDS	13 °C - 1:10	
	ΕΒΔΟΜΑΔΑ	ΜΗΝΑΣ
Isoamyl acetate	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00
Hexanoic acid ethyl ester (Ethyl caproate)	0.04 ± 0.00	0.02 ± 0.02
Octanoic acid ethyl ester (Ethyl caprylate)	0.30 ± 0.06	1.83 ± 1.09
Phenyl ethyl acetate (Acetic acid, 2-phenylethyl ester)	0.04 ± 0.00	0.02 ± 0.00
Decanoic acid ethyl ester (Ethyl caprate)	0.07 ± 0.04	ND
Dodecanoic acid ethyl ester (Ethyl laurate)	ND	ND
1H-Indole-3-ethanol, acetate (ester)	0.25 ± 0.02	ND

* ND= NOT DETECTED

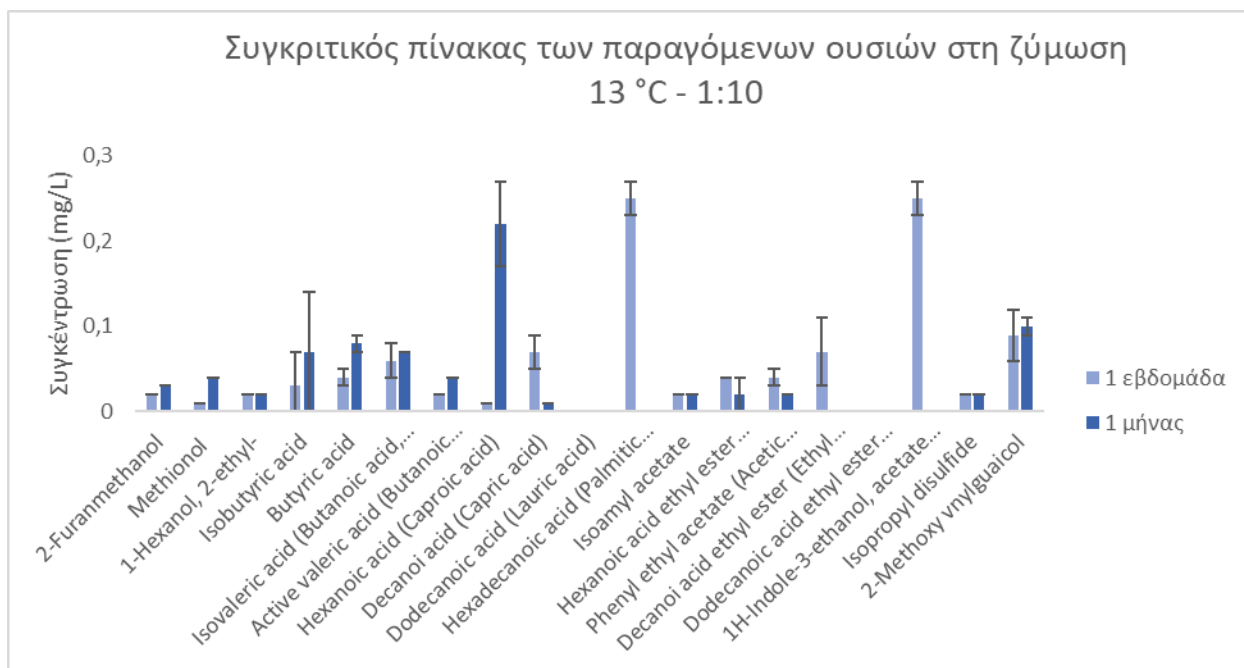
Πίνακας 19: Συγκριτικός πίνακας των λοιπών αρωματικών ενώσεων που παράχθηκαν στη μπίρα αναλογίας 1:10 (13 °C ζύμωσης) κατά την πρώτη εβδομάδα και τον πρώτο μήνα παλαίωσης.

COMPOUNDS	13 °C - 1:10	
	ΕΒΔΟΜΑΔΑ	ΜΗΝΑΣ
Isopropyl disulfide	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00
2-Methoxy vinylguaicol	0.09 ± 0.03	0.10 ± 0.01

Στις αλκοόλες της ζύμωσης αυτής όπως είναι η ισοαμυλική αλκοόλη, η ενεργή αμυλική αλκοόλη, η τυροσόλη, η φαινυλαιθυλική αλκοόλη και η τρυπτοφόλη παρατηρείται αύξηση των συγκεντρώσεων. Στο εξανοϊκό και οκτανοϊκό οξύ βλέπουμε σημαντικά μεγαλύτερη συγκέντρωση στον μήνα. Δεν ανιχνεύονται με το πέρασμα του μήνα τα οξέα δωδεκανοϊκό και εξαδεκανοϊκό. Η 1H-Indole-3-ethanol, acetate και ο αιθυλεστέρας δεκανοϊκού οξέος δεν ανιχνεύονται. Η συγκέντρωση όμως του αιθυλεστέρα οκτανοϊκού οξέος αυξάνεται κατά πολύ.



Διάγραμμα 30: Συγκριτικό διάγραμμα των αρωματικών ενώσεων που παράχθηκαν στη μπύρα αναλογίας 1:10 (13 °C ζύμωσης) κατά την πρώτη εβδομάδα και τον πρώτο μήνα παλαίωσης.



Διάγραμμα 31: Συγκριτικό διάγραμμα των αρωματικών ενώσεων που παράχθηκαν στη μπύρα αναλογίας 1:10 (13 °C ζύμωσης) κατά την πρώτη εβδομάδα και τον πρώτο μήνα παλαίωσης.

Πίνακας 20: Συγκριτικός πίνακας των αλκοολών που παράχθηκαν στη μπίρα αναλογίας 1:1 (20°C ζύμωσης) κατά την πρώτη εβδομάδα και τον πρώτο μήνα παλαίωσης.

COMPOUNDS	20 °C - 1:1	
	ΕΒΔΟΜΑΔΑ	ΜΗΝΑΣ
Isoamyl alcohol	1.63 ± 0.21	1.25 ± 0.51
Active amyl alcohol	0.42 ± 0.07	0.47 ± 0.28
2-Furanmethanol	0.02 ± 0.00	0.03 ± 0.00
Methionol (1-Propanol, 3-(methyl)-)	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.01
Tyrosol	0.11 ± 0.00	0.23 ± 0.04
Phenyl ethanol	7.19 ± 0.54	7.47 ± 2.22
Tryptophol	0.77 ± 0.15	0.88 ± 0.29
1-Hexanol, 2-ethyl-	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00

Πίνακας 21: Συγκριτικός πίνακας των οξέων που παράχθηκαν στη μπίρα αναλογίας 1:1 (20°C ζύμωσης) κατά την πρώτη εβδομάδα και τον πρώτο μήνα παλαίωσης.

COMPOUNDS	20 °C - 1:1	
	ΕΒΔΟΜΑΔΑ	ΜΗΝΑΣ
Isobutyric acid	0.03 ± 0.00	0.04 ± 0.05
Butyric acid	0.03 ± 0.01	0.06 ± 0.01
Isovaleric acid (Butanoic acid, 3-methyl)	0.03 ± 0.01	0.05 ± 0.02
Active valeric acid (Butanoic acid, 2-methyl)	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.03
Hexanoic acid (Caproic acid)	0.02 ± 0.00	0.15 ± 0.02
Octanoic acid (Caprylic acid)	0.18 ± 0.04	0.41 ± 0.10
Decanoic acid (Capric acid)	0.03 ± 0.02	0.01 ± 0.01
Dodecanoic acid (Lauric acid)	ND	ND
Hexadecanoic acid (Palmitic acid)	0.14 ± 0.06	0.12 ± 0.01

* ND= NOT DETECTED

Πίνακας 22: Συγκριτικός πίνακας των εστέρων που παράχθηκαν στη μπίρα αναλογίας 1:1 (20°C ζύμωσης) κατά την πρώτη εβδομάδα και τον πρώτο μήνα παλαίωσης.

COMPOUNDS	20 °C - 1:1	
	ΕΒΔΟΜΑΔΑ	ΜΗΝΑΣ
Isoamyl acetate	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.02
Hexanoic acid ethyl ester (Ethyl caproate)	0.05 ± 0.01	0.02 ± 0.03
Octanoic acid ethyl ester (Ethyl caprylate)	0.26 ± 0.08	0.10 ± 0.14
Phenyl ethyl acetate (Acetic acid, 2-phenylethyl ester)	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.02
Decanoic acid ethyl ester (Ethyl caprate)	0.07 ± 0.02	ND
Dodecanoic acid ethyl ester (Ethyl laurate)	0.06 ± 0.02	ND
1H-Indole-3-ethanol, acetate (ester)	ND	0.02 ± 0.01

* ND= NOT DETECTED

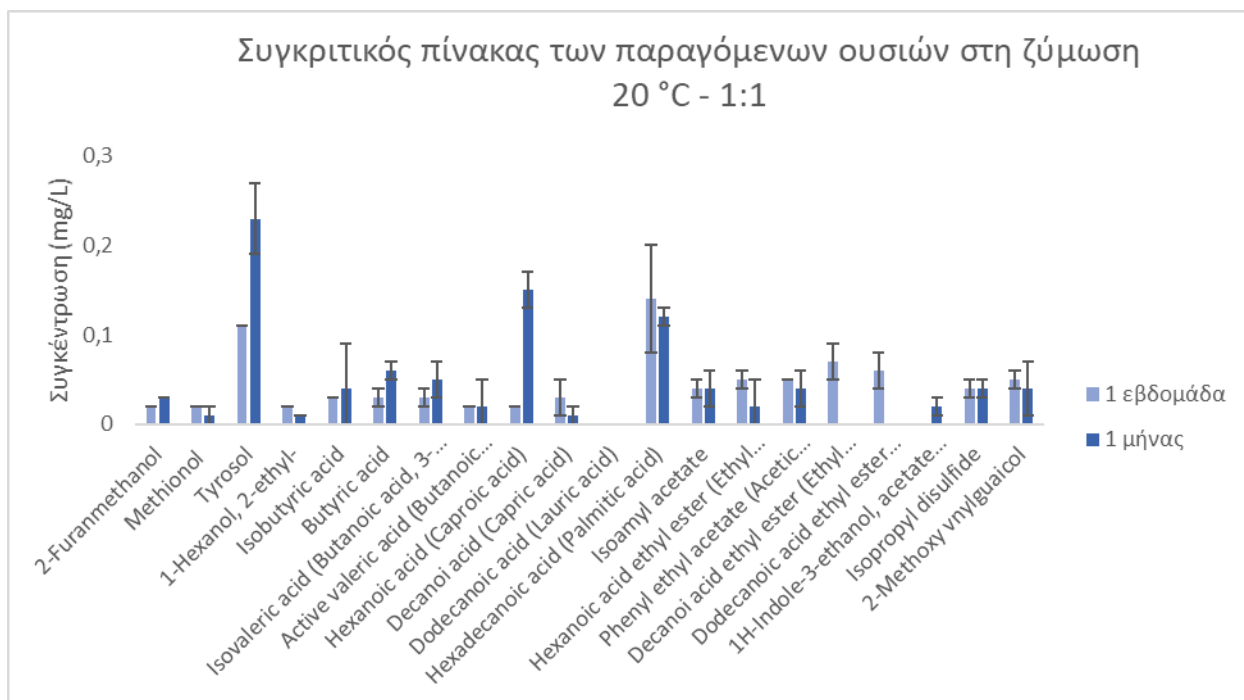
Πίνακας 23: Συγκριτικός πίνακας των λοιπών αρωματικών ενώσεων που παράχθηκαν στη μπίρα αναλογίας 1:1 (20°C ζύμωσης) κατά την πρώτη εβδομάδα και τον πρώτο μήνα παλαίωσης.

COMPOUNDS	20 °C - 1:1	
	ΕΒΔΟΜΑΔΑ	ΜΗΝΑΣ
Isopropyl disulfide	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01
2-Methoxy vinylguaicol	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.03

Στη συγκέντρωση της τυροσόλης, της φαινυλαιθυλικής αλκοόλης και της τρυπτοφόλης παρατηρούμε αύξηση, ενώ σε αυτήν την περίπτωση η ισοαμυλική αλκοόλη φαίνεται να μειώνεται. Το εξανοϊκό και το οκτανοϊκό οξύ αυξάνονται σε συγκέντρωση και τα υπόλοιπα οξέα φέρουν μικρές αλλαγές στις τιμές τους. Για τους εστέρες, ο αιθυλεστέρας οκτανοϊκού οξέος μειώνεται σε συγκέντρωση, η 1H-Indole-3-ethanol, acetate ενώ στις μετρήσεις από την πρώτη εβδομάδα εμφιάλωσης δεν ανιχνεύεται, σε εκείνες που πραγματοποιήθηκαν στο μήνα υπάρχει σε μικρές συγκεντρώσεις. Όσον αφορά τον αιθυλεστέρα δεκανοϊκού οξέος και το δωδεκανοϊκό αιθύλιο στις δεύτερες μετρήσεις παύουν να ανιχνεύονται.



Διάγραμμα 32: Συγκριτικό διάγραμμα των αρωματικών ενώσεων που παράχθηκαν στη μπίρα αναλογίας 1:1 (20 °C ζύμωσης) κατά την πρώτη εβδομάδα και τον πρώτο μήνα παλαίωσης.



Διάγραμμα 33: Συγκριτικό διάγραμμα των αρωματικών ενώσεων που παράχθηκαν στη μπίρα αναλογίας 1:1 (20 °C ζύμωσης) κατά την πρώτη εβδομάδα και τον πρώτο μήνα παλαίωσης.

Πίνακας 24: Συγκριτικός πίνακας των αλκοολών που παράχθηκαν στη μπίρα αναλογίας 1:10 (20°C ζύμωσης) κατά την πρώτη εβδομάδα και τον πρώτο μήνα παλαίωσης.

COMPOUNDS	20 °C - 1:10	
	ΕΒΔΟΜΑΔΑ	ΜΗΝΑΣ
Isoamyl alcohol	1.40 ± 0.05	1.78 ± 0.00
Active amyl alcohol	0.52 ± 0.01	0.83 ± 0.10
2-Furanmethanol	0.02 ± 0.01	0.05 ± 0.02
Methionol (1-Propanol, 3-(methyl)-)	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.00
Tyrosol	0.16 ± 0.01	0.08 ± 0.05
Phenyl ethanol	8.27 ± 2.65	11.59 ± 0.69
Tryptophol	0.77 ± 0.39	0.53 ± 0.23
1-Hexanol, 2-ethyl-	0.01 ± 0.00	0.03 ± 0.01

Πίνακας 25: Συγκριτικός πίνακας των οξέων που παράχθηκαν στη μπίρα αναλογίας 1:10 (20°C ζύμωσης) κατά την πρώτη εβδομάδα και τον πρώτο μήνα παλαίωσης.

COMPOUNDS	20 °C - 1:10	
	ΕΒΔΟΜΑΔΑ	ΜΗΝΑΣ
Isobutyric acid	0.07 ± 0.02	0.04 ± 0.01
Butyric acid	0.02 ± 0.02	0.04 ± 0.02
Isovaleric acid (Butanoic acid, 3-methyl)	0.03 ± 0.00	0.05 ± 0.01
Active valeric acid (Butanoic acid, 2-methyl)	0.02 ± 0.01	0.06 ± 0.03
Hexanoic acid (Caproic acid)	0.14 ± 0.01	0.20 ± 0.01
Octanoic acid (Caprylic acid)	0.55 ± 0.46	0.51 ± 0.12
Decanoic acid (Capric acid)	0.04 ± 0.02	0.04 ± 0.01
Dodecanoic acid (Lauric acid)	0.01 ± 0.00	ND
Hexadecanoic acid (Palmitic acid)	0.49 ± 0.26	0.17 ± 0.04

* ND= NOT DETECTED

Πίνακας 26: Συγκριτικός πίνακας των εστέρων που παράχθηκαν στη μπίρα αναλογίας 1:10 (20°C ζύμωσης) κατά την πρώτη εβδομάδα και τον πρώτο μήνα παλαίωσης.

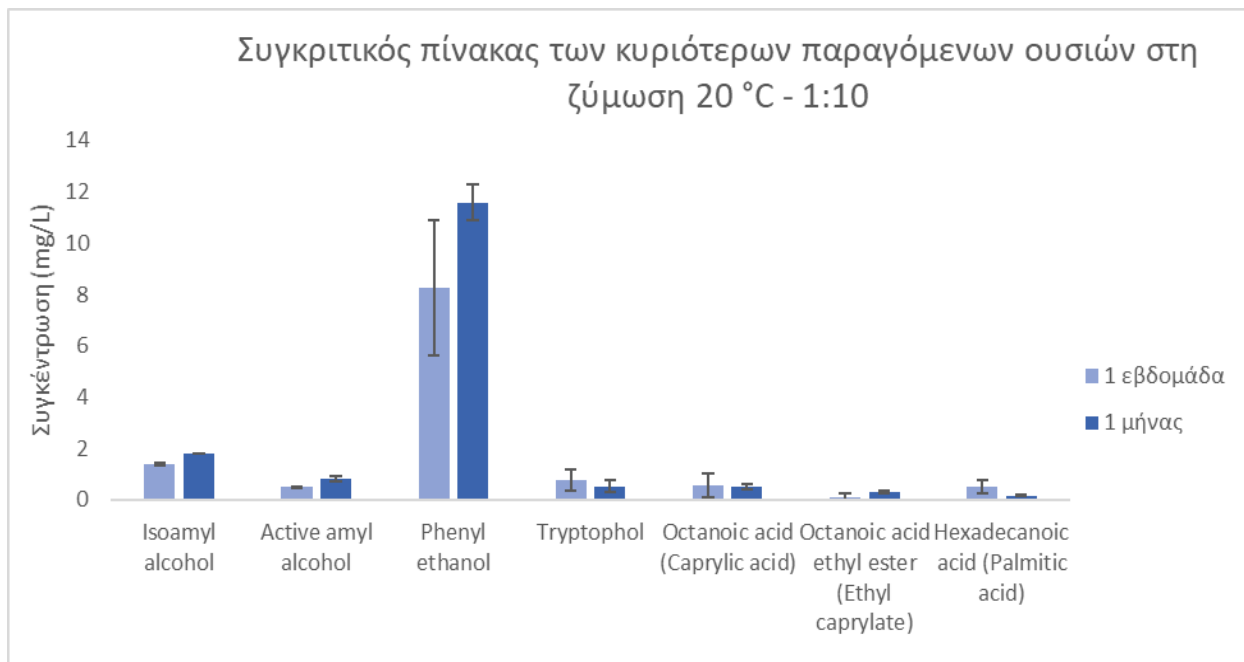
COMPOUNDS	20 °C - 1:10	
	ΕΒΔΟΜΑΔΑ	ΜΗΝΑΣ
Isoamyl acetate	0.02 ± 0.01	0.06 ± 0.03
Hexanoic acid ethyl ester (Ethyl caproate)	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.01
Octanoic acid ethyl ester (Ethyl caprylate)	0.11 ± 0.15	0.30 ± 0.03
Phenyl ethyl acetate (Acetic acid, 2-phenylethyl ester)	0.05 ± 0.02	0.07 ± 0.01
Decanoic acid ethyl ester (Ethyl caprate)	0.06 ± 0.02	0.03 ± 0.02
Dodecanoic acid ethyl ester (Ethyl laurate)	ND	0.03 ± 0.04
1H-Indole-3-ethanol, acetate (ester)	ND	0.02 ± 0.02

* ND= NOT DETECTED

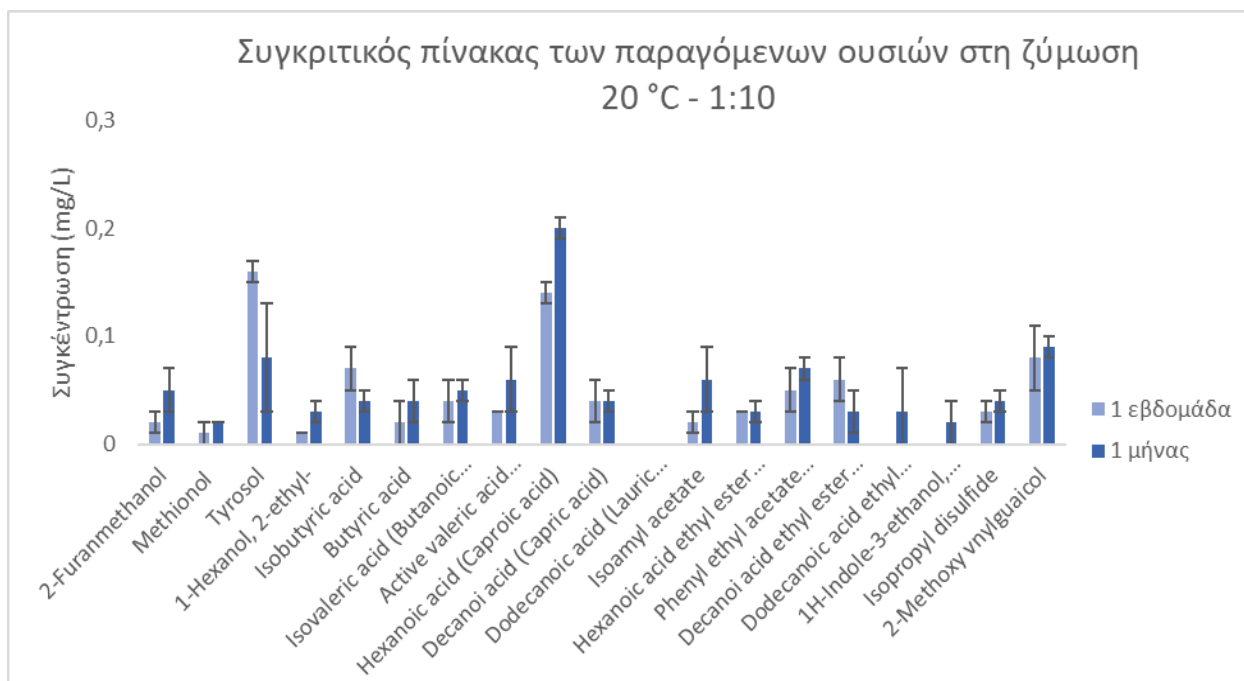
Πίνακας 27: Συγκριτικός πίνακας των λοιπών αρωματικών ενώσεων που παράχθηκαν στη μπίρα αναλογίας 1:10 (20°C ζύμωσης) κατά την πρώτη εβδομάδα και τον πρώτο μήνα παλαίωσης.

COMPOUNDS	20 °C - 1:10	
	ΕΒΔΟΜΑΔΑ	ΜΗΝΑΣ
Isopropyl disulfide	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.01
2-Methoxy vinylguaicol	0.08 ± 0.03	0.09 ± 0.01

Η ισοαμυλική αλκοόλη, η ενεργή αμυλική αλκοόλη και η φαινυλαιθυλική αλκοόλη και σε αυτήν τη ζύμωση αυξάνονται σε ποσότητα ενώ, η συγκέντρωση της τρυπτοφώλης μειώνεται και της τυροσόλης μνει ίδια. Στα οξέα οι συγκεντρώσεις του εξανοϊκού οξέος και του εξαδεκανοϊκού οξέος, αυξάνεται και μειώνεται αντίστοιχα. Ο αιθυλεστέρας οκτανοϊκού οξέος μειώνεται σε συγκέντρωση ενώ το δωδεκανοϊκό αιθύλιο και η 1H-Indole-3-ethanol, acetate ενώ στην πρώτη εβδομάδα εμφιάλωσης δεν ανιχνεύονται, στο μήνα υπάρχουν σε μικρές συγκεντρώσεις.



Διάγραμμα 34 : Συγκριτικό διάγραμμα των αρωματικών ενώσεων που παράχθηκαν στη μπύρα αναλογίας 1:10 (20 °C ζύμωσης) κατά την πρώτη εβδομάδα και τον πρώτο μήνα παλαίωσης.



Διάγραμμα 35: Συγκριτικό διάγραμμα των αρωματικών ενώσεων που παράχθηκαν στη μπύρα αναλογίας 1:10 (20 °C ζύμωσης) κατά την πρώτη εβδομάδα και τον πρώτο μήνα παλαίωσης.

ΣΥΝΟΛΙΚΑ:

Σε γενικές γραμμές τα αποτελέσματα των δειγμάτων από την πρώτη εβδομάδα εμφιάλωσης σε σχέση με του πρώτου μήνα παλαίωσης δείχνουν για τις ζυμώσεις ότι η φαινυλαιθυλική αλκοόλη εμφανίζει αύξηση στη συγκέντρωσή της σε όλες τις ζυμώσεις, η ισοαμυλική αλκοόλη και η ενεργή αμυλική αλκοόλη εμφανίζουν αύξηση των συγκεντρώσεών τους στην περίπτωση αναλογίας ζυμομυκήτων 1:10 και για τις δύο θερμοκρασίες ζύμωσης (13 °C και 20 °C) ενώ αντιστίχια παρουσιάζουν μείωση στις ζυμώσεις αναλογίας 1:1 (13 °C και 20 °C). Η τυροσόλη και αυτή δείχνει μια αύξηση στη συγκέντρωση της σε όλες τις ζυμώσεις, εκτός εκείνης που πραγματοποιήθηκαν στους 20 °C με αναλογία 1:10 όπου η συγκέντρωση παρέμεινε ίδια.

Στα οξέα, εκείνο που έδειξε αύξηση συγκέντρωσης σε όλες τις ζυμώσεις είναι το εξανοϊκό οξύ. Το δωδεκανοϊκό οξύ φαίνεται να μην υπάρχει πλέον είτε γιατί δεν ανιχνεύθηκε εξαρχής (ζυμώσεις 20 °C αναλογιών 1:1 και 1:10) είτε γιατί δεν ανιχνεύθηκε στα δεύτερα δείγματα από τον μήνα παλαίωσης (ζυμώσεις σε θερμοκρασία 13 °C σε αναλογίες 1:1 και 1:10).

Στην περίπτωση των εστέρων, ο αιθυλεστέρας οκτανοϊκού οξέος αυξάνεται σε συγκέντρωση για τις ζυμώσεις των 13 °C (αναλογίες 1:1 και 1:10) ενώ μειώνεται για αυτές των 20 °C (αναλογίες 1:1 και 1:10). Η 1H-Indole-3-ethanol ανιχνεύεται στον ένα μήνα παλαίωσης αφού τα δείγματα της πρώτης εβδομάδας από την εμφιάλωση δεν έδωσαν αποτελέσματα. Συνολικά όμως ο αιθυλεστέρας δεκανοϊκού οξέος, το δωδεκανοϊκό αιθύλιο και η 1H-Indole-3-ethanol με την παλαίωση παύουν να ανιχνεύονται.

Στο ισοπρότυλο δισουλφίδιο και στην 2-μέθοξυ-βινυλ-γουαϊκόλη, σημαντική αύξηση των συγκεντρώσεων παρατηρούμε στη ζύμωση 1:1 στους 13 °C. Στις υπόλοιπες ζυμώσεις υπάρχουν μικρές αποκλίσεις από τις αρχικές συγκεντρώσεις.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η παραγωγή μπίρας με χρήση του μη συμβατικού ζυμομύκητα *Metschnikowia pulcherrima* σε μικτές καλλιέργειες με τον *Saccharomyces cerevisiae*. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκαν τέσσερις διαφορετικές ζυμώσεις του ίδιου ζυθογλεύκου. Οι ζυμώσεις διέφεραν ως προς την αναλογία των μικροοργανισμών στην καλλιέργεια και τη θερμοκρασία ζύμωσης. Έτσι πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις αναλογίας μικροοργανισμών 1:1 και 1:10 σε δύο θερμοκρασίες ζύμωσης 20 °C και 13 °C.

Όσον αφορά στη ζύμωση του ζυθογλεύκου παρατηρήθηκε ότι ο χρόνος ζύμωσης επηρεάζεται σημαντικά τόσο από την αναλογία των μικροοργανισμών στο ζυθογλεύκος όσο και από τη θερμοκρασία ζύμωσης. Αναλυτικότερα οι ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν στους 20 °C ολοκλήρωσαν τη ζύμωση ταχύτερα αφήνοντας μικρότερο ποσοστό αζύμωτων σακχάρων. Η μιξ καλλιέργεια με αναλογία 1:1 ολοκληρώθηκε σε 9 ημέρες με 3.1 °P και η 1:10 χρειάστηκε σχεδόν το διπλάσιο χρόνο (17 ημέρες) με 3.3 °P. Οι ζυμώσεις των 13 °C διακόπηκαν στις 30 ημέρες ζύμωσης με την 1:1 να έχει φτάσει τους 3.4 °Plato και την 1:10, έχοντας χαμηλότερο ρυθμό κατανάλωσης σακχάρων, στα 4.4 °P. Οι ζυμώσεις με καθαρές καλλιέργειες *Metschnikowia pulcherrima* παρουσίασαν τη μεγαλύτερη καθυστέρηση όσον αφορά την εκκίνηση της ζύμωσης αφήνοντας μάλιστα και τα περισσότερα αζύμωτα σάκχαρα. Το σύνολο των ζυμώσεων όμως, κατάφερε σε μεγάλο βαθμό να ζυμώσει το γλεύκος στις διάφορες θερμοκρασίες.

Όσον αφορά στη μεταβολή του pH ανάμεσα στις ζυμώσεις, υψηλότερες τιμές μετρήθηκαν στην περίπτωση των ζυμώσεων στους 13 °C σε σχέση με τις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 20 °C. Οι τιμές pH που μετρήθηκαν κυμαίνονται μεταξύ των τιμών 4.33-4.62. Ένα ακόμη σημαντικό χαρακτηριστικό της αλκοολικής ζύμωσης είναι η κατανάλωση αζώτου από τους ζυμομύκητες, σύμφωνα με τις μετρήσεις βρέθηκε ότι οι καθαρές καλλιέργειες του μη συμβατικού ζυμομύκητα κατανάλωσαν μικρότερη ποσότητα αζώτου από τις μικτές καλλιέργειες, γεγονός θετικό για τους non-*Saccharomyces*. Την υψηλότερη κατανάλωση αζώτου παρατηρήσαμε στην περίπτωση της ζύμωσης ίσης αναλογίας μικροοργανισμών (1:1) στους 20 °C. Οι τιμές τις αιθανόλης στις ζυμώσεις από την *Metschnikowia pulcherrima* φαίνεται να είναι μικρότερες (4.6 στους 20 °C και 3.9 στους 13 °C) από τις τιμές των μικτών καλλιεργειών που κυμαίνονται μεταξύ του 5.0 και του 5.5.

Τέλος οι αρωματικές αναλύσεις έδειξαν ότι ο μελετώμενος μη συμβατικός μικροοργανισμός σε καθαρές καλλιέργειες αλλά και στις μικτές καλλιέργειες που πραγματοποιήθηκαν, έχει την δυνατότητα παραγωγής ενός πλήθους αρωματικών ουσιών, διαμορφώνοντας ένα πολύπλοκο αρωματικό προφίλ με ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Αναλυτικότερα, στο σύνολό τους, οι ζυμώσεις έδωσαν υψηλές περιεκτικότητες ισοαμυλικής αλκοόλης, ενεργής αμυλικής αλκοόλης, φαινυλαιθυλικής αλκοόλης αλλά και τρυπτοφώλης, ενώσεις που χαρακτηρίζονται από αρώματα γλυκά και αρώματα που παραπέμπουν σε φρούτα, στο αμύγδαλο και στο τριαντάφυλλο. Η συγκέντρωση του οκτανοϊκού οξέος ανιχνεύθηκε σε υψηλά ποσοστά ιδιαίτερα στην περίπτωση της ζύμωσης 1:10 στους 13 °C. Το ίδιο ισχύει και για τον αιθυλεστέρα οκτανοϊκού οξέος, ο οποίος χαρακτηρίζεται από αρώματα φρούτων. Υψηλή παραγωγή εστέρων παρατηρήθηκε στην περίπτωση της *Metschnikowia pulcherrima*, στην περίπτωση αυτή όμως τα αρώματα φρούτων που οφείλονται στους εστέρες συνδυάζονται και με πιο έντονα πικρικά και φυτικά αρώματα λόγω των ενώσεων ισοχουμουλόνη, χουμουλόνη, λουλουπόνη και καρυοφυλλένιο αλλά και αρώματα σιταριού που προέρχονται από την ένωση 2-μέθοξυ-4-βινυλοφαινόλη.

Σύμφωνα με τα παραπάνω γίνεται σαφές ότι η *Metschnikowia pulcherrima* στις μικτές καλλιέργειες στην παρούσα εργασία δίνουν πολύ θετικά αποτελέσματα για την παραγωγή μπίρας 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. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον θα παρουσίαζε μια μέτρηση αέριας χρωματογραφίας που θα αφορά τα τερπενοειδή, δίνοντας έτσι μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα για τις ουσίες που παράγουν οι μικροοργανισμοί και το αρωματικό προφίλ που διαμορφώνουν. Για μια πιο ολοκληρωμένη μελέτη των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των προϊόντων ζύμωσης, θα είχε ενδιαφέρον η συσχέτιση των αποτελεσμάτων των αναλυτικών μεθόδων με τα σχόλια ενός έμπειρου πάνελ δοκιμαστών.

BIBΛIOΓΡΑΦΙΑ

- Albertin, Warren, Laura Chasseriaud, Guillaume Comte, Aurélie Panfili, Adline Delcamp, Franck Salin, Philippe Marullo, and Marina Bely. "Winemaking and Bioprocesses Strongly Shaped the Genetic Diversity of the Ubiquitous Yeast *Torulaspora Delbrueckii*." Edited by Joseph Schacherer. *PLoS ONE* 9, no. 4 (April 9, 2014): e94246. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094246>.
- American Industrial Hygiene Association, 2013. *Odor Thresholds for Chemicals with Established Health Standards*, Virginia: American Industrial Hygiene Association.
- Andrew James, E. (2015, February 01). Analysis of Diacetyl and Other Vicinal Diketones (VDKs) in Alcoholic Beverages. *LCGC Special Issues*. V35, I8, pp. 35-42.
- Basso, R. F., Alcarde, A. R. & Barbosa, C., 2016. Could non-Saccharomyces yeasts contribute on innovative brewing fermentations?. *Food Research International* V.86, 8, pp. 112-120.
- Bellut, Konstantin, and Elke K. Arendt. "Chance and Challenge: Non- *Saccharomyces* Yeasts in Nonalcoholic and Low Alcohol Beer Brewing – A Review." *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 77, no. 2 (April 3, 2019): 77–91. <https://doi.org/10.1080/03610470.2019.1569452>.
- Benito, Santiago. "The Impact of *Torulaspora Delbrueckii* Yeast in Winemaking." *Applied Microbiology and Biotechnology* 102, no. 7 (April 2018): 3081–94. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8849-0>.
- Breandán Kearney. (2015). 15 COMMON OFF FLAVOURS IN BEER AND HOW TO IDENTIFY THEM. Gent: Resources, Belgian Smaak.
- Burdock, G. A., 2016. *Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients*. 6th ed. Φλόριντα: CRC Press.
- Callejo, María Jesús, Carmen González, and Antonio Morata. "Use of Non-Saccharomyces Yeasts in Bottle Fermentation of Aged Beers." In *Brewing Technology*, edited by Makoto Kanauchi. InTech, 2017. <https://doi.org/10.5772/intechopen.68793>.
- Capece, Angela, Rossana Romaniello, Gabriella Siesto, and Patrizia Romano. "Conventional and Non-Conventional Yeasts in Beer Production." *Fermentation* 4, no. 2 (June 1, 2018): 38. <https://doi.org/10.3390/fermentation4020038>.
- Carr, N. (2016, July 1). Learn Kegerator. Retrieved November 14, 2017, from <https://learn.kegerator.com/off-flavors-in-beer/>
- Collin, Sonia, Sabrina Nizet, and Jacques Gros. "Le houblonnage à cru des bières spéciales belges est bien plus qu'une simple dissolution des composés aromatiques du houblon." *Cerevisia* 36, no. 4 (January 2012): 119–24. <https://doi.org/10.1016/j.cervis.2011.12.001>.
- Combina, M.; Elía, A.; Mercado, L.; Catania, C.; Ganga, A.; Martinez, C. Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. *Int. J. Food Microbiol.* 2005, 99, 237–243. [CrossRef] [PubMed]
- Comitini F, Gobbi M, Domizio P, Romani C, Lencioni L, Mannazzu I, Ciani M (2011) Selected non-Saccharomyces wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol* 28:873–882
- D. Callemien and S. Collin (2009) Structure, Organoleptic Properties, Quantification methods and Stability of Phenolic Compounds in beer – A Review, *Fppd reviews International*, 26:1, 1:84, DOI: 10.1080/87559120903157954

- Dutraive, Ophélie, Santiago Benito, Stefanie Fritsch, Beata Beisert, Claus-Dieter Patz, and Doris Rauhut. "Effect of Sequential Inoculation with Non-Saccharomyces and Saccharomyces Yeasts on Riesling Wine Chemical Composition." *Fermentation* 5, no. 3 (September 1, 2019): 79. <https://doi.org/10.3390/fermentation5030079>.
- Escribano, R., L. González-Arenzana, J. Portu, P. Garijo, I. López-Alfaro, R. López, P. Santamaría, and A.R. Gutiérrez. "Wine Aromatic Compound Production and Fermentative Behaviour within Different Non- Saccharomyces Species and Clones." *Journal of Applied Microbiology* 124, no. 6 (June 2018): 1521–31. <https://doi.org/10.1111/jam.13735>.
- Esteve-Zarzoso, Braulio, Paloma Manzanares, Daniel Ramón, and Amparo Querol. "The Role of Non-Saccharomyces Yeasts in Industrial Winemaking." *International Microbiology; Vol. 1, Núm. 2 (1998); 143-148* 1 (July 1, 1998). <https://www.researchgate.net/publication/42243932>.
- Evans, D., & Sheehan, M. (2002). Don't be fobbed off, the substance of beer foam, a review (invited). *Journal American Society of Brewing Chemists*, 60 , pp. 45-57.
- Fernandez, M., Ubeda, J., & Briones, A. (2000, July 25). Typing of non-Saccharomyces yeasts with enzymatic activities of interest in wine-making. *Int J Food Microbiol.*, pp. 29-36. Retrieved from http://wineserver.ucdavis.edu/industry/enology/winemicro/wineyeast/metschnikowia_pulcherrima.html
- Fischborn, Tobias, and Lallemand Brewing. "Yeast and Flavour Production," n.d., 46.
- Fix, G. (1999). *Principles of Brewing Science: A Study of Serious Brewing Issues* (2nd ed.). Colorado: BREWERS ASSOCIATION.
- Gupta, M., Abu-Ghannam, N., & Gallagher, E. (2010, 4 29). Barley for Brewing: Characteristic Changes during Malting, Brewing and Applications of its By-Products. *Comprehensive REVIEWS in food science and food safety*, pp. 318-328.
- Ha, S.-J., Galazkac, J., Kima, S., Cho, J.-H., Yangd, X., Seoe, J.-H., . . . Jin, Y.-S. (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.
- Hernandezorte, P, M Cersosimo, N Loscos, J Cacho, E Garciamoruno, and V Ferreira. "The Development of Varietal Aroma from Non-Floral Grapes by Yeasts of Different Genera." *Food Chemistry* 107, no. 3 (April 1, 2008): 1064–77. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.09.032>.
- Hidalgo, C., Henschke, P., Chambers, P., Curtin, C., & Varela, C. (2014, March). Evaluation of Non-Saccharomyces yeasts for the reduction of alcohol content in wine. *Applied Environmental Microbiology* 80(5), pp. 1670-1678.
- Holt, Sylvester, Vaskar Mukherjee, Bart Lievens, Kevin J. Verstrepen, and Johan M. Thevelein. "Bioflavoring by Non-Conventional Yeasts in Sequential Beer Fermentations." *Food Microbiology* 72 (June 2018): 55–66. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.11.008>.
- Inês Ferreira and Luís Guido. "Impact of Wort Amino Acids on Beer Flavour: A Review." *Fermentation* 4, no. 2 (March 28, 2018): 23. <https://doi.org/10.3390/fermentation4020023>.

- Ivit, Nedret, and Belinda Kemp. "The Impact of Non-Saccharomyces Yeast on Traditional Method Sparkling Wine." *Fermentation* 4, no. 3 (September 1, 2018): 73. <https://doi.org/10.3390/fermentation4030073>.
- Jolly, N.P., O.P.H. Augustyn, and I.S. Pretorius. "The Role and Use of Non-Saccharomyces Yeasts in Wine Production." *South African Journal of Enology & Viticulture* 27, no. 1 (March 2017). <https://doi.org/10.21548/27-1-1475>.
- Kennedy, A. I. (1997). FullyDefined Medium for Yeast Fermentation. *Food technol. Biotechnol.* 35 (4) , pp. 261-265.
- King, Andrew, and J Richard Dickinson. "Biotransformation of Monoterpene Alcohols by Saccharomyces Cerevisiae, Torulaspora Delbrueckii and Kluyveromyces Lactis," 2000, 8.
- König, H., Uden, G., & Fröhlich, J. (2009). Yeasts. In H. U. König (Ed.), *Biology of Microorganisms on Grape, in Must and in Wine* (pp. 47-56). Manattan: Springer. Retrieved November 11, 2017, from http://wineserver.ucdavis.edu/industry/enology/winemicro/wineyeast/saccharomyces_cerevisiae.html
- Kurtzman, C.P.; Fell, J.W. *The Yeasts: A Taxonomic Study*, 4th ed.; Elsevier Science Publishers: Amsterdam, The Netherlands, 1998; ISBN 9780444813121
- Lachance, M-A. & Starmer, W.T., 1998. Ecology of yeasts. In: Kurtzman, C.P. & Fell, J.W. (eds). *The yeasts, a taxonomic study*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Langos, D., Granvogl, M., 2016. Studies on the Simultaneous Formation of Aroma-Active and Toxicologically Relevant Vinyl Aromatics from Free Phenolic Acids during Wheat Beer Brewing. *J. Agric. Food Chem.* 64, 2325–2332. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b05606>
- Laskin, A., Bennett, J. & Gadd, G., 2005. *Advances in Applied Microbiology*. 1η ed. San Diego, California: EL SEVIER Academic Press.
- Leonardos , G., Kendall , D. & Barnard, N., 2012. Odor Threshold Determinations of 53 Odorant. *Journal of the Air Pollution Control Association*, 12 Μάρτιος.
- Lettisha H, Balakrishna P, Ademola O. 2013. Stability profile of flavour-active ester compounds in ale and lager beer during storage. *Afr J Biotechnol* 12: 491–498.
- Lewis, A. (1997, November 13). *Brew Your Own*. Retrieved 10 28, 2017, from <https://byo.com/article/brew-beer-that-matches-your-water/>
- Lewis, M. J., & Bamforth, C. W. (2006). *ESSAYS IN BREWING SIENCE* (1 ed.). Davis, California, USA: Springer.
- Lewis, M. J., & Young, T. W. (2001). Overview of the brewing process. In *Brewing* (pp. 3-10). Manhattan: Springer Science+Business Media.
- Li X, Chan LJ, Yu B, Curran P, Liu SQ (2012a) Fermentation of three varieties of mango juices with a mixture of Saccharomyces cerevisiae and Williopsis saturnus var. mrakii. *Int J Food Microbiol* 158:28–35
- Li X, Yu B, Curran P, Liu SQ (2012b) Impact of two Williopsis yeast strains on the volatile composition of mango wine. *Int J Food Sci Tech* 47:808–815
- Mas, . A., Guillamón, J. M. & Beltran, G., 2017. *Non-conventional Yeast in the Wine Industry*. Lausanne: Frontiers Media SA.
- Michel, Maximilian, Jana Kopecká, Tim Meier-Dörnberg, Martin Zarnkow, Fritz Jacob, and Mathias Hutzler. "Screening for New Brewing Yeasts in the Non- Saccharomyces Sector with Torulaspora Delbrueckii as Model: Brew Screening for Non-

- Saccharomyces Yeasts.” *Yeast* 33, no. 4 (April 2016,a): 129–44. <https://doi.org/10.1002/yea.3146>.
- Michel, M., Meier-Dörnberg, T., Jacob, F., Methner, F.-J., Wagner, R. S., & Hutzler, M. (2016,b, 9 15). Review: Pure non-Saccharomyces starter cultures for beer fermentation with a focus on secondary metabolites and practical applications. *Journal of the Institute of Brewing* 122, pp. 569-587. <http://dx.doi.org/10.1002/jib.381>
- Morata, Antonio, Iris Loira, Carlos Escott, Juan Manuel del Fresno, María Antonia Bañuelos, and José Antonio Suárez-Lepe. “Applications of *Metschnikowia Pulcherrima* in Wine Biotechnology.” *Fermentation* 5, no. 3 (July 9, 2019): 63. <https://doi.org/10.3390/fermentation5030063>.
- Mosher, R. (2006, November 1). MAJOR FLAVOR AND AROMA GROUPS IN BEER. All About Beer Magazine - Volume 27, Issue 5, pp. 18-10.
- 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, pp. 73-75.
- Nissen, Peter, Dennis Nielsen, and Nils Arneborg. “Viable *Saccharomyces Cerevisiae* Cells at High Concentrations Cause Early Growth Arrest of Non-Saccharomyces Yeasts in Mixed Cultures by a Cell-Cell Contact-Mediated Mechanism.” *Yeast* 20, no. 4 (March 2003): 331–41. <https://doi.org/10.1002/yea.965>.
- Olaniran, Ademola O., Lettisha Hiralal, Mduduzi P. Mokoena, and Balakrishna Pillay. “Flavour-Active Volatile Compounds in Beer: Production, Regulation and Control: Flavour-Active Volatile Compounds in Beer: Production, Regulation and Control.” *Journal of the Institute of Brewing* 123, no. 1 (January 2017): 13–23. <https://doi.org/10.1002/jib.389>.
- Oro, L., Ciani, M., & Comitini, F. (2016, May 5). Antimicrobial activity of *Metschnikowia pulcherrima* on wine yeasts. *J Appl Microbiol.* 116(5), pp. 1209-17.
- 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.
- Pesce, S. (2015). tes teach. Retrieved November 3, 2017, from <https://www.tes.com/lessons/ztUU7PfnFY-T1Q/beer-making>
- Pires, E., Teixeira, J. A., Branyik, T., & Vicente, A. (2014, March). Yeast: The soul of beer's aroma-A review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. *Appl Microbiol Biotechnol*, 98, pp. 1937-49.
- Renger R, Van Hateren S, Luyben K. 1992. The formation of esters and higher alcohols during brewery fermentation; the effect of carbon dioxide pressure. *J Inst Brew* 98: 509–513.
- 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.
- Riitonen T., EtaV., Hyvä S., Jönsson L.J., Mikkola J.P., 2013. Engineering Aspects of Bioethanol In Synthesis.In: Advances in Chemical Engineering, Volume 42, Murzin D.Y. (Eds) Chapter 1, Elsevier Inc., 1-73.
- Rosa, R. D. (2010). INTERMEDIATE BEER PRODUCTION. Retrieved November 13, 2017, from <http://www.imperialbeverage.com>

- Ruiz, Javier, Ignacio Belda, Beata Beisert, Eva Navascués, Domingo Marquina, Fernando Calderón, Doris Rauhut, Antonio Santos, and Santiago Benito. "Analytical Impact of *Metschnikowia Pulcherrima* in the Volatile Profile of Verdejo White Wines." *Applied Microbiology and Biotechnology* 102, no. 19 (October 2018): 8501–9. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9255-3>.
- Sadineni V, Kondapalli N, Obulam VSR (2012) Effect of co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii* or *Appl Microbiol Biotechnol Metschnikowia pulcherrima* on the aroma and sensory properties of mango wine. *Ann Microbiol* 62:1353–1360
- Santamauro F., Whiffin F.M., Scott R.J., Chuck C.J., 2014. Low-cost lipid production by an oleaginous yeast cultured in non-sterile conditions using model waste resources. *Biotechnology for Biofuels*. 7:34-35
- Savini V., Hendriekx M.m, Sisti M., Masciarelli G., Favaro M., Fontana C., Pitzurra L., Arzeni D., Astofli D., Catavitello C., Polilli E., Farina C., Fazii P., Antonio D.D., Stubee D., 2013. An atypical, pigment-producing *Metschnikowia* strain from a leukemia patient. *Medical Mycology* May 51, 438-443.
- Schönberger, C., & Kosteletzky, T. (2011). 125th Anniversary Review: The Role of Hops in Brewing. *Journal of the Institute of Brewing* 117 (3), pp. 259-267.
- Simpson, B., Mairs, J., n.d. *The Beer Flavour Handbook*. FlavorActiV.
- Steiner, E., Becker, T., & Gastl, M. (2010). Turbidity and Haze Formation in Beer – Insights and Overview. *J. Inst. Brew.* 116(4), pp. 360-368.
- Stewart, Graham G. "Flavour Production by Yeast." In *Brewing and Distilling Yeasts*, by Graham G. Stewart, 325–55. Cham: Springer International Publishing, 2017. https://doi.org/10.1007/978-3-319-69126-8_15.
- 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.
- Tao, Y. & Zhang, L., 2010. Intensity prediction of typical aroma characters of cabernet sauvignon wine. *LWT - Food Science and Technology*, 2 (10), pp. 1550-1556.
- Thegoodscentscompany, 2009. The Good Scents Company Information System. [Online] Available at: <http://www.thegoodscentscompany.com/> [Accessed 21 3 2018].
- Toh, Darel Wee Kiat, Jian Yong Chua, and Shao Quan Liu. "Impact of Simultaneous Fermentation with *Saccharomyces Cerevisiae* and *Torulaspora Delbrueckii* on Volatile and Non-Volatile Constituents in Beer." *LWT* 91 (May 2018): 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.025>.
- Vanderhaegen, B, H Neven, H Verachtert, and G Derdelinckx. "The Chemistry of Beer Aging – a Critical Review." *Food Chemistry* 95, no. 3 (April 2006): 357–81. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.01.006>.
- Varela, Cristian. "The Impact of Non-*Saccharomyces* Yeasts in the Production of Alcoholic Beverages." *Applied Microbiology and Biotechnology* 100, no. 23 (December 2016): 9861–74. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7941-6>.
- Verstrepen K, Derdelinckx G, Dufour J, et al. 2003b. Flavor-active esters: adding fruitiness to beer. *J Biosci Bioeng* 96: 110–118.

- Xiros, C., Topakas, E., & Christakopoulos, P. (2013). Hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. *WIRE Energy and Environment* vol.2, pp. 663-654.
- Yonezawa, T., & Fushiki, T. (2002). Testing for Taste and Flavour of Beer. In J. Jackson, & H. Linskens (Eds.), *Analysis of Taste and Aroma* (2η ed., pp. 29-45). Cham: SPRINGER.
- Zhao, C.-Y. et al., 2016. Assessment of the key aroma compounds in rose-based products. *Journal of Food and Drug Analysis*, Ιούλιος, pp. 471-476.
- Αρβανιτίδου-Βαγιωνά, Μ., 2016. Μικροβιολογία του νερού. Χαρακτηριστικά Βακτηρίων., Αθήνα: Watermico Προγραμμα κατάρτισης εξαποστάσεως.
- Ταταρίδης, Π., & Κεχαγιά, Δ. (2010). Εργαστήριο Βυνοποίησης–Κεφάλαιο τέταρτο-Ξήρανση Βύνης (1η ed.). Αθήνα: ΤΕΙ Αθήνας.
- Ταταρίδης, Π., & Κεχαγιά, Δ. (2010). Κεφάλαιο όγδοο-Λυκίσκος–Βρασμός– Θερμό & Ψυχρό Θόλωμα. In Εργαστήριο Βυνοποίησης - Ζυθοποίησης (pp. 160-188). Αθήνα: ΤΕΙ Αθήνας.
- Ταταρίδης, Π., & Κεχαγιά, Δ. (2010). Κεφάλαιο τέταρτο- Ξήρανση Βύνης. In Εργαστήριο Βυνοποίησης (pp. 119-137). Αθήνα: ΤΕΙ Αθήνας.
- Ταταρίδης, Π., & Κεχαγιά, Δ. (2010). Εργαστήριο Βυνοποίησης-Ζυθοποίησης. In Ιστορική ανασκόπηση εξέλιξης της μπίρα-Παραγωγικά στάδια (pp. 1-20). Αθήνα: ΤΕΙ Αθήνας.
- Τζιά, Κ., Ωραιοπούλου, Β. & Ταύκης, Π., 2008. Επιστήμη κα Μηχανική των Τροφίμων: Οδηγός Εργαστηριακών Ασκήσεων. 1η επιμ. Αθήνα: Ε.Μ.Π..