



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

Τομέας IV: Τομέας Σύνθεσης και
Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διαδικασιών

Εργαστήριο Τροφίμων

Μελέτη παραγωγής μπύρας με χρήση ζυμών non-Sacharomyces.

Διπλωματική εργασία:

Αναστασάκου-Παρασκευοπούλου Αικατερίνη

Επιβλέπουσα καθηγήτρια:

Ωραιοπούλου Βάσω

ΑΘΗΝΑ 2018

Περίληψη

Τα τελευταία χρόνια στον χώρο της ζυθοποιίας συντελείται μια διαρκής έρευνα που αφορά στη βελτίωση και στην αύξηση της αρωματικής πολυπλοκότητας των παραγόμενων προϊόντων. Κύριο αντικείμενο αυτής της έρευνας είναι οι ζυμομύκητες οι οποίοι μέσα από διαφορετικά μεταβολικά μονοπάτια είναι δυνατό να παράγουν ένα πλήθος ουσιών που επιδρούν στο αρωματικό προφίλ της μπίρας. Ένα σύνολο μικροοργανισμών που ανήκουν στην κατηγορία non-*Saccharomyces* μελετώνται τόσο για τη δυνατότητά τους να μεταβολίσουν τα βασικά σάκχαρα του ζυθογλεύκου, όσο και για τα αρωματικά που τελικά παράγουν, με σκοπό να αντικαταστήσουν ή ακόμη και να συνδυαστούν με τον συμβατικό ζυμομύκητα *S. cerevisiae*.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η δυνατότητα μεταβολισμού των τριών βασικών σακχάρων που περιέχονται στο ζυθογλεύκος και στη συνέχεια η δυνατότητα ζύμωσης του ίδιου του ζυθογλεύκου και τα ποιοτικά και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των παραγόμενων προϊόντων από δύο non-*Saccharomyces* μικροοργανισμούς. Οι μικροοργανισμοί που επιλέχθηκαν είναι οι *Torulaspora delbrueckii* και *Metshnikowia pulcherrima*. Η πρώτη σειρά πειραμάτων που πραγματοποιήθηκε αφορούσε στη μελέτη της δυνατότητας μεταβολισμού της γλυκόζης, της φρουκτόζης και της μαλτόζης από τους δύο μύκητες. Για τον σκοπό αυτό παρασκευάστηκαν τεχνικά υποστρώματα πλούσια σε θρεπτικά συστατικά και μελετήθηκε ξεχωριστά ο ρυθμός ζύμωσης των δύο non-*Saccharomyces* μικροοργανισμών τόσο σε υποστρώματα ενός σακχάρου όσο και σε υπόστρωμα που περιείχε και τα 3 βασικά σάκχαρα σε αναλογίες αντίστοιχες του ζυθογλεύκου. Για να μπορεί να υπάρξει σύγκριση των αποτελεσμάτων το πείραμα πραγματοποιήθηκε και με το συμβατικό ζυμομύκητα. Τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού έδειξαν ότι και οι δύο μη συμβατικοί μικροοργανισμοί κατάφεραν επαρκώς να αναπτυχθούν και να μεταβολίσουν και τα 3 σάκχαρα παράγοντας αιθανόλη. Όσον αφορά στο ρυθμό ανάπτυξης της *M. pulcherrima* βρέθηκε σχεδόν ανάλογος με του *S. cerevisiae* ολοκληρώνοντας τη ζύμωση σε 11 ημέρες έναντι 9 ημερών που χρειάστηκε ο συμβατικός μύκητας. Αντίθετα η *T. delbrueckii* στα υποστρώματα που περιείχαν μαλτόζη ολοκλήρωσε την ζύμωση σε 14 ημέρες καθώς φαίνεται πως απαιτεί ένα χρονικό διάστημα 5-6 ημερών για να ξεκινήσει να μεταβολίζει τον δισακχαρίτη.

Στη δεύτερη σειρά πειραμάτων και μετά τη διαπίστωση της ικανότητας μεταβολισμού των σακχάρων από τους μελετώμενους μικροοργανισμούς επιχειρήθηκε η παραγωγή μπίρας τύπου American Pale Ale από αυτούς. Στα πειράματα αυτά παρασκευάστηκαν 4 διαφορετικές μπίρες οι οποίες ζυμώθηκαν με μονοκαλλιέργειες *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii* και *M. pulcherrima* και με μικτή καλλιέργεια *S. cerevisiae* - *T. delbrueckii* σε αναλογία 1:10. Κάθε ζύμωση πραγματοποιήθηκε δύο φορές με μικρή διαφοροποίηση στην αρχική πυκνότητα γλεύκου (12.6 και 14.5 °P) και στη μέση θερμοκρασία ζύμωσης (24 και 20 °C). Όσον αφορά στο χρόνο ζύμωσης, αρχικά παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση του χρόνου με την αύξηση της αρχικής πυκνότητας και τη μείωση της θερμοκρασίας (διπλασιασμός). Οι ρυθμοί ζύμωσης των μονοκαλλιεργειών βρέθηκαν ανάλογοι με αυτούς της αρχικής σειράς πειραμάτων ενώ στη μικτή καλλιέργεια ο χρόνος ζύμωσης βρέθηκε λίγο μικρότερος (1-2 ημέρες) από αυτόν της απλής καλλιέργειας *T. delbrueckii*. Οι τιμές pH και χρώματος στο τελικό προϊόν δεν εμφάνισαν σημαντικές αποκλίσεις μεταξύ τους, ενώ όσον αφορά στην πικράδα υψηλότερες τιμές προέκυψαν στην περίπτωση της *M. pulcherrima*. Επιπλέον μελετήθηκε το αρωματικό προφίλ των διαφορετικών μπιρών, όπου και οι δύο μελετώμενοι

non-*Saccharomyces* μικροοργανισμοί παρουσίασαν ενδιαφέροντα στοιχεία φρούτων και λουλουδιών χωρίς να παράγουν ουσίες με αρνητικά αρώματα(off-flavor). Συγκεκριμένα διαπιστώθηκε η έντονη παραγωγή ισοαμυλικής, ενεργής αμυλικής και φαινυλαιθυλικής αλκοόλης και από τους δύο μη συμβατικούς μύκητες και η παραγωγή εστέρων όπως , ο καπρικός και ο καπρυλικός αιθυλεστέρας και ο οξικός φαινυλαιθυλεστέρας. Στην περίπτωση της *M. pulcherrima* παρατηρήθηκαν ακόμη πιο έντονα πικρικά και φυτικά αρώματα που προέρχονται από τον λυκίσκο.

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. However, it's been very difficult to find maltose-positive yeast strains and also determine the fermentation parameters of each, in order to produce a normal gravity beer with the desirable features.

In the present study, two different non-*Saccharomyces* yeasts were studied for their ability to metabolize maltose, as well as the aroma and flavour profile of the produced beer. In particular, the yeast strains that were chosen in this study are *Torulaspora delbrueckii* and *Metschnikowia pulcherrima* in both pure and mixed cultures with a *Saccharomyces cerevisiae*. All the results were compared to those of the conventional *Saccharomyces* yeast.

In the first series of experiments, we studied the ability of the two non-*Saccharomyces* to ferment the three basic sugars of beer (glycose, fructose and maltose) in artificial substrates rich in nutrients. Each yeast strain was vaccinated in four substrates, containing a different type of sugar (glycose, fructose, maltose and a mix with proportions 9, 5 and 86%, respectively). The fermentation was carried out at a temperature of 20 °C and the results showed that both *T. delbrueckii* and *M. pulcherrima* have the ability to metabolise the three sugars but in a different rate. In particular, the substrate with all three sugars and the conventional yeast needed 9 days to complete fermentation, *M. pulcherrima* 11 and *T. delbrueckii* 14 days. Despite the different rates both of the non-*Saccharomyces* managed to grow, metabolise the sugars and produce ethanol in slightly lower but generally respective percentages to the conventional microorganism ($\approx 5\%$ v/v).

In the second series of experiments four different yeast cultures were evaluated for a Pale Ale beer production. In particular, pure cultures of *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii* and *M. pulcherrima* and a mixed culture of the conventional yeast with *T. delbrueckii*, in proportion 1:10, were used to ferment beer wort in an average temperature of 20 °C. The experiment was carried out twice, the first time, the original gravity of the wort was 12.6 ° P and the pH value 5.4, whereas, the second time 14.5 and 5.7, respectively. It was found that the increase in the original gravity seriously affects the fermentation time, in the second experiment the time was almost two times bigger in each culture. Concerning the fermentation rate of the different cultures, it was found that the rate of *M. pulcherrima* was the same as the conventional yeast, contrary to the cultures of *T. delbrueckii* that the rate was found slower. The ethanol content, the pH value and the colour of the produced beers were comparable to those of the *S. cerevisiae* strain, but the beer that was produced from the *M. pulcherrima* was found bitterer. Moreover beers were characterized by a distinctive overall analytical and aromatic profile. Indeed were found that the two non conventional yeast are capable of producing aromatic components such as higher alcohols and esters which form a fruity and floral aromatic profile.

Keywords: non-*Saccharomyces*; *Torulaspora delbrueckii*; *Metschnikowia pulcherrima*; beer

Περιεχόμενα

Περίληψη	1
Abstract.....	3
Περιεχόμενα	4
Ευρετήριο διαγραμμάτων.....	7
Ευρετήριο πινάκων	8
Πρόλογος.....	11
Εισαγωγή.....	12
Θεωρητικό μέρος.....	13
1. Η ιστορία της μπίρας	13
1.1 Μεσοποταμία	13
1.2 Η Αίγυπτος	14
1.3 Η Ευρώπη	14
1.4 Οι ανακαλύψεις του 19ου αιώνα	15
2. Τα βασικά στάδια παραγωγής της μπίρας.....	15
2.1 Βυνοποίηση.....	15
2.2 Ζυθοποίηση.....	16
3. Τα βασικά συστατικά της μπίρας.....	18
3.1 Η βύνη.....	18
3.2 Το νερό	20
3.3 Ο λυκίσκος.....	21
3.4 Η ζύμη	23
3.4.1 Γενικά χαρακτηριστικά των ζυμών	23
3.4.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	27
4. Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της μπίρας	28
4.1 Χρώμα.....	28
4.1.1 Η αντίδραση Maillard	28
4.1.2 Η οξειδωση των πολυφαινολών.....	28
4.2 Αφρός.....	29
4.3 Το Θόλωμα.....	29
4.4 Άρωμα-γεύση (flavour)	30
4.4.1 Δευτερογενείς μεταβολίτες	30
4.4.2 Εξωτερικοί παράγοντες	35
5. Non-saccharomyces ζύμες	38

1. Η εξέλιξη των non- <i>Saccharomyces</i> ζυμών.....	38
2. Τα κυριότερα στελέχη non- <i>Saccharomyces</i> που έχουν χρησιμοποιηθεί στην ζυθοποιεία	39
3. <i>Torulaspora delbrueckii</i>	40
4. <i>Metschnikowia pulcherrima</i>	42
Πειραματικό μέρος	44
1. Σχεδιασμός πειραμάτων	44
2. Πειραματική διαδικασία.....	45
2.1 Αντιδραστήρια & Όργανα	45
2.2 Προετοιμασία των υποστρωμάτων αναφοράς.....	46
2.3 Εμβολιασμός υποστρωμάτων	47
2.4 Παρασκευή ζυθογλεύκους	48
2.5 Εμβολιασμός ζυθογλεύκους	48
3. Αναλυτικές μέθοδοι.....	49
3.1 Μέτρηση πληθυσμού και βιωσιμότητας.....	49
3.2 Μέτρηση σακχάρων	50
3.3 Προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε αιθανόλη	51
3.4 Μέτρηση διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου (FAN)	54
3.5 Προσδιορισμός Πικράδας (Beer Bitterness)	55
3.6 Προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε γλυκερίνη	55
3.7 Προσδιορισμός χρώματος	57
3.8 Ανάλυση αρωματικών.....	58
Παρουσίαση αποτελεσμάτων και σχολιασμός.....	60
A Πείραμα ζύμωσης απλών σακχάρων	60
A.1 Μελέτη της ανάπτυξης των μικροοργανισμών σε πρότυπο υπόστρωμα	60
A.2 Μελέτη της κατανάλωσης σακχάρων	64
A.3 Μελέτη της παραγωγής αιθανόλης.....	68
A.4 Συνολικά διαγράμματα εξέλιξης της ζύμωσης.....	70
A.5 Συγκριτικά διαγράμματα	77
A.6 Μεταβολές pH	79
A.7 Μεταβολή διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου (FAN).....	80
A.8 Προσδιορισμός αρωματικού προφίλ	81
A.9 Συμπεράσματα.....	88

B	Παραγωγή μπύρας.....	88
B.1	Πυκνότητα σακχάρων	88
B.2	Μεταβολή pH.....	90
B.3	Καμπύλες κατανάλωσης διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου.....	92
B.4	Προσδιορισμός πικράδας στο τελικό προϊόν	94
B.5	Προσδιορισμός χρώματος	95
B.6	Προσδιορισμός αιθανόλης.	97
B.7	Προσδιορισμός γλυκερίνης.....	98
B.8	Προσδιορισμός αρωματικού προφίλ	99
	Συμπεράσματα	109
	Βιβλιογραφία	112
	Παράρτημα	116

Ευρετήριο εικόνων

Εικόνα 1:	Ο ύμνος στη θεά της ζυθοποιίας Ninkasi (Ταταρίδης & Κεχαγιά, 2010).....	13
Εικόνα 2:	Αιγυπτιακή τοιχογραφία που αναπαριστά τη διαδικασία ζυθοποίησης (Ταταρίδης & Κεχαγιά, 2010).....	14
Εικόνα 3:	Διάγραμμα ροής παραγωγής μπύρας.....	17
Εικόνα 4:	Τα τέσσερα βασικά συστατικά της μπύρας (Pesce, 2015).....	18
Εικόνα 5:	Διαφορετικά είδη βύνης που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή μπύρας (Brison, 2014).	19
Εικόνα 6:	Τα βασικά ζυμώσιμα σάκχαρα που προέρχονται από τη βύνη (Ταταρίδης & Κεχαγιά, 2010).....	19
Εικόνα 7:	Η ισομερίωση των α και β-οξέων του λυκίσκου (Lewis & Bamforth, 2006).....	22
Εικόνα 8:	ο χημικός τύπος μερικών από τα πιο σημαντικά μονοτερπένια (Schönberger & Kostelecky, 2011).....	23
Εικόνα 9:	Καμπύλη ανάπτυξης μικροοργανισμού (Αρβανιτίδου-Βαγιωνά, 2016).....	23
Εικόνα 10:	Εισροές και εκροές κατά την ζύμωση του γλεύκους (Lewis & Bamforth, 2006). ..	25
Εικόνα 11:	Το μονοπάτι EMP (Embden-Meyerhof-Parnas) (Lewis & Bamforth, 2006).	26
Εικόνα 12:	Η μετατροπή του πυροσταφυλικού οξέος σε αιθανόλη (Lewis & Bamforth, 2006).	26
Εικόνα 13:	Ο μικροοργανισμός <i>S. cerevisiae</i> όπως φαίνεται από το μικροσκόπιο (König, et al., 2009).....	27
Εικόνα 14:	Το μονοπάτι Ehrlich (Pires, et al., 2014).	31
Εικόνα 15:	Η χημική αντίδραση που περιγράφει την παραγωγή του οξικού αιθυλεστέρα από αιθανόλη και οξικό οξύ (Pires, et al., 2014).....	33
Εικόνα 16:	Ο μικροοργανισμός <i>T. delbrueckii</i> όπως φαίνεται από το μικροσκόπιο (van Breda, et al., 2013).	40

Εικόνα 17: Ο μικροοργανισμός <i>M. pulcherrima</i> όπως φαίνεται από το μικροσκόπιο (Fernandez, et al., 2000).....	42
Εικόνα 18: Κλίμακα της μεθόδου SRM.....	95
Εικόνα 19: Χρωματική αναπαράσταση στον χώρο, των παραμέτρων της διεθνούς κλίμακας CIELab	96

Ευρετήριο διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1: Καμπύλες ανάπτυξης του <i>S. cerevisiae</i> στα διαφορετικά υποστρώματα καθαρών σακχάρων και μίγματος.....	60
Διάγραμμα 2: Καμπύλες ανάπτυξης της <i>T. delbrueckii</i> ζύμωσης στα διαφορετικά υποστρώματα σακχάρων και μίγματος.....	61
Διάγραμμα 3: Καμπύλες ανάπτυξης της <i>M. pulcherrima</i> ζύμωσης στα διαφορετικά υποστρώματα σακχάρων και μίγματος.....	61
Διάγραμμα 4: Βιωσιμότητα των κυττάρων του <i>S. cerevisiae</i> κατά την διάρκεια της ζύμωσης στα διαφορετικά υποστρώματα σακχάρων και μίγματος.....	62
Διάγραμμα 5: Βιωσιμότητα των κυττάρων της <i>T. delbrueckii</i> κατά την διάρκεια ζύμωσης στα διαφορετικά υποστρώματα σακχάρων και μίγματος.	62
Διάγραμμα 6: %Βιωσιμότητα των κυττάρων της <i>M. pulcherrima</i> κατά την διάρκεια της ζύμωσης στα διαφορετικά υποστρώματα σακχάρων και μίγματος.	63
Διάγραμμα 7: Καμπύλη αναφοράς της γλυκόζης για την μέθοδο DNS.	64
Διάγραμμα 8: Καμπύλη αναφοράς της φρουκτόζης για την μέθοδο DNS.	65
Διάγραμμα 9: Καμπύλη αναφοράς της μαλτόζης για την μέθοδο DNS.	65
Διάγραμμα 10: Καμπύλη κατανάλωσης σακχάρων του <i>S. cerevisiae</i> στα διαφορετικά υποστρώματα σακχάρων και μίγματος.....	66
Διάγραμμα 11: Καμπύλη κατανάλωσης σακχάρων της <i>T. delbrueckii</i> στα διαφορετικά υποστρώματα σακχάρων και μίγματος.....	66
Διάγραμμα 12: Καμπύλη κατανάλωσης σακχάρων της <i>M. pulcherrima</i> στα διαφορετικά υποστρώματα σακχάρων και μίγματος.....	67
Διάγραμμα 13: Καμπύλες παραγωγής αιθανόλης του <i>S. cerevisiae</i> στα διαφορετικά υποστρώματα σακχάρων και μίγματος.....	68
Διάγραμμα 14: Καμπύλες παραγωγής αιθανόλης της <i>T. delbrueckii</i> στα διαφορετικά υποστρώματα σακχάρων και μίγματος.....	69
Διάγραμμα 15: Καμπύλες παραγωγής αιθανόλης της <i>M. pulcherrima</i> στα διαφορετικά υποστρώματα σακχάρων και μίγματος.....	69
Διάγραμμα 16: Συνολικό διάγραμμα ζύμωσης της γλυκόζης από τον <i>S. cerevisiae</i>	70
Διάγραμμα 17: Συνολικό διάγραμμα ζύμωσης της φρουκτόζης από τον <i>S. cerevisiae</i>	71
Διάγραμμα 18: Συνολικό διάγραμμα ζύμωσης της μαλτόζης από τον <i>S. cerevisiae</i>	71
Διάγραμμα 19: Συνολικό διάγραμμα ζύμωσης του μίγματος σακχάρων από τον <i>S. cerevisiae</i>	72
Διάγραμμα 20: Συνολικό διάγραμμα ζύμωσης της γλυκόζης από την <i>T. delbrueckii</i>	72
Διάγραμμα 21: Συνολικό διάγραμμα ζύμωσης της φρουκτόζης από την <i>T. delbrueckii</i>	73
Διάγραμμα 22: Συνολικό διάγραμμα ζύμωσης της μαλτόζης από την <i>T. delbrueckii</i>	73

Διάγραμμα 23: Συνολικό διάγραμμα ζύμωσης του μίγματος σακχάρων από την <i>T. delbrueckii</i>	74
Διάγραμμα 24: Συνολικό διάγραμμα ζύμωσης της γλυκόζης από την <i>M. pulcherrima</i>	75
Διάγραμμα 25: Συνολικό διάγραμμα ζύμωσης της φρουκτόζης από την <i>M. pulcherrima</i>	75
Διάγραμμα 26: Συνολικό διάγραμμα ζύμωσης της μαλτόζης από την <i>M. pulcherrima</i>	76
Διάγραμμα 27: Συνολικό διάγραμμα ζύμωσης του μίγματος σακχάρων από την <i>M. pulcherrima</i>	76
Διάγραμμα 28: Καμπύλες ανάπτυξης των κυττάρων των τριών μικροοργανισμών σε υπόστρωμα μίγματος σακχάρων.....	77
Διάγραμμα 29: Καμπύλες κατανάλωσης σακχάρων των τριών μικροοργανισμών σε υπόστρωμα μίγματος σακχάρων.....	78
Διάγραμμα 30: Καμπύλες παραγωγής αιθανόλης των τριών μικροοργανισμών σε υπόστρωμα μίγματος σακχάρων.....	78
Διάγραμμα 31: Καμπύλες μείωσης της πυκνότητας των σακχάρων στο ζυμώμενο γλεύκος των διαφορετικών μικροοργανισμών στο Πείραμα 1.....	89
Διάγραμμα 32: Καμπύλες μείωσης της πυκνότητας των σακχάρων στο ζυμώμενο γλεύκος των διαφορετικών μικροοργανισμών στο Πείραμα 2.....	89
Διάγραμμα 33: Καμπύλες μεταβολής του pH στις διαφορετικές μπύρες στο πείραμα 1.....	91
Διάγραμμα 34: Καμπύλες μεταβολής του pH στις διαφορετικές μπύρες στο πείραμα 2.....	91
Διάγραμμα 35: Καμπύλες κατανάλωσης διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου από τον εκάστοτε μικροοργανισμό στο πείραμα 1.	92
Διάγραμμα 36: Καμπύλες κατανάλωσης διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου από τον εκάστοτε μικροοργανισμό στο πείραμα 2.....	93

Ευρετήριο πινάκων

Πίνακας 1: Η σύσταση του νερού σε διάφορα χαρακτηριστικά είδη μπύρας (Lewis, 1997)...	21
Πίνακας 2: Το χαρακτηριστικό άρωμα και το όριο ανίχνευσης όλων των ουσιών που προέκυψαν από την αέρια χρωματογραφία μάζας.	36
Πίνακας 3: Συνταγή υποστρώματος αναφοράς (Kennedy, et al., 1997).	46
Πίνακας 4: Ποσότητα σακχάρων που προστέθηκαν σε κάθε υπόστρωμα (Kennedy, et al., 1997).	46
Πίνακας 5: Ποσότητα μικροοργανισμού που χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή του κάθε εμβολίου.	47
Πίνακας 6: Συγκέντρωση και βιωσιμότητα κάθε εμβολίου και ποσότητες εμβολιασμού.....	47
Πίνακας 7: Ποσότητες ξηρής ζύμης για τον εμβολιασμό του ζυθογλεύκους.	49
Πίνακας 8: Οι τιμές pH των διαφορετικών συστημάτων μικροοργανισμού-σακχάρου.	79
Πίνακας 9: Μετρήσεις διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου (FAN) και κατανάλωση αυτού από τους διάφορους συνδυασμούς μικροοργανισμού-υποστρώματος.	80
Πίνακας 10: Οι αλκοόλες που παράχθηκαν από τους τρεις μικροοργανισμούς στα υποστρώματα γλυκόζης.....	81
Πίνακας 11: Τα οξέα που παράχθηκαν από τους τρεις μικροοργανισμούς στα υποστρώματα γλυκόζης.....	81
Πίνακας 12: Οι εστέρες που παράχθηκαν από τους τρεις μικροοργανισμούς στα υποστρώματα γλυκόζης.....	82

Πίνακας 13: Οι υδρογονάνθρακες που παράχθηκαν από τους τρεις μικροοργανισμούς στα υποστρώματα γλυκόζης.	82
Πίνακας 14: Οι αλκοόλες που παράχθηκαν από τους τρεις μικροοργανισμούς στα υποστρώματα φρουκτόζης.	82
Πίνακας 15: Τα οξέα που παράχθηκαν από τους τρεις μικροοργανισμούς στα υποστρώματα φρουκτόζης.	83
Πίνακας 16: Οι εστέρες που παράχθηκαν από τους τρεις μικροοργανισμούς στα υποστρώματα φρουκτόζης.	83
Πίνακας 17: Οι υδρογονάνθρακες που παράχθηκαν από τους τρεις μικροοργανισμούς στα υποστρώματα φρουκτόζης.	84
Πίνακας 18: Οι αλκοόλες που παράχθηκαν από τους τρεις μικροοργανισμούς στα υποστρώματα μαλτόζης.	84
Πίνακας 19: Τα οξέα που παράχθηκαν από τους τρεις μικροοργανισμούς στα υποστρώματα μαλτόζης.	84
Πίνακας 20: Οι εστέρες που παράχθηκαν από τους τρεις μικροοργανισμούς στα υποστρώματα μαλτόζης.	85
Πίνακας 21: Οι υδρογονάνθρακες που παράχθηκαν από τους τρεις μικροοργανισμούς στα υποστρώματα μαλτόζης.	85
Πίνακας 22: Οι αλκοόλες που παράχθηκαν από τους τρεις μικροοργανισμούς στα υποστρώματα μίγματος σακχάρων.	86
Πίνακας 23: Τα οξέα που παράχθηκαν από τους τρεις μικροοργανισμούς στα υποστρώματα μίγματος σακχάρων.	86
Πίνακας 24: Οι εστέρες που παράχθηκαν από τους τρεις μικροοργανισμούς στα υποστρώματα μίγματος σακχάρων.	87
Πίνακας 25: Οι υδρογονάνθρακες που παράχθηκαν από τους τρεις μικροοργανισμούς στα υποστρώματα μίγματος σακχάρων.	87
Πίνακας 26: Μετρήσεις της πικράδας της μπύρας στα πειράματα 1 & 2.	94
Πίνακας 27: Οι τιμές χρώματος των διαφορετικών δειγμάτων μπύρας του Πειράματος 1 (αρχική πυκνότητα 12 °Plato, θερμοκρασία 24 °C) σύμφωνα με την πρότυπη φωτομετρική μέθοδο SRM.	95
Πίνακας 28: Οι τιμές χρώματος των διαφορετικών δειγμάτων μπύρας του Πειράματος 2 (αρχική πυκνότητα 14.5 °Plato, θερμοκρασία 20 °C) σύμφωνα με την πρότυπη φωτομετρική μέθοδο SRM.	95
Πίνακας 29: Παράμετροι χρώματος για τις τρεις διαφορετικές μπύρες.	96
Πίνακας 30: Διαφορά του χρώματος των non-Saccharomyces προϊόντων από το προϊόν του <i>S. cerevisiae</i>	97
Πίνακας 31: Περιεκτικότητα σε αιθανόλη (ABV) στις διαφορετικές μπύρες των δύο πειραμάτων.	97
Πίνακας 32: Περιεκτικότητα σε γλυκερίνη στις διαφορετικές μπύρες των δύο πειραμάτων. ...	98
Πίνακας 33: Συγκριτικός πίνακας των αλκοολών που παράχθηκαν από κάθε σύστημα μικροοργανισμού στις μπύρες του Πειράματος 1 (αρχική πυκνότητα 12 °Plato, θερμοκρασία 24 °C).	99
Πίνακας 34: Συγκριτικός πίνακας των οξέων που παράχθηκαν από κάθε σύστημα μικροοργανισμού στις μπύρες του Πειράματος 1 (αρχική πυκνότητα 12 °Plato, θερμοκρασία 24 °C).	100

Πίνακας 35: Συγκριτικός πίνακας των εστέρων που παράχθηκαν από κάθε σύστημα μικροοργανισμού στις μπύρες του Πειράματος 1 (αρχική πυκνότητα 12 °Plato, θερμοκρασία 24 °C).	101
Πίνακας 36: Συγκριτικός πίνακας των υδρογονανθράκων που παράχθηκαν από κάθε σύστημα μικροοργανισμού στις μπύρες του Πειράματος 1 (αρχική πυκνότητα 12 °Plato, θερμοκρασία 24 °C).	102
Πίνακας 37: Συγκριτικός πίνακας των αλκοολών που παράχθηκαν από κάθε σύστημα μικροοργανισμού στις μπύρες του Πειράματος 2 (αρχική πυκνότητα 14.5 °Plato, θερμοκρασία 20 °C).	103
Πίνακας 38: Συγκριτικός πίνακας των οξέων που παράχθηκαν από κάθε σύστημα μικροοργανισμού στις μπύρες του Πειράματος 2 (αρχική πυκνότητα 14.5 °Plato, θερμοκρασία 20 °C).	104
Πίνακας 39: Συγκριτικός πίνακας των εστέρων που παράχθηκαν από κάθε σύστημα μικροοργανισμού στις μπύρες του Πειράματος 2 (αρχική πυκνότητα 14.5 °Plato, θερμοκρασία 20 °C).	105
Πίνακας 40: Συγκριτικός πίνακας των υδρογονανθράκων που παράχθηκαν από κάθε σύστημα μικροοργανισμού στις μπύρες του Πειράματος 2 (αρχική πυκνότητα 14.5 °Plato, θερμοκρασία 20 °C).	106

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία, διεξήχθη κατά το 10^ο και 11^ο εξάμηνο, της Σχολής Χημικών Μηχανικών κατά τη χρονική περίοδο Απριλίου-Δεκεμβρίου 2017. Πραγματοποιήθηκε κατόπιν συνεργασίας, της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου με το Εργαστήριο Βιομοριακής ανάλυσης και Χημείας Οίνου του Τμήματος Οινολογίας και Τεχνολογίας Αποσταγμάτων του ΤΕΙ Αθήνας. Η πειραματική μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιομοριακής ανάλυσης και Χημείας Οίνου του ΤΕΙ Αθήνας, στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας και στο εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων του Ε.Μ.Π..

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την κα Βάσω Ωραιοπούλου καθηγήτρια στο Ε.Μ.Π. και επιβλέπουσα τη διπλωματική εργασία, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου το συγκεκριμένο θέμα. Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω την Φαίη Δρόσου, η οποία πραγματοποιεί τη διδακτορική της Διατριβή με την κα Ωραιοπούλου καθώς μαζί καταφέραμε να φέρουμε σε πέρας την παρούσα εργασία, και για τη βοήθειά της καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής μελέτης και της εκπόνησης της εργασίας. Επιπλέον, οφείλω ιδιαίτερες ευχαριστίες στον καθηγητή κ. Βασίλη Ντουρτόγλου υπεύθυνο του Εργαστήριο Βιομοριακής ανάλυσης και Χημείας Οίνου του ΤΕΙ Αθήνας και στον κ. Παναγιώτη Ταταρίδη επίσης καθηγητή του ΤΕΙ Αθήνας, ο οποίος κατά τον πρώτο καιρό της πειραματικής μελέτης, όποτε αντιμετωπίσαμε δυσκολίες, ήταν πάντα πρόθυμος να μας εξηγήσει και να επιλύσουμε από κοινού το εκάστοτε πρόβλημα. Τέλος θα ήθελα φυσικά να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους φίλους μου για την συνεχή στήριξή τους καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου, και ιδιαίτερα τον φίλο μου Γιάννη Ντέκα με τον οποίο περάσαμε μαζί σε αυτήν τη Σχολή και μαζί θα την ολοκληρώσουμε βοηθώντας και στηρίζοντας πάντα ο ένας τον άλλον.

Εισαγωγή

Κατά τη διάρκεια της ανθρώπινης ιστορίας και στις περισσότερες κοινωνίες, η μπύρα παίζει έναν μοναδικό ρόλο λόγω της οικονομικής και πολιτιστικής της σημασίας. Ήδη από το 4000 π.Χ. η μπύρα αποτελούσε αναπόσπαστο κομμάτι της κοινωνικής αλλά και της οικονομικής ζωής πολλών πολιτισμών. Η μπύρα εξακολουθεί να είναι ένα από τα πιο διαδεδομένα αλκοολούχα ποτά του σύγχρονου κόσμου και ένα από τα κατεξοχήν προτερήματά της είναι το γεγονός ότι συναντάται σε πολλές διαφορετικές παραλλαγές και είδη. Η βιομηχανία παραγωγής της είναι σήμερα πολύ ανεπτυγμένη περιλαμβάνοντας αρκετές και οικονομικά ισχυρές πολυεθνικές εταιρείες.

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

Η υψηλή ζήτηση από τους καταναλωτές και η ανταγωνιστικότητα μεταξύ των διαφορετικών ζυθοποιιών έχουν οδηγήσει στην ανάγκη βελτίωσης της ποιότητας της μπύρας και αύξησης της πολυπλοκότητας της. Τα αρώματα της μπύρας 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 μπύρας 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 τη 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 τη βιομηχανία του κρασιού.

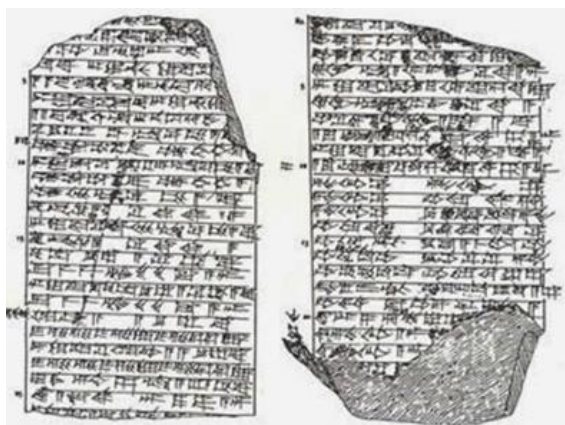
Στην παρούσα εργασία θα εξετάσουμε τη δυνατότητα μεταβολισμού των σακχάρων του ζυθογλεύκους από δύο non-*Saccharomyces* μικροοργανισμούς που προέρχονται από την οينوποιία και στη συνέχεια θα εξετάσουμε τα αρωματικά και λοιπά ποιοτικά χαρακτηριστικά που προσδίδουν οι μικροοργανισμοί αυτοί στην παραγόμενη μπύρα. Οι δύο ζυμομύκητες που θα χρησιμοποιήσουμε είναι η *Torulasporea delbrueckii* και η *Metschnikowia pulcherrima*.

Θεωρητικό μέρος

1. Η ιστορία της μπύρας

1.1 Μεσοποταμία

Η λέξη μπύρα πηγάζει από τη λατινική λέξη *bibere* που σημαίνει πίνω και από την ισπανική *Cerveza* που είναι μετάφραση του ονόματος της ελληνίδας θεάς της καλλιέργειας, Δήμητρας. Η πρώτη απόπειρα παρασκευής μπύρας 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 οδήγησε σε ένα προϊόν που σήμερα είναι γνωστό ως βύνη (Basso, et al., 2016). Αρχαιολογικές πηγές αναφέρουν ότι εκείνη την περίοδο η μπύρα είχε ως πρώτη ύλη κριθάρι, σιτάρι ή και τα δύο. Η έκθεση αυτών των συστατικών στο περιβάλλον του αέρα προκαλούσε την επιμόλυνση αυτών από μύκητες της ατμόσφαιρας με αποτέλεσμα να ξεκινά η ζύμωση. Ορισμένες πηγές, όπως είναι ο «Ύμνος στη Ninkasi» ο οποίος είναι ένας ύμνος στην ομώνυμη θεά της ζυθοποιίας και εμπεριέχει ταυτόχρονα συνταγή μπύρας, αναφέρουν ότι πριν ξεκινήσει η ζύμωση προσέθεταν στο παραπάνω μίγμα κρασί και μέλι (Orpenheim, 1964).

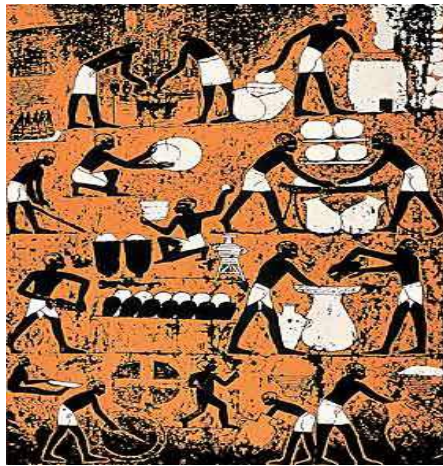


Εικόνα 1: Ο ύμνος στη θεά της ζυθοποιίας Ninkasi (Ταταρίδης & Κεχαγιά, 2010).

Τη 2η χιλιετία οι Βαβυλώνιοι κυριαρχούν στη Μεσοποταμία και συνεχίζουν την παραγωγή μπύρας αυξάνοντας τον αριθμό διαφορετικών ειδών μπύρας από 9 σε 70 χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη άσπρο δίκοκκο σιτάρι γνωστό και ως *emmer* και κριθάρι (Meusdoerffer & Eßlinger, 2009). Οι πρώτες αυτές μπύρες δεν έμοιαζαν πολύ με τις σύγχρονες, ήταν θολές, αφιλτράριστες και αρκετά πικρές καθώς δεν είχαν την τεχνογνωσία για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων μετά το πέρας της ζύμωσης (Lutz, 1922). Αναφέρεται ακόμη ότι ο Hammurabi, ένας από τους πιο σημαντικούς Βαβυλώνιους βασιλιάδες συνέταξε έναν νόμο ο οποίος καθόριζε την επιτρεπόμενη ημερήσια κατανάλωση ανάλογα με την κοινωνική θέση του ατόμου. Δηλαδή ένας απλός εργάτης δικαιούταν μόλις 2 L μπύρα την ημέρα, ένας δημόσιος υπάλληλος αντίστοιχα 3 L, ενώ οι διαχειριστές του κράτους και οι ιερείς ως πιο προνομιούχοι έφταναν τα 5 L (Ταταρίδης & Κεχαγιά, 2010).

1.2 Η Αίγυπτος

Με την πάροδο των χρόνων τα ηνία στη ζυθοποιία ανέλαβαν οι Αιγύπτιοι, και η πρώτη ιστορική αναφορά χρονολογείται περίπου το 3500π.Χ. Οι Αιγύπτιοι για την παρασκευή μπίρας, χρησιμοποίησαν κριθάρι, ενώ μερικές μόνο παράγονταν εξ ολοκλήρου από emmer. Στις περισσότερες αιγυπτιακές μπίρες χρησιμοποιείτο 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. Παράλληλα η παραγωγή μπίρας διαδίδεται και σε άλλα μέρη του κόσμου όπου παράγεται από διάφορες πρώτες ύλες όπως για παράδειγμα η Changisa (μπύρα τύπου Θιβέτ), η Chichais από καλαμπόκι και η Kumis από γάλα καμήλας (Nicholson & Shaw, 2000).



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

1.3 Η Ευρώπη

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 την 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 (Weihestephan) (Ταταρίδης & Κεχαγιά, 2010). Εκείνη την εποχή οι Σκανδιναβοί και οι Γερμανοί χρησιμοποιούσαν κατά την παρασκευή της μπίρας ένα μείγμα από βότανα και φυτά, ονομαζόμενο “gruit” το οποίο περιείχε μεταξύ άλλων γλυκάνισο, δενδρολίβανο, 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 νερό, βυνοποιημένο κριθάρι, βυνοποιημένο σιτάρι και ο λυκίσκος (Meussdoerffer & Eßlinger, 2009).

1.4 Οι ανακαλύψεις του 19ου αιώνα

Στη σύγχρονη εποχή και συγκεκριμένα στις αρχές του 19ου αιώνα δύο επαναστατικές ανακαλύψεις συμβάλλουν στην παραγωγή της μπίρας. Η πρώτη ήταν η ατμομηχανή του James Watt, που είχε ως 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 (Meussdoerffer & Eßlinger, 2009). 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. Ως 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 την μπίρα έγινε από τον Christian Hansen 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 αντικαταστήθηκαν από μεταλλικά διευκολύνοντας έτσι το καθάρισμα, το γέμισμα, το κλείσιμο και το σφράγισμα (Ταταρίδης & Κεχαγιά, 2010).

2. Τα βασικά στάδια παραγωγής της μπίρας

Η παραγωγική διαδικασία για τη δημιουργία της μπίρας ακολουθεί κάποια βασικά στάδια ανεξάρτητα από τη χώρα καταγωγής της, τον ειδικό τύπο της και το εκάστοτε ζυθοποιείο. Τα στάδια αυτά είναι:

2.1 Βυνοποίηση

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. Τα στάδια παρασκευής βύνης είναι τέσσερα:

- Η παραλαβή και διαλογή της πρώτης ύλης. 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 καθάρισμός αυτής από ξένες ύλες, με τη βοήθεια απορροφητήρων και ταξινόμηση των σπόρων κατά μέγεθος με τη χρήση παλλόμενων κόσκινων (Gupta, et al., 2010).
- 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 (Gupta, et al., 2010).

- ο Το τελικό στάδιο της βυνοποίησης είναι η ξήρανση-φρίξη με ατμό και η αποθήκευση της βύνης. Η ξήρανση της βύνης έχει ως στόχο την αδρανοποίηση των ενζύμων που παράχθηκαν χωρίς όμως την καταστροφή 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. Η διάρκεια της φρίξης 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).

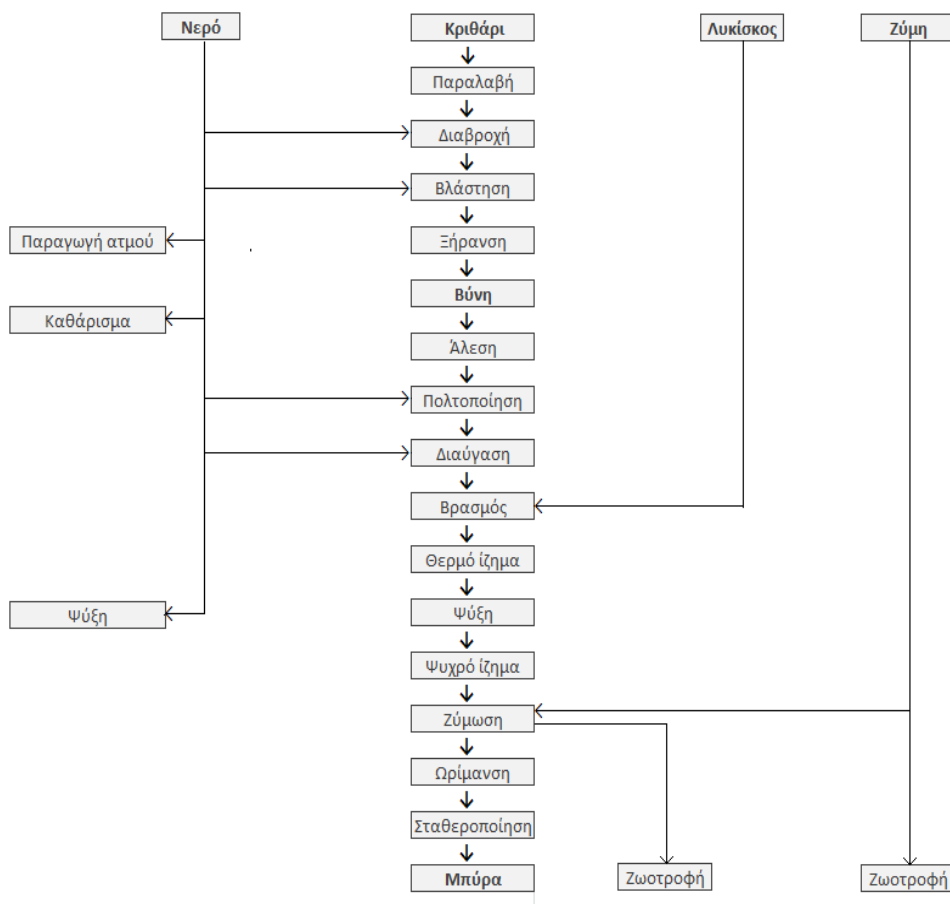
2.2 Ζυθοποίηση

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:

- ο 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).
- ο 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 στην 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 μεγαλύτερη των 78°C ώστε να καταστραφούν τα παραπάνω ένζυμα.
- ο 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.
- ο 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 κατακάθονται (Fix, 1999).

- 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 οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της μπύρας. Η θερμοκρασία ζύμωσης εξαρτάται από το είδος της μπύρας (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 μπύρας. Δηλαδή η ωρίμανση αποτελεί ένα στάδιο φυσικής σταθεροποίησης (Rosa, 2010).
- 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).
- 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.

Στην εικόνα 3 παρουσιάζεται το διάγραμμα ροής της παραγωγής μπύρας:



Εικόνα 3:Διάγραμμα ροής παραγωγής μπύρας.

3. Τα βασικά συστατικά της μπίρας

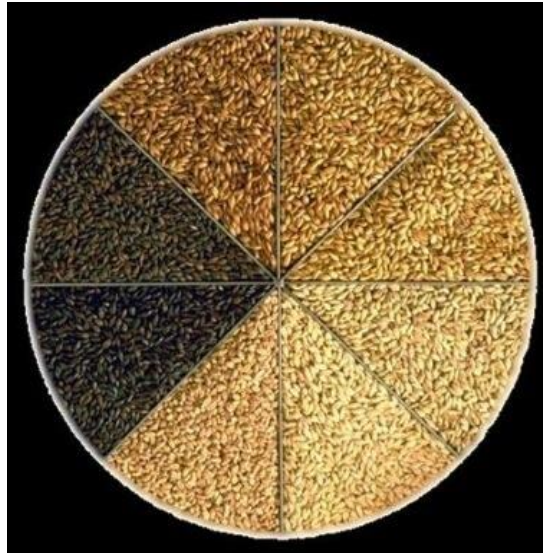


Εικόνα 4: Τα τέσσερα βασικά συστατικά της μπίρας (Pesce, 2015).

3.1 Η βύνη

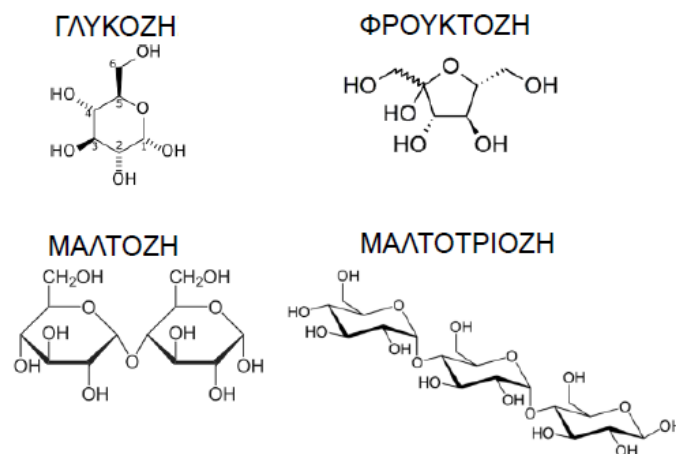
Η βύνη όπως έχει ήδη αναφερθεί είναι προϊόν που προκύπτει με κατεργασία του κριθαριού ή άλλων δημητριακών ενώ χρησιμοποιείται και για την παραγωγή άλλων τροφίμων πέρα από την μπίρα. Οι κυριότερες πρώτες ύλες για την παραγωγή βύνης είναι το κριθάρι, το σιτάρι, η βρώμη, το καλαμπόκι και το ρύζι. Η βύνη από κριθάρι όμως είναι η πιο διαδεδομένη επειδή η περιεκτικότητά της σε ένζυμα είναι μεγαλύτερη σε σχέση με τα άλλα δημητριακά και ακόμη επειδή δεν είναι τόσο επιρρεπής σε ανεπιθύμητα βακτήρια (Ταταρίδης & Κεχαγιά, 2010). 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%) και να είναι αρκετά χαμηλό σε υγρασία (12% -14%) (Lewis & Bamforth, 2006).

Η βύνη χωρίζεται σε δύο κατηγορίες. Αποτελείται από τη βύνη βάσης, όπως λέγεται 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).



Εικόνα 5: Διαφορετικά είδη βύνης που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή μπίρας (Brison, 2014).

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 (αντιδράσεις Maillard) που οδηγεί μέσα από πολλά στάδια στην παραγωγή σκουρόχρωμων προϊόντων (Τζιά, et al., 2008). Η βύνη περιέχει ακόμη δεξτρίνες που είναι μη ζυμώσιμοι ολιγοσακχαρίτες και 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 στην μπίρα (Lewis & Bamforth, 2006).



Εικόνα 6: Τα βασικά ζυμώσιμα σάκχαρα που προέρχονται από τη βύνη (Ταταριδής & Κεχαγιά, 2010).

3.2 Το νερό

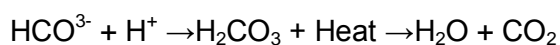
Η ποιότητα του νερού που χρησιμοποιείται κατά τη ζυθοποίηση είναι πολύ σημαντικός παράγοντας που διαμορφώνει τον χαρακτήρα του τελικού προϊόντος καθώς σχεδόν το 90-95% της μπίρας είναι νερό. Στο παρελθόν μάλιστα η μεταλλικότητά του επηρέαζε σε μεγάλο βαθμό τη γεύση της μπίρας αλλά έδινε και το στίγμα 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).

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 γλεύκος, 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 για 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 εκχυλισιμότητα των ταννικών και φαινολικών ουσιών από το φλοιό της βύνης. Ένα ακόμη στάδιο της ζυθοποίησης το οποίο εξαρτάται από το pH είναι ο βρασμός, καθώς οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκειά ευνοούνται σε σχετικά υψηλές τιμές pH και καθορίζουν το χρώμα, τα αρωματικά στοιχεία και την ενσωμάτωση του λυκίσκου. 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 στη γεύση τα ιόντα αυτά ανάλογα με τη συγκέντρωσή τους μπορούν να προσδώσουν πολύ γλυκά ή ακόμη και πολύ πικρά αρώματα (Lewis, 1997).

Στον πίνακα 1 παρουσιάζονται ορισμένα πολύ χαρακτηριστικά είδη μπίρας και οι αντίστοιχες συστάσεις του νερού της περιοχής:

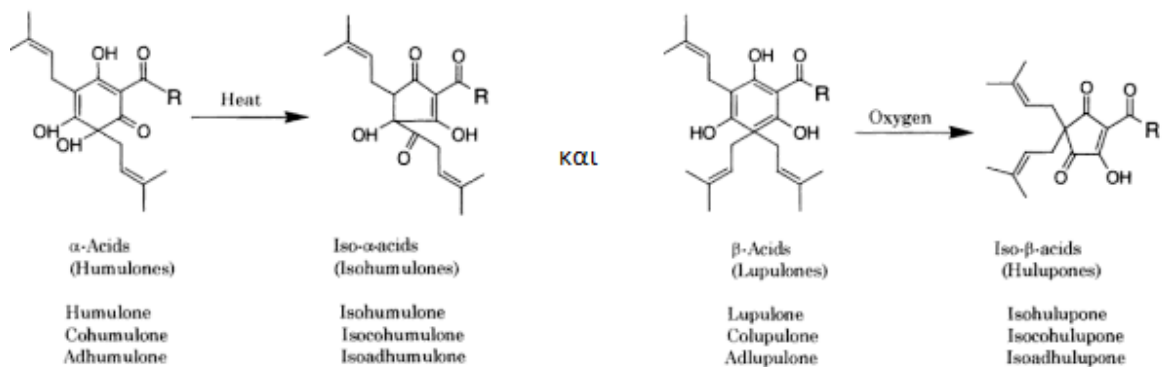
Πίνακας 1: Η σύσταση του νερού σε διάφορα χαρακτηριστικά είδη μπύρας (Lewis, 1997).

Ion	Burton-on-Trent (pale ales)	Dortmund (pale lagers)	Dublin (stout,porter & mild ales)	London (stout,porter & mild ales)	Munich (dark lagers)	Pilsen (pilsner)
Calcium	268	260	80	90	80	7
Magnesium	62	23	19	4	18	1
Bicarbonate	282	540	328	246	328	18
Sodium	30	69	1	24	1	3
Chloride	36	106	1	18	1	5
Sulfate	638	283	5	58	5	6
Residual Alkanity	0.1	4.9	4.0	2.7	4.0	0.2

3.3 Ο λυκίσκος

Κανένα άλλο από τα βασικά συστατικά της μπύρας δεν έχει μελετηθεί και αναπτυχθεί τόσο όσο ο λυκίσκος ο οποίος θεωρείται ένα από τα βασικότερα αρωματικά και γευστικά συστατικά της μπύρας. Παρόλα αυτά έχει ταυτόχρονα εξαιρετική δράση και ως αντιμικροβιακός παράγοντας, δηλαδή δρα ως συντηρητικό στην μπύρα (Schönberger & Kostecky, 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 μπύρας 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 μπύρα προέρχεται από τα α- και β-οξέα τα οποία είναι τα βασικά συστατικά του λυκίσκου και η διαφορά 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 τη ζυθοποίηση (Schönberger & Kostecky, 2011). Τα α-οξέα που είναι πολύ λίγο διαλυτά σε κρύο νερό (3ppm), κατά τη 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).

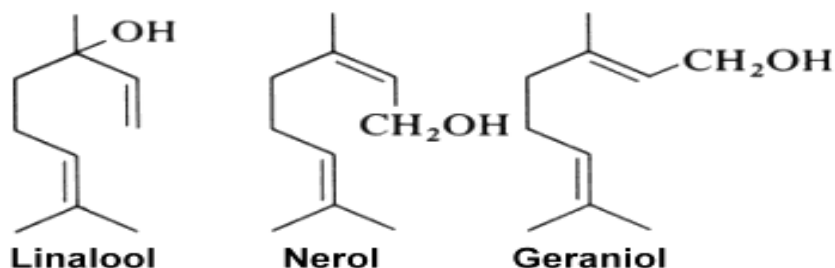


Εικόνα 7: Η ισομερίωση των α και β -οξέων του λυκίσκου (Lewis & Bamforth, 2006).

Τα α και β -οξέα οξειδώνονται κατά την διάρκεια της αποθήκευσης σε άλλα πιο διαλυτά συστατικά. Μεταξύ αυτών βρέθηκε ότι τα ίσο- 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 μπύρας (Michel, et al., 2016,b). Τα ίσο- 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 μπύρας είναι πάντα ο αφρός της (Yonezawa & Fushiki, 2002).

Τα ποσοστά πικράδας μιας μπύρας 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 ίσο- α -οξέων, υπό την προϋπόθεση ότι υπάρχουν σε επαρκή ποσότητα. Με αύξηση του pH και ιδιαίτερα παρουσία κατιόντων ασβεστίου (Ca^{2+}) οι αντιδράσεις ισομερίωσης επιταχύνονται με αποτέλεσμα την παραγωγή μεγαλύτερης ποσότητας α -ίσο-οξέων, παράλληλα όμως υποβαθμίζεται σημαντικά το χρώμα και η πικράδα της μπύρας. Για τον λόγο αυτό σε μαύρες και stout μπύρες μπορούν να ρυθμιστούν υψηλότερα pH (Lewis & Bamforth, 2006).

Όσον αφορά τα αρώματα που δίνει ο λυκίσκος στην μπύρα, αυτά προέρχονται από ενώσεις οι οποίες ονομάζονται μονοτερπένια. Οι ουσίες αυτές προέρχονται από φυτά και προσδίδουν έντονα αρώματα λουλουδιών στην μπύρα, αλλά και στο κρασί. Οι κυριότερες από αυτές τις ουσίες είναι η λιναλόλη (5mg/L, άρωμα λεβάντας), η α -τερπινεόλη (2mg/L άρωμα πασχαλιάς), η β -κιτρονελλόλη (8mg/L, άρωμα λεμονιού και λάιμ), η γερανιόλη (6mg/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 μπύρας (Yonezawa & Fushiki, 2002).



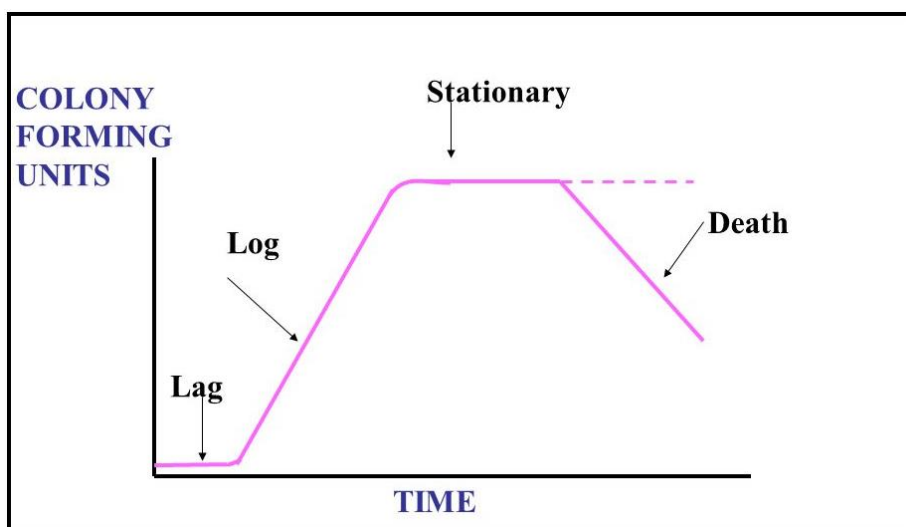
Εικόνα 8: ο χημικός τύπος μερικών από τα πιο σημαντικά μονοτερπένια (Schönberger & Kostelecky, 2011).

Έχει βρεθεί ότι ένα ανεπιθύμητο άρωμα που μπορεί να συναντήσει κάποιος στην μπύρα 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 βρετανομύκτης. Το άρωμα αυτό μπορεί να είναι αποδεκτό σε κάποια είδη μπύρας αλλά όχι σε όλα (Carr, 2016).

3.4 Η ζύμη

3.4.1 Γενικά χαρακτηριστικά των ζυμών

Οι ζύμες μπορούν να οριστούν ως μονοκύτταροι μύκητες, οι οποίοι 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). 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 9 (Nissen, et al., 2003).



Εικόνα 9: Καμπύλη ανάπτυξης μικροοργανισμού (Αρβανιτίδου-Βαγιωνά, 2016).

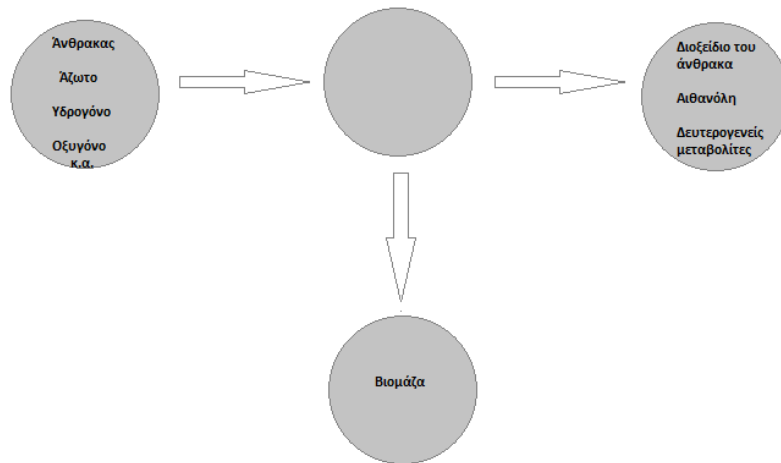
Το βυνογλεύκος είναι η πρώτη ύλη στην οποία θα προστεθεί η ζύμη και μέσω της διαδικασίας της ζύμωσης αυτό το γλυκό και αρκετά ήπιο υγρό θα μετατραπεί σε ένα ποτό που έχει λατρευτεί από την ανθρωπότητα εδώ και χιλιετίες, τη μπύρα. Τέσσερις είναι οι αλλαγές που καθορίζουν αυτή τη μετατροπή:

1. Η απομάκρυνση της γλυκύτητας του γλεύκους, καθώς η ζύμη καταναλώνει τα σάκχαρα με ταυτόχρονη παραγωγή αιθανόλης.
2. Η παραγωγή οξέων από τους ζυμομύκητες, που έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του pH.
3. Η ενανθράκωση του γλεύκους που οφείλεται στην παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα.
4. 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*. Οι ζυθοποιοί επιλέγουν όμως 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 μπύρας, 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 ως 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).

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. Στο σχήμα 10 παρουσιάζονται τα συστατικά που εισρέουν και εκρέουν από το σύστημα κατά τη διάρκεια της ζύμωσης:

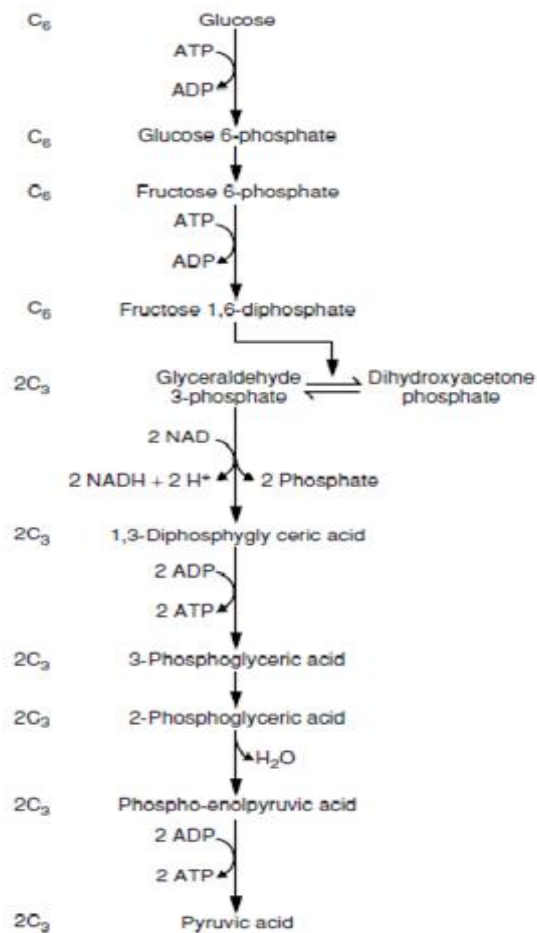


Εικόνα 10: Εισροές και εκροές κατά την ζύμωση του γλεύκους (Lewis & Bamforth, 2006).

Υπάρχουν αρκετές μέθοδοι για τη μελέτη της ανάπτυξης των μικροοργανισμών, οι οποίες όμως δεν χρησιμοποιούνται κατά τη ζυθοποίηση σε κανονική κλίμακα λόγω της κατακράτησης των μικροοργανισμών. Αντίθετα μπορούν να εφαρμοστούν σε πειραματικές ζυμώσεις σε ποσότητες της τάξης των χιλιοστόλιτρων. Μερικές από αυτές τις μεθόδους είναι η απευθείας μέτρηση του πληθυσμού με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου από αναδεδυμένο δείγμα, η μέτρηση του όγκου του ιζήματος μετά από φυγοκέντρηση και η ζύγιση των δειγμάτων που δίνει ως αποτέλεσμα την αύξηση της μάζας του διοξειδίου του άνθρακα η οποία σχετίζεται με την ανάπτυξη των ζυμών. Σε πραγματικά όμως συστήματα δεν μπορεί να εφαρμοστεί καμία από αυτές τις μεθόδους και κατά συνέπεια δεν έχει επιτευχθεί η συσχέτιση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών με την ανάπτυξη των αρωματικών ενώσεων. Παρόλα 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).

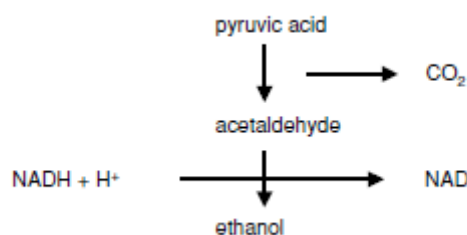
Οι ζυμομύκητες της μπίρας χρησιμοποιούν τα ζυμώσιμα σάκχαρα (γλυκόζη, φρουκτόζη, μαλτόζη και μαλτοτριόζη) σαν πηγή ενέργειας (ATP) για τη γλυκόλυση ή μονοπάτι EMP (Embden-Meyerhof-Parnas) το οποίο οδηγεί στη διάσπαση της γλυκόζης σε δύο μόρια πυροσταφυλικού οξέος. Το πρώτο βήμα της γλυκόλυσης είναι η 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 (Xiros, et al., 2013). Τα προϊόντα αυτά δεν είναι ενδιάμεσα του μονοπατιού, αντίθετα παράγονται όταν ένας σημαντικός μεταβολίτης το NADH, που σχηματίζεται από την οξειδωση 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).

Στην εικόνα 11 παρουσιάζεται μια αναπαράσταση του μονοπατιού της γλυκόλυσης:



Εικόνα 11: 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).

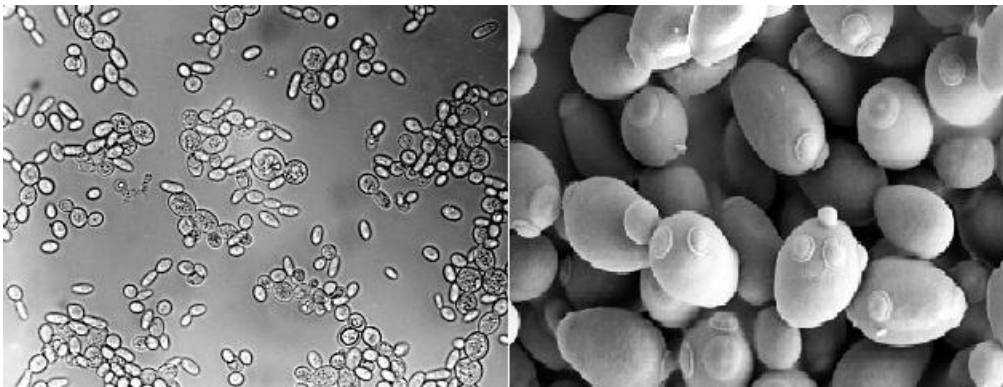


Εικόνα 12: Η μετατροπή του πυροσταφυλικού οξέος σε αιθανόλη (Lewis & Bamforth, 2006).

Από διαφορετικές μεταβολικές οδούς παράγονται μερικά από τα βασικότερα συστατικά που σχετίζονται με τα αρώματα της μπύρας 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 μπύρας (Ταταρίδης & Κεχαγιά , 2010).

3.4.2 *Saccharomyces cerevisiae*

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



Εικόνα 13: Ο μικροοργανισμός *S. cerevisiae* όπως φαίνεται από το μικροσκόπιο (König, et al., 2009).

Ο *S. 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. Ο *S. 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, μπύρας, 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).

Από τις πρώτες κιόλας προσπάθειες παραγωγής μπύρας στην ανθρώπινη ιστορία ο *S. cerevisiae* ήταν η κυρίαρχη ζύμη στις αυθόρμητες ζυμώσεις και έτσι τυχαία συνεχίστηκε η ζύμωση μπύρας με αυτόν τον μικροοργανισμό για αιώνες. 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 μπύρας (Basso, et al., 2016). Μετά από χρόνια μελέτης, οι ζυθοποιοί σήμερα έχουν καταφέρει να έχουν απόλυτη γνώση του τρόπου λειτουργίας, των συνθηκών ζύμωσης, του χρόνου ζύμωσης και των μονοπατιών

μεταβολισμού των σακχάρων και των αμινοξέων όσον αφορά τον *S. 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). Ο *S. cerevisiae* χρησιμοποιείται κυρίως για την παραγωγή αφροζύμωντων μπυρών (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 τις οποίες θα χρησιμοποιήσουν για την παραγωγή άλλων μπυρών.

4. Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της μπίρας

4.1 Χρώμα

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 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 αντίδραση 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 στο γλεύκος, 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 πολυφαινολών

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. Παρόλα 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 Αφρός

Μετά την παρατήρηση του χρώματος, ο αφρός είναι ένα από τα επόμενα χαρακτηριστικά που παρατηρεί κάποιος στην 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 στην 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 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 να παράξει μεγαλύτερη ποσότητα λιπιδίων. Για τον λόγο αυτό μπίρες υψηλού αλκοόλ δεν εμφανίζουν σταθερό και πλούσιο αφρό. Τέλος ο αφρισμός του ποτού επηρεάζεται από το πόσο άφρισε κατά τη ζύμωση και τη μεταφορά του, καθώς κατά τον αφρισμό απομακρύνονται από την μπίρα τα υδρόφοβα συστατικά της τα οποία σταθεροποιούν τον αφρό (Lewis & Bamforth, 2006).

4.3 Το Θόλωμα

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 στην μπίρα είναι η βύνη, παρόλα αυτά το μεγαλύτερο ποσοστό αυτών μετουσιώνεται κατά την πολτοποίηση και το βρασμό. Τα πολυπεπτίδια 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 κατακάθιση 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).

4.4 Άρωμα-γεύση (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. Όπως έχει ήδη αναφερθεί το αρωματικό προφίλ της μπίρας διαμορφώνεται από την ξήρανση της βύνης και τον βρασμό του γλεύκους, την σύστασή του χρησιμοποιούμενου νερού και την περιεκτικότητα του λυκίσκου σε α-οξέα. 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 κακές συνθήκες συσκευασίας και μεταφοράς του προϊόντος.

4.4.1 Δευτερογενείς μεταβολίτες

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).

Στη συνέχεια αναπτύσσονται ορισμένες τέτοιες ενώσεις:

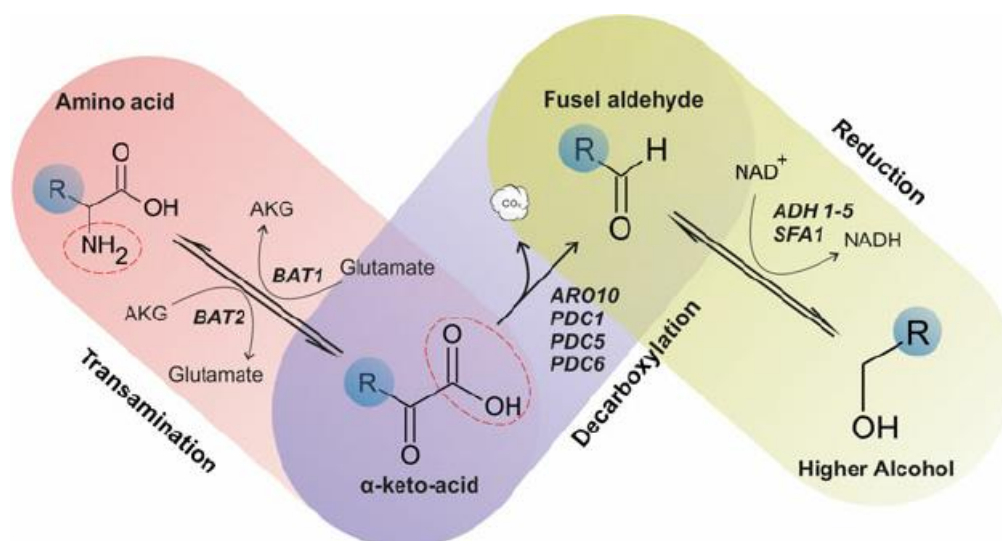
ο Αλκοόλες:

Η κύρια αλκοόλη που εμφανίζεται στην μπίρα είναι η αιθανόλη, ενώ 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, τα φρουτώδη και τα αρώματα βοτάνων, τα οποία εξαρτώνται από το πώς αλληλεπιδρούν με τα άλλα αρωματικά συστατικά της μπίρας (Yonezawa & Fushiki, 2002). Μερικές από τις πιο σημαντικές ανώτερες αλκοόλες είναι οι εξής:

- Η n-προπανόλη όπου έχει το υψηλότερο όριο ανίχνευσης ίσο με 600 mg/L και η οποία προσδίδει ένα γλυκό αλκοολικό άρωμα.
- 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 ένα άρωμα που θυμίζει τριαντάφυλλο και gummy bears.

- Οι αλειφατικές αλκοόλες που αποτελούνται από 6 έως 10 άτομα άνθρακα έχουν αρώματα που θυμίζουν καρύδα αλλά δεν γίνονται αντιληπτά αν το CFU δεν είναι μεγαλύτερο της μονάδας.
- Η γλυκερίνη η οποία υπάρχει στην μπίρα σε συγκεντρώσεις 1.1- 2.2 g/L αλλά δεν θεωρείται ότι συμβάλλει ιδιαίτερα στο αρωματικό προφίλ της μπίρας. Προσδίδει γενικά μια γλυκύτητα και θεωρείται ότι ομαλοποιεί και “μαλακώνει” τα διάφορα αρώματα της μπίρας (Michel, et al., 2016,b).

Οι ανώτερες αλκοόλες παράγονται από τις ζύμες ως παραπροϊόντα των αντιδράσεων μεταβολισμού και καταβολισμού των αμινοξέων. 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).



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

Ο μεταβολισμός των αμινοξέων ξεκινά από έναν υδρογονάνθρακα ο οποίος μετατρέπεται σε α-κετό οξύ. Το οξύ αυτό στη συνέχεια μετατρέπεται στο αντίστοιχο αμινοξύ και τελικά παράγονται ανώτερες αλκοόλες μέσω της αποκαρβοξυλίωσης και της μείωσης των α-κετό οξέων (Lewis & Bamforth, 2006).

ο Οξέα:

Το διοξειδίο του άνθρακα είναι αυτό που δίνει την αφρώδη αίσθηση στη γεύση και στην αίσθηση στο στόμα, η οποία συναντάται στη μπίρα. Μια μεγάλη ομάδα οργανικών και ανόργανων οξέων όμως είναι αυτή που συνεισφέρει σημαντικά στο αρωματικό προφίλ και στην τελική οξύτητα της μπίρας. Τα οργανικά αυτά οξέα μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες, τα πτητικά και τα μη πτητικά οξέα και οι δύο κατηγορίες όμως αν υπάρχουν σε μεγάλες ποσότητες χαρακτηρίζονται ως ανεπιθύμητα αρώματα (Yonezawa & Fushiki, 2002).

Τα βασικά πτητικά οργανικά οξέα είναι:

- Το οξικό οξύ το οποίο έχει το χαρακτηριστικό άρωμα του ξυδιού και έντονη οξύτητα και 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 όπως προδίδεται από το όνομά του έχει αρώματα βουτύρου και τυριού αλλά και φρούτων όπως κεράσι και ανανάς 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:

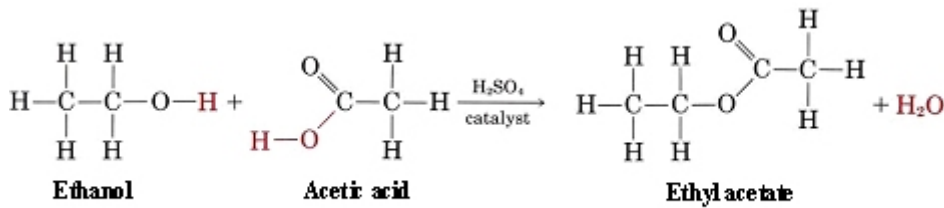
- Το οξαλικό οξύ με όριο ανίχνευσης τα 500 mg/L. Το μη πτητικό αυτό οξύ αν βρίσκεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις δίνει μια αλμυρή και οξειδωμένη αίσθηση στη μπίρα.
- Το κιτρικό οξύ που δίνει μια ξινή γεύση αν ξεπεράσει η συγκέντρωσή του τα 400 mg/L.
- Το μηλικό οξύ με όριο ανίχνευσης ίσο με 700 mg/L και 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).

ο Εστέρες:

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 στην μπίρα μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες (Yonezawa & Fushiki, 2002).

Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν οι οξικοί εστέρες οι οποίοι σχηματίζονται από ανώτερες αλκοόλες ή αιθανόλη με οξικό οξύ και βρίσκονται σε μεγάλες σχετικά ποσότητες στην μπίρα. Το οξικό οξύ είναι διαθέσιμο σε ενεργή μορφή ως ακετυλο-συνένζυμο-A, το οποίο σχηματίζεται κατά τη φάση ανάπτυξης των ζυμών. 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. Αυτό είναι λογικό καθώς η αλκοόλη που βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στην μπίρα είναι η αιθανόλη (Lewis & Bamforth, 2006). 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).



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

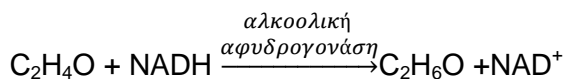
Οι πιο σημαντικοί από τους εστέρες τις πρώτης κατηγορίας είναι :

- 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) στο προϊόν δίνει ένα αρνητικό άρωμα που θυμίζει διαλύτη.
- Ο οξικός ισοαμυλεστέρας με όριο ανίχνευσης 1.6 mg/L και χαρακτηριστικά αρώματα γλυκών φρούτων όπως η μπανάνα.
- Ο οξικός φαινυλαιθυλεστέρας που προσδίδει αρώματα μπανάνας, μήλου και μελιού με όριο ανίχνευσης 0.05-3.8 mg/L (Michel, et al., 2016,b), (Laskin, et al., 2005).

Στη 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 συμβάλλουν σημαντικά στο αρωματικό προφίλ της μπύρας. Ο καπρικός αιθυλεστέρας (0.008-0.076 mg/L) ο οποίος παράγει γλυκά αρώματα φρούτων, όπως για παράδειγμα μήλο αλλά και αρώματα γλυκάνισου (Mas, et al., 2017). Ο δεύτερος εστέρας αυτής της κατηγορίας είναι ο καπρυλικός αιθυλεστέρας (0.04-0.58 mg/L) που παράγει αρώματα όπως φρούτα, κρασί, βερίκοκο, μπανάνα, μπράντυ και αχλάδι. (Lewis & Bamforth, 2006), (Laskin, et al., 2005).

- Ανεπιθύμητες οργανικές ενώσεις:

Οι πιο σημαντικές ενώσεις σε αυτή την κατηγορία είναι η ακεταλδεΐδη και οι γειτονικές δικετόνες (VDKs). Η ακεταλδεΐδη παράγεται κατά τη φάση ανάπτυξης των μικροοργανισμών ως αποτέλεσμα του μεταβολισμού των σακχάρων και στην συνέχεια της ζύμωσης το μεγαλύτερο ποσοστό αυτής μετατρέπεται σε αιθανόλη σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



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

Όσον αφορά στις γειτονικές δικετόνες παράγονται με φυσικό τρόπο κατά τη διαδικασία της ζύμωσης. Η παρακολούθηση των επιπέδων VDK έχει μεγάλη σημασία καθώς η συγκέντρωση αυτών των ενώσεων μπορεί να μεταβάλει σημαντικά τη γεύση ενός ποτού. Οι VDK παράγουν μια γεύση σαν βούτυρο ή ακόμη και σαν καραμέλα στο ποτό και λόγω αυτού

είναι ανεπιθύμητες σε ελαφριές μπύρες 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 αντίστοιχα. Η παρουσία διακετυλίου στην μπύρα μπορεί σε ορισμένες περιπτώσεις να προδίδει τη μόλυνση του προϊόντος από βακτήρια. Το διακετύλιο στην συνέχεια κατά την ωρίμανση της μπύρας 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 αλδεϋδών με ανεπιθύμητα χαρακτηριστικά είναι η νοναλδεϋδη και η trans-2- νοναλδεϋδη 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- νοναλδεϋδης προκύπτουν συχνά από αποθήκευση της μπύρας σε υψηλή θερμοκρασία και θεωρείται χαρακτηριστική μυρωδιά οξειδωσης (Michel, et al., 2016,b).

- ο Θειούχα συστατικά:

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

Το διοξείδιο του θείου παράγεται κατά τον αναβολισμό των αμινοξέων και είναι μια ένωση πολύ οικεία στους ζυθοποιούς καθώς παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη σταθερότητα του προϊόντος και ιδιαίτερα της γεύσης καθώς δρα ως ισχυρό αντιοξειδωτικό στην μπύρα και αυξάνει 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 να δημιουργεί θειούχες οσμές στο προϊόν γεγονός το οποίο είναι αρεστό σε ορισμένες μόνο βυθοζύμωτες μπύρες (Michel, et al., 2016,b).

Το υδρόθειο είναι μια ουσία η οποία είναι γνωστή για την έντονη μυρωδιά κλούβιου αυγού ή γεωθερμικής δράσης και όταν βρεθεί στην μπύρα έχει την τάση να καλύπτει τα υπόλοιπα αρωματικά στοιχεία. Παρόλα αυτά σε μικρές συγκεντρώσεις μπορεί να της προσδώσει φρεσκάδα. Το όριο ανίχνευσής του είναι πολύ χαμηλό, περίπου ίσο με 0.005 mg/L (Michel, et al., 2016,b). Το σύνολο των ζυμομύκητων παράγει αυτήν την ουσία κατά τις πρώτες μέρες της ζύμωσης και στη φάση της ωρίμανσης, λόγω της μεγάλης πτητικότητάς της όμως κατά τις επόμενες μέρες μπορεί να μειωθεί σημαντικά η ποσότητά της.

- ο Φαινόλες:

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. Παρόλα 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, καπνιστό, πικάντικο, καμμένο, ή ακόμη και 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 ένα καπνιστό χαρακτήρα στην μπίρα και έχει όριο ανίχνευσης 0.2 mg/L.

Οι μπίρες που προκύπτουν από ζύμωση κάποιου στελέχους *S. cerevisiae* περιέχουν κυρίως βινυλ-φαινόλες (4-βινυλ-γουαϊκόλη και 4-βινυλ-φαινόλη) 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).

4.4.2 Εξωτερικοί παράγοντες

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

- ο Ο θειικός σίδηρος ο οποίος προσδίδει ένα μεταλλικό άρωμα που 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.
- ο 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).
- ο 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).

Στον πίνακα 2 που ακολουθεί παρουσιάζεται συνοπτικά το σύνολο των ουσιών που προέκυψαν από την αέρια χρωματογραφία μάζας στην παρούσα εργασία καθώς και το άρωμα και το όριο ανίχνευσης της κάθε μίας όπως προέκυψαν από την βιβλιογραφία.

Πίνακας 2: Το χαρακτηριστικό άρωμα και το όριο ανίχνευσης όλων των ουσιών που προέκυψαν από την αέρια χρωματογραφία μάζας.

	Συστατικό	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)
	2,3-Butanediol	Φρουτώδες, βούτυρο, κρεμώδες	150-600	(Leffingwell & Associates, 2010)
	1-Propanol, 3-ethoxy	Φρουτώδες	Δεν είναι διαθέσιμο	(Burdock, 2016)
	2-Ethyl-1-hexanol	Εσπεριδοειδή, γλυκό, λουλούδια, λιπαρό	Δεν είναι διαθέσιμο	(Burdock, 2016)
	1,2,3-Butanetriol	Γλυκό	Δεν είναι διαθέσιμο	(Thegoodscentcompany, 2009)
	Methionol	Κρεμμύδι, σούπα λαχανικών	0.05	(Thegoodscentcompany, 2009)
	Phenylethyl Alcohol	Τριαντάφυλλο, ζελεδάκια	4	(Burdock, 2016)
	Tryptophol	Αμύγδαλο, ήπια φρουτώδες	Δεν είναι διαθέσιμο	(Thegoodscentcompany, 2009)
Οξέα	Isobutyric acid	Γλυκό, φράουλα	0.23	(Tao & Zhang, 2010)
	Valeric acid	Τυρί, γάλα, φρούτα, καπνό	0.0009-0.004	(Burdock, 2016)
	Leucic acid	Άοσμο	Δεν είναι διαθέσιμο	(Thegoodscentcompany, 2009)
	Butyric acid	Κεράσι, ανανάς, Τυρί (blue cheese)	2	(Laskin, et al., 2005)
	Isovaleric acid	Τυρί, όξινο, πικάντικο, λιπαρό, ποδαρίλα	0.75	(Laskin, et al., 2005)
	Active valeric acid	Πικράδα, τυρί, όξινο	Δεν είναι διαθέσιμο	(Burdock, 2016)
	Caproic acid	Γεώδες, μανιτάρι, γαλακτοκομικά	8	(Mas, et al., 2017)
	Caprylic acid	Λιπαρό, σαπούνι	15	(Mas, et al., 2017)
	Capric acid	Πικρό, όξινο, λιπαρό, εσπεριδοειδή	10	(Mas, et al., 2017)
	Palmitic acid	Κρεμώδες, κερι	10	(Mas, et al., 2017)
	Lauric acid	Λιπαρό, καρύδα	10	(Mas, et al., 2017)
	Myristic acid	Κερι, καρύδα	10	(Mas, et al., 2017)

				2017)
Εστέρες	Isobutyl acetate	Φρουτώδες	0.66	(RUTH, 2009)
	Ethyl butyrate	Ανανάς, φρουτώδες, κρεμώδες	0.1-18	(Laskin, et al., 2005)
	Ethyl lactate	Γλυκό, τυρί, φρουτώδες, όξινο, φυτικό	14	(Tao & Zhang, 2010)
	Isoamyl acetate	Γλυκό, μπανάνα, αχλάδι	1.6	(Tao & Zhang, 2010)
	Ethyl caproate	Μήλο, γλυκάνισος	0.008-0.076	(Mas, et al., 2017)
	Ethyl caprylate	Φρουτώδες, βερίκοκο, μπανάνα, μπράντυ, αχλάδι	0.04-0.58	(Laskin, et al., 2005)
	Phenethyl acetate	Μπανάνα, μήλο, μέλι	0.05-3.8	(Laskin, et al., 2005)
	Ethyl acetate	Γλυκό, διαλύτης	33	(Mas, et al., 2017)
	Ethyl caprate	Κερί	0.51-1.1	(Mas, et al., 2017)
	Ethyl laurate	Γλυκό, κηρώδες, φρουτώδες, σαπούνι	50	(Mas, et al., 2017)
	Ethyl palmate	Κηρώδες	Δεν είναι διαθέσιμο	(Burdock, 2016)
	Tryptophol acetate	Ζωικό, κοπριά	Δεν είναι διαθέσιμο	(Thegoodscentcompany, 2009)
	Ethyl 9-hexadecenoate	Άοσμο (περιέχεται και στο κρασί)	Δεν είναι διαθέσιμο	(Thegoodscentcompany, 2009)
	Ethyl palmitate	Κηρώδες, φρουτώδες, κρεμώδες, γάλα, βάλαμο	2-30	(Zhao, et al., 2016)
	Ethyl oleate	Λιπαρό, γάλα, κερί	Δεν είναι διαθέσιμο	(Burdock, 2016)
	Ethyl stearate	Κερώδες	Δεν είναι διαθέσιμο	(Burdock, 2016)
Υδρογονάνθρακες	Acetal	Φυτικό , γκαζόν	Δεν είναι διαθέσιμο	(Leffingwell & Associates, 2010)
	Disulfide, dimethyl	Μαγειρεμένο λαχανικό, λάχανο, σκόρδο	0.029	(Burdock, 2016)
	Toluene	Διαλυτικό, γλυκό	1.55-7.9	(Burdock, 2016)
	Methylethyl disulphide	Θείο	Δεν είναι διαθέσιμο	(Mas, et al., 2017)
	o-Xylene	Γεράνι	0.5	(Leonardos , et al., 2012)
	p-Xylene	Γλυκό	0.47	(Leonardos , et al., 2012)
	D-Limonene	Εσπεριδοειδή, φρέσκο, γλυκό	0.01	(Thegoodscentcompany, 2009)
	Disulfide, isopropyl propyl	Κρεμμύδι, κρέας, λάχανο	Δεν είναι διαθέσιμο	(Burdock, 2016)
	Diethyl disulfide	Λιπαρό, κρεμμύδι, σκόρδο	0.01	(Mas, et al., 2017)
	2-Methoxy-4-vinylphenol	Ξύλο, κέδρο, φιστίκι	0.03	(Tao & Zhang, 2010)
	4-Vinylguaiacol	Πικράδα, σκόρδο	0.3	(Burdock, 2016)
	γ-Undecalactone	Φρουτώδες, καρύδα,	Δεν είναι διαθέσιμο	(Leonardos , et

		ροδάκινο, κρέμα		al., 2012)
	Caryophyllene	Ξύλο, πικάντικο, γλυκό (προέρχεται από τον λυκίσκο)	0.0005	(Mas, et al., 2017)
	γ-Nonalactone	Καρύδα, γλυκό, βούτυρο	0.065	(Burdock, 2016)
	Pentadecane	Κηρώδες, βρίσκεται σε πολλά τρόφιμα	Δεν είναι διαθέσιμο	(Zhao, et al., 2016)
	Tyrosol	Δυσάρεστη ταγγισμένη οσμή, λιπαρό, κερώδες	Δεν είναι διαθέσιμο	(Thegoodscentcompany, 2009)
	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)
	Nonadecane	Ήπιο άρωμα	Δεν είναι διαθέσιμο	(Zhao, et al., 2016)

5. Non-Saccharomyces ζύμες

Επιλεγμένα στελέχη ζυμών *Saccharomyces* χρησιμοποιούνται εδώ και τουλάχιστον 150 χρόνια για την παραγωγή μπύρας και κρασιού. Παρόλο 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).

1. Η εξέλιξη των non-*Saccharomyces* ζυμών

Τελευταία παρατηρείται μια μείωση στο ενδιαφέρον των καταναλωτών για τις παραδοσιακές μπύρες, καθώς συνεχώς παράγονται καινούργια αλκοολούχα ποτά με ιδιαίτερες γεύσεις. Οι ζυθοποιοί για να ανατρέψουν αυτή την τάση προσπαθούν να βρουν τρόπους βελτίωσης της ποιότητας της μπύρας δίνοντας στο τελικό προϊόν μεγαλύτερη πολυπλοκότητα και νέα αρώματα (Michel, et al., 2016). Τα αρωματικά στοιχεία που χαρακτηρίζουν τα διάφορα είδη μπύρας προέρχονται από το κριθάρι, τη βύνη και τον λυκίσκο. Παρόλα 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 (Canonico, 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 μπύρας (Varela, 2016).

Τις προηγούμενες δεκαετίες οι ζύμες non-*Saccharomyces* δεν ήταν επιθυμητές σε μία ζύμωση καθώς θεωρούνταν ότι επέφεραν αλλοιώσεις και ανεπιθύμητα χαρακτηριστικά στο προϊόν και ακόμη παρουσίαζαν μικρή ικανότητα ζύμωσης. Έρευνες όμως των τελευταίων χρόνων έχουν αναδείξει τα θετικά στοιχεία των ζυμών αυτών, είτε όταν αυτές χρησιμοποιούνται μόνες τους (ζυθοποιία) είτε σε συνδυασμό με κάποιο στέλεχος *Saccharomyces* το οποίο θα ολοκληρώσει τη ζύμωση (οινοποιία) (Tataridis, et al., 2013). 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 ενισχύουν 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 τη δυνατότητα παραγωγής μπύρας χαμηλού αλκοολικού περιεχομένου (low-alcohol beer 0.5-1.2%) και μπύρα 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).

Παρόλα αυτά τα χαρακτηριστικά της διαδικασίας της ζύμωσης που ακολουθούν τα non-*Saccharomyces* στελέχη διαφοροποιούνται αρκετά και μπορούν να επηρεάσουν τη σύσταση και την ποιότητα της παραγόμενης μπύρας, σε αντίθεση με τα καθιερωμένα στελέχη *Saccharomyces*, των οποίων οι συνθήκες ζύμωσης είναι γνωστές και η σύσταση του παραγόμενου προϊόντος 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 φαινολικές οσμές (off-flavours) οι οποίες είναι ανεπιθύμητες τόσο στην παραγωγή κρασιού όσο και στη μπύρα. Αυτά τα φαινολικά αρώματα παράγονται από την αποκαρβοξυλίωση ορισμένων οξέων τα οποία υπάρχουν στο βυνογλεύκος, όπως το φερούλικό οξύ, το κουμαρικό οξύ και το κινamikό οξύ (Varela, 2016).

2. Τα κυριότερα στελέχη non-*Saccharomyces* που έχουν χρησιμοποιηθεί στην ζυθοποιεία

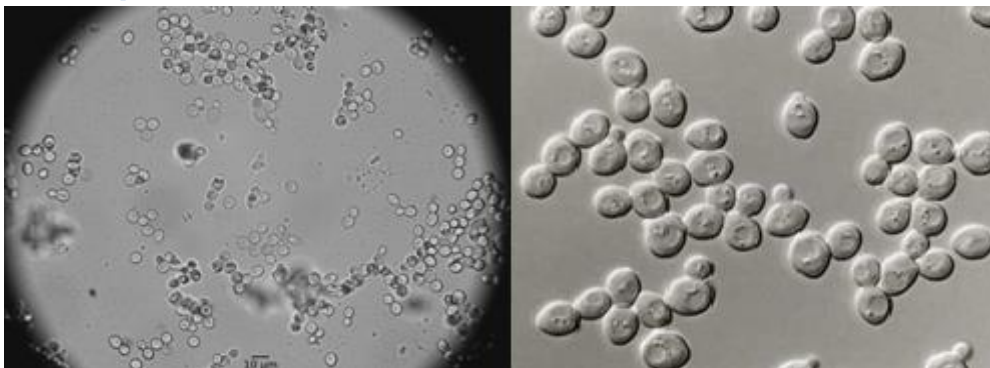
Παρόλο που πολλά είδη ζυμομυκήτων non-*Saccharomyces* λαμβάνουν μέρος σε αυθόρμητες ζυμώσεις ορισμένων τύπων μπύρας (Belgium lambic beer and American coolship ales), συμπεριλαμβανομένων των *Meyerozyma guilliermondii*, *Debaryomyces* spp., *Pichia* spp., *Wickerhamomyces anomalus*, *Brettanomyces anomalus*, *Brettanomyces custersii*, *Brettanomyces bruxellensis*, *Candida krusei*, *Cryptococcus keulingii* και *Saccharomycodes ludwigii* μόνο ένας πολύ μικρός αριθμός έχει δοκιμαστεί σε μεμονωμένες ή σε μικτές αρχικές καλλιέργειες για την παραγωγή μπύρας (Varela, 2016). Οι πιο διαδεδομένοι non-*Saccharomyces* μικροοργανισμοί στη ζυθοποιεία είναι αναμφισβήτητα εκείνοι που ανήκουν στο γένος *Brettanomyces* καθώς έχουν την δυνατότητα να διασπάσουν και να μεταβολίσουν την μαλτόζη και είναι γνωστοί για την χρήση τους στην παραγωγή μπύρας τύπου lambic και gueuze. Συγκεκριμένα η ζύμωση με *Brettanomyces anomalus* διαρκεί περίπου 4 εβδομάδες στους 20°C και έχει ως αποτέλεσμα ένα προϊόν με αυξημένες συγκεντρώσεις βινυλ-φαινόλων (γαρύφαλλο, και καπνιστό) ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις γίνονται αντιληπτά και αρώματα φρούτων. Όσον αφορά τον *Brettanomyces bruxellensis* παράγει μπύρες υψηλής περιεκτικότητας σε αιθανόλη (15%v/v) με αρώματα που θυμίζουν άλογο (αιθυλ-φαινόλες) και εμφανίζουν έντονη οξύτητα. Ακόμη ο *Brettanomyces custersii* χρησιμοποιείται επίσης για την παραγωγή μπύρας καθώς προκαλεί την ενίσχυση των

γλυκοζιτών του λυκίσκου (Michel, et al., 2016,b). Τα τελευταία χρόνια η έρευνα για τους non-*Saccharomyces* μικροοργανισμούς έχει επικεντρωθεί στη *Torulaspota delbrueckii* καθώς ορισμένα στελέχη έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν τη μαλτόζη, μάλιστα μερικά από αυτά φτάνουν ακόμη και σε περιεκτικότητα σε αιθανόλη της τάξης του 10%v/v (Michel et al 2016) με την ταυτόχρονη παραγωγή αρκετών εστέρων που προσδίδουν έντονα αρώματα φρούτων και λουλουδιών όπως το τριαντάφυλλο (Canonico, et al., 2015).

Το βασικό κριτήριο για την επιλογή ενός ζυμομύκητα για την παραγωγή μπύρας είναι το να μπορεί να μεταβολίσει τη μαλτόζη, παρόλα αυτά συχνά χρησιμοποιούνται και στελέχη non-*Saccharomyces* τα οποία δεν διασπούν τη μαλτόζη, αλλά μπορούν να παράξουν low alcohol ή non-alcohol μπύρες με ιδιαίτερα αρωματικά στοιχεία. Ο *Saccharomycodes ludwigii* μπορεί να μεταβολίσει μόνο γλυκόζη, φρουκτόζη και σακχαρόζη και παράγει μπύρες με λιγότερο από 1%v/v αιθανόλη με υψηλή παραγωγή οξικού αιθυλεστέρα (αρώματα φρούτων) και ανώτερων αλκοολών (Michel, et al., 2016). Αντίστοιχα ο *Kluyveromyces lactis* μεταβολίζει μόνο τη γλυκόζη, τη φρουκτόζη και τη σακχαρόζη και χρησιμοποιείται ευρέως καθώς προσδίδει ένα έντονο αρωματικό προφίλ, το οποίο βασίζεται σε λεμόνι και λάιμ και οφείλεται στην μετατροπή των μονοτερπενικών αλκοολών του λυκίσκου (King et al 2000). Τέλος για την παραγωγή low ή non-alcohol προϊόντων χρησιμοποιούνται οι μικροοργανισμοί *Zygosaccharomyces rouxii* και *Pichia kluyveri* οι οποίοι εμφανίζουν αυξημένη παραγωγή διακετυλίου (βούτυρο, καραμέλα) και θιολών (φρούτα του πάθους και γκρέιπφρουτ) αντίστοιχα (Michel et al 2016).

Στην εν λόγω εργασία μελετήθηκε η χρήση δύο non-*Saccharomyces* ζυμών για την παραγωγή μπύρας η *Torulaspota delbrueckii* και η *Metschnikowia pulcherrima*. Στην συνέχεια θα αναφερθούμε σε ορισμένα χαρακτηριστικά των δύο ζυμών όπως αυτά προέκυψαν από την βιβλιογραφία.

3. *Torulaspota delbrueckii*



Εικόνα 16: Ο μικροοργανισμός *T. delbrueckii* όπως φαίνεται από το μικροσκόπιο (van Breda, et al., 2013).

Ο μικροοργανισμός *Torulaspota delbrueckii* είναι ένα είδος ζύμης που ανήκει στους ασκομύκητες (Phylum Ascomycota) . Το μέγεθος των κυττάρων του είναι σχετικά μικρό, το σχήμα στρογγυλό και συναντάται σε φρούτα, βύνη, μούστο και στο έδαφος. Η *T. delbrueckii* παλαιότερα ήταν γνωστή ως *Saccharomyces delbrueckii* ή *Saccharomyces rosei* λόγω του αρώματος τριαντάφυλλου που προσδίδει στα προϊόντα ζύμωσής της (Jolly, et al., 2006).

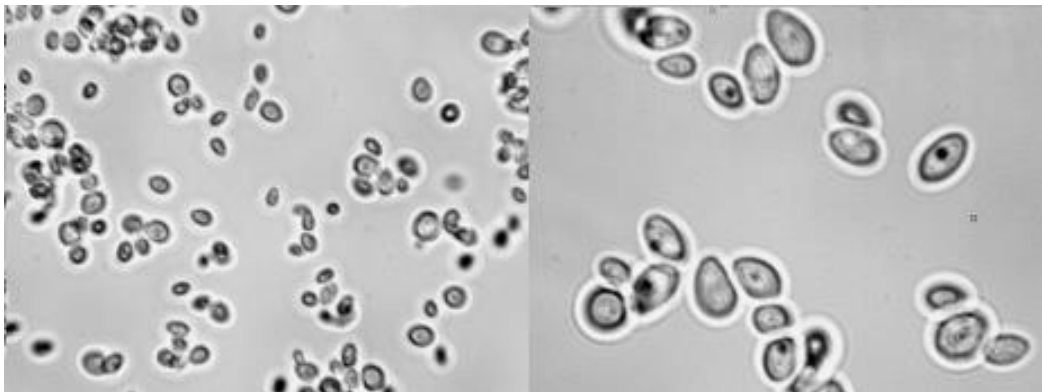
Ανάμεσα στα διάφορα είδη non-*Saccharomyces* ζυμών, πολλές έρευνες έχουν επικεντρωθεί στη χρήση του μικροοργανισμού *T. delbrueckii*, καθώς αυτός έχει δείξει θετικά στοιχεία όσον αφορά στην αντοχή του σε υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης και σε χαμηλές θερμοκρασίες (κρυσταλλοποιητικός) και μειωμένη παραγωγή ανεπιθύμητων ουσιών όπως η ακεταλδεΐδη, το μεθυλοπροπανικό οξύ και το οξικό οξύ, με ταυτόχρονη παραγωγή άλλων επιθυμητών (Canonico, et al., 2015). Ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός είναι ήδη γνωστός εδώ και αρκετά χρόνια για τη χρήση του στην παραγωγή κρασιού, όπου προτιμάται καθώς δίνει φρουτώδη αρώματα στο κρασί, ενώ πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι ο *T. delbrueckii* έχει ήδη "εξημερωθεί" από τον άνθρωπο εδώ και 4000 χρόνια (Albertin, et al., 2014). Το 2003 ήταν ο πρώτος μικροοργανισμός non-*Saccharomyces* ο οποίος άρχισε να πωλείται για τη παραγωγή οίνου. Έχει όμως χρησιμοποιηθεί και στη παραγωγή γερμανικής μπίρας σιταριού καθώς προσδίδει χαρακτηριστικά αρώματα μπανάνας, τσιχλόφουσкас και κλούβιου αυγού, τα οποία είναι επιθυμητά σε αυτό το είδος μπίρας (Tataridis, et al., 2013). Η εν λόγω ζύμη προτάθηκε πρώτη φορά για τη χρήση της στη ζυθοποιία από τους King και Dickinson (2000), οι οποίοι ανακάλυψαν ότι παρόλο που η *T. delbrueckii* προέρχεται από τη βιομηχανία οίνου έχει τη δυνατότητα να μετατρέπει τα αρώματα του λυκίσκου με αξιοσημείωτα αποτελέσματα όσον αφορά στις μονοτερπενικές αλκοόλες. Συγκεκριμένα έχει τη δυνατότητα να μεταβολίζει τη νερόλη αυξάνοντας την ποσότητα λιναλόλης. Η *T. delbrueckii* έχει ακόμη μελετηθεί κατά την παραγωγή ψωμιού. Σε αυτή την περίπτωση η ζύμη αυτή έδειξε μεγάλη οσμωτική ανοχή σε συνθήκες μεγάλης συγκέντρωσης άλατος και σακχάρων, συνθήκες οι οποίες είναι θανατηφόρες για άλλες ζύμες. Καθώς λοιπόν η μεγάλη οσμωτική ανοχή είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την παραγωγή μπίρας υψηλής αρχικής πυκνότητας, η *T. delbrueckii* είναι μια μάλλον καλή επιλογή (Michel, et al., 2016).

Τα τελευταία χρόνια έχουν δημοσιευθεί αρκετές έρευνες σχετικές με την χρήση της ζύμης *T. delbrueckii* για την παραγωγή μπίρας, είτε μόνη της ή σε συνδυασμό με κάποιο στέλεχος *cerevisiae*. Τα αποτελέσματα αυτών των ερευνών παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία καθώς φαίνεται ότι η περιεκτικότητα σε αιθανόλη του τελικού προϊόντος αλλά και τα χαρακτηριστικά της ζύμωσης γενικότερα, εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από το εκάστοτε στέλεχος, την αρχική πυκνότητα σακχάρων στο γλεύκος και τη θερμοκρασία ζύμωσης. Ακόμη σημαντικό παράγοντα αποτελεί η περιεκτικότητα του γλεύκους σε γλυκόζη, άρα ο χρόνος και οι θερμοκρασίες πολτοποίησης, καθώς αυξημένη περιεκτικότητα φαίνεται να εμποδίζει την δράση του ενζύμου μαλτάση που είναι υπεύθυνο για την διάσπαση της μαλτόζης (Michel, et al., 2016,b). Όσον αφορά στα ποσοστά αλκοόλης στην τελική μπίρα οι τιμές κυμαίνονται από 0.9-4% v/v. Η δυνατότητα μεταβολισμού της μαλτόζης δεν είναι το μόνο χαρακτηριστικό της ζύμωσης που διαφοροποιείται. Ανάλογα με το στέλεχος η απαίτηση σε άζωτο και οξυγόνο αλλά και οι συγκεντρώσεις των παραγόμενων δευτερογενών μεταβολιτών επίσης διαφοροποιούνται (Basso, et al., 2016). Ακόμη η αρχική πυκνότητα σακχάρων του ζυθογλεύκους επηρεάζει σημαντικά τον ρυθμό ζύμωσης, καθώς σε γλεύκος αρχικής πυκνότητας 11 °P ο ρυθμός ανάπτυξης του μικροοργανισμού βρέθηκε ανάλογος του *S. cerevisiae*, 9 ημέρες ζύμωσης σε θερμοκρασία ίση με 20 °C (Tataridis, et al., 2013), ενώ σε μεγαλύτερες πυκνότητες (έως 16 °P) και ίδια θερμοκρασία ο χρόνος για την ολοκλήρωση της ζύμωσης φτάνει έως και 19 ημέρες (Michel, et al., 2016,b).

Παρά τις διαφοροποιήσεις των ερευνών σχετικά με την ικανότητα της *T. delbrueckii* να μεταβολίσει τη μαλτόζη, τα αποτελέσματα σχετικά με τα αρωματικά προφίλ που δίνει στη μπίρα σε γενικές γραμμές συμφωνούν και παρουσιάζουν εξαιρετικό ενδιαφέρον. Γενικά περιγράφεται ένα έντονα φρουτώδες αρωματικό προφίλ το οποίο οφείλεται στην υψηλή

παραγωγή εστέρων κυρίως ισοαμυλεστέρα, ισοβουτυλεστέρα και οξικού φαινυλαιθυλεστέρα. Όσον αφορά στις αλκοόλες που παράγονται από τον συγκεκριμένο non-*Saccharomyces* μικροοργανισμό η πιο χαρακτηριστική είναι φαινυλαιθυλική αλκοόλη η οποία προσδίδει ένα γλυκό άρωμα, με χαρακτηριστικά λουλουδιών και στην οποία οφείλονται τα αρώματα τριαντάφυλλου που χαρακτηρίζουν τον συγκεκριμένο μύκητα (Canonico, et al., 2015). Ακόμη σε υψηλές συγκεντρώσεις παράγονται η n-προπανόλη, η ισοβουτανόλη και η ισοαμυλική αλκοόλη (ζυμέλαιο, οιοπνευματώδες ποτό, ούισκι, μπανάνα). Όπως έχει ήδη αναφερθεί η *T. delbrueckii* διαθέτει την δυνατότητα μετατροπής των μονοτερπενικών αλκοολών και συγκεκριμένα παράγει αυξημένες ποσότητες λιναλόλης (λεβάντα) και α-τερπινεόλη (πασχαλιά) (Basso, et al., 2016). Ταυτόχρονα όμως σε γενικές γραμμές παρουσιάζει και μειωμένη παραγωγή μη επιθυμητών ουσιών όπως είναι το οξικό οξύ η ακεταλδεΐδη και οι φαινολικές ενώσεις (Padilla, et al., 2016). Παρόλα αυτά έχουν αναφερθεί και περιπτώσεις στις οποίες η ζύμωση με *T. delbrueckii* είχε ως αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή ακεταλδεΐδης (γρασίδι) και οξικού αιθυλεστέρα (άρωμα διαλύτη) (Michel, et al., 2016,b). Στην περίπτωση μικτής ζύμωσης (*T. delbrueckii* - *S. cerevisiae*) έχει βρεθεί ότι η παρουσία της *T. delbrueckii* αυξάνει την συγκέντρωση του οξικού φαινυλαιθυλεστέρα, του καπρωϊκού και του καπρυλικού αιθυλεστέρα, ενώ ταυτόχρονα μειώνει τη συγκέντρωση του οξικού ισοαμυλεστέρα και της φαινυλαιθυλικής αλκοόλης (Canonico, et al., 2015).

4. *Metschnikowia pulcherrima*



Εικόνα 17: Ο μικροοργανισμός *M. pulcherrima* όπως φαίνεται από το μικροσκόπιο (Fernandez, et al., 2000).

Η *Metschnikowia pulcherrima*, γνωστή στην βιβλιογραφία και ως *Candida pulcherrima* (anamorpha) συναντάται συνήθως στο νέκταρ των λουλουδιών καθώς και σε φρούτα ή φυτικούς ιστούς που βρίσκονται σε αποσύνθεση και μεταφέρονται σε νέους ξενιστές από έντομα όπως είναι η μέλισσα και η δροσόφιλα. Το στέλεχος *M. pulcherrima* έχει ωοειδές και ελλειψοειδές σχήμα και σχετικά μεγάλο μέγεθος, ανήκει στο είδος των ασκομύκητων (Phylum Ascomycota) και αναπαράγεται με εκβλάστηση (Jolly, et al., 2006).

Πρόκειται για έναν non-*Saccharomyces* μικροοργανισμό ο οποίος παίζει σημαντικό ρόλο στην οينوποίηση του κρασιού όταν είναι παρών στα σταφύλια ή στον εξοπλισμό του οινοποιείου και έχει ιστορικά χρησιμοποιηθεί στη βιομηχανία οίνου της Νότιας Αφρικής. Είναι γνωστή για την παραγωγή κόκκινης χρωστικής (πουλχεριμίνη) από τη μη αναστρέψιμη σύνδεση του πουλχεριμικού οξέος και του περιβάλλοντος σιδήρου. Το γεγονός αυτό δεν επιτρέπει στην ανταγωνιστική μικροχλωρίδα την πρόσβαση σε σίδηρο. Η εν λόγω ζύμη

βρίσκεται στο γλεύκος των σταφυλιών μετά το πάτημα και λόγω της ανθεκτικότητας της στην υψηλή οξύτητα (pH 3-4) και συγκέντρωση σακχάρων (>100 g/L), εκτός του ότι συμβάλει στην διαμόρφωση της γεύσης και του αρώματος του κρασιού, αντιστέκεται και στην ανταγωνιστική μικροχλωρίδα του γλεύκους (Ευθυμίου, 2015). Ο ρόλος λοιπόν της *M. pulcherrima* στην παραγωγή κρασιού είναι να ξεκινήσει τη ζύμωση του γλεύκους, όταν ακόμη ο ζυμομύκητας *Saccharomyces* βρίσκεται στη φάση ανάπτυξης, καταστέλλοντας ταυτόχρονα την ανάπτυξη άλλων μη επιθυμητών μικροοργανισμών όπως *Pichia*, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Saccharomycodes*, *Torulaspota* και *Brettanomyces* (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). Στην περίπτωση αυτή πάλι η *M. pulcherrima* ξεκινά την ζύμωση και στην συνέχεια επιλέγεται ένα συμβατικό στέλεχος ζυμομύκητα. Η διαδοχική αυτή ζύμωση έχει εφαρμοστεί στην παραγωγή Chardonnay και Syrah 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).

Τα περισσότερα στοιχεία σχετικά με τους παραγόμενους δευτερογενείς μεταβολίτες προέρχονται από τον βιομηχανία οίνου και αναφέρουν ότι η *M. pulcherrima* παράγει πτητικές φαινολικές ενώσεις σε αυξημένες συγκεντρώσεις (off-flavours, άλογο, καπνιστό και γαρύφαλλο), μετατρέπει τις μονοτερπενικές αλκοόλες του λυκίσκου σε α-τερπινεόλη, γερανιόλη και νερόλη (αρώματα βοτάνων). Ακόμη σε ορισμένες περιπτώσεις προσδίδει αρώματα φρούτων λόγω αυξημένης ποσότητας 2-φαινυλαιθυλικής αλκοόλης, αλλά και αυξημένες συγκεντρώσεις οξικού οξέος (Padilla, et al., 2016). Στην περίπτωση της μπύρας έχουν γίνει ορισμένες απόπειρες παρασκευής της με διαδοχική ζύμωση, όπως και στην περίπτωση του κρασιού. Το τελικό προϊόν σε σχέση με μια μπύρα ίδιας κατηγορίας που ζυμώθηκε μόνο από ένα συμβατικό ζυμομύκητα είχε μικρότερη περιεκτικότητα σε αιθανόλη αλλά και σε οξικό οξύ, πιο έντονη πικράδα και κάποια αρώματα φρούτων και λουλουδιών, αλλά χωρίς ιδιαίτερα γεμάτο σώμα. Στην περίπτωση ζύμωσης μόνο με την *M. pulcherrima* τα αποτελέσματα είναι αρνητικά καθώς τα στελέχη που μέχρι τώρα έχουν χρησιμοποιηθεί φαίνεται να μην έχουν τη δυνατότητα ζύμωσης της μαλτόζης. Παρόλα αυτά οι πηγές σε σχέση με τέτοιου είδους πειράματα είναι περιορισμένες.

Πειραματικό μέρος

1. Σχεδιασμός πειραμάτων

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν να διερευνηθεί η δυνατότητα παραγωγής μπίρας με διαφοροποιημένα αρωματικά χαρακτηριστικά με χρήση εναλλακτικών non-*Saccharomyces* ζυμομηκύτων. Για το λόγο αυτό, μετά από βιβλιογραφική έρευνα και βάσει της εμπειρίας του Εργαστηρίου Βιομοριακής ανάλυσης και Χημείας Οίνου του ΤΕΙ Αθήνας, επιλέχθηκαν μικροοργανισμοί οι οποίοι είχαν δώσει ενθαρρυντικά αποτελέσματα στην αλκοολική ζύμωση οиноγλεύκους.

Ο πρώτος στόχος ήταν να διαπιστωθεί εάν οι επιλεγμένοι non-*Saccharomyces* μικροοργανισμοί έχουν τη δυνατότητα να μεταβολίσουν τα βασικά σάκχαρα (γλυκόζη, φρουκτόζη και μαλτόζη) του ζυθογλεύκους. Για τον σκοπό αυτό οι μικροοργανισμοί αναπτύχθηκαν σε ειδικό υπόστρωμα πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά που περιείχε τα παραπάνω σάκχαρα. Μελετήθηκε λοιπόν, η ανάπτυξη του κάθε μικροοργανισμού σε υπόστρωμα ενός σακχάρου αλλά και σε υπόστρωμα που περιείχε και τα τρία βασικά σάκχαρα σε αναλογίες αντίστοιχες του βυνογλεύκους. Από αυτή την διαδικασία εκτιμήθηκε η ανάπτυξη του κάθε μικροοργανισμού, ο ρυθμός κατανάλωσης του κάθε σακχάρου και κυρίως η δυνατότητα παραγωγής αιθανόλης.

Αφού μελετήθηκαν τα χαρακτηριστικά ανάπτυξης των τριών μικροοργανισμών σε υποστρώματα, στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η κάθε ζύμωση σε κανονικό ζυθογλεύκος, με σκοπό τη μελέτη των διαφορετικών αρωματικών και ποιοτικών χαρακτηριστικών των τελικών προϊόντων. Συγκεκριμένα γλεύκος όμοιας σύστασης ζυμώθηκε με τέσσερις διαφορετικές καλλιέργειες μικροοργανισμών, τρεις καθαρές καλλιέργειες των μελετώμενων μικροοργανισμών *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii*, *M. pulcherrima* και μία μικτή καλλιέργεια των *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii* σε αναλογία 1:10. Η συγκεκριμένη αναλογία επιλέχθηκε με βάση τη βιβλιογραφία (Canonico, et al., 2015) καθώς έχει βρεθεί ότι οι δύο μικροοργανισμοί σε αυτή την αναλογία αναπτύσσονται παράλληλα χωρίς ανταγωνισμό παράγοντας ένα προϊόν με πολύ ενδιαφέρον αρωματικό προφίλ και υψηλά ποσοστά αιθανόλης. Στην παρούσα εργασία σκοπός είναι η ανάδειξη των διαφορετικών αρωματικών στοιχείων που προσδίδει ο εκάστοτε 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 καλύψει τις διαφορές αρωμάτων των διαφορετικών ζυμώσεων, και για τον λόγο αυτό προστέθηκε μικρή ποσότητα μόνο πικρικού λυκίσκου. Σκοπός αυτού του πειράματος είναι κατά κύριο λόγο η σύγκριση των τελικών χαρακτηριστικών (αιθανόλη, γλυκερίνη, άρωμα, πικράδα, χρώμα κ.λ.π) των προϊόντων που ζυμώθηκαν με μη συμβατικούς μικροοργανισμούς με εκείνα που προέκυψαν από τον κλασικό σακχαρομύκητα.

2. Πειραματική διαδικασία

2.1 Αντιδραστήρια & Όργανα

- a. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω όργανα:
- Φυγόκεντρος HERMLE Z 200 A
 - ARE Heating Magnetic Stirrer VELP. SCIENTIFICA
 - Πλατόμετρο 2510 Standard-Saccharimeter (Measuring range 0-10^oP) FUNKE GERBER
 - Πλατόμετρο 2510 Standard-Saccharimeter (Measuring range 10-20^oP) 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
- b. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια:
- Όξινο φωσφορικό κάλιο (Potassium phosphate dibasic puriss) >99% SIGMA-ALDRICH
 - Δίσοξινο φωσφορικό κάλιο (POTASSIUM DIHYDROGEN POSPHATE) >98% PENTA
 - Θειικό αμμώνιο (AMMONIUM SULFATE A.G.) >99.5% PENTA
 - Θειικό μαγνήσιο (Magnesium sulfate heptahydrate) >99.5% MERCK
 - Θειικός ψευδάργυρος (Zink sulfate heptahydrate) >99.5% MERCK
 - Εκχύλισμα ζύμης (Yeast Extract) LAB
 - Γλυκόζη (D-(+)-Glucose), 99% Alfa Aesar
 - Φρουκτόζη (D-FRUCTOSE) >98.5% Duchefa Biochemies
 - Μαλτόζη (D-(+)-Maltose monohydrate) > 99% MERCK
 - *Saccharomyces cerevisiae* (Safale US-05)
 - *Torulasporea delbrueckii* (BIODIVA TD 291)
 - *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
 - Ιωδιούχο 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
 - Υδροχλωρικό οξύ (HCl) 3N
 - Ισοοκτάνιο Uvasol Isooctane for spectroscopy >99.8% SIGMA-ALDRICH.

2.2 Προετοιμασία των υποστρωμάτων αναφοράς

Τα υποστρώματα αναφοράς παρασκευάστηκαν ώστε να περιέχουν όλα τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά που απαιτούνται για την βέλτιστη ανάπτυξη ενός μικροοργανισμού, καθώς και τα βασικά σάκχαρα ανάλογα με το πείραμα

Το υπόστρωμα αναφοράς που παρασκευάστηκε αποτελείται από τα εξής συστατικά:

Πίνακας 3: Συνταγή υποστρώματος αναφοράς (Kennedy, et al., 1997).

Συστατικό	Συγκέντρωση (g/L)
Όξινο φωσφορικό κάλιο	1
Δίσοξινο φωσφορικό κάλιο	1
Θειικό αμμώνιο	2
Θειικό μαγνήσιο	0.2
Θειικός ψευδάργυρος	0.2
Εκχύλισμα ζύμης	2

Το εκχύλισμα ζύμης είναι εμπορικό σκεύασμα το οποίο περιέχει:

- Αμινοξέα
- Πεππίδια
- Βιταμίνες
- Υδρογονάνθρακες

Αφού ζυγίσθηκαν οι παραπάνω ποσότητες προστέθηκαν σε περίπου 3.00 L νερού βρύσης και ακολούθησε ήπια ανάδευση. Στη συνέχεια ρυθμίστηκε το pH του μίγματος (≈ 4.5) με την βοήθεια HCl (5 M).

Το μίγμα που προέκυψε χωρίστηκε σε τέσσερα ίσα μέρη των 750 mL σε κάθε ένα από τα οποία προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα σακχάρων όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 4: Ποσότητα σακχάρων που προστέθηκαν σε κάθε υπόστρωμα (Kennedy, et al., 1997).

A/A	1 (Υπόστρωμα γλυκόζης)	2 (Υπόστρωμα φρουκτόζης)	3 (Υπόστρωμα μαλτόζης)	4 (Mix)
Σάκχαρο				
Γλυκόζη	75 g	-	-	6.80 g
Φρουκτόζη	-	75 g	-	3.55 g
Μαλτόζη	-	-	75 g	64.65 g

Η αναλογία σακχάρων που επιλέχθηκε για το υπόστρωμα μίγματος σακχάρων προέκυψε από την βιβλιογραφία και προσομοιάζει την περιεκτικότητα ενός βυνογλεύκου σε σάκχαρα. Δηλαδή:

- Γλυκόζη 9% των ολικών σακχάρων.
- Φρουκτόζη 5% των ολικών σακχάρων.
- Μαλτόζη 86% των ολικών σακχάρων.

Η προσθήκη των σακχάρων πραγματοποιήθηκε σε συνθήκες συνεχούς και ήπιας ανάδευσης.

Κάθε ένα από τα τέσσερα ισόποσα συστήματα υποστρώματος-σακχάρου χωρίστηκε σε τρία ίσα μέρη των 250 mL. Οι 12 κωνικές φιάλες που παρασκευάστηκαν συνολικά σφραγίστηκαν με βαμβάκι και αλουμινόχαρτο, αποστειρώθηκαν μαζί με ακόμη τρεις κωνικές φιάλες, οι οποίες περιείχαν 100 mL νερό βρύσης και χρησιμοποιήθηκαν στην συνέχεια για τον εμβολιασμό των ζυμών.

2.3 Εμβολιασμός υποστρωμάτων

Μετά το πέρας της αποστείρωσης και την ψύξη των διαλυμάτων (20°C) ακολούθησε ο εμβολιασμός τους με ζύμες. Για τον σκοπό αυτό αρχικά ζυγίστηκε ποσότητα ξηρής ζύμης, όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 5, η οποία στην συνέχεια διαλύθηκε σε 100 mL αποστειρωμένου νερού.

Πίνακας 5: Ποσότητα μικροοργανισμού που χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή του κάθε εμβολίου.

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
0.5 g	1.0 g	0.5 g

Η επιλογή της ποσότητας της ξηρής ζύμης μπορεί να γίνει είτε με βάση την μάζα ξηρής ζύμης είτε με βάση τον όγκο εμβολιασμού. Σε κάθε περίπτωση επιλέγονται ποσότητες τέτοιες ώστε το εμβολιαζόμενο υπόστρωμα/γλεύκος να έχει αρχική συγκέντρωση κυττάρων περίπου ίση με 3×10^6 κύτταρα/mL (Lewis & Bamforth, 2006, p. 117). Στην περίπτωση των υποστρωμάτων αναφοράς η επιλογή της ποσότητας της ξηρής ζύμης έγινε με βάση την συγκέντρωση πληθυσμού στο υπόστρωμα και όχι με βάση την μάζα. Συγκεκριμένα ζυγίστηκε ποσότητα τέτοια ώστε τα τρία εμβόλια να έχουν παρόμοια συγκέντρωση και ο απαιτούμενος όγκος εμβολιασμού των υποστρωμάτων στην συνέχεια να είναι της τάξης μεγέθους μερικών mL.

Για κάθε αιώρημα από τις τρεις ζύμες πραγματοποιήθηκε μέτρηση συγκέντρωσης κυττάρων και βιωσιμότητας σύμφωνα με τη διαδικασία που αναφέρεται στις αναλυτικές μεθόδους. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν για τους τρεις μικροοργανισμούς παρουσιάζονται στον Πίνακα 6. Στη συνέχεια υπολογίστηκε η ποσότητα ενυδατωμένης ζύμης που πρέπει να προστεθεί σε κάθε ένα από τα 12 υποστρώματα σακχάρου (250 mL) ώστε σε αυτό να υπάρχουν 3×10^6 κύτταρα /mL περίπου, και η οποία παρουσιάζεται επίσης στον Πίνακα 5. Στην περίπτωση του *S. cerevisiae* στον υπολογισμό της απαιτούμενης ποσότητας ενυδατωμένης ζύμης συμπεριλήφθηκε το ποσοστό της βιωσιμότητας, καθώς ο αριθμός των μη ενεργών κυττάρων ήταν πολύ μεγάλος. Ο εμβολιασμός των υποστρωμάτων πραγματοποιήθηκε σε αποστειρωμένες συνθήκες.

Πίνακας 6: Συγκέντρωση και βιωσιμότητα κάθε εμβολίου και ποσότητες εμβολιασμού.

Μικροοργανισμός	Βιωσιμότητα %	Συγκέντρωση $\times 10^6$ (κύτταρα/mL)	Ποσότητα εμβολιασμού (mL)
<i>S. cerevisiae</i>	68	342	3.20
<i>T. delbrueckii</i>	86	320	2.34
<i>M. pulcherrima</i>	81	295	2.50

2.4 Παρασκευή ζυθογλεύκους

Για την παρασκευή του βυνογλεύκους (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 προστίθεται στην δεξαμενή πολτοποίησης μαζί με 63 L νερό θερμοκρασίας 64°C. Τα στάδια της πολτοποίησης που ακολουθήθηκαν είναι τρία.
- Κατά το πρώτο στάδιο η θερμοκρασία διατηρείται στους 67 °C για 1 h περίπου, κατά το στάδιο αυτό δρα το ένζυμο β-αμυλάση.
- Στην συνέχεια η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72 °C που 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 ώστε 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 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 γλεύκους πριν τον βρασμό να είναι περίπου ίσος με 120 L.
- Ακολουθεί ο βρασμός του γλεύκους για περίπου 2 h. 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 γλεύκους είναι περίπου 100 L.
- Ακολουθεί ψύξη του γλεύκους μέχρι η θερμοκρασία του να φτάσει τους 20 °C.

2.5 Εμβολιασμός ζυθογλεύκους

Για τον εμβολιασμό κάθε παρτίδας ζυθογλεύκους (20 L) προετοιμάστηκαν εμβόλια με ποσότητες ξηρής ζύμης όπως φαίνονται στον Πίνακα 7, 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 γλεύκους. 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 βυνογλεύκους η οποία έχει μοιραστεί σε τέσσερις ίσες ποσότητες (20 L).

Πίνακας 7: Ποσότητες ξηρής ζύμης για τον εμβολιασμό του ζυθογλεύκου.

Μικροοργανισμός	Ποσότητα ξηρής ζύμης (g) για 20 L γλεύκου.
<i>S. cerevisiae</i>	11.5
<i>T. delbrueckii</i>	11.5
<i>M. pulcherrima</i>	11.5
<i>S. cerevisiae</i> - <i>T. delbrueckii</i> 1:10	0.575-10.925

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

3. Αναλυτικές μέθοδοι

3.1 Μέτρηση πληθυσμού και βιωσιμότητας

Η συγκέντρωση κυττάρων σε ένα δείγμα ανέρχεται σε εκατομμύρια κύτταρα ανά mL και μετρήθηκε με την χρήση μικροσκοπίου με την χρήση πλακιδίου Neubauer (Νεραντζής, 2010).

a. Προετοιμασία δείγματος:

Με την χρήση ειδικού αποστειρωμένου σιφωνίου τοποθετείται 1mL δείγματος, ύστερα από κατάλληλη αραιώση σε δοκιμαστικό σωλήνα και στην συνέχεια προστίθεται 1mL κυανού του μεθυλενίου. Το μίγμα αναδεύεται και αφήνεται για 10 λεπτά.

b. Μέτρηση στο μικροσκόπιο:

Η μεγέθυνση που επιλέγεται στο μικροσκόπιο είναι 40×10 και η μέτρηση πραγματοποιείται με ένα πλακίδιο Neubauer. Το εν λόγω πλακίδιο αποτελείται από 25 μεγάλα τετράγωνα και η μέτρηση πραγματοποιείται σε πέντε από αυτά (εδώ επιλέχθηκε η μέτρηση πέντε τετραγώνων της διαγωνίου). Πρέπει συνολικά να μετριοούνται 100-150 κύτταρα ανά πλακίδιο ώστε το ποσοστό λάθους να είναι μικρότερο από 10%. Προσεγγιστικά 30-60 κύτταρα σε κάθε μεγάλο τετράγωνο, αν ο αριθμός των κυττάρων είναι μεγαλύτερος τότε το δείγμα πρέπει να αραιωθεί. Με την βοήθεια του μικροσκοπίου μετράται ο αριθμός των ενεργών (λευκό χρώμα) και των μη ενεργών (μπλε χρώμα) κυττάρων σε συγκεκριμένο αριθμό τετραγώνων.

c. Υπολογισμοί:

Στην συνέχεια σύμφωνα με τις εξισώσεις που ακολουθούν υπολογίζεται η βιωσιμότητα και η συγκέντρωση των κυττάρων:

$$\text{Βιωσιμότητα \%} = \frac{\alpha}{n} * 100,$$

όπου α ο αριθμός των ενεργών κυττάρων και n ο συνολικός αριθμός αυτών.

$$C = \frac{n}{N} * D * 0.25 * 10^6$$

όπου n ο συνολικός αριθμός κυττάρων, N ο αριθμός των τετραγώνων που μετρήθηκαν και D ο συντελεστής αραιώσης.

3.2 Μέτρηση σακχάρων

3.2.1 Μέτρηση σακχάρων με την μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS)

Η μέτρηση των αναγωγικών σακχάρων πραγματοποιείται με την φωτομετρική μέθοδο DNS. Τα αναγωγικά σάκχαρα (αναγωγικά είναι και τα τρία βασικά σάκχαρα της μπίρας) καθώς διαθέτουν ένα ελεύθερο ημιακεταλικό υδροξύλιο μπορούν να σχηματίσουν σύμπλοκο μεταξύ αυτού και του δινιτροσαλικυλικού οξέος. Η αντίδραση αυτή είναι δυνατό να πραγματοποιηθεί σε θερμοκρασία μεγαλύτερη των 70°C. Το σύμπλοκο που σχηματίζεται παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στα 540nm. Τα τρία σάκχαρα που χρησιμοποιούνται στην εν λόγω εργασία (γλυκόζη, φρουκτόζη και μαλτόζη) είναι αναγωγικά, και κατά συνέπεια μπορούν να μετρηθούν με την μέθοδο DNS (Anon., 2015).

a. Παρασκευή αντιδραστήριου:

Παρασκευάζεται διάλυμα δινιτροσαλικυλικού οξέος (3,5 dinitrosalicylic acid) συνολικής ποσότητας 1 L, ως εξής:

- Αρχικά ζυγίζονται 16 g NaOH και διαλύονται σε 200 mL απιονισμένου νερού σε ένα ποτήρι ζέσεως. Έτσι προκύπτει διάλυμα NaOH 8% w/v.
- Στο ίδιο ποτήρι ζέσεως και υπό συνεχή ανάδευση προστίθενται 500 mL απιονισμένου νερού.
- Στην συνέχεια πάλι υπό ανάδευση προστίθενται 10 g άνυδρου DNS.
- Με παροχή ελαφριάς θέρμανση και ήπιας ανάδευσης προστίθενται 402.7 g τρυγικού καλιονατρίου με πολύ αργό ρυθμό.
- Τελικά το ομοιογενές διάλυμα τοποθετείται σε ειδικό δοχείο καφέ χρώματος ώστε να προστατεύεται από το φως.

b. Μεθοδολογία:

:

- Σε δοκιμαστικούς σωλήνες (δύο για κάθε συγκέντρωση σακχάρου) προστίθενται 0.5 mL δινιτροσαλικυλικού οξέος και 0.5 mL δείγματος.
- Επίσης παρασκευάζεται και το τυφλό διάλυμα, που περιέχει 0.5 mL DNS και 0.5 mL απιονισμένο νερό.
- Τα δείγματα αναδεύονται καλά και στην συνέχεια τοποθετούνται σε νερό που βράζει για 5 min, ώστε να ξεκινήσει η αντίδραση.
- Στη συνέχεια σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται 4 mL απιονισμένο νερό.
- Ρυθμίζεται το φωτόμετρο στα 540 nm και μετά τον μηδενισμό του με το τυφλό διάλυμα πραγματοποιείται η μέτρηση των δειγμάτων.
- Ο υπολογισμός της περιεκτικότητας σε αναγωγικά σάκχαρα γίνεται με βάση τις καμπύλες αναφοράς. Οι καμπύλες αναφοράς παρασκευάστηκαν χωριστά για γλυκόζη, φρουκτόζη και μαλτόζη από αρχικά διαλύματα συγκέντρωσης 2 mg/mL με διαδοχικές αραιώσεις.

3.2.2 Μέτρηση σακχάρων με πλατόμετρο

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.

a. 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.

3.3 Προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε αιθανόλη

Στην παρούσα εργασία ο προσδιορισμός της αιθανόλης πραγματοποιήθηκε με δύο μεθόδους:

3.3.1 Προσδιορισμός της αιθανόλης με μέθοδο UV

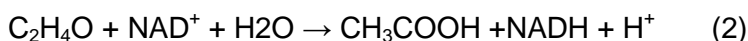
Για την μέθοδο αυτή χρησιμοποιήθηκε πρότυπο kit αιθανόλης (Cat. No. 10 176 290 035)

a. Αρχή της μεθόδου:

Η αιθανόλη οξειδώνεται σε ακεταλδεΐδη από NAD παρουσία του ενζύμου αλκοολική αφυδρογονάση (ADH) (αντίδραση 1):



Η ισορροπία της παραπάνω αντίδρασης είναι μετατοπισμένη προς τα αριστερά. Σε αλκαλικές όμως συνθήκες η αντίδραση μετατοπίζεται δεξιά και παράγεται ακεταλδεΐδη. Η ακεταλδεΐδη στη συνέχεια οξειδώνεται ποσοτικά σε οξικό οξύ παρουσία αλδεϋδικής αφυδρογονάσης (AI-DH) (αντίδραση 2):



Το NADH προσδιορίζεται μέσω της απορρόφησης του φωτός στα εξής μήκη κύματος: 334, 340 και 365nm.

b. Αντιδραστήρια:

Το kit αιθανόλης περιείχε τα εξής αντιδραστήρια:

- 1ος περιέκτης: 100 mL πρότυπου διαλύματος διφωσφορικού καλίου, pH≈9.
- 2ος περιέκτης: περιέχει 30 δισκία κάθε ένα από τα οποία περιέχει 4 mg NAD και 0.8 U του ενζύμου AI-DH.
- 3ος περιέκτης: 1.3 mL εναιωρήματος το οποίο αποτελείται από 7000 U ADH.
- 4ος περιέκτης: πρότυπο διάλυμα αιθανόλης.

c. Μεθοδολογία:

- Για τη μέτρηση αυτή απαιτείται αλκαλικό περιβάλλον, για τον λόγο αυτό σε κάθε μετρούμενο δείγμα προστίθεται αρχικά μικρή ποσότητα NaOH σε κρυσταλλική μορφή ώστε το pH του δείγματος να γίνει ίσο με 8-9.
- Το κάθε δείγμα αναδεύεται ήπια για 5-10 min ώστε να απομακρυνθεί εντελώς το διοξείδιο του άνθρακα.
- Στη συνέχεια πραγματοποιείται η κατάλληλη αραιώση ώστε το μετρούμενο διάλυμα να έχει συγκέντρωση σε αιθανόλη 0.02-0.12 g/L (365 nm) ή 0.06 g/L (340, 334 nm).
- Κατευθείαν σε κυψελίδα τοποθετείται ένα δισκίο από τον 2^ο περιέκτη και 3 mL από το διάλυμα του 1^{ου} περιέκτη. Το μίγμα αφήνεται για μερικά λεπτά έως ότου να διαλυθεί το δισκίο και έπειτα αναδεύεται ελαφρά. Ένα ίδιο μίγμα παρασκευάζεται για το τυφλό.
- Στην περίπτωση των δειγμάτων στην ίδια κυψελίδα προστίθενται 0.100 mL κατάλληλα αραιωμένου δείγματος, ενώ στην περίπτωση του τυφλού 0.100 mL απιονισμένο νερό. Τα διαλύματα αναδεύονται ελαφρά και αφήνονται για περίπου 3 min. Στο στάδιο αυτό πραγματοποιείται η αντίδραση1.
- Κάθε δείγμα μετράται στο φωτόμετρο (A_1)
- Σε κάθε κυψελίδα προστίθενται 0.050 mL από τον 3^ο περιέκτη και ακολουθεί ήπια ανάδευση. Τα δείγματα αφήνονται σε ηρεμία για 5-10 min περίπου και στην συνέχεια καταγράφεται η ένδειξη του φωτόμετρου. (A_2).

d. Υπολογισμοί:

Αρχικά για όλα τα δείγματα αλλά και για το τυφλό υπολογίζεται η διαφορά (A_2-A_1) και στη συνέχεια αφαιρείται η διαφορά απορρόφησης του κάθε δείγματος από την αντίστοιχη διαφορά του τυφλού.

$$\Delta A = (A_2 - A_1)_{sample} - (A_2 - A_1)_{blank}$$

Για να θεωρηθούν ασφαλή τα αποτελέσματα πρέπει η διαφορά (A_2-A_1) να είναι τουλάχιστον 0.100.

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης σε αντιδράσεις στις οποίες η ποσότητα του NADH που σχηματίζεται είναι, με βάση την στοιχειομετρία της αντίδρασης, μισή από αυτή του υποστρώματος χρησιμοποιείται η παρακάτω γενική εξίσωση:

$$c = \frac{V \times MW}{\epsilon \times d \times v \times 2 \times 1000} \times \Delta A \left(\frac{g}{L}\right)$$

Όπου:

V: ο τελικός όγκος στην κυψελίδα (mL)

v: ο όγκος του δείγματος(mL)

MW: το μοριακό βάρος της προσδιοριζόμενης ουσίας

d: light path

ϵ : συντελεστής εξαφάνισης του NADH, ο οποίος εξαρτάται από το μήκος κύματος στο οποίο πραγματοποιείται η μέτρηση, δηλαδή αν:

- $\lambda=340 \text{ nm} \rightarrow \varepsilon=6.3(1 \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1})$
- $\lambda=365 \text{ nm} \rightarrow \varepsilon=3.4(1 \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1})$
- $\lambda=334 \text{ nm} \rightarrow \varepsilon=6.18(1 \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1})$

Στην περίπτωση της αιθανόλης η εξίσωση γίνεται ως εξής:

$$c_{\text{αιθανόλης}} = \frac{0.7256}{\varepsilon} \times \Delta A \left(\frac{g_{\text{αιθανόλης}}}{L_{\text{δείγματος}}} \right)$$

Αν το δείγμα έχει αραιωθεί τότε προφανώς το αποτέλεσμα πολλαπλασιάζεται με τον συντελεστή αραιώσης.

Όταν πραγματοποιείται ανάλυση σε δείγματα που περιέχουν αιθανόλη (αλκοολούχα ποτά ή φαρμακευτικά προϊόντα) για να υπολογιστεί η επί τις εκατό περιεκτικότητα της αιθανόλης στο σκεύασμα στους 20 °C χρησιμοποιείται η πυκνότητα της αιθανόλης στην ίδια θερμοκρασία, η οποία είναι ίση με $d=0.78924 \text{ g/mL}$.

Οπότε τελικά προκύπτει ότι:

$$\% \text{αιθανόλη} = \frac{c_{\text{αιθανόλης}} \left(\frac{g}{L_{\text{δείγματος}}} \right)}{10 \times 0.78924 \times \left(\frac{g}{mL} \right)} \left(\% \frac{v}{v} \right)$$

3.3.2 Προσδιορισμός αιθανόλης με απόσταξη

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 απόσταγμα 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.

3.4 Μέτρηση διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου (FAN)

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

a. 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 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 6.0 g KH_2PO_4 , 0.5 g νινυδρίνης και 0.3 g φρουκτόζης. Στην συνέχεια η κωνική φιάλη πληρώνεται με απιονισμένο νερό μέχρι την χαραγή.
- Διάλυμα αραιώσης: Ζυγίζονται 2 g KIO_3 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.

b. 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.

c. 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:

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

3.5 Προσδιορισμός Πικράδας (Beer Bitterness)

Για την μέτρηση της πικράδας χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Isooctane extraction: Reduce solvent technique σύμφωνα με την ASBC Methods of Analysis

a. Μεθοδολογία:

- Αρχικά 5 mL παγωμένης μπύρας μεταφέρονται σε σωλήνα φυγοκέντρησης των 50 mL.
- Στον σωλήνα φυγοκέντρησης προστίθενται 0.5 mL πρότυπου δ/τος HCl 3 N και 10 mL ισοοκτανίου.
- Για το τυφλό διάλυμα σε ένα σωλήνα φυγοκέντρησης προστίθενται 10 mL ισοοκτάνιο και 0.5 mL HCl, 3 N.
- Οι σωλήνες σφραγίζονται και τοποθετούνται σε μηχανικό shaker για 15 min και σε ταχύτητα ίση με το 80% της μέγιστης ταχύτητας του μηχανήματος.
- Μετά το πέρας των 15 min τα δείγματα τοποθετούνται στη φυγόκεντρο στις 4000 rpm για 5 min, ώστε να γίνει διαχωρισμός φάσεων.
- Στην συνέχεια το κάθε δείγμα τοποθετείται στον πάγκο εργασίας και περιστρέφεται για λίγο ώστε να διαπιστωθεί αν έχει γίνει σαφής διαχωρισμός των φάσεων.
- Οι σωλήνες επανατοποθετούνται στην φυγόκεντρο για ακόμη 5 min.
- Μετά το τέλος της δεύτερης φυγοκέντρησης περιστρέφουμε ξανά το κάθε δείγμα πάνω στον πάγκο. Αν ο διαχωρισμός είναι καλός προχωράμε στο επόμενο βήμα της διαδικασίας, αν όχι επαναλαμβάνεται ακόμη μια φυγοκέντρηση.
- Τελικά μεταφέρεται κατάλληλη ποσότητας του επάνω στρώματος του φυγοκεντρημένου διαλύματος, το οποίο αποτελείται από ισοοκτάνιο, σε κυψελίδα χαλαζία και πραγματοποιείται μέτρηση στα 275 nm.

b. Υπολογισμοί:

Ο αριθμός πικράδας της μπύρας (International Bitterness units) δίνεται από την σχέση:

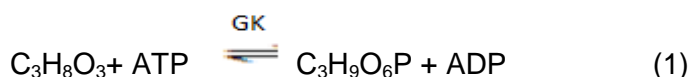
$$IBU = Absorbance_{275} \times 50$$

3.6 Προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε γλυκερίνη

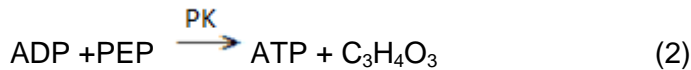
Για τον προσδιορισμό της παραγόμενης γλυκερίνης χρησιμοποιήθηκε μια φασματοφωτομετρική μέθοδος με χρήση πρότυπου kit γλυκερίνης (Cat. No. 10 148 270 035).

a. Αρχή της μεθόδου:

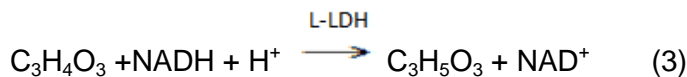
Η γλυκερόλη φωσφορυλιώνεται με χρήση ATP σε 3-φωσφορική γλυκερόλη σε μια αντίδραση η οποία καταλύεται από γλυκεροκινάση (GK) (αντίδραση 1).



Το 5'-αδενοσινο-διφωσφορικό οξύ (ADP) που σχηματίζεται στην παραπάνω αντίδραση μετατρέπεται ξανά σε ATP από το PEP με κατάλυση από την πυροσταφυλική κινάση (PK) με τον ταυτόχρονο σχηματισμό πυροσταφυλικού (αντίδραση 2).



Με την παρουσία του ενζύμου L-γαλακτική αφυδρογονάση (L-LDH), το πυροσταφυλικό ανάγεται σε L-γαλακτικό με την ταυτόχρονη μείωση του NADH καθώς το NADH οξειδώνεται σε NAD. (αντίδραση 3):



Το ποσό NADH που οξειδώνεται στην παραπάνω αντίδραση είναι ίσο, βάση στοιχειομετρίας με το ποσό της γλυκερόλης. Το NADH προσδιορίζεται μέσω της απορρόφησης του φωτός στα εξής μήκη κύματος: 334, 340 και 365 nm.

b. Αντιδραστήρια:

- 1ος περιέκτης(×3): περιέχει 2 g μίγματος συνενζύμου/buffer, κάθε ένα από τα οποία περιέχει: γλυκυλ γλυκίνη με pH=7.4, 7 g NADH, 22 mg ATP, 11 mg PEP-CHA και θειικό μαγνήσιο.
- 2ος περιέκτης: 0.4 mL εναιωρήματος που αποτελείται από: 240 U πυροσταφυλική κινάση, 220 U L-γαλακτική αφυδρογονάση
- 3ος περιέκτης: 0.4 mL αιωρήματος γλυκεροκινάσης 34 U
- 4ος περιέκτης: πρότυπο διάλυμα γλυκερόλης.

c. Μεθοδολογία:

- Τα δείγματα που χρησιμοποιούνται στη μέθοδο αυτή υφίστανται μια προκατεργασία ώστε να αφαιρεθεί το διοξείδιο του άνθρακα (ανάδευση) και να έχουν μια τιμή pH περίπου ίση με 8 (με NaOH).
- Το κάθε δείγμα πρέπει να έχει συγκέντρωση γλυκερίνης μεταξύ 0.04 και 0.4 g/L. Έτσι σύμφωνα με τα αναμενόμενα ποσά γλυκερίνης εκτελείται και η αντίστοιχη αραιώση.
- Ακόμη αραιώνεται το διάλυμα του 1^{ου} περιέκτη με 11 mL απιονισμένο νερό και αφήνεται για 10 min σε ηρεμία σε θερμοκρασία δωματίου.
- Σε κυψελίδα (μια για κάθε δείγμα και μια επιπλέον για το τυφλό) τοποθετείται 1 mL του αραιωμένου διαλύματος του 1^{ου} περιέκτη.
- Στην συνέχεια σε όλες τις κυψελίδες προστίθενται 0.01 mL από τον 2^ο περιέκτη.
- Στην περίπτωση των δειγμάτων στο παραπάνω μίγμα προστίθενται 0.100 mL κατάλληλα αραιωμένου δείγματος και 1.9 mL απιονισμένο νερό. Ενώ στην περίπτωση του τυφλού διαλύματος προστίθενται απλά 2 mL απιονισμένου νερού.
- Ακολουθεί ανάδευση και μετά από 5-7 min που ολοκληρώνεται η προ-αντίδραση καταγράφεται η απορρόφηση του κάθε δείγματος. (A₁)
- Σε κάθε μια από τις κυψελίδες προστίθενται 0.01 mL από το περιεχόμενο του 3^{ου} περιέκτη.
- Ανάδευση και μετά από περίπου 5-10 min όπου θα έχει ολοκληρωθεί η αντίδραση καταγράφεται η απορρόφηση των δειγμάτων (A₂).

d. Υπολογισμοί:

Ομοίως με την μέθοδο προσδιορισμού της αιθανόλη ισχύουν οι εξισώσεις:

$$\Delta A = (A_2 - A_1)_{sample} - (A_2 - A_1)_{blank}$$

και

$$c = \frac{V \times MW}{\epsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta A \left(\frac{g}{L} \right)$$

Για την γλυκερόλη:

$$c_{\text{γλυκερόλης}} = \frac{2.781}{\epsilon} \times \Delta A \left(\frac{g_{\text{αιθανόλης}}}{L_{\text{δείγματος}}} \right)$$

Αν το δείγμα έχει αραιωθεί τότε προφανώς το αποτέλεσμα πολλαπλασιάζεται με τον συντελεστή αραιώσης.

3.7 Προσδιορισμός χρώματος

Ο προσδιορισμός του χρώματος στα τελικά προϊόντα πραγματοποιήθηκε με δύο μεθόδους:

3.7.1 Φωτομετρική μέθοδος προσδιορισμού του χρώματος

Η μέτρηση του χρώματος στην περίπτωση αυτή πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την επίσημη μέθοδο όπως περιγράφεται από το ASBC Methods of Analysis.

a. Μεθοδολογία:

Το μετρούμενο δείγμα πρέπει να είναι διαυγές. Αν το δείγμα δεν είναι διαυγές τότε πρέπει πριν την μέτρησή του στο φωτόμετρο να φυγοκεντρηθεί. Στην περίπτωση που μετά την φυγοκέντρωση το δείγμα είναι ακόμη θολό τότε φιλτράρεται. Το διαυγές πλέον δείγμα φωτομετρείται σε μήκος κύματος 430 nm και στην συνέχεια σε μήκος κύματος 700 nm.

b. Υπολογισμοί:

Υπολογίζονται τα εξής:

$$(A^{1/2}, 430 \text{ nm}) = 1.27 \times A_{430} \text{ και}$$

$$(A^{1/2}, 700 \text{ nm}) = 1.27 \times A_{700}$$

Για να είναι δεκτές οι μετρήσεις πρέπει $(A^{1/2}, 430 \text{ nm}) \geq (A^{1/2}, 700 \text{ nm})$.

Αν ισχύει η παραπάνω σχέση τότε το χρώμα του δείγματος δίνεται από την παρακάτω σχέση:

$$\text{Beer color} = 10 \times (A^{1/2}, 430 \text{ nm})$$

Στην περίπτωση που ισχύει το αντίθετο τότε το πείραμα πρέπει να επαναληφθεί καθώς τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν δεν ήταν αρκετά διαυγή.

3.7.2 Προσδιορισμός του χρώματος με χρήση χρωματομέτρου

Χρησιμοποιήθηκε το χρωματομέτρο Minolta CR-200 (Minolta Company, Chuo-Ku, Osaka, Japan) και συγκεκριμένα οι παράμετροι χρώματος CIE Lab (Comission International de l' Eclairage) (CIE 1978).

a. Μεθοδολογία:

Η μέθοδος αυτή έχει ως μόνη προϋπόθεση ένα ομοιόμορφο και διαυγές δείγμα χωρίς φυσαλίδες. Κατά συνέπεια τα δείγματα φυγοκεντρούνται και στην συνέχεια κατάλληλη ποσότητα (≈ 3 mL) τοποθετείται σε ειδικό τρυβλίο. Το χρωματομέτρο είναι φορητό με οπή διαμέτρου 8 mm μέσω της οποίας πραγματοποιείται η μέτρηση χρώματος του εκάστοτε δείγματος.

b. Υπολογισμοί:

Κατά την χρωματομετρία μέτρησης των συντεταγμένων Lab της κλίμακας CIE το L εκφράζει την φωτεινότητα των δειγμάτων, ενώ οι άλλες δύο παράμετροι a και b σχετίζονται με το χρώμα του δείγματος. Συγκεκριμένα, η παράμετρος a όταν λαμβάνει αρνητικές τιμές προσδιορίζει πράσινο χρώμα, ενώ όταν λαμβάνει θετικές τιμές προσδιορίζει το κόκκινο χρώμα. Στην περίπτωση της παραμέτρου b, όταν λαμβάνει αρνητικές τιμές προσδιορίζει το μπλε χρώμα, ενώ όταν λαμβάνει θετικές τιμές προσδιορίζει το κίτρινο χρώμα. Από τις λαμβανόμενες τιμές των παραμέτρων αυτών, υπολογίζεται η συνολική μεταβολή της οπτικής απόκρισης ΔE και η συνολική μεταβολή του χρώματος ΔC . Οι τιμές των μεγεθών αυτών υπολογίζονται μέσω των εξισώσεων:

$$\Delta E = \sqrt{(L - L_0)^2 + (a - a_0)^2 + (b - b_0)^2}$$

$$\Delta C = \sqrt{(a - a_0)^2 + (b - b_0)^2}$$

όπου τα L_0 , a_0 και b_0 αναφέρονται στα δείγματα αναφοράς

3.8 Ανάλυση αρωματικών

3.8.1 Διαδικασία εκχύλισης με στήλη Vigreux

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

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

Για τον προσδιορισμό του αρωματικού προφίλ χρησιμοποιήθηκε σε αέριο χρωματογράφο-φασματόμετρο μάζας Hewlett-Packard 6890 Agilent Technologies 5975C VL MSD Triple-Axis detector. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με μια τριχοειδή στήλη διοξειδίου του πυριτίου HP-1 (Agilent Technologies) με διαστάσεις 30 m × 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.

Παρουσίαση αποτελεσμάτων και σχολιασμός

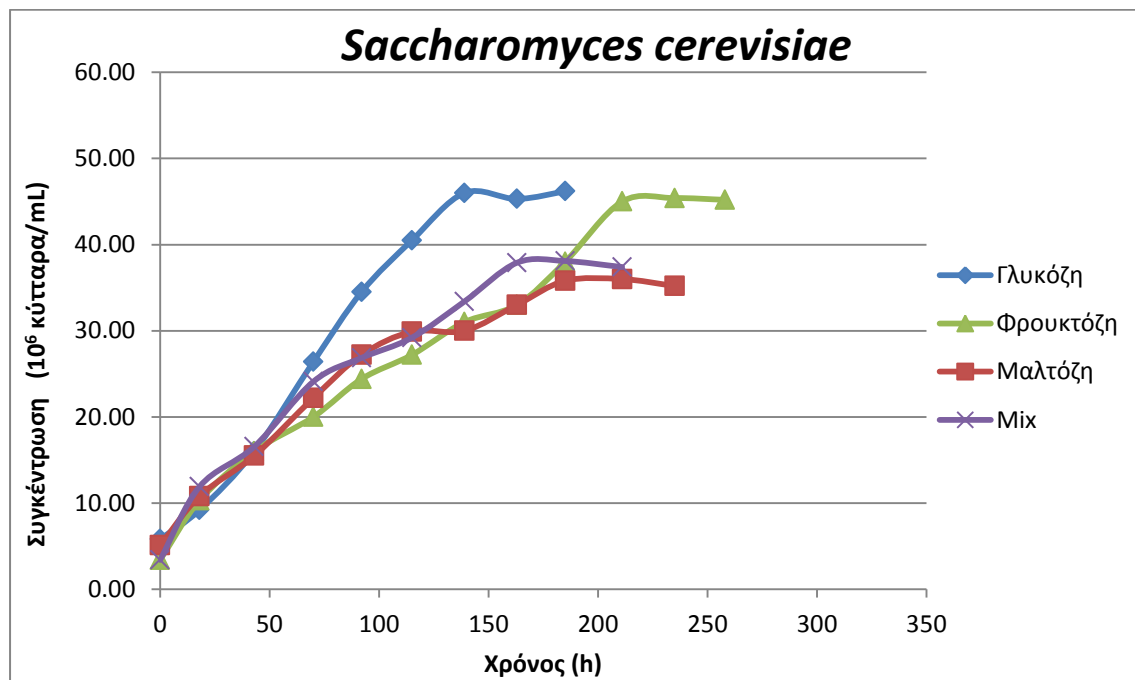
A Πείραμα ζύμωσης απλών σακχάρων

Στο κεφάλαιο που ακολουθεί παρατίθενται και σχολιάζονται τα αποτελέσματα του πειράματος ζύμωσης σε υπόστρωμα απλών σακχάρων τα οποία έχουν προκύψει από μονή επανάληψη στην περίπτωση των υποστρωμάτων ενός σακχάρου και διπλή επανάληψη του πειράματος στην περίπτωση του υποστρώματος μίγματος σακχάρων.

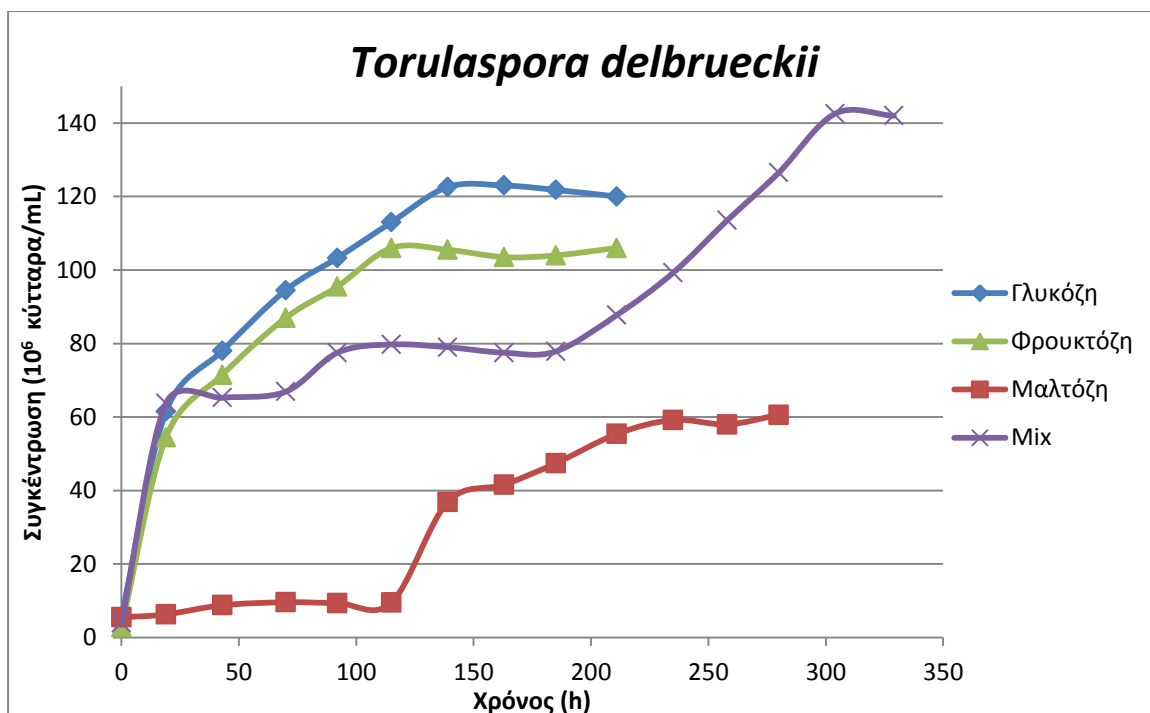
A.1 Μελέτη της ανάπτυξης των μικροοργανισμών σε πρότυπο υπόστρωμα

A.1.1 Καμπύλες ανάπτυξης

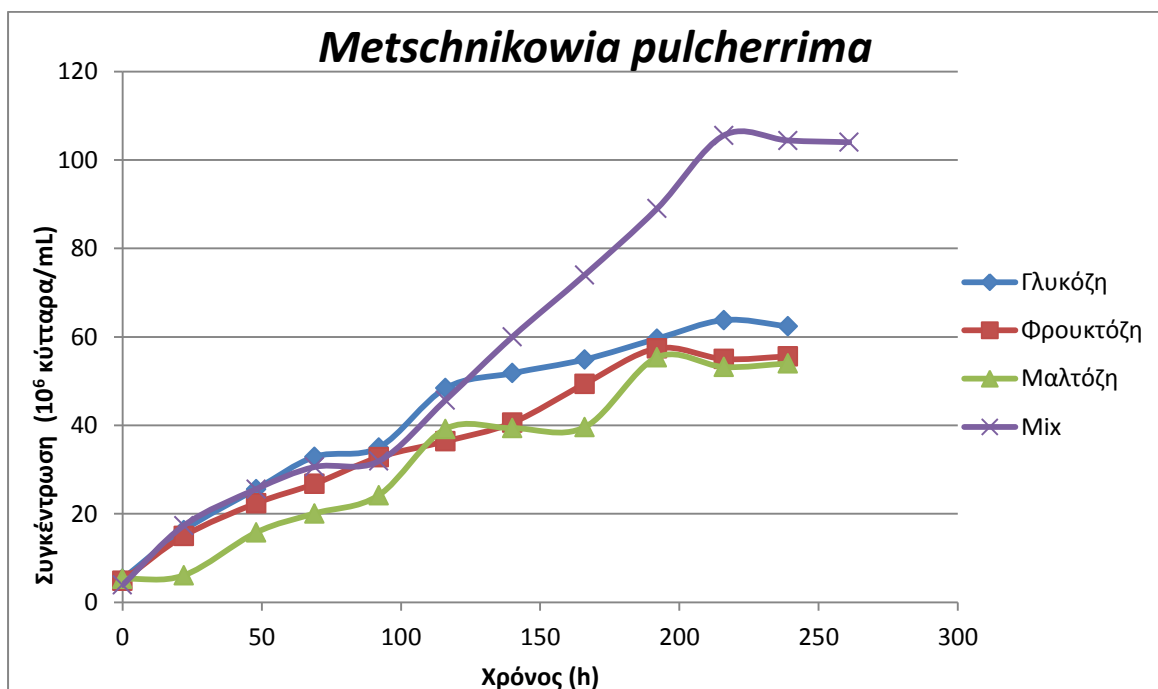
Στα διαγράμματα 1 έως 3 παρουσιάζεται η ανάπτυξη των τριών μικροοργανισμών σε κάθε ένα από τα τέσσερα υποστρώματα σακχάρων, ενώ στους πίνακες 1 έως 3 του παραρτήματος παρουσιάζονται οι αντίστοιχες τιμές συγκέντρωσης των κυττάρων συναρτήσει του χρόνου :



Διάγραμμα 1: Καμπύλες ανάπτυξης του *S. cerevisiae* στα διαφορετικά υποστρώματα καθαρών σακχάρων και μίγματος.



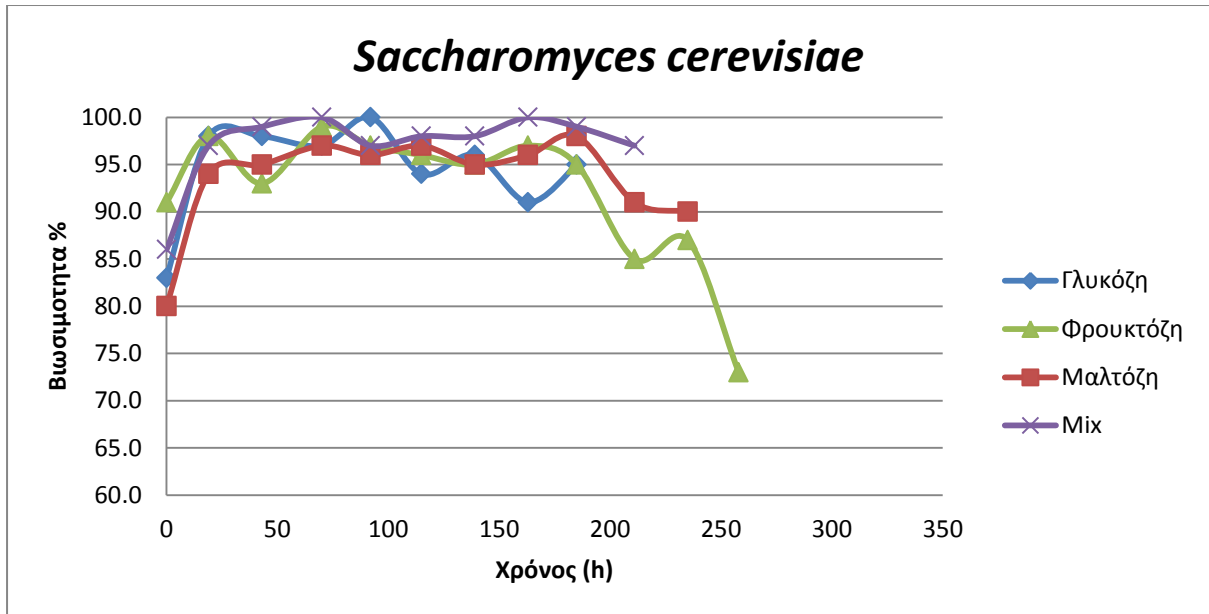
Διάγραμμα 2: Καμπύλες ανάπτυξης της *T. delbrueckii* στα διαφορετικά υποστρώματα σακχάρων και μίγματος.



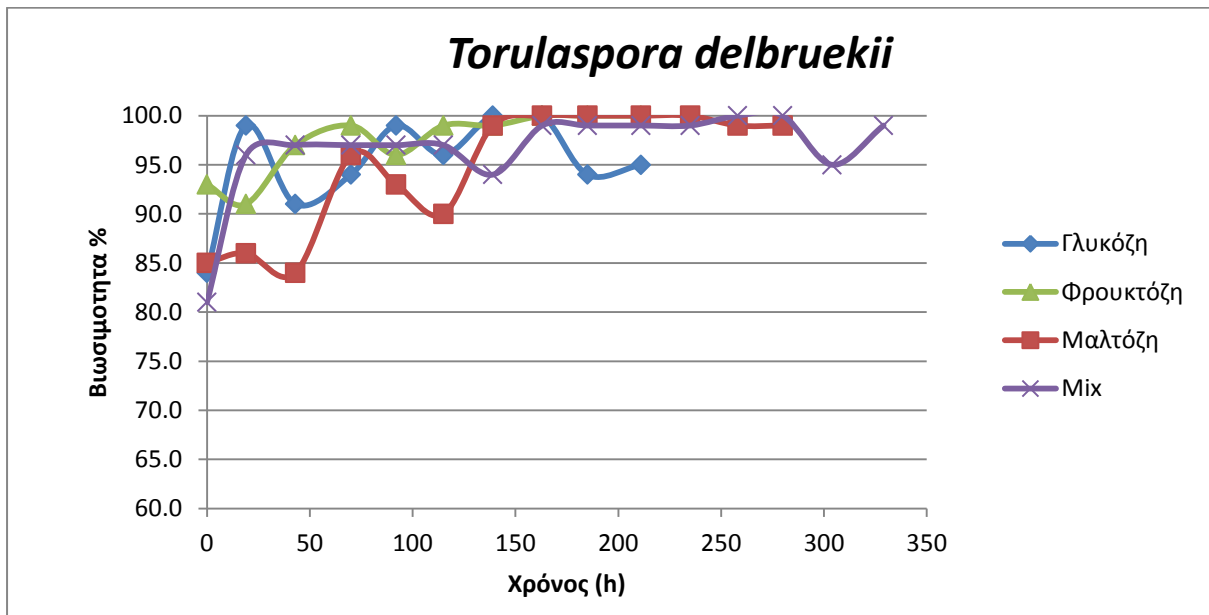
Διάγραμμα 3: Καμπύλες ανάπτυξης της *M. pulcherrima* στα διάφορα υποστρώματα σακχάρων και μίγματος.

A.1.2 Βιωσιμότητα

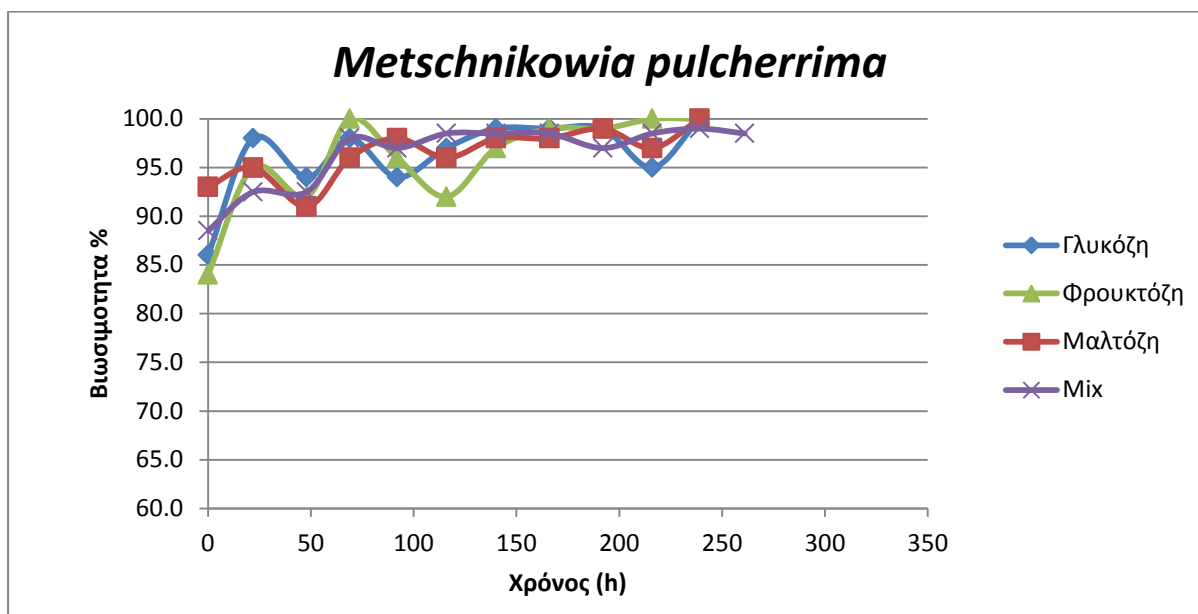
Παράλληλα με τις μετρήσεις για τη συγκέντρωση των κυττάρων καταγραφόταν και ο αριθμός μεταβολικά ενεργών και ανενεργών κυττάρων και υπολογιζόταν η βιωσιμότητα αυτών. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στα διαγράμματα 4 έως 6, ενώ οι αντίστοιχες τιμές δίνονται στο παράρτημα (Πίνακες 4-6):



Διάγραμμα 4: Βιωσιμότητα των κυττάρων του *S. cerevisiae* κατά την διάρκεια της ζύμωσης στα διαφορετικά υποστρώματα σακχάρων και μίγματος.



Διάγραμμα 5: Βιωσιμότητα των κυττάρων της *T. delbrueckii* κατά την διάρκεια ζύμωσης στα διαφορετικά υποστρώματα σακχάρων και μίγματος.



Διάγραμμα 6: %Βιωσιμότητα των κυττάρων της *M. pulcherrima* κατά την διάρκεια της ζύμωσης στα διαφορετικά υποστρώματα σακχάρων και μίγματος.

A.1.3 Σχολιασμός διαγραμμάτων

Όπως μπορεί να παρατηρηθεί από τα διαγράμματα και οι τρεις μικροοργανισμοί κατάφεραν να πολλαπλασιαστούν στα διάφορα υποστρώματα αλλά με διαφορετικό ρυθμό ανάπτυξης ο καθένας.

Πιο συγκεκριμένα ο *S. cerevisiae* παρουσίασε παρόμοιο ρυθμό ανάπτυξης και στα τέσσερα διαφορετικά υποστρώματα σακχάρων, με λίγο πιο γρήγορη ανάπτυξη στην περίπτωση της γλυκόζης (8 ημέρες) από ότι στα υπόλοιπα τρία υποστρώματα (10 ημέρες). Όσον αφορά στη συγκέντρωση των κυττάρων μεγαλύτερη τελική συγκέντρωση παρατηρήθηκε στα υποστρώματα που περιείχαν γλυκόζη και φρουκτόζη παρόλο που η τελική συγκέντρωση κυττάρων στο σύνολο των υποστρωμάτων ήταν περίπου 2 φορές χαμηλότερη από την αναμενόμενη. Αυτό θεωρείται ότι οφείλεται σε ελαττωματική πρώτη ύλη (ξηρή ζύμη) καθώς ήδη κατά την παρασκευή του εμβολίου η βιωσιμότητα των κυττάρων βρέθηκε πολύ μικρή (68%). Παρόλα αυτά θεωρήθηκε ότι και με αυτή τη συγκέντρωση κυττάρων ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός θα ήταν σε θέση να ολοκληρώσει τη ζύμωση, γεγονός που θα δειχτεί παρακάτω στις καμπύλες κατανάλωσης των σακχάρων.

Όσον αφορά στη ζύμη *T. delbrueckii* στα υποστρώματα γλυκόζης και φρουκτόζης ο ρυθμός ανάπτυξης είναι ομαλός και παρόμοιος με το ρυθμό ανάπτυξης του *S. cerevisiae* (ολοκλήρωση της ανάπτυξης σε περίπου 9 ημέρες). Στην περίπτωση του πρότυπου υποστρώματος που περιείχε ως σάκχαρο την μαλτόζη διαπιστώθηκε μια αρκετά μεγάλη λανθάνουσα φάση (4-5 ημέρες). Στη φάση αυτή η ζύμη βρίσκεται σε μία περίοδο προσαρμογής και ακόμη δεν δρα η μαλτάση που θα διασπάσει τη μαλτόζη σε δύο μόρια γλυκόζης τα οποία θα μεταβολίσει στην συνέχεια ο μικροοργανισμός. Την 5^η όμως ημέρα ξεκινά η φάση πολλαπλασιασμού των κυττάρων αλλά η τελική συγκέντρωση βρέθηκε σημαντικά μικρότερη, ίση με περίπου 60×10^6 κύτταρα/mL. Τέλος παρατηρήθηκε ότι στην

περίπτωση του υποστρώματος που περιέχει μίγμα σακχάρων σε αναλογίες αντίστοιχες του ζυθογλεύκου η τελική συγκέντρωση κυττάρων είναι μεγαλύτερη από κάθε άλλο υπόστρωμα (140×10^6 κύτταρα/mL). Στην περίπτωση αυτή παρατηρούνται δύο φάσεις ανάπτυξης, η πρώτη η οποία ξεκινά αμέσως μετά τον εμβολιασμό και αφορά τον μεταβολισμό της γλυκόζης και της φρουκτόζης ακολουθούμενη από μια σχεδόν στατική φάση και την 8^η μέρα ξεκινά ο περεταίρω πολλαπλασιασμός των κυττάρων (κατανάλωση μαλτόζης).

Στην περίπτωση της *M. pulcherrima* ο ρυθμός ανάπτυξης στα υποστρώματα γλυκόζης φρουκτόζης και μαλτόζης είναι σχετικά αργός αλλά και στις τρεις περιπτώσεις ο μικροοργανισμός σε διάστημα 10 ημερών ολοκλήρωσε την ανάπτυξή του και έφτασε σε τελική συγκέντρωση περίπου ίση με 60×10^6 κύτταρα/mL. Στο υπόστρωμα που περιείχε και τα τρία σάκχαρα ενώ ο ρυθμός ανάπτυξής του ήταν όμοιος με των υπολοίπων μέχρι και την 5^η μέρα ζύμωσης, κατά την 6^η ο ρυθμός αυξήθηκε και στην περίπτωση αυτή η τελική συγκέντρωση της ζύμης μετρήθηκε ίση με 100×10^6 κύτταρα/mL.

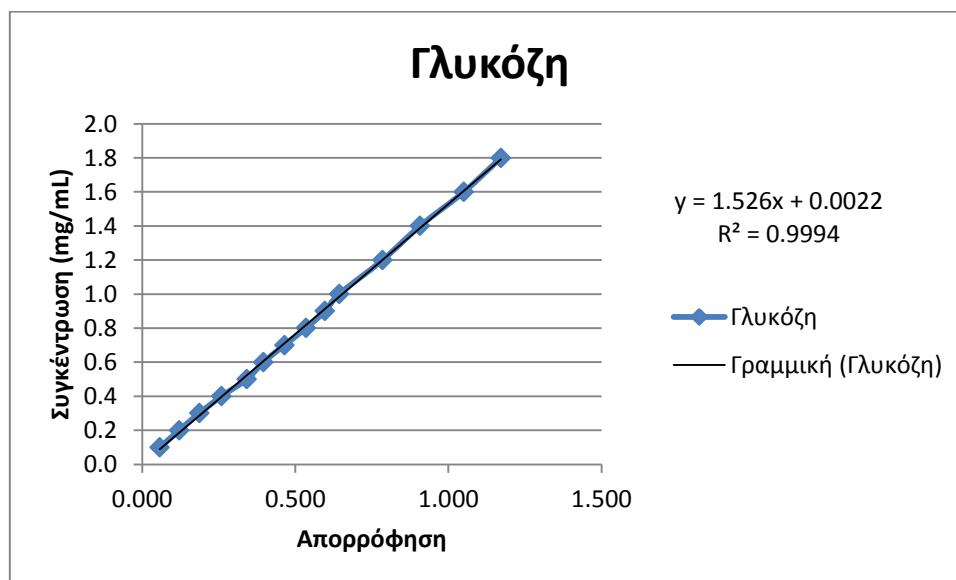
Σε κάθε ένα από τα δώδεκα συστήματα ζύμης-σακχάρου η βιωσιμότητα ξεκινούσε από σχετικά χαμηλά επίπεδα 80-90% και με την έναρξη της φάσης πολλαπλασιασμού το ποσοστό αυτό αυξανόταν (90-100%). Στη συνέχεια κατά τη διάρκεια της ζύμωσης η βιωσιμότητα παρέμεινε σχετικά σταθερή, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρήθηκε και η φάση θανάτου του μικροοργανισμού (μείωση της βιωσιμότητας).

A.2 Μελέτη της κατανάλωσης σακχάρων

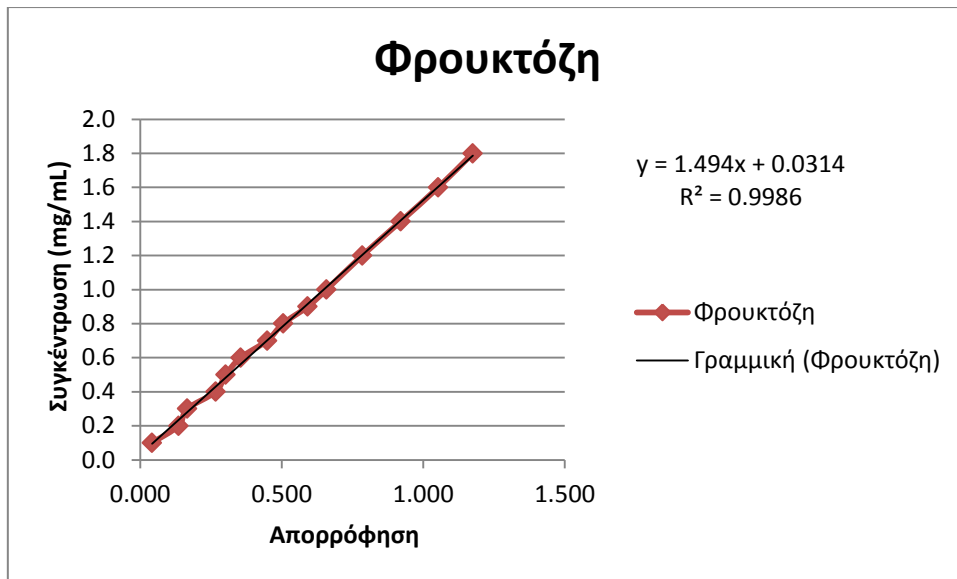
Παράλληλα με τις μετρήσεις συγκέντρωσης και βιωσιμότητας των μικροοργανισμών γίνονταν καθημερινά και μετρήσεις συγκέντρωσης σακχάρων με τη μέθοδο DNS.

A.2.1 Καμπύλες αναφοράς

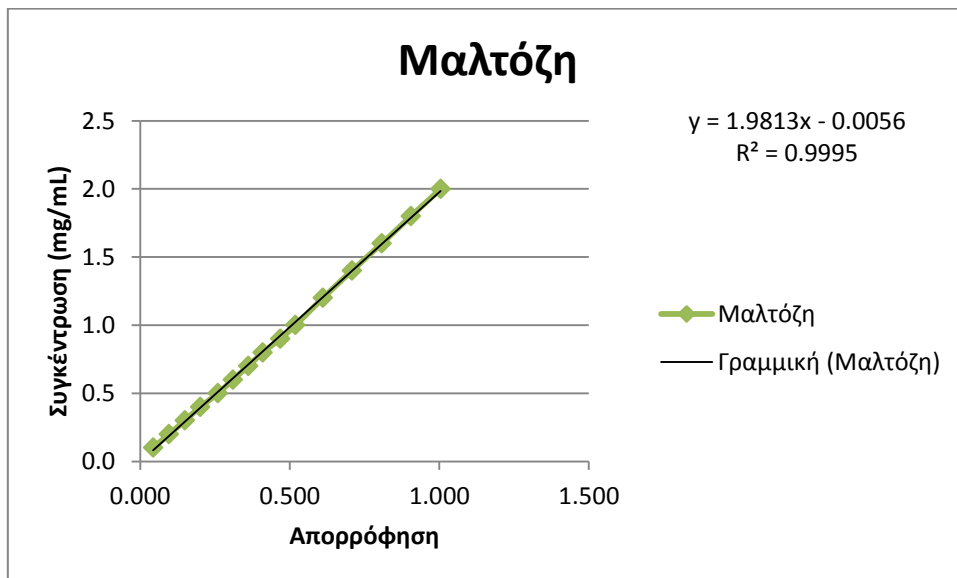
Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης σακχάρων στα δείγματα είναι απαραίτητη η κατασκευή καμπυλών αναφοράς για κάθε ένα από τα τρία αναγωγικά σάκχαρα (γλυκόζη, φρουκτόζη και μαλτόζη) οι οποίες δίνονται στα διαγράμματα 7 έως 9:



Διάγραμμα 7: Καμπύλη αναφοράς της γλυκόζης για την μέθοδο DNS.



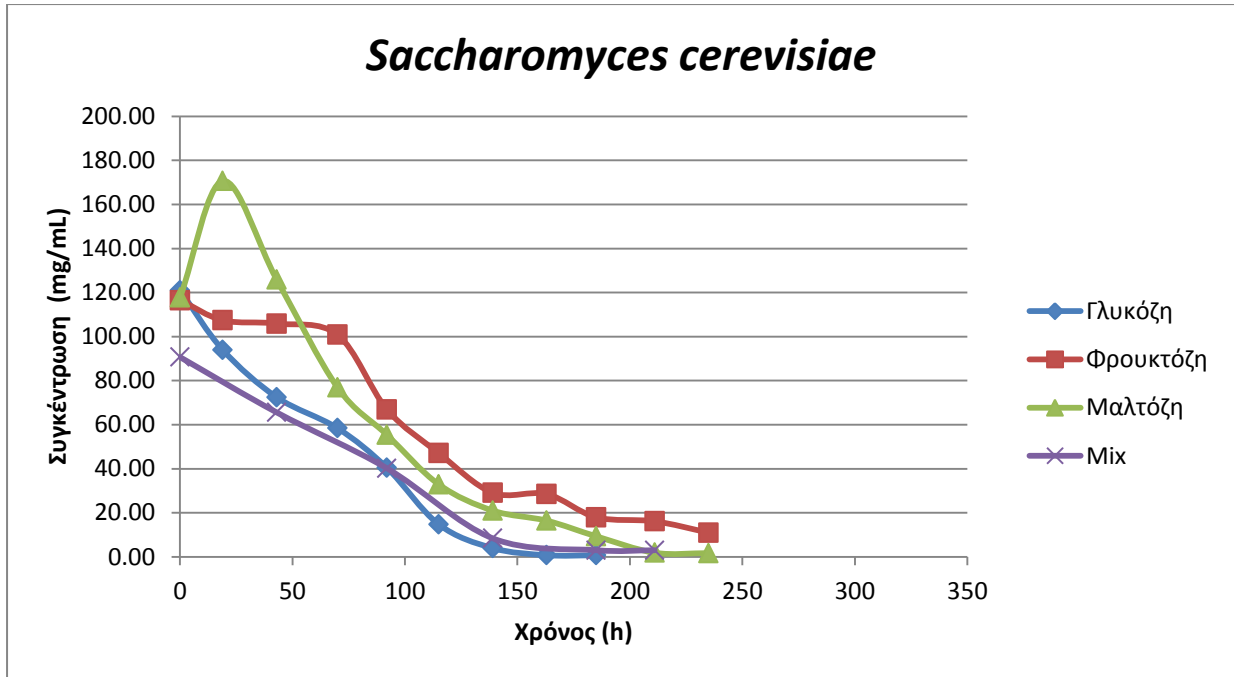
Διάγραμμα 8: Καμπύλη αναφοράς της φρουκτόζης για την μέθοδο DNS.



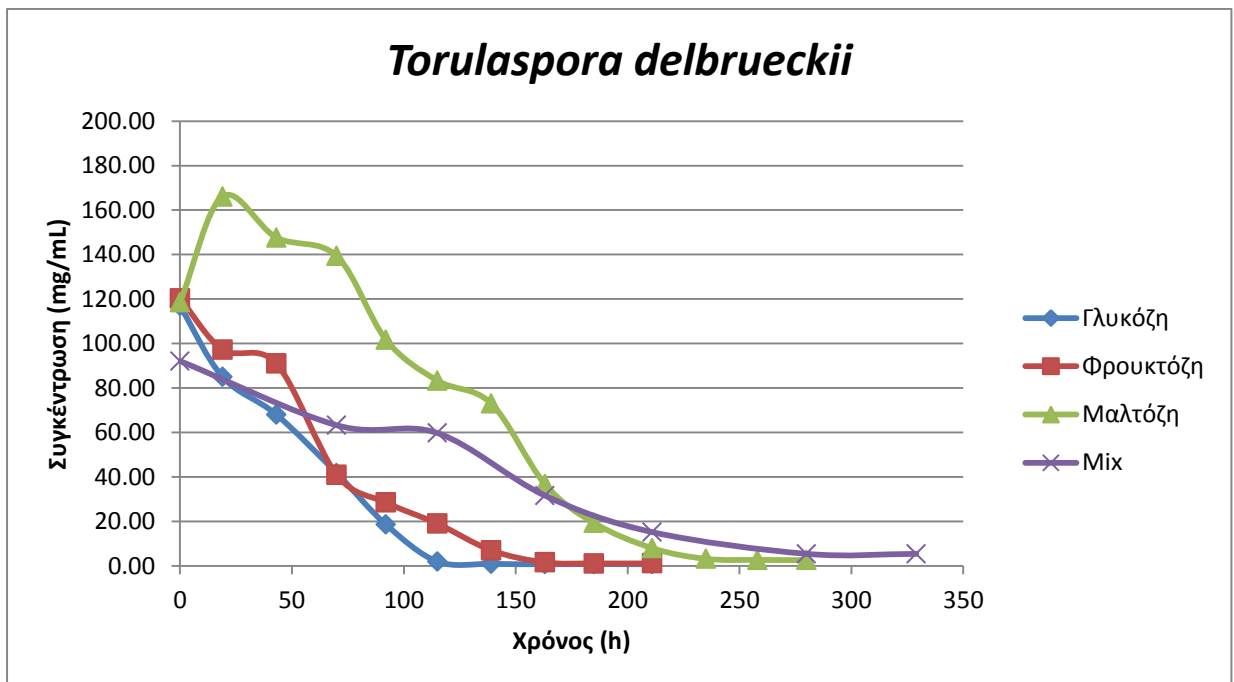
Διάγραμμα 9: Καμπύλη αναφοράς της μαλτόζης για την μέθοδο DNS.

A.2.2 Καμπύλες κατανάλωσης σακχάρων

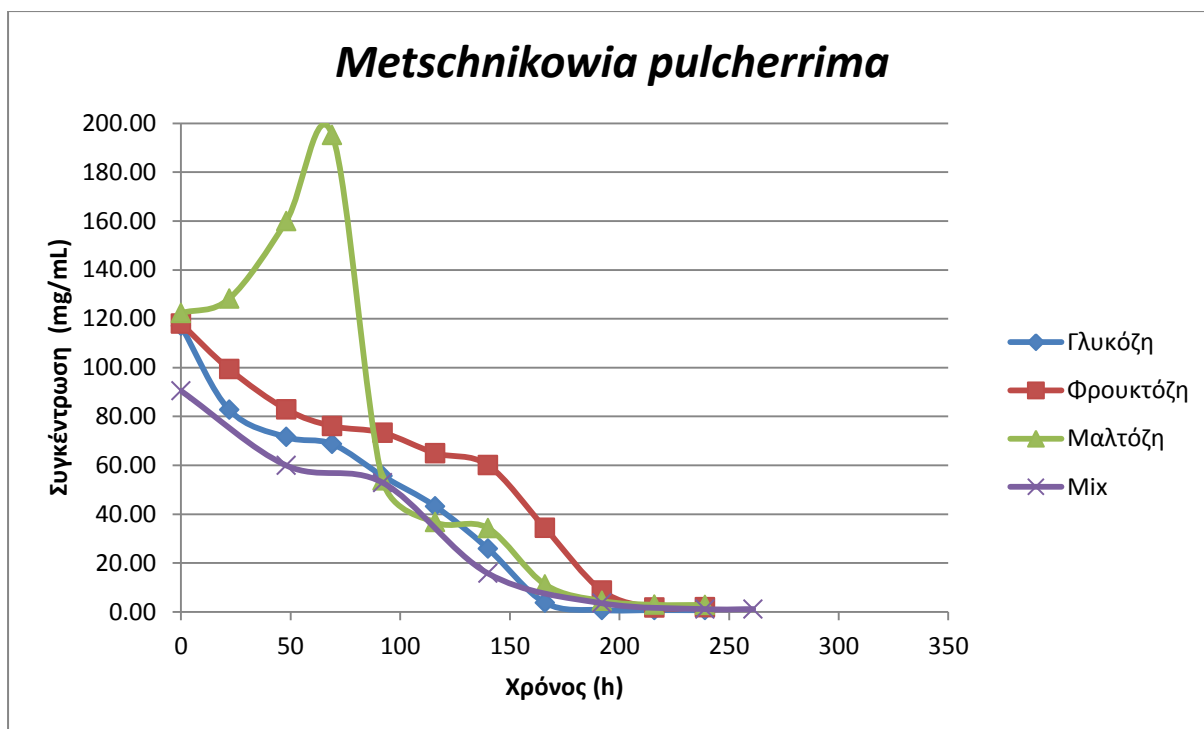
Στα διαγράμματα 10-12 που ακολουθούν παρουσιάζεται η μείωση της συγκέντρωσης των ζυμώσιμων σακχάρων συναρτήσει του χρόνου ζύμωσης για κάθε μικροοργανισμό που μελετήθηκε. Οι τιμές που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή των διαγραμμάτων παρατίθενται στο παράρτημα (Πίνακες 7-9).



Διάγραμμα 10: Καμπύλη κατανάλωσης σακχάρων από τον *S. cerevisiae* στα διαφορετικά υποστρώματα σακχάρων και μίγματος.



Διάγραμμα 11: Καμπύλη κατανάλωσης σακχάρων από την *T. delbrueckii* στα διαφορετικά υποστρώματα σακχάρων και μίγματος.



Διάγραμμα 12: Καμπύλη κατανάλωσης σακχάρων από την *M. pulcherrima* στα διαφορετικά υποστρώματα σακχάρων και μίγματος.

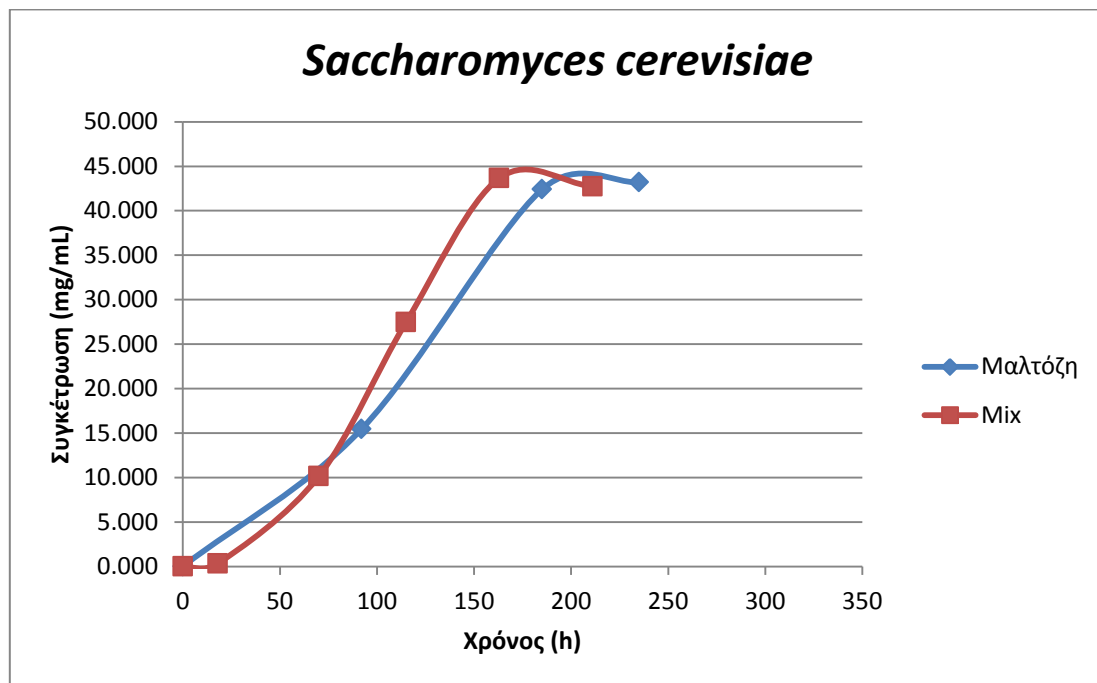
A.2.3 Σχολιασμός διαγραμμάτων

Παρατηρείται ότι όλοι οι ζυμομύκητες κατάφεραν να μεταβολίσουν κάθε είδος σακχάρου με ρυθμό κατανάλωσης αντίστοιχο του ρυθμού ανάπτυξής τους. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι καμπύλες κατανάλωσης της μαλτόζης όπου παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσης του σακχάρου κατά τις δύο πρώτες ημέρες της ζύμωσης. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι η μαλτόζη, όπως έχει ήδη αναφερθεί, είναι ένας δισακχαρίτης που διαθέτει ένα αναγωγικό άκρο. Για να καταφέρει ο εκάστοτε ζυμομύκητας να μεταβολίσει την μαλτόζη πρέπει πρώτα να τη διασπάσει σε δύο μόρια γλυκόζης (ένα αναγωγικό άκρο στο κάθε μόριο). Έτσι εφόσον η μέθοδος DNS μετρά τα αναγωγικά άκρα είναι λογικό στην αρχή της ζύμωσης να εμφανίζεται αυτή η κορυφή. Ακόμη πρέπει να σημειωθεί ότι στην περίπτωση των υποστρωμάτων που περιείχαν μαλτόζη καθώς και σε αυτά που περιείχαν μίγμα σακχάρων, τα αποτελέσματα δεν είναι ακριβή καθώς στα δείγματα αυτά δεν περιέχεται μόνο ένα είδος σακχάρου. Παρόλα αυτά ο σκοπός των εν λόγω διαγραμμάτων είναι να δείξουν την ικανότητα μεταβολισμού της μαλτόζης από τους non-*Saccharomyces* μικροοργανισμούς. Τέλος αξίζει να σχολιαστεί ότι ο *S. cerevisiae* στο υπόστρωμα φρουκτόζης δεν κατάφερε να αποζυμώσει δεδομένου ότι η τελική συγκέντρωση αζύμων σακχάρων στην περίπτωση αυτή ήταν περίπου 11 mg/mL, γεγονός που πιθανά οφείλεται στη μεγάλη μείωση της βιωσιμότητας του μύκητα στο συγκεκριμένο υπόστρωμα (73%).

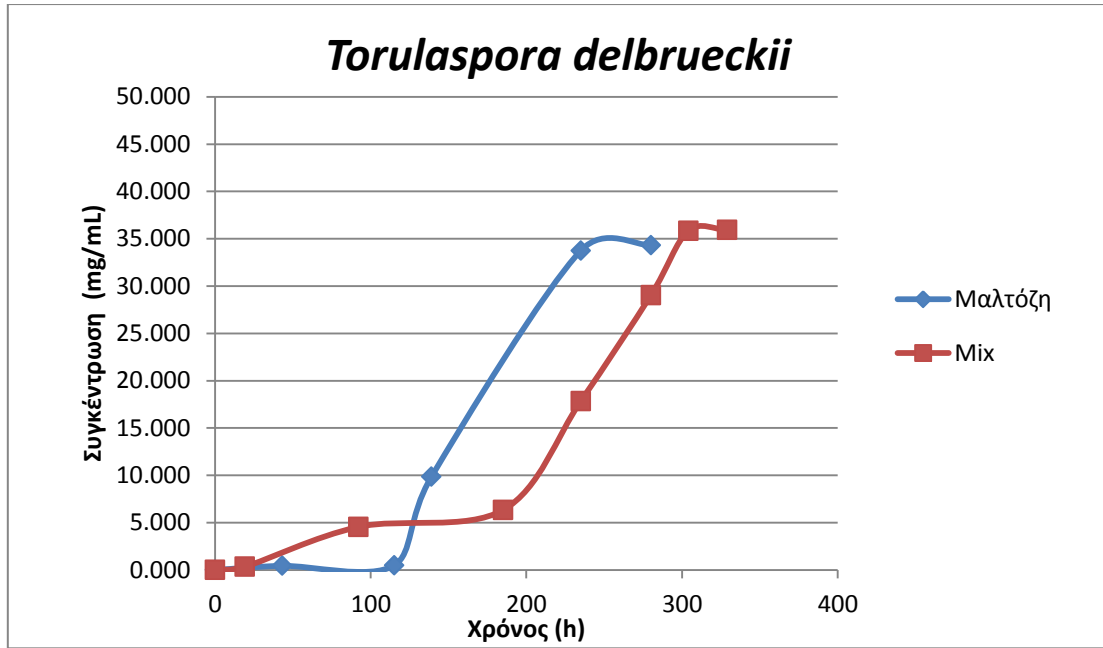
A.3 Μελέτη της παραγωγής αιθανόλης

A.3.1 Καμπύλες παραγωγής αιθανόλης

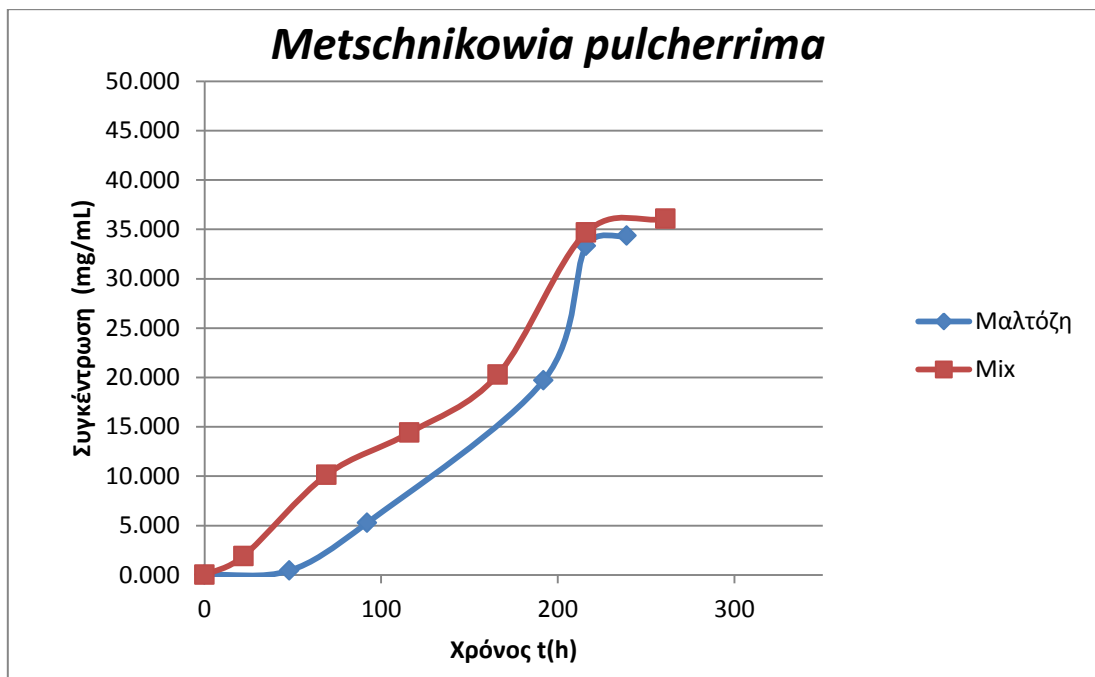
Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης στα υποστρώματα απλών σακχάρων παράλληλα με τις μετρήσεις συγκέντρωσης κυττάρων και κατανάλωσης σακχάρου πραγματοποιούνταν και μετρήσεις παραγωγής αιθανόλης. Παρόλα αυτά λόγω υψηλού κόστους της μεθόδου δεν θεωρήθηκε αναγκαίο η μέτρηση αυτή να καταγράφεται σε καθημερινή βάση και για τον λόγο αυτό επιλέχθηκαν ορισμένες μέρες σε κάθε σύστημα οι οποίες θα απέδιδαν μια αντιπροσωπευτική καμπύλη της παραγωγής αιθανόλης. Δεν μετρήθηκαν επίσης τα υποστρώματα γλυκόζης και φρουκτόζης, δηλαδή των σακχάρων που υπάρχουν σε μικρή ποσότητα στο ζυθογλεύκος, και από τα διαγράμματα που παρουσιάστηκαν παραπάνω έδειξαν ότι δεν παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Η μέθοδος που επιλέχθηκε ήταν η φωτομετρική με πρότυπο kit αιθανόλης καθώς απαιτούσε μικρότερη ποσότητα δείγματος. Στα διαγράμματα 13-15 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων ενώ οι αντίστοιχοι πίνακες δίνονται στο παράρτημα (Πίνακες 10-12).



Διάγραμμα 13: Καμπύλες παραγωγής αιθανόλης του *S. cerevisiae* στα διαφορετικά υποστρώματα σακχάρων και μίγματος.



Διάγραμμα 14: Καμπύλες παραγωγής αιθανόλης της *T. delbrueckii* στα διαφορετικά υποστρώματα σακχάρων και μίγματος.



Διάγραμμα 15: Καμπύλες παραγωγής αιθανόλης της *M. pulcherrima* στα διαφορετικά υποστρώματα σακχάρων και μίγματος.

A.3.2 Σχολιασμός διαγραμμάτων

Αρχικά, με βάση την παρατηρούμενη παραγωγή αιθανόλης, γίνεται πλέον σαφές ότι τόσο η *T. delbrueckii* όσο και η *M. pulcherrima* έχουν τη δυνατότητα να μεταβολίσουν και τα τρία βασικά σάκχαρα της μπύρας (γλυκόζη, φρουκτόζη, μαλτόζη) παράγοντας με τον αντίστοιχο ρυθμό αιθανόλη. Συγκεκριμένα αποδεικνύεται ότι οι δύο non-*Saccharomyces* μικροοργανισμοί που επιλέχθηκαν διαθέτουν το ένζυμο μαλτάση το οποίο είναι υπεύθυνο για τη διάσπαση της μαλτόζης σε δύο μόρια γλυκόζης.

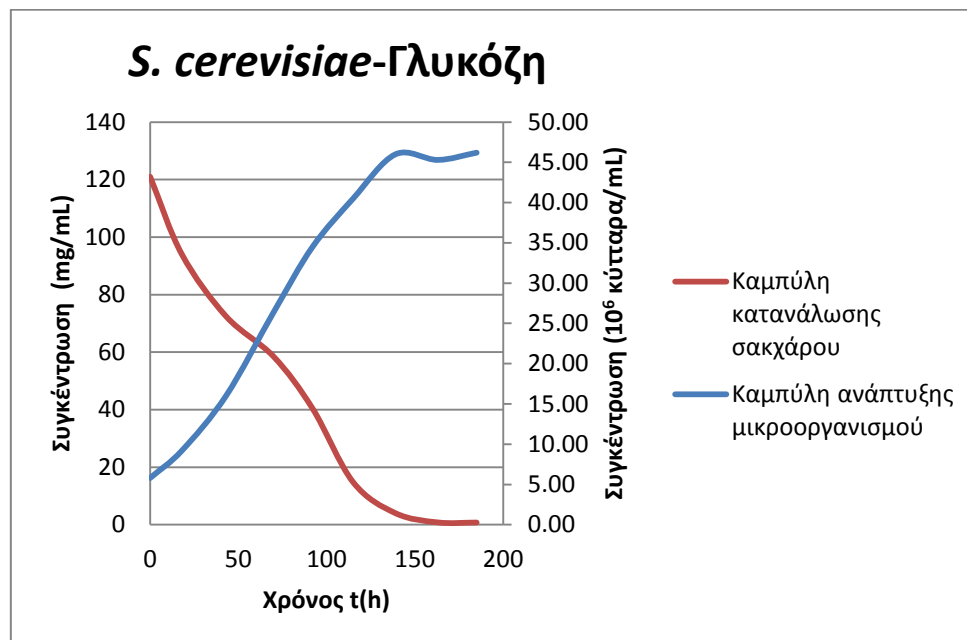
Όσον αφορά τα επίπεδα αιθανόλης στο τέλος της ζύμωσης παρατηρείται ότι στην περίπτωση του *S. cerevisiae* είναι ανώτερα (≈ 45 mg/mL) σε σχέση με τους δύο non-*Saccharomyces* (≈ 35 mg/mL) τόσο στα υποστρώματα μαλτόζης όσο και σε αυτά που περιείχαν μίγμα σακχάρων.

A.4 Συνολικά διαγράμματα εξέλιξης της ζύμωσης

Στη συνέχεια παρουσιάζονται ξεχωριστά διαγράμματα (16-27) για κάθε μικροοργανισμό σε κάθε υπόστρωμα σακχάρου. Σε κάθε διάγραμμα αναπαρίστανται οι καμπύλες ανάπτυξης του μικροοργανισμού, κατανάλωσης του εκάστοτε σακχάρου και παραγωγής αιθανόλης. Έτσι παρουσιάζεται μια συνολική εικόνα της διαδικασίας της ζύμωσης.

A.4.1 *Saccharomyces cerevisiae*

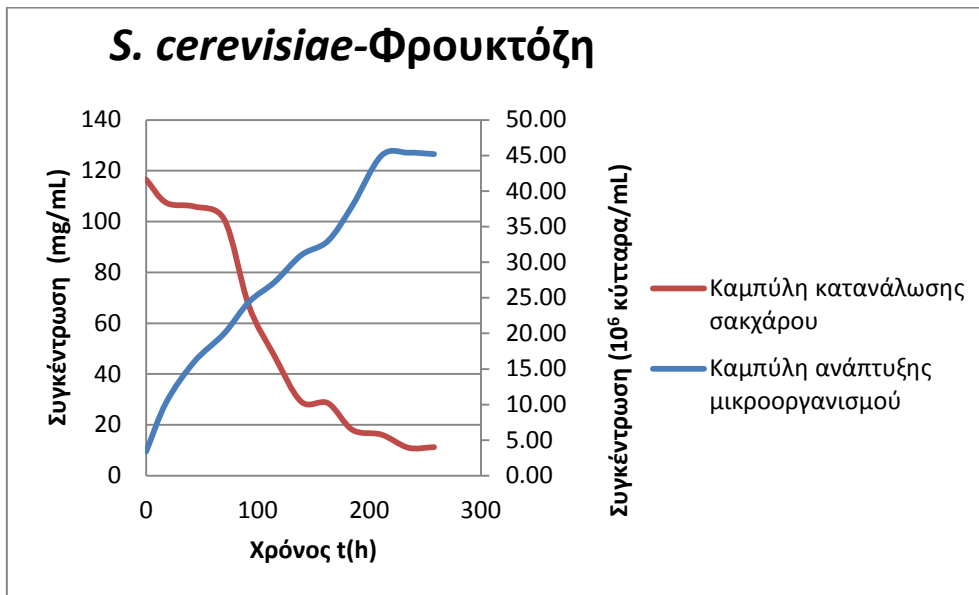
- Γλυκόζη.



Διάγραμμα 16: Συνολικό διάγραμμα ζύμωσης της γλυκόζης από τον *S. cerevisiae*.

Η ανάπτυξη του μικροοργανισμού και η κατανάλωση σακχάρου στο σύστημα αυτό ακολουθούν ένα σταθερό και όμοιο ρυθμό χωρίς να παρατηρούνται ενδιάμεσες στατικές φάσεις.

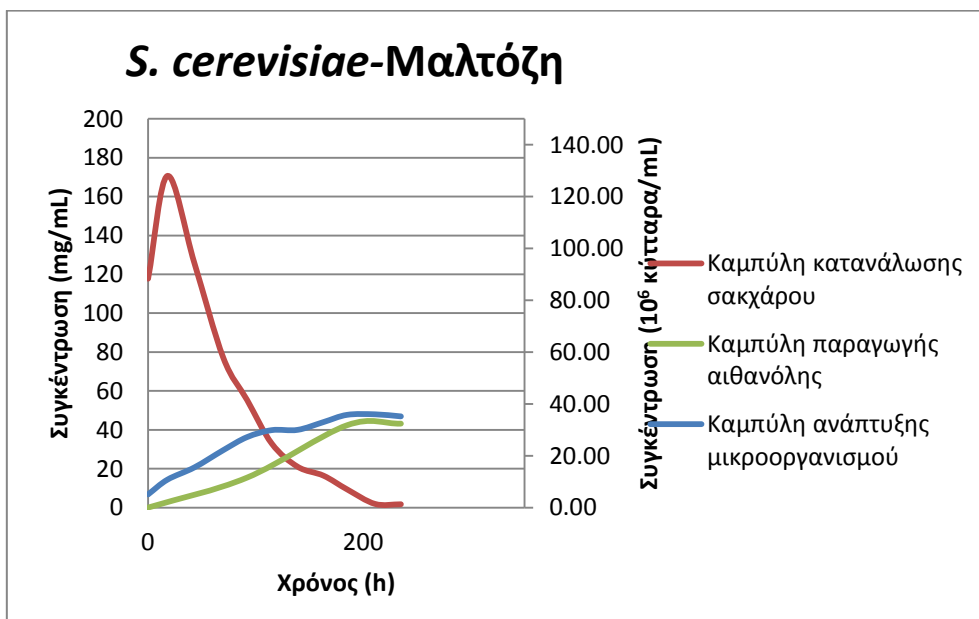
- Φρουκτόζη.



Διάγραμμα 17: Συνολικό διάγραμμα ζύμωσης της φρουκτόζης από τον *S. cerevisiae*.

Στην περίπτωση της κατανάλωσης της φρουκτόζης από τον *S. cerevisiae* παρατηρείται ένα μικρό διάστημα (3 ημερών) στην αρχή της ζύμωσης κατά το οποίο ο ζυμομύκητας δεν καταναλώνει το σάκχαρο το οποίο δεν παρατηρείται στην καμπύλη της ανάπτυξης του μικροοργανισμού. Το γεγονός αυτό πιθανά οφείλεται, όπως έχει ήδη αναφερθεί, στο ότι στο συγκεκριμένο σύστημα σακχάρου-μικροοργανισμού η βιωσιμότητα των κυττάρων βρέθηκε πολύ χαμηλή, έτσι μπορεί να απαιτήθηκε να αρχικό διάστημα μέχρι να αναπτυχθεί ο μικροοργανισμός επαρκώς και να αρχίσει τον μεταβολισμό των σακχάρων.

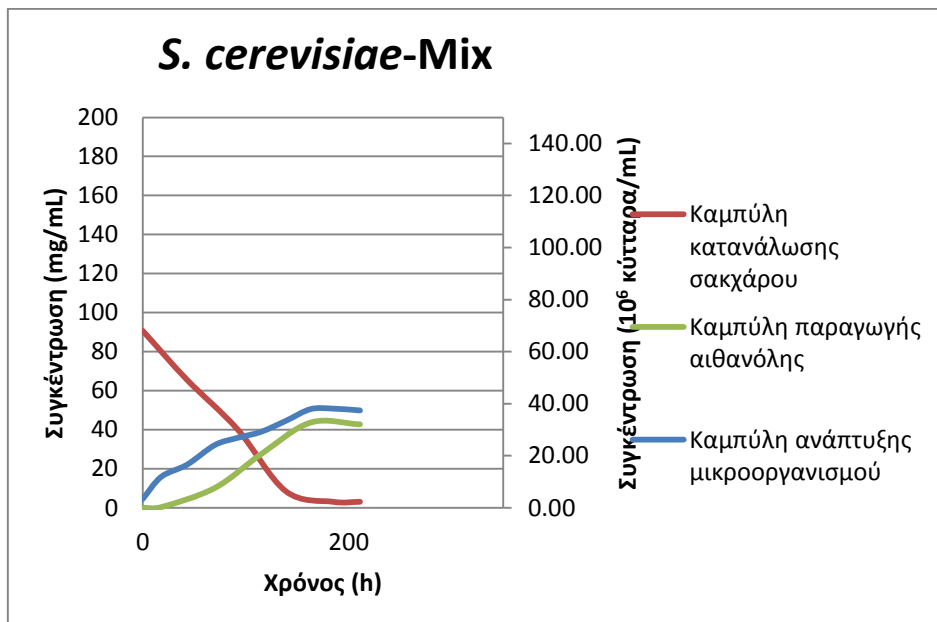
- Μαλτόζη.



Διάγραμμα 18: Συνολικό διάγραμμα ζύμωσης της μαλτόζης από τον *S. cerevisiae*.

Σύμφωνα με το διάγραμμα 18 ο συμβατικός ζυμομύκητας κατάφερε να αναπτυχθεί και να μεταβολίσει τη μαλτόζη προς αιθανόλη με σταθερό ρυθμό.

- Μίγμα σακχάρων.

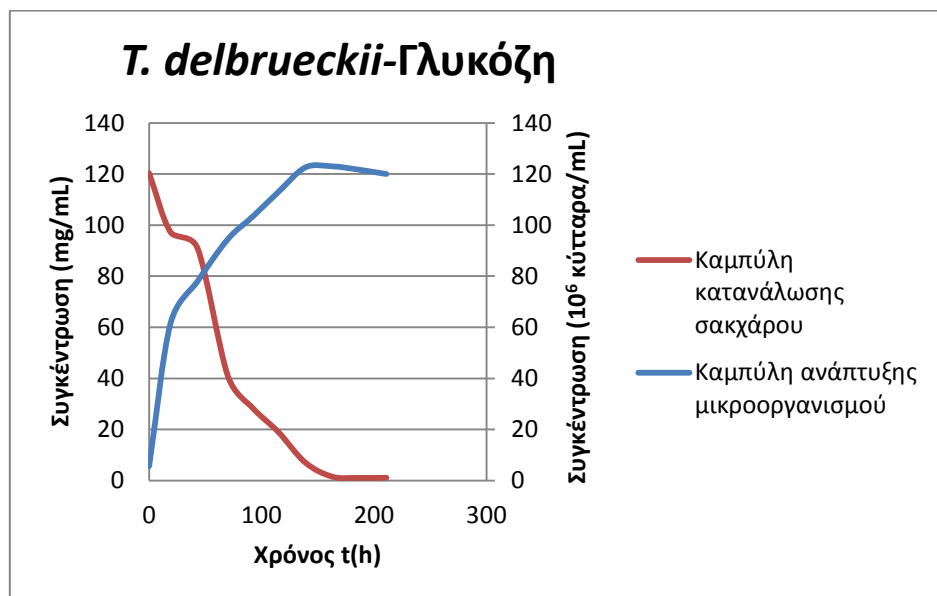


Διάγραμμα 19: Συνολικό διάγραμμα ζύμωσης του μίγματος σακχάρων από τον *S. cerevisiae*.

Ομοίως και στην περίπτωση του μίγματος σακχάρων οι τρεις καμπύλες παρουσιάζουν σταθερό και όμοιο ρυθμό μέχρι την τελική στατική φάση.

A.4.2 *Torulasporea delbrueckii*

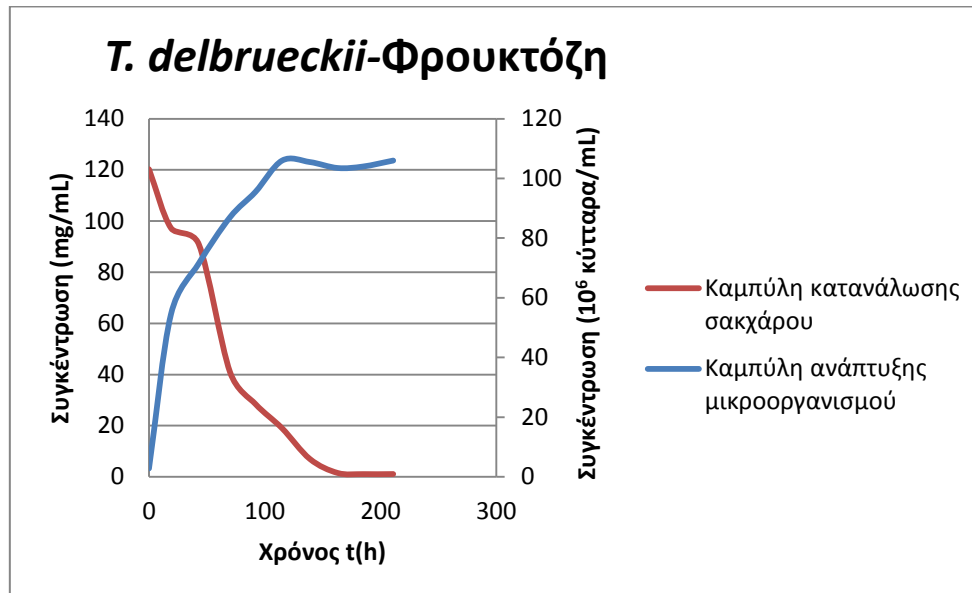
- Γλυκόζη.



Διάγραμμα 20: Συνολικό διάγραμμα ζύμωσης της γλυκόζης από την *T. delbrueckii*.

Στο διάγραμμα 20 παρατηρείται ότι η ανάπτυξη του μικροοργανισμού εμφανίζεται πολύ πιο απότομη από ότι η κατανάλωση της γλυκόζης. Συγκεκριμένα στην περίπτωση των κυττάρων μόλις από την 6^η ημέρα ζύμωσης φαίνεται να σταματά η ανάπτυξη και να ακολουθεί η στατική φάση.

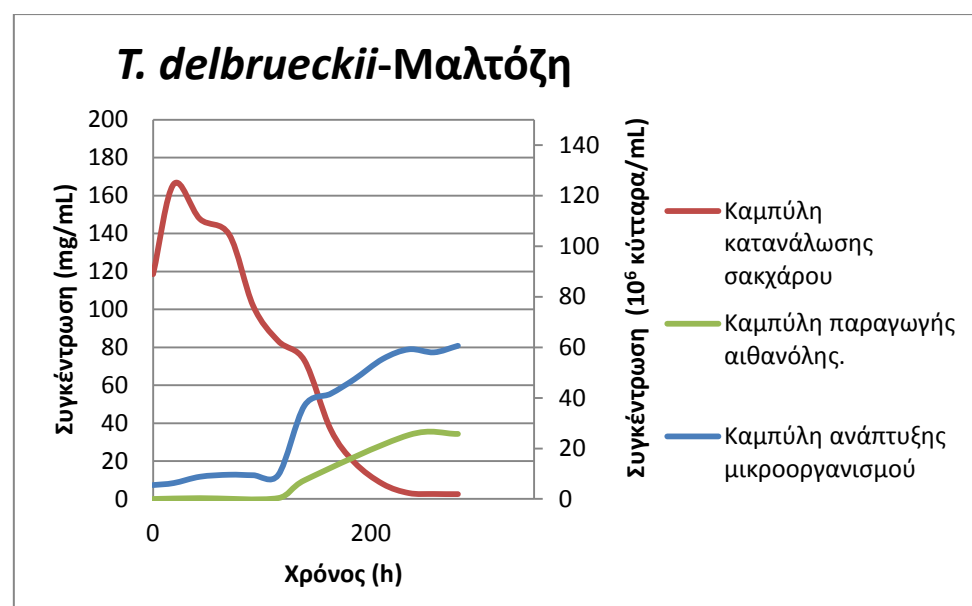
- Φρουκτόζη.



Διάγραμμα 21: Συνολικό διάγραμμα ζύμωσης της φρουκτόζης από την *T. delbrueckii*.

Όπως και στην προηγούμενη περίπτωση παρατηρείται ότι η φάση εκθετικής ανάπτυξης της *T. delbrueckii* έχει πολύ μεγάλη κλίση και η στατική φάση ξεκινά ήδη από την 5^η ημέρα ζύμωσης από τις συνολικά 9. Αντίθετα η κατανάλωση της φρουκτόζης ακολουθεί έναν πιο αργό ρυθμό.

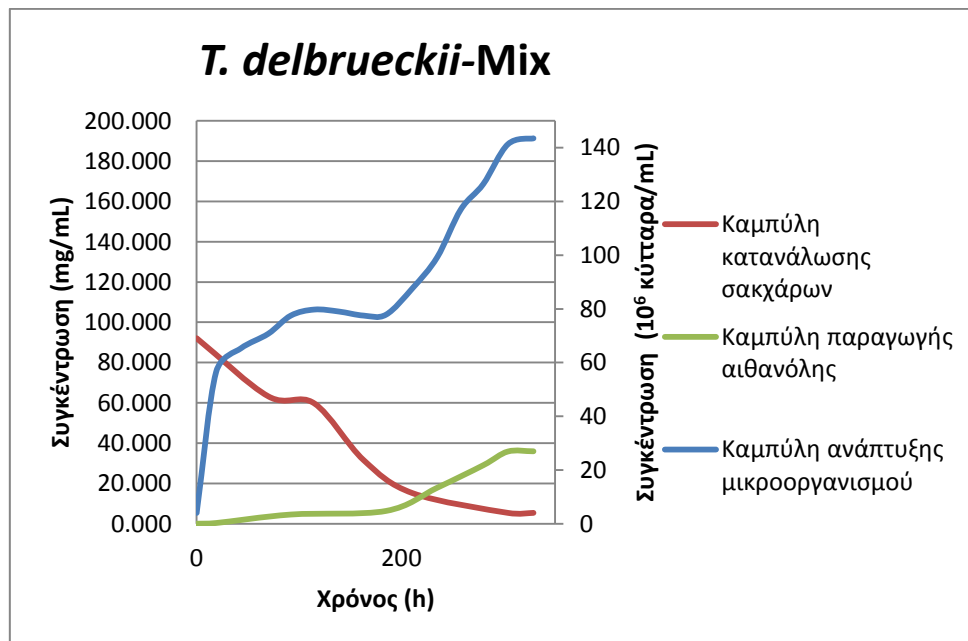
- Μαλτόζη.



Διάγραμμα 22: Συνολικό διάγραμμα ζύμωσης της μαλτόζης από την *T. delbrueckii*.

Στο διάγραμμα 22 οι καμπύλες ανάπτυξης του μικροοργανισμού και παραγωγής αιθανόλης ακολουθούν ακριβώς την ίδια πορεία, δηλαδή μια στάσιμη φάση τις πρώτες 6 ημέρες και στη συνέχεια αυξάνονται ομαλά. Η αρχική φάση προσαρμογής του μικροοργανισμού κατά την οποία δεν παράγεται αιθανόλη δεν μπορεί να αποτυπωθεί στο διάγραμμα κατανάλωσης της μαλτόζης, καθώς τις πρώτες μέρες της ζύμωσης στη συγκεκριμένη καμπύλη εμφανίζεται μια κορυφή η οποία αναπαριστά τη διάσπαση της μαλτόζης πριν αυτή αρχίσει να καταναλώνεται.

- Μίγμα σακχάρων.

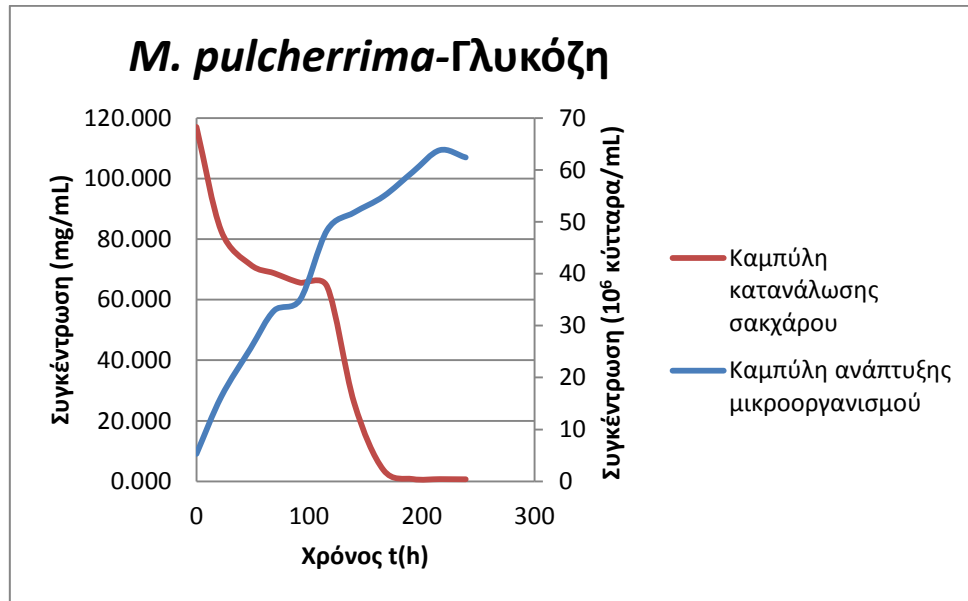


Διάγραμμα 23: Συνολικό διάγραμμα ζύμωσης του μίγματος σακχάρων από την *T. delbrueckii*.

Στο διάγραμμα 23 παρουσιάζεται επαρκώς και από τις 3 καμπύλες ο αρχικός μεταβολισμός των απλών σακχάρων του γλεύκους, στη συνέχεια η στάσιμη φάση που απαιτείται μέχρι την ενεργοποίηση του ενζύμου που θα διασπάσει τη μαλτόζη και τελικά ο μεταβολισμός της.

A.4.3 *Metschnikowia pulcherrima*

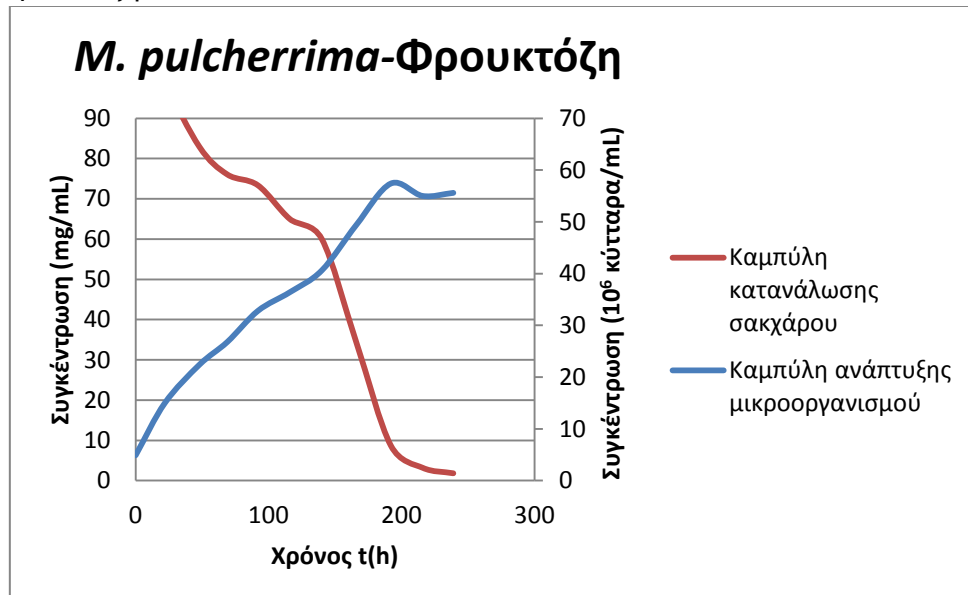
- ο Γλυκόζη.



Διάγραμμα 24: Συνολικό διάγραμμα ζύμωσης της γλυκόζης από την *M. pulcherrima*.

Κατά τον μεταβολισμό της γλυκόζης από την *M. pulcherrima* ο ρυθμός ήταν ομαλός με μία ενδιάμεση στάσιμη φάση κατά την 3^η ημέρα ζύμωσης και έως την 5^η. Η στάσιμη αυτή φάση αποτυπώνεται και στις δύο καμπύλες.

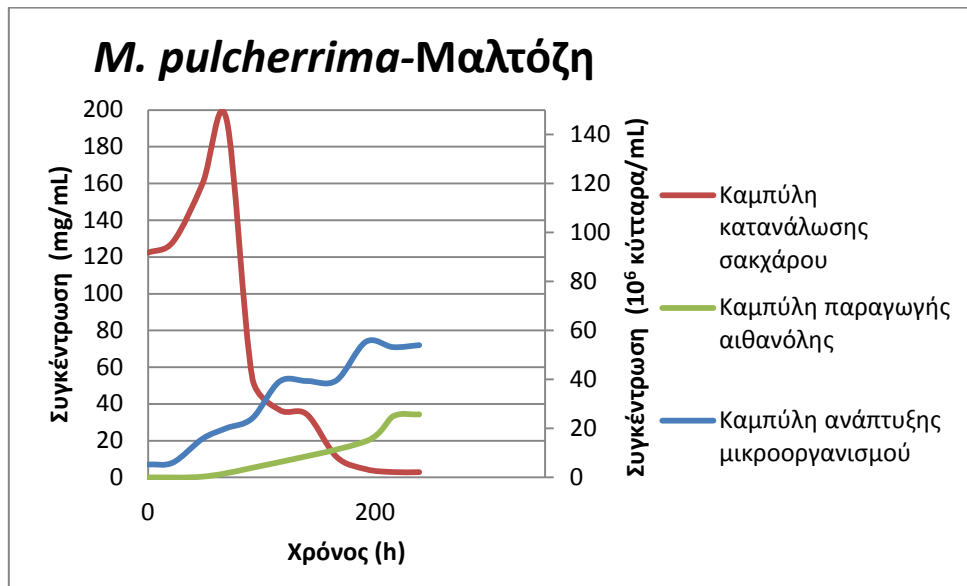
- ο Φρουκτόζη.



Διάγραμμα 25: Συνολικό διάγραμμα ζύμωσης της φρουκτόζης από την *M. pulcherrima*.

Ομοίως στην περίπτωση της ζύμωσης του υποστρώματος που περιείχε φρουκτόζη ο ρυθμός της ζύμωσης από την *M. pulcherrima* είναι ομαλός, όπως φαίνεται από τις παραπάνω καμπύλες.

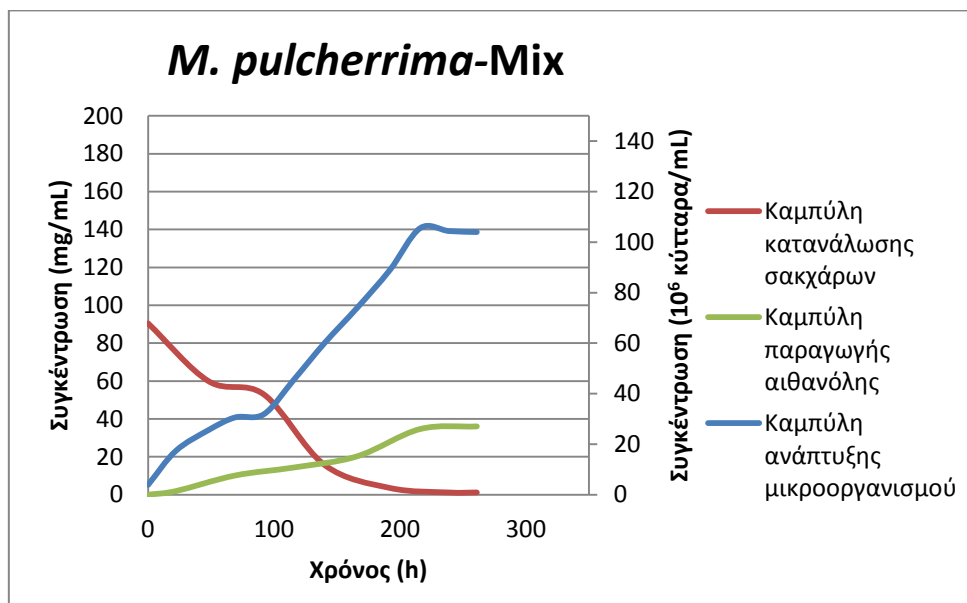
- ο Μαλτόζη.



Διάγραμμα 26: Συνολικό διάγραμμα ζύμωσης της μαλτόζης από την *M. pulcherrima*.

Στο διάγραμμα 26 η ζύμωση ξεκινά κατά την τρίτη ημέρα καθώς ο μύκητας απαιτεί ένα χρονικό διάστημα για την προσαρμογή του και την ενεργοποίηση του ενζύμου που θα διασπάσει τον δισακχαρίτη. Ακόμη στην καμπύλη ανάπτυξης των κυττάρων του μικροοργανισμού εμφανίζεται μια μικρή στατική φάση περίπου στο μέσο της ζύμωσης (5^η -7^η ημέρα) η οποία επίσης αποτυπώνεται από την καμπύλη κατανάλωσης του σακχάρου. Ο λόγος που αυτή η σταθερή φάση δεν αποτυπώνεται στην καμπύλη παραγωγής της αιθανόλης αποδίδεται στο γεγονός ότι οι μετρήσεις της αιθανόλης δεν λαμβάνονταν σε καθημερινή βάση, όπως έχει ήδη αναφερθεί.

- ο Μίγμα σακχάρων.

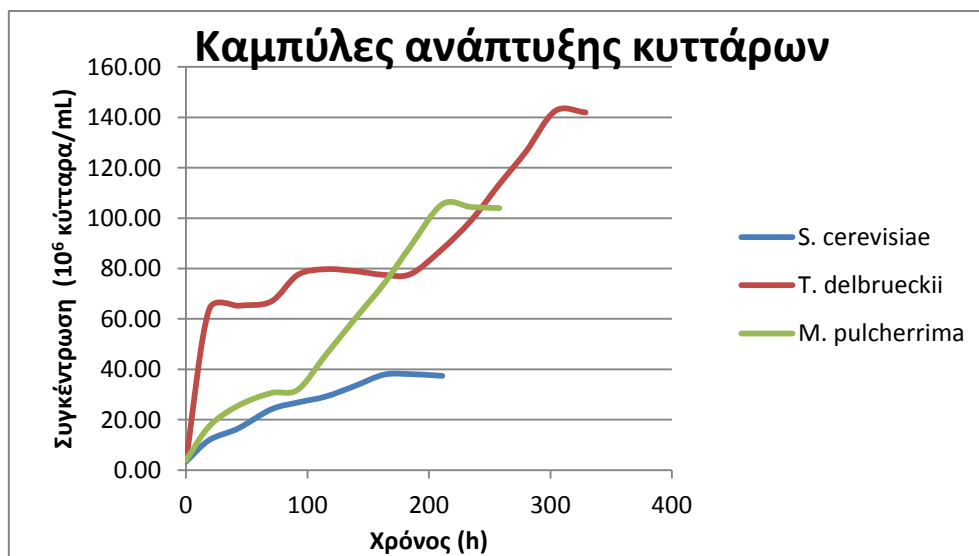


Διάγραμμα 27: Συνολικό διάγραμμα ζύμωσης του μίγματος σακχάρων από την *M. pulcherrima*.

Στο διάγραμμα 27 που αφορά τον μεταβολισμό του μίγματος σακχάρων από την *M. pulcherrima*, το σύνολο των καμπύλων (ανάπτυξη μικροοργανισμού, κατανάλωση προϊόντος και παραγωγή προϊόντος) περιγράφουν μια αργή ζύμωση με γενικά σταθερό ρυθμό και μία μικρή στατική φάση τις πρώτες μέρες της ζύμωσης (2^η – 4^η ημέρα) που αντιστοιχεί στο χρονικό διάστημα το οποίο απαιτείται για την ενεργοποίηση της μαλτάσης.

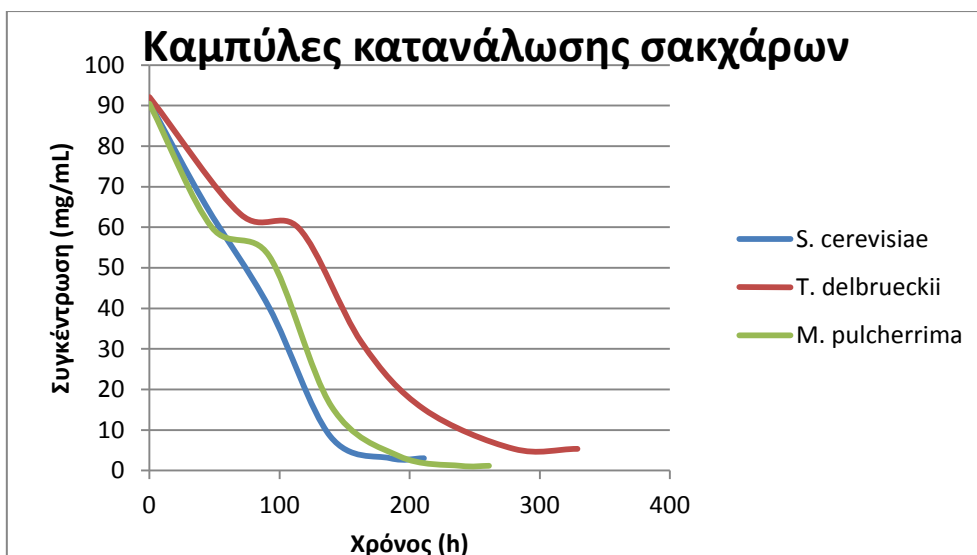
A.5 Συγκριτικά διαγράμματα

Στα διαγράμματα 28-30 που ακολουθούν παρουσιάζονται συγκριτικά οι καμπύλες ζύμωσης των τριών μικροοργανισμών στο υπόστρωμα που περιείχε μίγμα σακχάρων. Ο λόγος που επιλέχθηκε αυτό το υπόστρωμα σακχάρων για την άμεση σύγκριση των τριών ζυμώσεων είναι γιατί περιέχει και τα τρία βασικά σάκχαρα του βυνογλεύκου σε αντίστοιχες αναλογίες.



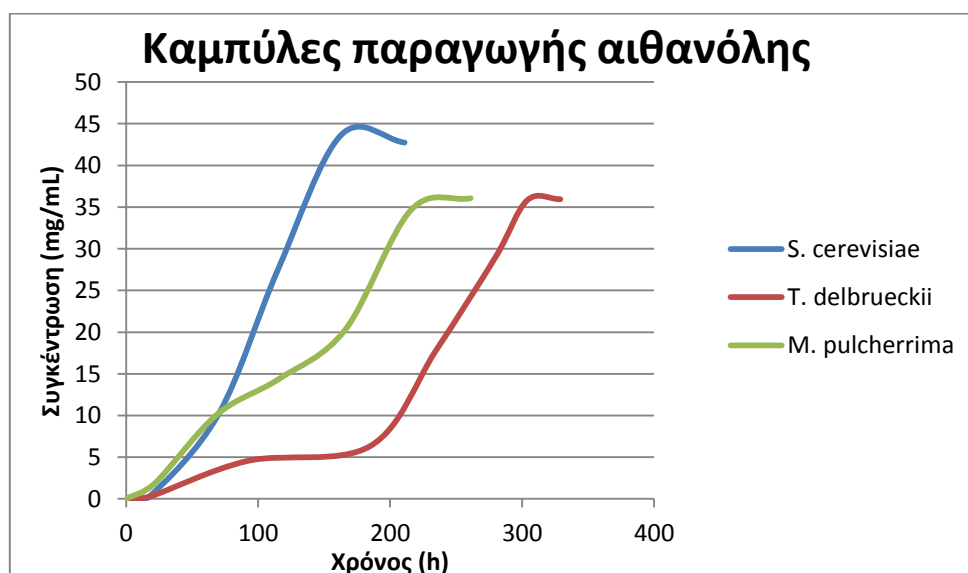
Διάγραμμα 28: Καμπύλες ανάπτυξης των κυττάρων των τριών μικροοργανισμών σε υπόστρωμα μίγματος σακχάρων.

Στο διάγραμμα 28 μπορεί να παρατηρηθεί ο διαφορετικός ρυθμός ανάπτυξης των τριών μικροοργανισμών. Ο συμβατικός ζυμομύκητας παρουσιάζει έναν ομαλό ρυθμό ανάπτυξης ο οποίος ολοκληρώνεται σε 9 ημέρες, ενώ οι δύο non-*Saccharomyces* μικροοργανισμοί απαιτούν μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (10 και 14 ημέρες) για την ανάπτυξη τους και εμφανίζουν ενδιάμεσες στάσιμες φάσεις. Στην περίπτωση της *T. delbrueckii* η ενδιάμεση στάσιμη φάση διαρκεί περίπου 7 ημέρες. Όσον αφορά στις τελικές συγκεντρώσεις κυττάρων ο *S. cerevisiae* φτάνει σε τελική τιμή ίση με 37.4* 10⁶ κύτταρα/mL, τιμή η οποία όπως έχει ήδη αναφερθεί είναι πολύ χαμηλή και οφείλεται σε ελαττωματική πρώτη ύλη. Υψηλότερη συγκέντρωση κυττάρων εμφανίζεται στην περίπτωση της *T. delbrueckii* (142* 10⁶ κύτταρα/mL).



Διάγραμμα 29: Καμπύλες κατανάλωσης σακχάρων των τριών μικροοργανισμών σε υπόστρωμα μίγματος σακχάρων.

Οι καμπύλες κατανάλωσης σακχάρων όπως παρουσιάζονται στο διάγραμμα 29 απεικονίζουν έναν ομαλό ρυθμό μείωσης της συγκέντρωσης των σακχάρων από τον συμβατικό ζυμομύκητα, ενώ οι δύο non-*Saccharomyces* εμφανίζουν και σε αυτή την περίπτωση μια στάσιμη φάση. Το σύνολο των μικροοργανισμών κατάφερε να μεταβολίσει τα σάκχαρα, όμως στην περίπτωση της *T. delbrueckii* η τελική συγκέντρωση σακχάρων είναι σχετικά υψηλότερη (5.4 mg/mL) σε σχέση με τους *S. cerevisiae* και *M. pulcherrima* (3 και 1.2 mg/mL αντίστοιχα).



Διάγραμμα 30: Καμπύλες παραγωγής αιθανόλης των τριών μικροοργανισμών σε υπόστρωμα μίγματος σακχάρων.

Στην περίπτωση της αιθανόλης η υψηλότερη παραγωγή εμφανίζεται στην περίπτωση του συμβατικού μύκητα (43 mg/mL) ενώ οι δύο non-*Saccharomyces* παρήγαγαν αιθανόλη σε συγκέντρωση περίπου ίση με 36 mg/mL. Οι ρυθμοί παραγωγής είναι αντίστοιχοι των ρυθμών ανάπτυξης κυττάρων και κατανάλωσης σακχάρων.

A.6 Μεταβολές pH

Στον πίνακα 8 παρουσιάζονται οι τελικές μετρήσεις του pH στα δώδεκα διαφορετικά συστήματα μικροοργανισμού-σακχάρου. Η αρχική τιμή pH των δειγμάτων είναι κοινή και ίση με 4.5.

Πίνακας 8: Οι τιμές pH των διαφορετικών συστημάτων μικροοργανισμού-σακχάρου.

Μικροοργανισμός	Σάκχαρο	Τιμή pH
<i>S. cerevisiae</i>	Γλυκόζη	3.27
	Φρουκτόζη	3.10
	Μαλτόζη	3.17
	Mix	3.20
<i>T. delbrueckii</i>	Γλυκόζη	3.17
	Φρουκτόζη	3.12
	Μαλτόζη	3.19
	Mix	2.85
<i>M. pulcherrima</i>	Γλυκόζη	2.91
	Φρουκτόζη	3.12
	Μαλτόζη	3.03
	Mix	2.87

Οι τελικές τιμές pH των διάφορων συστημάτων μικροοργανισμού-σακχάρου παρατηρείται ότι κυμαίνονται μεταξύ 3.27 και 2.87. Γενικά οι υψηλότερες τιμές pH εμφανίζονται στην περίπτωση του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* ενώ οι πιο χαμηλές στα δύο υποστρώματα μίγματος σακχάρων που ζυμώθηκαν από τις *T. delbrueckii* και *M. pulcherrima* (2.85 και 2.87 αντίστοιχα). Παρόλα αυτά το σύνολο των τιμών κυμαίνεται μέσα σε λογικά και αναμενόμενα όρια και η μικρή απόκλιση των τιμών από τον συμβατικό ζυμομύκητα οδηγεί σε θετικά συμπεράσματα για το προϊόν της ζύμωσης από τους non-*Saccharomyces* μικροοργανισμούς.

A.7 Μεταβολή διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου (FAN)

Η αρχική συγκέντρωση αμμωνιακού αζώτου μετρήθηκε ίση με 283.27 mg/L και είναι ίδια για κάθε ένα από τα 12 συστήματα μικροοργανισμού-σακχάρου. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων του αμμωνιακού αζώτου στο τέλος των ζυμώσεων, καθώς και η αντίστοιχη κατανάλωση αζώτου παρουσιάζονται στον πίνακα 9:

Πίνακας 9: Μετρήσεις διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου (FAN) και κατανάλωση αυτού από τους διάφορους συνδυασμούς μικροοργανισμού-υπόστρώματος.

Μικροοργανισμός	Σάκχαρο	Τελική τιμή FAN (mg/L)	Τυπική απόκλιση (STDEV)	Κατανάλωση FAN (mg/L)
<i>S. cerevisiae</i>	Γλυκόζη	207.77	2.757	75.49
	Φρουκτόζη	226.09	1.891	57.18
	Μαλτόζη	189.86	2.422	93.41
	Mix	186.67	2.628	96.59
<i>T. delbrueckii</i>	Γλυκόζη	164.82	5.010	118.44
	Φρουκτόζη	146.90	2.911	136.36
	Μαλτόζη	212.25	1.614	71.01
	Mix	142.49	1.455	140.78
<i>M. pulcherrima</i>	Γλυκόζη	180.24	2.465	103.03
	Φρουκτόζη	201.19	0.672	82.08
	Μαλτόζη	168.38	2.628	114.89
	Mix	147.23	2.422	136.03

Παρατηρείται ότι σε γενικές γραμμές ο σακχαρομύκητας *S. cerevisiae* κατανάλωσε μικρότερη ποσότητα διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου σε σχέση με τους non-*Saccharomyces* μικροοργανισμούς. Η μικρότερη ποσότητα καταναλώθηκε στο υπόστρωμα της φρουκτόζης όπου ο *S. cerevisiae* εμφάνισε πολύ χαμηλά ποσοστά βιωσιμότητας (73%) και μεγάλη συγκέντρωση αζύμωτων σακχάρων (11 mg/mL). Κατά συνέπεια παρατηρείται ότι τα χαμηλά ποσοστά βιωσιμότητας δεν οφείλονται σε έλλειψη θρεπτικού υλικού αλλά πιθανά στην αρχική χαμηλή βιωσιμότητα των κυττάρων. Η μεγαλύτερη κατανάλωση αμμωνιακού αζώτου υπήρξε στα δύο συστήματα non-*Saccharomyces*-μίγμα σακχάρων (136.36 και 140.78 mg/L).

A.8 Προσδιορισμός αρωματικού προφίλ

Στους πίνακες 10-25 που ακολουθούν παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τον προσδιορισμό των ουσιών που διαμορφώνουν το αρωματικό προφίλ σε κάθε ένα από τα συστήματα σακχάρου-μικροοργανισμού, με την χρήση GC-MS. Για την καλύτερη κατανόηση των αποτελεσμάτων οι ουσίες χωρίστηκαν σε ομάδες ανάλογα με το είδος τους (αλκοόλες, οξέα, εστέρες και υδρογονάνθρακες). Τα υποστρώματα ενός σακχάρου (γλυκόζης, φρουκτόζης και μαλτόζης) μετρήθηκαν μόνο μία φορά καθώς στο πείραμα αυτό δεν έγινε διπλή επαναληψη. Το είδος των ουσιών προσδιορίστηκε με την χρήση ειδικού λογισμικού (HP Chemstation rev.A.06.03), ενώ ο ποσοτικός προσδιορισμός βασίστηκε στην προσθήκη σε κάθε δείγμα γνωστής ποσότητας (10μL) 3-οκτανόλης. Στο παράρτημα παρατίθενται τα αντίστοιχα χρωματογραφήματα.

Πίνακας 10: Οι αλκοόλες που παράχθηκαν από τους τρεις μικροοργανισμούς στα υποστρώματα γλυκόζης.

COMPOUNDS	Συγκέντρωση (mg/L)		
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>T. delbrueckii</i>	<i>M. pulcherrima</i>
Isoamyl alcohol	3.45	7.00	4.79
Active amyl alcohol	1.01	1.66	1.63
1-Propanol, 3-ethoxy-	NOT DETECTED	0.05	NOT DETECTED
Methionol	NOT DETECTED	TRACES	NOT DETECTED
Phenethyl alcohol	3.79	5.88	6.18

Στα υποστρώματα γλυκόζης στο σύνολο των δειγμάτων ανιχνεύθηκε ισοαμυλική (ζυμέλαιο, ούισκι, μπανάνα) και ενεργή αμυλική αλκοόλη (γλυκό, αλκοολούχο άρωμα) σε υψηλές συγκεντρώσεις, με την υψηλότερη συγκέντρωση να εμφανίζεται και στις δύο περιπτώσεις στα δείγματα της *T. delbrueckii*. Ακόμη σε συγκέντρωση υψηλότερη του ορίου ανίχνευσης παράγεται η φαινυλαιθυλική αλκοόλη (τριαντάφυλλο) από όλους τους μικροοργανισμούς, με ιδιαίτερα αυξημένες τιμές στην περίπτωση των μη συμβατικών μικροοργανισμών. Τέλος ανιχνεύθηκαν και άλλες ανώτερες αλκοόλες, οι οποίες προσδίδουν ενδιαφέροντα αρώματα, αλλά σε χαμηλές συγκεντρώσεις.

Πίνακας 11: Τα οξέα που παράχθηκαν από τους τρεις μικροοργανισμούς στα υποστρώματα γλυκόζης.

COMPOUNDS	Συγκέντρωση (mg/L)		
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>T. delbrueckii</i>	<i>M. pulcherrima</i>
Isobutyric acid	0.62	0.66	0.15
Butyric acid	0.11	0.14	0.14
Isovaleric acid	0.13	TRACES	TRACES
Active valeric acid	TRACES	0.20	TRACES
Caproic acid	0.26	TRACES	0.41
Caprylic acid	1.07	TRACES	0.58
Capric acid	NOT DETECTED	TRACES	TRACES

Στην περίπτωση των οξέων, παρατηρείται ότι το σύνολο των μικροοργανισμών παράγει έναν σημαντικό αριθμό οξέων τα οποία μπορούν να δημιουργήσουν ένα πολύ ενδιαφέρον αρωματικό προφίλ με στοιχεία όπως φράουλα, κεράσι, ανανά αλλά και πιο έντονα πικρικά και όξινα στοιχεία. Στα μετρώμενα δείγματα των υποστρωμάτων γλυκόζης, οι συγκεντρώσεις όμως είναι αρκετά χαμηλές και μόνο το ισοβουτυρικό οξύ που παράχθηκε από τον *S.*

cerevisiae και την *T. delbrueckii* ανιχνεύθηκε σε συγκέντρωση υψηλότερη του ορίου ανίχνευσης. Ακόμη σε σχετικά υψηλή συγκέντρωση παρατηρείται στο υποστρώμα που ζυμώθηκε από την *T. delbrueckii* το ενεργό βαλερικό οξύ, του οποίου όμως το όριο ανίχνευσης δεν είναι γνωστό.

Πίνακας 12: Οι εστέρες που παράχθηκαν από τους τρεις μικροοργανισμούς στα υποστρώματα γλυκόζης.

COMPOUNDS	Συγκέντρωση (mg/L)		
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>T. delbrueckii</i>	<i>M. pulcherrima</i>
Isoamyl acetate	TRACES	NOT DETECTED	0.08
Ethyl caproate	0.06	TRACES	TRACES
Ethyl caprylate	0.18	TRACES	TRACES
Phenylethyl acetate	TRACES	TRACES	0.12
Ethyl caprate	NOT DETECTED	TRACES	TRACES

Όσον αφορά στους εστέρες παρατηρείται πολύ μικρή παραγωγή από το σύνολο των μικροοργανισμών. Ενδιαφέρον παρουσιάζουν ο καπροϊκός (μήλο, γλυκάνισος) και καπρυλικός (βερίκοκο, μπανάνα, μπράντυ, αχλάδι) αιθυλεστέρας που παράχθηκαν από τον συμβατικό ζυμομύκητα, αλλά και ο οξικός φαινυλαιθυλεστέρας (μπανάνα, μήλο, μέλι) που παράχθηκε από την *M.pulcherrima*.

Πίνακας 13: Οι υδρογονάνθρακες που παράχθηκαν από τους τρεις μικροοργανισμούς στα υποστρώματα γλυκόζης.

COMPOUNDS	Συγκέντρωση (mg/L)		
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>T. delbrueckii</i>	<i>M. pulcherrima</i>
Disulfide, dimethyl	NOT DETECTED	0.06	TRACES
Methyl ethyl disulfide	0.06	0.08	0.08
p-Xylene	0.05	0.08	0.07
Diethyl disulfide	TRACES	TRACES	TRACES
Disulfide, isopropyl propyl	TRACES	TRACES	TRACES

Από τον πίνακα 13 προκύπτει ότι σε όλα τα δείγματα βρέθηκαν ενώσεις του θείου οι οποίες γενικά χαρακτηρίζονται από αρνητικά (off-flavor) αρώματα. Σε ανιχνεύσιμες συγκεντρώσεις παράχθηκε το διμεθυλοδισουλφίδιο (μαγειρεμένο λαχανικό, σκόρδο) από την *T. delbrueckii*. Ακόμη παρατηρείται παραγωγή μεθυλαιθυλ δισουλφιδίου (θείο) από το σύνολο το μικροοργανισμών, αλλά το όριο ανίχνευσης της ουσία αυτής δεν είναι γνωστό.

Πίνακας 14: Οι αλκοόλες που παράχθηκαν από τους τρεις μικροοργανισμούς στα υποστρώματα φρουκτόζης.

COMPOUNDS	Συγκέντρωση (mg/L)		
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>T. delbrueckii</i>	<i>M. pulcherrima</i>
Isoamyl alcohol	6.28	5.02	5.23
Active amyl alcohol	1.72	1.11	1.81
Phenylethyl Alcohol	5.59	4.69	7.57

Στην περίπτωση των αλκοολών στα υποστρώματα φρουκτόζης, οι μόνες ουσίες που ανιχνεύθηκαν είναι η ισοαμυλική, η ενεργή αμυλική και η φαινυλαιθυλική αλκοόλη. Το σύνολο των ενώσεων σε όλα τα δείγματα βρίσκεται σε συγκέντρωσεις υψηλότερες του ορίου ανίχνευσης. Όπως και στο υπόστρωμα γλυκόζης υψηλότερη συγκέντρωση φαινυλαιθυλικής αλκοόλης βρέθηκε στην περίπτωση της *M. pulcherrima*.

Πίνακας 15: Τα οξέα που παράχθηκαν από τους τρεις μικροοργανισμούς στα υποστρώματα φρουκτόζης.

COMPOUNDS	Συγκέντρωση (mg/L)		
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>T. delbrueckii</i>	<i>M. pulcherrima</i>
Isobutyric acid	TRACES	0.25	0.13
Butyric acid	TRACES	TRACES	0.16
Isovaleric acid	0.20	TRACES	TRACES
Active valeric acid	0.18	TRACES	TRACES
Caproic acid	0.20	TRACES	0.26
Caprylic acid	TRACES	TRACES	1.07
Capric acid	NOT DETECTED	NOT DETECTED	TRACES

Όπως και στα υποστρώματα γλυκόζης, ανιχνεύθηκε μεγάλος αριθμός οξέων αλλά σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Μόνο το ισοβουτυρικό οξύ που παράχθηκε από την *T. delbrueckii* βρέθηκε σε συγκέντρωση λίγο μεγαλύτερη του ορίου ανίχνευσης (0.25 mg/L), στο ίδιο δείγμα όμως παρατηρούνται πολλές ουσίες σε ίχνη.

Πίνακας 16: Οι εστέρες που παράχθηκαν από τους τρεις μικροοργανισμούς στα υποστρώματα φρουκτόζης.

COMPOUNDS	Συγκέντρωση (mg/L)		
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>T. delbrueckii</i>	<i>M. pulcherrima</i>
Ethyl butyrate	0.19	TRACES	TRACES
Ethyl lactate	NOT DETECTED	TRACES	NOT DETECTED
Isoamyl acetate	0.07	TRACES	0.18
Ethyl caproate	0.09	TRACES	0.09
Ethyl caprylate	0.22	TRACES	0.12
Phenyethyl acetate	TRACES	TRACES	0.15
Ethyl caprate	0.12	TRACES	TRACES
Ethyl laurate	0.05	TRACES	NOT DETECTED

Στην περίπτωση των εστέρων που παράχθηκαν από τους τρεις μικροοργανισμούς στα υποστρώματα φρουκτόζης, παρατηρείται ένας σημαντικός αριθμός διαφορετικών ενώσεων με ενδιαφέροντα αρωματικά χαρακτηριστικά. Σε υψηλές συγκεντρώσεις παράγονται από τον συμβατικό μικροοργανισμό ο βουτυρικός, ο καπρωϊκός και ο καπρυλικός αιθυλεστέρας και από την *M. pulcherrima* ο καπρωϊκός, ο καπρυλικός αιθυλεστέρας και ο φαινυλαιθυλεστέρας. Στην περίπτωση της *T. delbrueckii* το σύνολο των εστέρων βρέθηκαν σε ίχνη.

Πίνακας 17: Οι υδρογονάνθρακες που παράχθηκαν από τους τρεις μικροοργανισμούς στα υποστρώματα φρουκτόζης.

COMPOUNDS	Συγκέντρωση (mg/L)		
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>T. delbrueckii</i>	<i>M. pulcherrima</i>
Disulfide, dimethyl	0.04	TRACES	TRACES
Methyl ethyl disulphide	0.09	0.07	0.06
p-Xylene	0.09	TRACES	0.07
Diethyl disulfide	0.03	TRACES	TRACES

Σε σημαντικές συγκεντρώσεις ανιχνεύθηκαν ενώσεις του θείου στην περίπτωση του *S. cerevisiae* και ιδιαίτερα το διμεθυλοδισουλφίδιο το οποίο είναι γνωστό για τα αρνητικά αρώματα που προσδίδει.

Στο υπόστρωμα φρουκτόζης που ζυμώθηκε από την *T. delbrueckii*, όπως παρατηρήθηκε στους πίνακες 14-17, η πλειοψηφία των ουσιών βρέθηκε σε ίχνη, γεγονός το οποίο πιθανά οφείλεται σε υπερσυμπύκνωση του δείγματος κατά την πειραματική διαδικασία.

Πίνακας 18: Οι αλκοόλες που παράχθηκαν από τους τρεις μικροοργανισμούς στα υποστρώματα μαλτόζης.

COMPOUNDS	Συγκέντρωση (mg/L)		
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>T. delbrueckii</i>	<i>M. pulcherrima</i>
Isoamyl alcohol	0.74	4.82	4.31
Active amyl alcohol	0.15	1.68	1.39
Phenylethyl Alcohol	0.41	4.07	5.00

Όπως καταγράφηκε ήδη στα υποστρώματα γλυκόζης και φρουκτόζης το σύνολο των μικροοργανισμών παράγει ισοαμυλική, ενεργή αμυλική και φαινυλαιθυλική αλκοόλη και ιδιαίτερα οι δύο μη συμβατικοί μικροοργανισμοί. Παρόλα αυτά οι αλκοόλες που παράχθηκαν από τον συμβατικό ζυμομύκητα στο υπόστρωμα μαλτόζης βρέθηκαν σε πολύ χαμηλότερες συγκεντρώσεις συγκριτικά με τα προηγούμενα υποστρώματα.

Πίνακας 19: Τα οξέα που παράχθηκαν από τους τρεις μικροοργανισμούς στα υποστρώματα μαλτόζης.

COMPOUNDS	Συγκέντρωση (mg/L)		
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>T. delbrueckii</i>	<i>M. pulcherrima</i>
Isobutyric acid	0.23	TRACES	0.30
Butyric acid	TRACES	0.17	0.14
Isovaleric acid	0.08	0.12	0.11
Caproic acid	TRACES	TRACES	0.41
Caprylic acid	0.33	0.83	0.69
Palmitic acid	0.12	TRACES	TRACES

Όσον αφορά στα οξέα που παράχθηκαν κατά την ζύμωση της μαλτόζης από τους τρεις μικροοργανισμούς, όπως και στα προηγούμενα υποστρώματα, παρατηρείται η παραγωγή ενός σημαντικού αριθμού οξέων, αλλά μόνο το ισοβουρυτικό οξύ παράγεται σε

συγκεντρώσεις υψηλότερες του ορίου ανίχνευσης. Συγκεκριμένα στο εν λόγω υπόστρωμα παράγεται από τον συμβατικό ζυμομύκητα και την *M. pulcherrima* ισοβουτυρικό οξύ σε συγκεντρώση 0.23 και 0.30 mg/L αντίστοιχα.

Πίνακας 20: Οι εστέρες που παράχθηκαν από τους τρεις μικροοργανισμούς στα υποστρώματα μαλτόζης.

COMPOUNDS	Συγκέντρωση (mg/L)		
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>T. delbrueckii</i>	<i>M. pulcherrima</i>
Ethyl lactate	TRACES	TRACES	0.25
Isoamyl acetate	TRACES	0.1	0.08
Ethyl caprylate	0.07	0.07	TRACES
Phenylethyl acetate	TRACES	0.07	TRACES
Ethyl caprate	0.07	TRACES	TRACES
Ethyl laurate	0.04	TRACES	TRACES
Ethyl 9-hexadecenoate	0.05	TRACES	TRACES
Ethyl palmitate	0.07	TRACES	TRACES

Στα υποστρώματα μαλτόζης ανιχνεύθηκαν από τον αέριο χρωματογράφο αρκετοί εστέρες και ορισμένοι οι οποίοι δεν βρέθηκαν στα προηγούμενα όπως ο εξαδεκανπικός αιθυλεστέρας (άοσμο) και ο παλμιτικός αιθυλεστέρας (κηρώδες, φρουτώδες, κρεμώδες), ενώ δεν ανιχνεύθηκε ο καπρικός αιθυλεστέρας ο οποίος προσδίδει χαρακτηριστικά αρώματα μήλου και γλυκάνισου. Σε συγκεντρώσεις υψηλότερες του ορίου ανίχνευσης μετρήθηκε ο καπρυλικός αιθυλεστέρας στα υποστρώματα που ζυμώθηκαν από τον *S. cerevisiae* και την *T. delbrueckii* και ο οξικός φαινυλαιθυλεστέρας στο υπόστρωμα του ίδιου μη συμβατικού μικροοργανισμού.

Πίνακας 21: Οι υδρογονάνθρακες που παράχθηκαν από τους τρεις μικροοργανισμούς στα υποστρώματα μαλτόζης.

COMPOUNDS	Συγκέντρωση (mg/L)		
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>T. delbrueckii</i>	<i>M. pulcherrima</i>
Acetal	0.08	TRACES	TRACES
Toluene	TRACES	0.51	0.16
Methyl ethyl disulfide	TRACES	0.09	0.09
p-Xylene	TRACES	TRACES	0.06
Caryophyllene	0.08	TRACES	TRACES
Isohumulone	0.76	TRACES	TRACES

Από τον πίνακα 21 παρατηρείται ότι στα δείγματα μαλτόζης όσον αφορά στους υδρογονάνθρακες δεν παράχθηκαν μόνο ενώσεις του θείου αλλά ακόμη, το καρυοφυλλένιο (ξύλο, πικάντικο) η ισοχουμουλόνη (πικράδα) και η ακεταλη (φυτικό, γκαζόν) ανιχνεύθηκαν στο υπόστρωμα του συμβατικού ζυμομύκητα σε σημαντικές ποσότητες. Ακόμη στα υποστρώματα που ζυμώθηκαν από τους δύο μη συμβατικούς μικροοργανισμούς παράχθηκε τολουόλιο αλλά σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες του ορίου ανίχνευσης.

Πίνακας 22: Οι αλκοόλες που παράχθηκαν από τους τρεις μικροοργανισμούς στα υποστρώματα μίγματος σακχάρων.

COMPOUNDS	Συγκέντρωση (mg/L)		
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>T. delbrueckii</i>	<i>M. pulcherrima</i>
Isoamyl alcohol	5.97 ± 0.88	3.00 ± 1.52	5.69 ± 1.19
Active amyl alcohol	1.39 ± 0.27	0.81 ± 0.38	1.82 ± 0.51
2,3-Butanediol	NOT DETECTED	NOT DETECTED	0.02 ± 0.02
2-Ethyl-1-hexanol	NOT DETECTED	NOT DETECTED	TRACES
Phenylethyl Alcohol	4.55 ± 0.14	2.65 ± 0.39	8.74 ± 1.48
Tryptophol	NOT DETECTED	NOT DETECTED	0.12 ± 0.12

Στην περίπτωση του μίγματος σακχάρων παρατηρείται παρόμοια παραγωγή ενεργής αμυλικής και ισοαμυλικής αλκοόλης από τον πρότυπο μικροοργανισμό και την *M. pulcherrima* και αρκετά χαμηλότερη από την *T. delbrueckii*. Η υψηλότερη συγκέντρωση φαινυλαιθυλικής αλκοόλης (τριαντάφυλλο) παρατηρείται και σε αυτή την περίπτωση στο υπόστρωμα που ζυμώθηκε με την *M. pulcherrima*. Ο ζυμομύκητας αυτός παράγει ακόμη σε σημαντική ποσότητα τρυπτοφόλη (αμύγδαλο) αλλά μόνο σε ένα από τα δύο δείγματα επανάληψης. Ακόμη σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις παρατηρείται η παραγωγή 2,3-βουτανοδιόλης και 2-αιθυλ-1-εξανόλης.

Πίνακας 23: Τα οξέα που παράχθηκαν από τους τρεις μικροοργανισμούς στα υποστρώματα μίγματος σακχάρων.

COMPOUNDS	Συγκέντρωση (mg/L)		
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>T. delbrueckii</i>	<i>M. pulcherrima</i>
Isobutyric acid	0.55 ± 0.03	1.25 ± 1.01	0.11 ± 0.11
Butyric acid	0.14 ± 0.01	TRACES	0.06 ± 0.06
Valeric acid	NOT DETECTED	TRACES	0.15 ± 0.15
Isovaleric acid	0.07 ± 0.07	TRACES	0.04 ± 0.04
Active valeric acid	0.06 ± 0.06	NOT DETECTED	0.05 ± 0.05
Caproic acid	0.25 ± 0.10	TRACES	0.23 ± 0.09
Caprylic acid	0.81 ± 0.26	0.19 ± 0.19	1.02 ± 0.18
Capric acid	TRACES	TRACES	0.03 ± 0.03

Όπως προκύπτει από τον πίνακα 23 από την αέρια χρωματογραφία στα υποστρώματα του μίγματος σακχάρων ανιχνεύθηκε ένας σημαντικός αριθμός οξέων. Παρόλα αυτά μόνο το ισοβουτυρικό οξύ (φράουλα) στα υποστρώματα που ζυμώθηκαν από τον *S. cerevisiae* και την *T. delbrueckii* βρέθηκε σε συγκέντρωση υψηλότερη του ορίου ανίχνευσης. Ακόμα στα δείγματα του συμβατικού ζυμομύκητα και της *M. pulcherrima* βρέθηκε ισοβαλερικό οξύ, ουσία που προσδίδει αρνητικά αρώματα, αλλά το όριο ανίχνευσης της συγκεκριμένης ουσίας δεν είναι διαθέσιμο και η τυπική απόκλιση και στις δύο μετρήσεις είναι πολύ υψηλή, γεγονός το οποίο δείχνει ότι η συγκεκριμένη ουσία ανιχνεύθηκε μόνο σε ένα από τα δύο δείγματα επανάληψης σε κάθε περίπτωση.

Πίνακας 24: Οι εστέρες που παράχθηκαν από τους τρεις μικροοργανισμούς στα υποστρώματα μίγματος σακχάρων.

COMPOUNDS	Συγκέντρωση (mg/L)		
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>T. delbrueckii</i>	<i>M. pulcherrima</i>
Ethyl butyrate	TRACES	NOT DETECTED	TRACES
Ethyl lactate	NOT DETECTED	NOT DETECTED	0.09 ± 0.03
Isoamyl acetate	0.21 ± 0.03	TRACES	0.09 ± 0.02
Ethyl caproate	0.09 ± 0.02	TRACES	0.02 ± 0.02
Ethyl caprylate	0.10 ± 0.10	TRACES	0.11 ± 0.02
Phenylethyl acetate	0.03 ± 0.03	TRACES	0.11 ± 0.03
Ethyl caprate	0.04 ± 0.04	TRACES	TRACES

Στα δείγματα του *S. cerevisiae* και της *M. pulcherrima* ανιχνεύθηκαν αρκετοί εστέρες οι οποίοι γενικά προσδίδουν γλυκά αρώματα φρούτων. Συγκεκριμένα ο συμβατικός μύκητας παράγει σε συγκεντρώσεις υψηλότερες του ορίου ανίχνευσης καπρωϊκό (μήλο και γλυκάνισος) και καπρυλικό (βερίκοκο, μπανάνα, μπράντυ, αχλάδι) αιθυλεστέρα, ενώ η *M. pulcherrima* καπρωϊκό και καπρυλικό αιθυλεστέρα και φαινυλαιθυλεστέρα (μπανάνα, μήλο και μέλι). Αντίθετα στο υπόστρωμα που ζυμώθηκε από την *T. delbrueckii* το σύνολο των εστέρων που ανιχνεύθηκαν βρίσκονται σε ίχνη.

Πίνακας 25: Οι υδρογονάνθρακες που παράχθηκαν από τους τρεις μικροοργανισμούς στα υποστρώματα μίγματος σακχάρων.

COMPOUNDS	Συγκέντρωση (mg/L)		
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>T. delbrueckii</i>	<i>M. pulcherrima</i>
Acetal	NOT DETECTED	TRACES	NOT DETECTED
Disulfide, dimethyl	TRACES	0.25 ± 0.25	0.13 ± 0.08
Toluene	0.02 ± 0.02	0.22 ± 0.06	NOT DETECTED
Methyl ethyl disulfide	0.02 ± 0.02	TRACES	0.03 ± 0.03
p-Xylene	0.02 ± 0.02	TRACES	0.08 ± 0.01
o-Xylene	NOT DETECTED	TRACES	NOT DETECTED
Diethyl disulfide	TRACES	TRACES	TRACES
Disulfide, 1-methylethyl propyl	TRACES	NOT DETECTED	TRACES
Limonene	NOT DETECTED	TRACES	NOT DETECTED
Pentadecane	NOT DETECTED	TRACES	NOT DETECTED
Tyrosol	NOT DETECTED	NOT DETECTED	TRACES
Nonadecane	NOT DETECTED	TRACES	NOT DETECTED

Στην περίπτωση των υδρογονανθράκων οι ενώσεις που ανιχνεύθηκαν βρέθηκαν σε ίχνη ή μόνο σε ένα από τα δύο δείγματα επανάληψης σε κάθε περίπτωση. Μόνο στα δείγματα της *M. pulcherrima* βρέθηκε διμεθυλοδισουλφίδιο σε συγκέντρωση υψηλότερη του ορίου ανίχνευσης, ουσία που χαρακτηρίζεται από αρνητικά αρώματα μαγειρεμένων λαχανικών.

A.9 Συμπεράσματα

Με την ολοκλήρωση της μελέτης της ανάπτυξης των επιλεγμένων μικροοργανισμών σε πρότυπα υποστρώματα διαπιστώθηκε ότι και οι δύο επιλεγμένοι μη συμβατικοί μικροοργανισμοί έχουν τη δυνατότητα μεταβολισμού των τριών βασικών σακχάρων του ζυθογλεύκου με την ταυτόχρονη παραγωγή αιθανόλης, με χαρακτηριστικά αντίστοιχα του *S. cerevisiae*. Ακόμη με την ανάλυση του αρωματικού προφίλ των προϊόντων της ζύμωσης προκύπτει ότι οι δύο non-*Saccharomyces* παράγουν ένα πλήθος αρωματικών ενώσεων όπως ισοαμυλική αλκοόλη, ενεργή αμυλική αλκοόλη, ισοβουτυρικό οξύ και φαινυλαιθυλική αλκοόλη οι οποίες συντελούν σε ένα αρωματικό προφίλ που χαρακτηρίζεται από φρούτα όπως μπανάνα, κεράσι αλλά και λουλούδια με πιο έντονο το τριαντάφυλλο. Ακόμη παρατηρείται ότι στο σύνολο των υποστρωμάτων βρέθηκε ένα πλήθος διαφορετικών ουσιών οι οποίες όμως βρίσκονται σε ίχνη ή σε χαμηλές συγκεντρώσεις, αλλά δείχνουν τη δυνατότητα των μη συμβατικών μικροοργανισμών να διαμορφώσουν ένα πολύπλοκο αρωματικό προφίλ, χωρίς σημαντική παρουσία αρνητικών αρωμάτων.

B Παραγωγή μπύρας

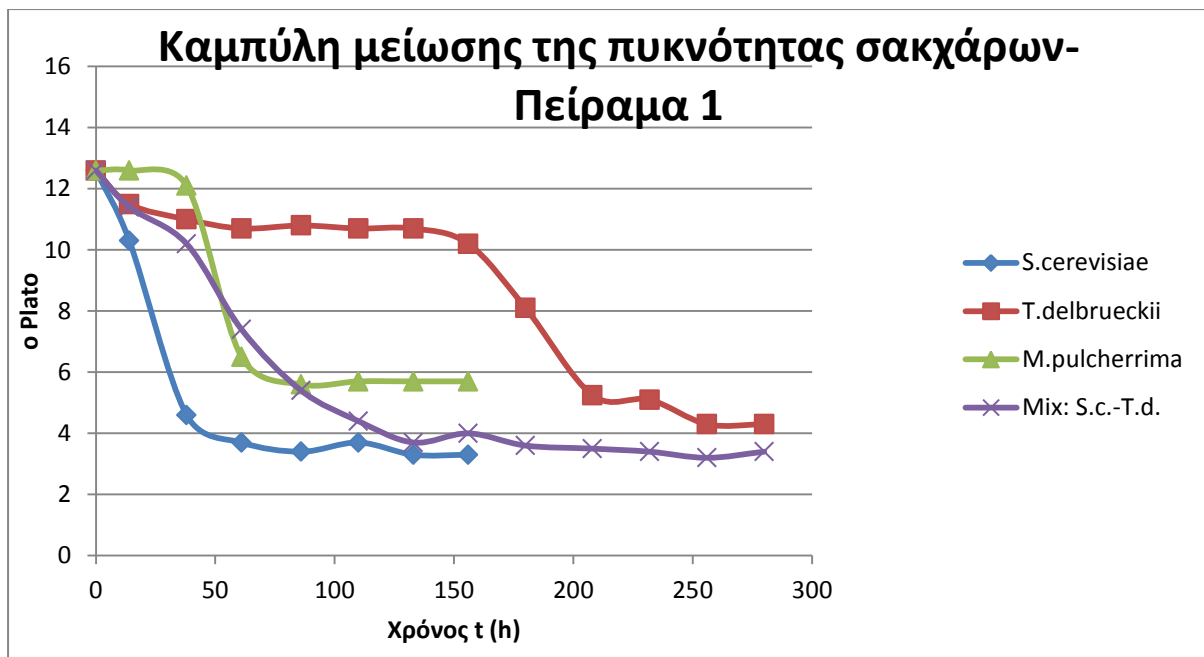
Εφόσον διαπιστώθηκε η ικανότητα μεταβολισμού των βασικών σακχάρων της μπύρας, στη συνέχεια επιχειρήθηκε η παραγωγή μπύρας με τους παρακάτω μικροοργανισμούς:

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

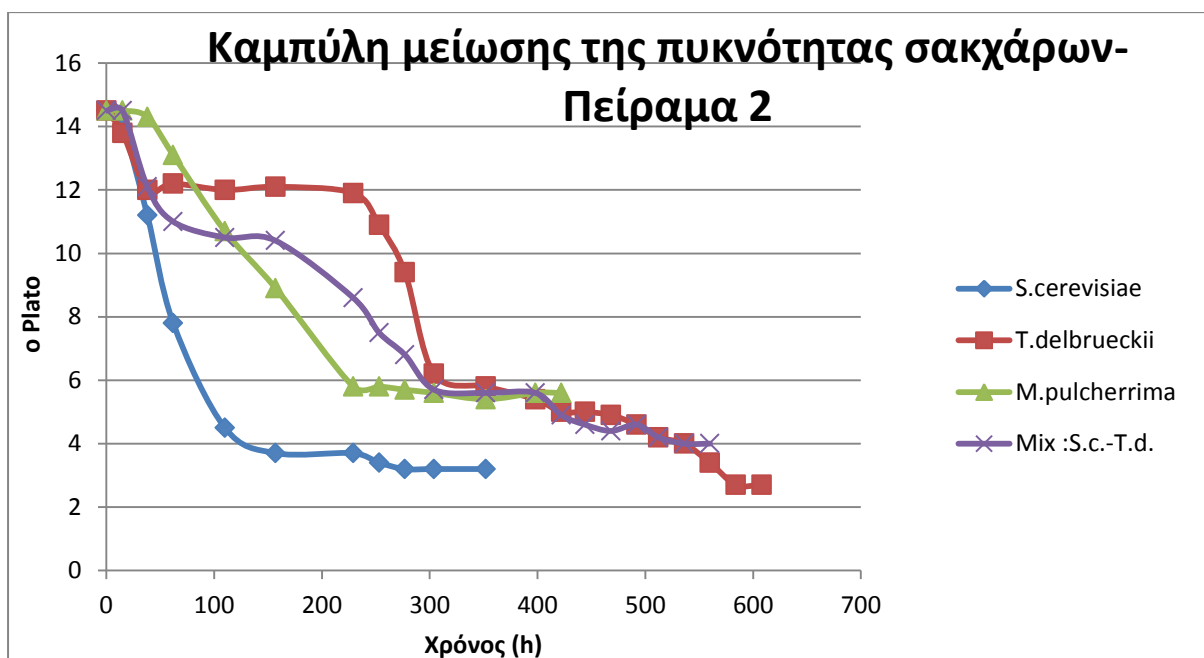
Συγκεκριμένα το πείραμα αυτό επιχειρήθηκε δύο φορές, στην πρώτη περίπτωση η αρχική πυκνότητα του γλεύκου ήταν ίση με 12.6 °Plato και η ζύμωση πραγματοποιήθηκε σε μέση θερμοκρασία 24 °C (Πείραμα 1), ενώ στη δεύτερη περίπτωση πραγματοποιήθηκε ζύμωση γλεύκου με αρχική πυκνότητα 14.5 °Plato, σε μέση θερμοκρασία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

B.1 Πυκνότητα σακχάρων

Στα πειράματα παραγωγής μπύρας για την ημερήσια μέτρηση της συγκέντρωσης των μη καταναλωθέντων σακχάρων χρησιμοποιήθηκε πυκνόμετρο βαθμονομημένο σε βαθμούς Plato. Στους πίνακες 13 και 14 του παραρτήματος παρουσιάζονται οι πρωτογενείς μετρήσεις Plato και η σχετική πυκνότητα (SG). Στα διαγράμματα 31 και 32 που ακολουθούν παρουσιάζεται η μείωση των τιμών Plato κατά την διάρκεια της ζύμωσης για τα τέσσερα διαφορετικά συστήματα μικροοργανισμών στα δύο πειράματα.



Διάγραμμα 31: Καμπύλες μείωσης της πυκνότητας των σακχάρων στο ζυμούμενο γλεύκος των διαφορετικών μικροοργανισμών στο Πείραμα 1 (αρχική πυκνότητα 12.6 °Plato, θερμοκρασία 24 °C).



Διάγραμμα 32: Καμπύλες μείωσης της πυκνότητας των σακχάρων στο ζυμούμενο γλεύκος των διαφορετικών μικροοργανισμών στο Πείραμα 2 (αρχική πυκνότητα 14.5 °Plato, θερμοκρασία 20 °C).

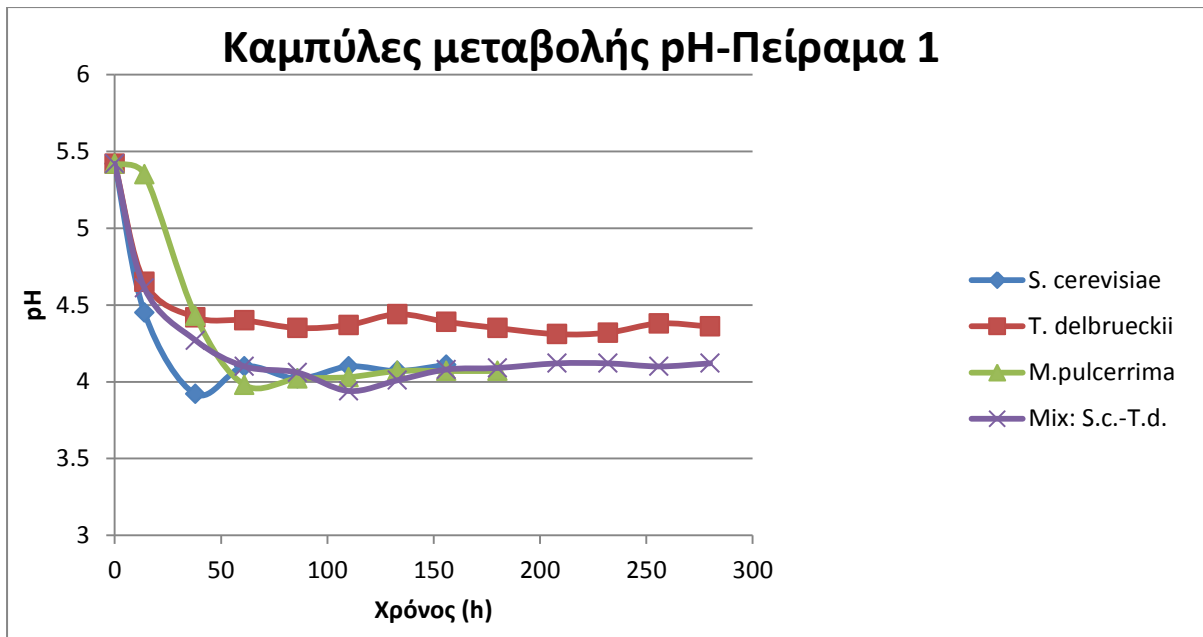
Από τα διαγράμματα 31 και 32 προκύπτει ότι ο χρόνος ζύμωσης στο πείραμα 1 είναι σαφώς μικρότερος για κάθε ένα από τα διαφορετικά συστήματα ζυμομύκητων. Συγκεκριμένα ο *S. cerevisiae* στην πρώτη περίπτωση ολοκλήρωσε τη ζύμωση σε 7 ημέρες ενώ στη δεύτερη σε 15, η *T. delbrueckii* σε 12 έναντι 26 στο πείραμα 2, η *M. pulcherrima* σε 7 και 18 αντίστοιχα και η μικτή καλλιέργεια σε 13 και 24 ημέρες.

Όσον αφορά στις διαφορές στον χρόνο ζύμωσης μεταξύ των διαφορετικών μικροοργανισμών, και στα δύο πειράματα νωρίτερα ολοκληρώνονται οι ζυμώσεις των *S. cerevisiae* και *M. pulcherrima* ενώ τον περισσότερο χρόνο χρειάστηκε η *T. delbrueckii* καθώς και η μικτή καλλιέργεια, γεγονός το οποίο είχε ήδη παρατηρηθεί στο πείραμα πρότυπου υποστρώματος. Συγκεκριμένα φαίνεται ότι η *T. delbrueckii* κατάφερε να μεταβολίσει τα μικρά ποσοστά μονοσακχαριτών τις πρώτες δύο ημέρες της ζύμωσης ενώ η κατανάλωση της μαλτόζης ξεκίνησε περίπου την 7^η ημέρα στο πείραμα 1 και τη 10^η στο πείραμα 2. Αντίστοιχα η *M. pulcherrima* και στα δύο πειράματα παρουσίασε σταθερή πυκνότητα σακχάρων για σχεδόν δύο ημέρες και στη συνέχεια σταθερό ρυθμό κατανάλωσης αντίστοιχο του συμβατικού ζυμομύκητα. Στην περίπτωση του μίγματος μικροοργανισμών παρατηρούνται διαφοροποιήσεις μεταξύ των δύο πειραμάτων. Στο πείραμα 1 το μίγμα μικροοργανισμών ξεκίνησε να μεταβολίζει τα σάκχαρα αμέσως μετά τον εμβολιασμό ενώ στο πείραμα 2 παρατηρήθηκε μικρή κατανάλωση τις πρώτες ημέρες ζύμωσης μετά μια σταθερή φάση και κατά την έβδομη ημέρα ξεκίνησε ο μεταβολισμός της μαλτόζης του ζυθογλεύκου, ο ρυθμός μεταβολισμού και στις δύο περιπτώσεις ήταν σημαντικά χαμηλότερος από του *S. cerevisiae*.

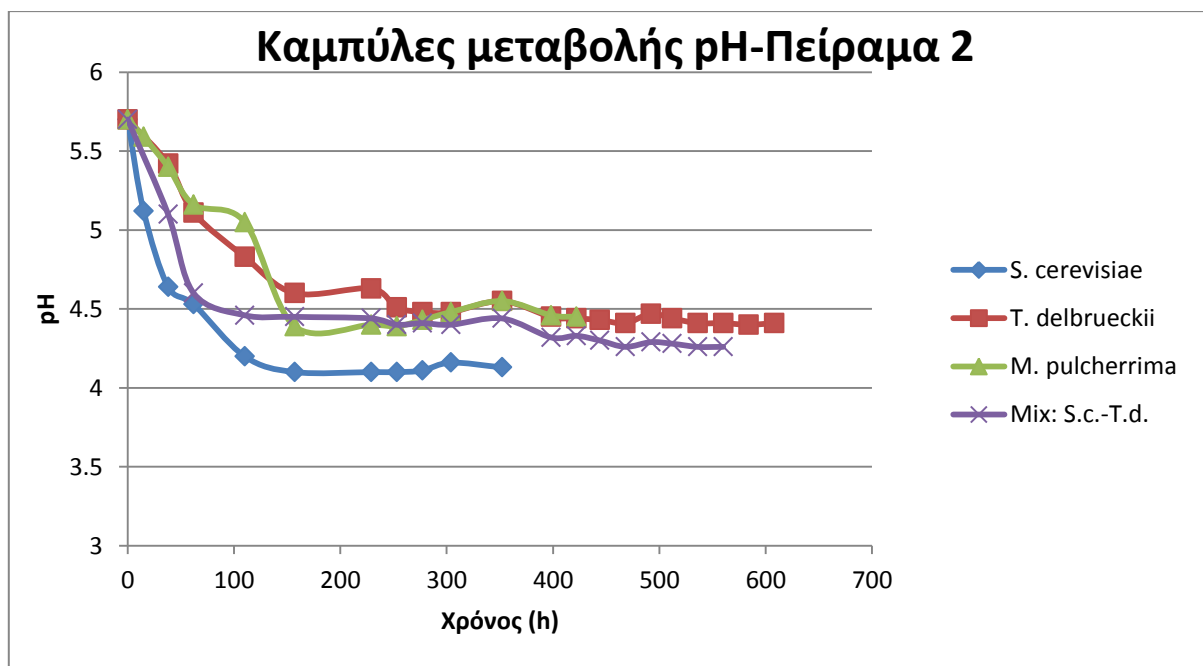
Παρόλο που όλοι οι μικροοργανισμοί κατάφεραν να ζυμώσουν το ζυθογλεύκος τα ποσοστά αζύμωντων σακχάρων διαφέρουν αρκετά. Συγκεκριμένα στο πείραμα 1 οι δύο non-*Saccharomyces* φαίνεται να μην κατάφεραν να αποζυμώσουν το γλεύκος καθώς η τιμή Plato στο τέλος της ζύμωσης ήταν 4.3 και 5.7 στην *T. delbrueckii* και *M. pulcherrima* αντίστοιχα. Ο συμβατικός ζυμομύκητας και η μικτή καλλιέργεια *S. cerevisiae* -*T. delbrueckii* εμφάνισαν τελικές τιμές Plato 3.3 και 3.5 αντίστοιχα. Στην περίπτωση του 2^{ου} πειράματος οι τελικές τιμές αζύμωντων σακχάρων είναι διαφορετικές. Μικρότερη ποσότητα αζύμωντων σακχάρων παρατηρήθηκε στην περίπτωση της *T. delbrueckii* και του *S. cerevisiae* με τελικές τιμές Plato 2.7 και 3.2 αντίστοιχα. Στην περίπτωση της *M. pulcherrima* και της μικτής καλλιέργειας *S. cerevisiae* -*T. delbrueckii* οι τιμές Plato στο τέλος της ζύμωσης βρέθηκαν ίσες με 5.6 και 4 αντίστοιχα. Συγκριτικά και στα δύο πειράματα η *M. pulcherrima* δεν κατάφερε να αποζυμώσει το γλεύκος, το οποίο πιθανά οφείλεται στην μικρή αντοχή του μύκητα αυτού στην αιθανόλη, όπως έχει ήδη αναφερθεί. Όσον αφορά στο μικροοργανισμό *T. delbrueckii* τα αποτελέσματα των δύο πειραμάτων διαφέρουν, στο 2^ο πείραμα φαίνεται ότι ο μικροοργανισμός έχει την δυνατότητα αποζύμωσης του γλεύκου, είναι λοιπόν πιθανό στην περίπτωση του 1^{ου} πειράματος η υψηλότερη τιμή τελικής πυκνότητας να οφείλεται σε στρες του μικροοργανισμού λόγω των θερμοκρασιακών διακυμάνσεων ή σε υποβαθμισμένη ποιότητα της ξηρής ζύμης που χρησιμοποιήθηκε. Στα άλλα δύο συστήματα μικροοργανισμών οι τελικές τιμές πυκνότητας μεταξύ των δύο πειραμάτων δεν διαφέρουν σημαντικά. Παρόλα αυτά το συγκεκριμένο στέλεχος *T. delbrueckii* φαίνεται αρκετά αποτελεσματικό στον μεταβολισμό της μαλτόζης, σε σχέση με άλλα στελέχη που έχουν μελετηθεί στο παρελθόν. Συγκεκριμένα στην δημοσίευση των Canonico et al (2015) ο μικροοργανισμός *Torulaspora delbrueckii* DiSVA 254 δοκιμάστηκε σε γλεύκος αρχικής πυκνότητας 12.7^oP και θερμοκρασία ζύμωσης ίση με 20 °C και η τελική πυκνότητα της μπίρας ήταν 7.51^oP, τιμή που αντιστοιχεί σε υψηλό ποσοστό αζύμωντων σακχάρων.

B.2 Μεταβολή pH

Στα διαγράμματα 33 και 34 παρουσιάζονται οι μεταβολές του pH κατά την διάρκεια της ζύμωσης στα τέσσερα διαφορετικά συστήματα μικροοργανισμών στα δύο πειράματα, και στους πίνακες 15 και 16 του παραρτήματος παρουσιάζονται οι αντίστοιχες μετρήσεις.



Διάγραμμα 33: Καμπύλες μεταβολής του pH στις διαφορετικές μπίρες στο Πείραμα 1(αρχική πυκνότητα 12 °Plato, θερμοκρασία 24 °C).



Διάγραμμα 34:Καμπύλες μεταβολής του pH στις διαφορετικές μπίρες στο Πείραμα 2 (αρχική πυκνότητα 14.5 °Plato, θερμοκρασία 20 °C).

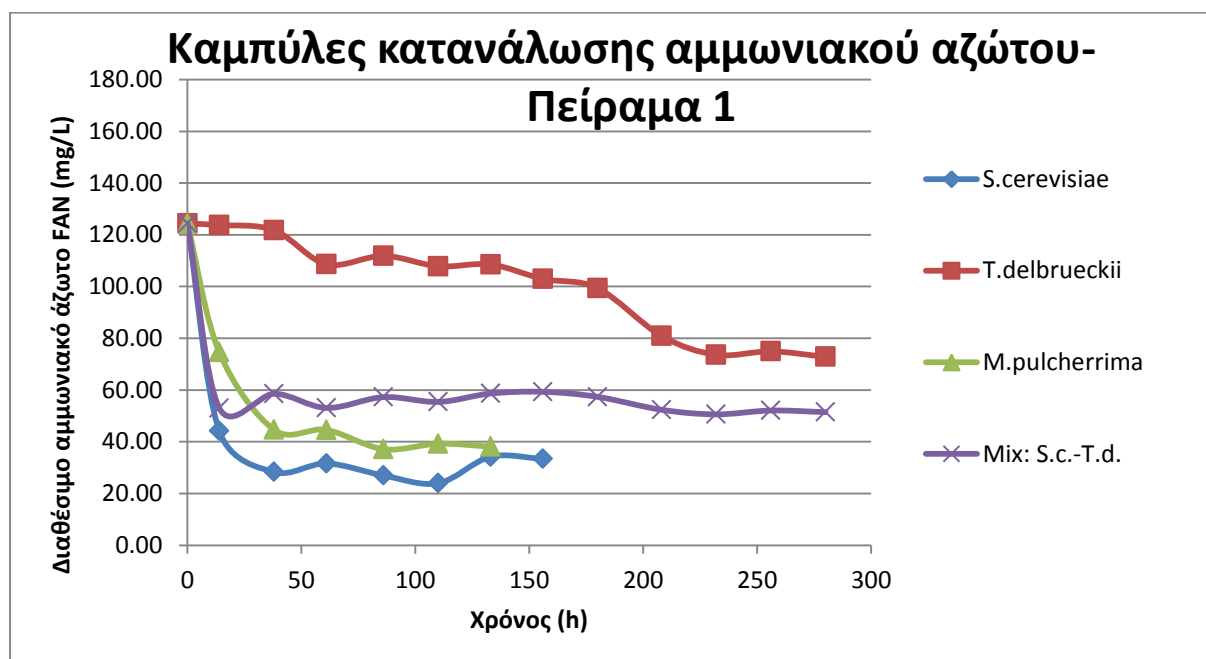
Παρατηρώντας τις καμπύλες των διαγραμμάτων 30 και 31 διαπιστώνεται ότι σε κάθε περίπτωση το pH μειώνεται μέσα στις πρώτες 2 ημέρες ζύμωσης και μετά διατηρείται σχεδόν σταθερό. Όσον αφορά τις τελικές τιμές pH στο πείραμα 1 χαμηλότερες είναι αυτές του *S. cerevisiae* και της *M. pulcherrima* με τιμές 4.11 και 4.07, ενώ υψηλότερη τιμή pH εμφανίζεται στην περίπτωση της μπίρας που ζυμώθηκε με *T. delbrueckii*. Αντίθετα στο

πείραμα 2 υψηλότερες τιμές pH εμφανίζονται στις μπίρες που ζυμώθηκαν με *M. pulcherrima* (4.45) και *T. delbrueckii* (4.41) και χαμηλότερες στις μπίρες που ζυμώθηκαν με την μικτή καλλιέργεια (4.26) και *S. cerevisiae* (4.13). Οι τιμές pH στην περίπτωση του 2^{ου} πειράματος είναι γενικά υψηλότερες, η διαφοροποίηση αυτή είναι πιθανό να οφείλεται σε διαφορετικές συγκεντρώσεις των δευτερογενών μεταβολιτών, όπως οξέων, που παράγουν οι ζύμες κατά τις διαφορετικές συνθήκες ζύμωσης.

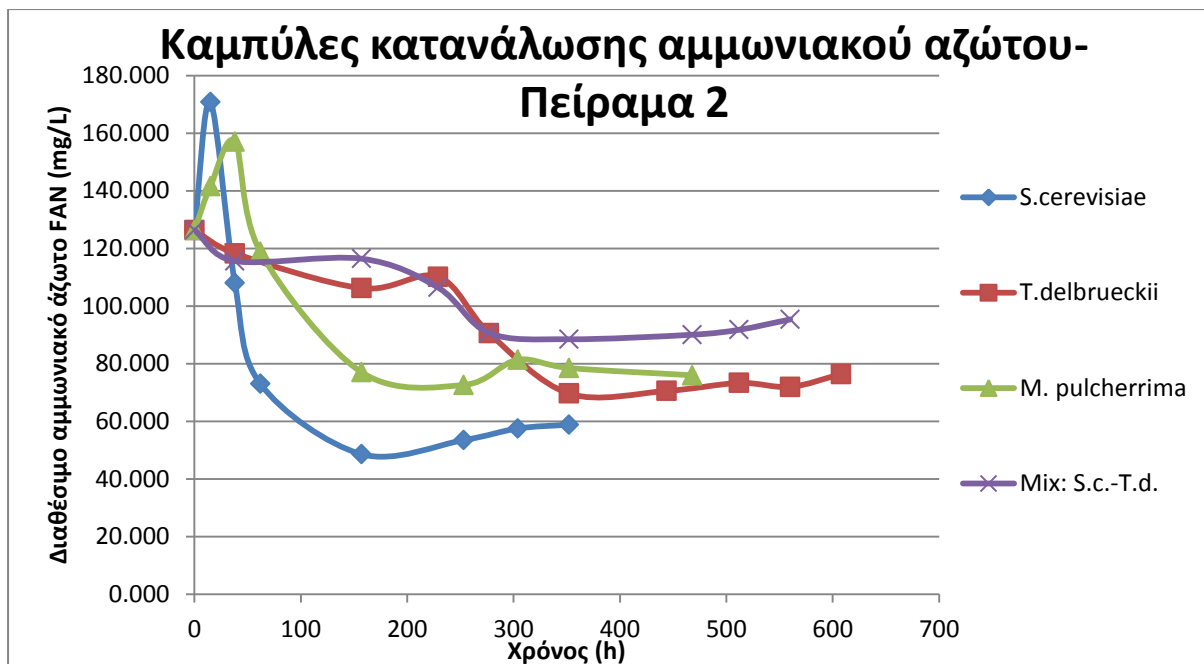
Κατά συνέπεια παρατηρείται ότι τα προϊόντα ζύμωσης της *T. delbrueckii* εμφανίζουν υψηλότερες τιμές pH σε σχέση με αυτά του συμβατικού ζυμομύκητα, το συμπέρασμα αυτό έρχεται σε αντίθεση με όσα έχουν βρεθεί στην βιβλιογραφία. Συγκεκριμένα σε δημοσίευση των Canónico et al (2015), από γλεύκος με αρχική τιμή pH ίση με 5.47 οι μπίρες που προέκυψαν με ζύμωση από *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii* και μικτή καλλιέργεια των δύο μικροοργανισμών σε αναλογία 1:10 είχαν pH ίσο με 4.8, 4.56 και 4.43 αντίστοιχα. Δηλαδή υψηλότερη τιμή pH εμφανίζεται στην περίπτωση του συμβατικού μικροοργανισμού, με το σύνολο όμως των τιμών να είναι υψηλότερες σε σχέση με την δική μας περίπτωση παρόλο που η αρχική τιμή του γλεύκους και οι συνθήκες ζύμωσης είναι οι ίδιες. Οι διαφορετικές αυτές τιμές στα πειραματικά δεδομένα οφείλονται στην αρκετά μεγάλη διαφοροποίηση που παρουσιάζουν τα διαφορετικά στελέχη του ίδιου μικροοργανισμού.

B.3 Καμπύλες κατανάλωσης διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου

Στα διαγράμματα 35 και 36 που ακολουθούν παρουσιάζεται ο ρυθμός κατανάλωσης του διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου σε κάθε πείραμα. Στους πίνακες 17 και 18 του παρατήματος παρουσιάζονται οι αντίστοιχες τιμές.



Διάγραμμα 35: Καμπύλες κατανάλωσης διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου από τον εκάστοτε μικροοργανισμό στο Πείραμα 1 (αρχική πυκνότητα 12 °Plato, θερμοκρασία 24 °C).



Διάγραμμα 36: Καμπύλες κατανάλωσης διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου από τον εκάστοτε μικροοργανισμό στο Πείραμα 2 (αρχική πυκνότητα 14.5 °Plato, θερμοκρασία 20 °C).

Στο πείραμα 1 ο *S. cerevisiae* η *M. pulcherrima* και το μίγμα μικροοργανισμών παρατηρείται ότι κατανάλωσαν τη μεγαλύτερη ποσότητα αζώτου μέσα στις δύο πρώτες μέρες της ζύμωσης και στην συνέχεια η ποσότητα αζώτου παρέμεινε σχεδόν σταθερή μέχρι το τέλος της ζύμωσης. Αντίθετα ο μικροοργανισμός *T. delbrueckii* καθώς άργησε να πολλαπλασιαστεί και να μεταβολίσει τα σάκχαρα του γλεύκους άργησε και να καταναλώσει το θρεπτικό άζωτο. Ο μικροοργανισμός που κατανάλωσε την μεγαλύτερη ποσότητα ήταν ο συμβατικός μικροοργανισμός ενώ το λιγότερο ο *T. delbrueckii*.

Στην περίπτωση του 2^{ου} πειράματος λόγω του μεγάλου όγκου των δειγμάτων επιλέχθηκε να μετρηθούν επιλεγμένα δείγματα. Συγκεκριμένα καθώς όπως παρατηρήθηκε στο πείραμα 1 η κατανάλωση του αζώτου πραγματοποιείται τις πρώτες ημέρες της ζύμωσης, δηλαδή κατά τη φάση προσαρμογής και πολλαπλασιασμού των μικροοργανισμών, και στη συνέχεια παραμένει σταθερό, επιλέχθηκε να μετρηθούν οι τρεις πρώτες ημέρες και στη συνέχεια μετρήθηκαν τα δείγματα κάθε μια-δύο ημέρες.

Στο δεύτερο πείραμα η *T. delbrueckii* επίσης καθυστέρησε να καταναλώσει το διαθέσιμο αμμωνιακό άζωτο καθώς αναπτύχθηκε με πιο αργό ρυθμό από τους υπόλοιπους, αλλά στην περίπτωση αυτή καθυστέρησε και η μύρα με το μίγμα μικροοργανισμών να φτάσει στην τελική τιμή αμμωνιακού αζώτου. Η καθυστέρηση αυτή είναι αντίστοιχη της μορφής της καμπύλης μείωσης της πυκνότητας των σακχάρων που παρατηρήθηκε παραπάνω. Όσον αφορά στις καμπύλες του *S. cerevisiae* και *M. pulcherrima* παρόλο που ο ρυθμός κατανάλωσης είναι πιο γρήγορος (όπως και στο πείραμα 1), παρατηρείται μια αύξηση στην συγκέντρωση του διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου κατά τις πρώτες ημέρες ζύμωσης. Η αύξηση του αμμωνιακού αζώτου κατά τις πρώτες ημέρες της ζύμωσης δεν ήταν αναμενόμενη, παρόλα αυτά οφείλεται στο ότι οι μικροοργανισμοί κατά την ανάπτυξή τους διασπούν αμινοξέα απελευθερώνοντας μόρια αζώτου. Στο σύνολο των πειραμάτων ο μύκτης που κατανάλωσε την μεγαλύτερη ποσότητα αζώτου είναι ο *S. cerevisiae*, ενώ

λιγότερο άζωτο (σχεδόν υπόδιπλάσιο) απαιτήθηκε για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών στην μικτή καλλιέργεια.

Συγκριτικά για τα δύο πειράματα, στο πρώτο πείραμα οι μικροοργανισμοί χρειάστηκαν αρκετά μεγαλύτερη ποσότητα αζώτου για την ανάπτυξή τους σε σχέση με το δεύτερο, αυτό πιθανά οφείλεται στις μεγάλες θερμοκρασιακές διακυμάνσεις που παρατηρήθηκαν κατά τις ζυμώσεις του πρώτου πειράματος. Οι διαφοροποιήσεις αυτές στην θερμοκρασία είναι πιθανό να οδήγησαν τους μικροοργανισμούς σε μια κατάσταση στρες και λόγω αυτού να απαιτήθηκε μεγαλύτερη κατανάλωση θρεπτικού υλικού για τον πολλαπλασιασμό τους.

B.4 Προσδιορισμός πικράδας στο τελικό προϊόν

Η αρχική τιμή πικράδας του γλεύκους στο πείραμα 1 μετρήθηκε ίση με IBU = 33.125 ενώ στο πείραμα 2 IBU = 35.285. Στον πίνακα 26 παρουσιάζονται οι διαφορετικές τιμές πικράδας στην κάθε μπίρα στο τέλος της ζύμωσης και μετά την ωρίμανση.

Πίνακας 26: Μετρήσεις της πικράδας της μπίρας στα πειράματα 1 & 2.

Αριθμός πειράματος	Μικροοργανισμός ζύμωσης	Πικράδα μπίρας (IBU)	
		Στο τέλος της ζύμωσης.	Μετά από την ωρίμανση.
Πείραμα 1 (12 °Plato, 24 °C).	<i>S. cerevisiae</i>	27.63	26.75
	<i>T. delbrueckii</i>	29.78	28.45
	<i>M. pulcherrima</i>	39.70	34.63
	Mix: <i>S. c-T. d.</i>	28.75	28.75
Πείραμα 2 (14.5 °Plato, 20 °C).	<i>S. cerevisiae</i>	32.65	31.85
	<i>T. delbrueckii</i>	34.54	33.06
	<i>M. pulcherrima</i>	36.52	34.31
	Mix: <i>S. c-T. d.</i>	31.56	30.11

Τόσο στο πείραμα 1 όσο και στο πείραμα 2 οι μπίρες που ζυμώθηκαν με *S. cerevisiae* και μίγμα *S. cerevisiae-T. delbrueckii* παρουσίασαν τις χαμηλότερες τιμές πικράδας. Και στις τρεις περιπτώσεις τα ποσοστά πικράδας σε σχέση με το αρχικό γλεύκος, μειώθηκαν κατά τη ζύμωση. Αντίθετα στην περίπτωση της *M. pulcherrima* τα ποσοστά πικράδας αυξήθηκαν. Συγκριτικά οι τιμές πικράδας στο τέλος της ζύμωσης και μετά από την ωρίμανση παρουσίασαν μια μικρή μείωση που δείχνουν ότι είναι πιθανό στην συνέχεια να μειωθούν και άλλο. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Strong Gordon; BEER JUDGE CERTIFICATION PROGRAM, 2015) τα επίπεδα πικράδας σε American Pale Ale μπίρες είναι IBU=30-50), οι τιμές στη δική μας περίπτωση είναι λίγο χαμηλότερες ή κοντά στο κάτω όριο των τιμών της βιβλιογραφίας. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι κατά τον βρασμό επιλέχθηκε να μην προστεθεί μεγάλη ποσότητα λυκίσκου ώστε να αναδειχθούν τα αρωματικά χαρακτηριστικά που προσφέρει στην μπίρα ο κάθε μικροοργανισμός.

B.5 Προσδιορισμός χρώματος

B.5.1 Προσδιορισμός χρώματος με φωτόμετρο

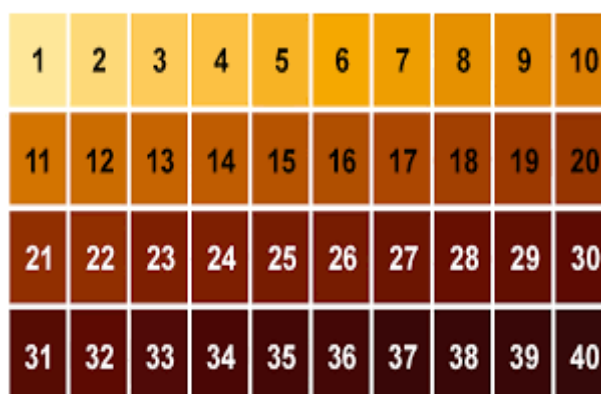
Στους πίνακες 27 και 28 παρουσιάζονται οι μετρήσεις σχετικά με το χρώμα της μπίρας σύμφωνα με την πρότυπη φωτομετρική μέθοδο (Standard Reference Method).

Πίνακας 27: Οι τιμές χρώματος των διαφορετικών δειγμάτων μπίρας του Πειράματος 1 (αρχική πυκνότητα 12 °Plato, θερμοκρασία 24 °C) σύμφωνα με την πρότυπη φωτομετρική μέθοδο SRM.

Μικροοργανισμός ζύμωσης.	SRM
<i>S. cerevisiae</i>	5.68
<i>T. delbrueckii</i>	6.08
<i>M. pulcherrima</i>	5.24
Mix: <i>S. c-T. d</i>	5.83

Πίνακας 28: Οι τιμές χρώματος των διαφορετικών δειγμάτων μπίρας του Πειράματος 2 (αρχική πυκνότητα 14.5 °Plato, θερμοκρασία 20 °C) σύμφωνα με την πρότυπη φωτομετρική μέθοδο SRM.

Μικροοργανισμός ζύμωσης.	SRM
<i>S. cerevisiae</i>	9.21
<i>T. delbrueckii</i>	9.08
<i>M. pulcherrima</i>	8.85
Mix: <i>S. c-T. d</i>	9.08



Εικόνα 18: Κλίμακα της μεθόδου SRM.

Στην πρότυπη φωτομετρική μέθοδο απαραίτητη προϋπόθεση είναι τα δείγματα να είναι απολύτως διαυγή. Στην περίπτωση μας στα δείγματα μπίρας που ζυμώθηκαν με τους μη συμβατικούς μικροοργανισμούς αλλά και με την μικτή καλλιέργεια, παρατηρήθηκε μια σχετική θολερότητα και για τον λόγο αυτό πριν την μέτρηση στο φωτόμετρο τα δείγματα αυτά φυγοκεντρήθηκαν και στην συνέχεια περάστηκαν από ειδικό φίλτρο.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία οι τιμές χρώματος για μπίρες τύπου American Pale Ale κυμαίνονται μεταξύ των τιμών SRM: 5-10. (Strong Gordon; BEER JUDGE CERTIFICATION PROGRAM, 2015). Παρατηρείται ότι οι τιμές του χρώματος μεταξύ των δυο πειραμάτων διαφέρουν σημαντικά. Συγκεκριμένα στην περίπτωση του 2^{ου} πειράματος οι τιμές είναι

σημαντικά αυξημένες, αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι κατά την διαδικασία παρασκευής του ζυθογλεύκου υπήρξε βλάβη στην δεξαμενή διήθησης και το γλεύκος παρέμεινε αρκετή ώρα εκτεθειμένο στον ατμοσφαιρικό αέρα. Με την επαφή του γλεύκου με το οξυγόνο έλαβε χώρα η αντίδραση οξειδωσης των πολυφαινολών που όπως έχει ήδη αναφερθεί αυξάνει το χρώμα του γλεύκου. Παρατηρώντας τους πίνακες 27 και 28 γίνεται σαφές ότι το τελικό χρώμα του προϊόντος δεν επηρεάζεται τόσο από το είδος του μικροοργανισμού όσο από την διαδικασία παρασκευής του γλεύκου. Παρόλα αυτά το σύνολο των τελικών προϊόντων βρίσκεται εντός των ορίων για μπύρες τύπου American Pale Ale.

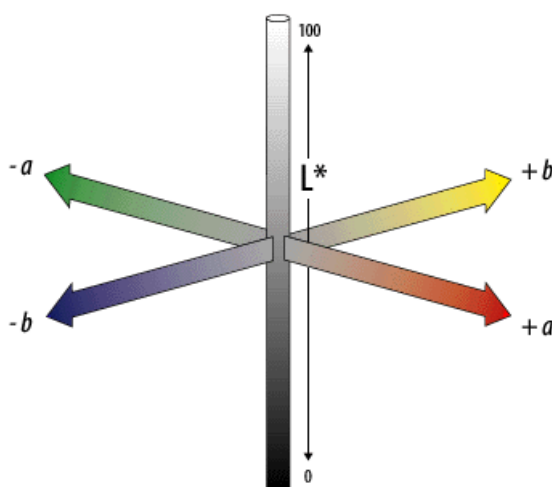
B.5.2 Προσδιορισμός χρώματος με χρωματόμετρο

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζεται ο μέσος όρος των μετρήσεων των παραμέτρων a (πράσινο - κόκκινο), b (μπλε - κίτρινο) και L (φωτεινότητα) των τελικών προϊόντων μπύρας (μετά την εμφιάλωση):

Πίνακας 29: Παράμετροι χρώματος για τις τρεις διαφορετικές μπύρες.

	Μικροοργανισμός ζύμωσης	A	b	L
Πείραμα 1 (12 °Plato, 20 °C)	<i>S. cerevisiae</i>	-0.903	10.823	55.097
	<i>T. delbrueckii</i>	-0.700	10.427	53.600
	<i>M. pulcherrima</i>	-1.032	12.987	55.604
	Mix: <i>S. c.</i> - <i>T. d.</i>	-0.827	10.867	53.950
Πείραμα 2 (14.5 °Plato, 20 °C)	<i>S. cerevisiae</i>	-0.830	12.167	55.797
	<i>T. delbrueckii</i>	-0.693	12.757	54.707
	<i>M. pulcherrima</i>	-1.500	12.977	55.933
	Mix: <i>S. c.</i> - <i>T. d.</i>	-1.530	12.527	56.127

Οι διαφοροποιήσεις στις παραμέτρους μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων είναι μικρές. Συγκεκριμένα και στις τρεις περιπτώσεις βρέθηκε ως προς τον άξονα πράσινο – κόκκινο προς το πράσινο (a), ως προς τον άξονα μπλε – κίτρινο προς το κίτρινο (b). Ενώ και τα τρία δείγματα παρουσιάζουν μια μέση φωτεινότητα.



Εικόνα 19: Χρωματική αναπαράσταση στον χώρο, των παραμέτρων της διεθνούς κλίμακας CIE Lab

Στη μέθοδο αυτή απαιτείται ένα δείγμα αναφοράς σύμφωνα με το οποίο μετράται η μεταβολή του χρώματος. Καθώς σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να διαπιστωθούν οι διαφορές των προϊόντων ζύμωσης των μη συμβατικών μικροοργανισμών από το προϊόν ενός συμβατικού ζυμομύκητα, επιλέγεται ως δείγμα αναφοράς η τελική μπίρα που ζυμώθηκε από τον *Saccharomyces cerevisiae*. Στον πίνακα 30 που ακολουθεί υπολογίζεται η συνολική μεταβολή της οπτικής απόκρισης ΔΕ και η συνολική μεταβολή του χρώματος ΔC για τις τρεις μπίρες που ζυμώθηκαν με μη συμβατικούς ζυμομύκητες.

Πίνακας 30: Διαφορά του χρώματος των non-Saccharomyces προϊόντων από το προϊόν του *S. cerevisiae*.

	Μικροοργανισμός ζύμωσης	ΔΕ	ΔC
Πείραμα 1 (12 °Plato, 24 °C)	<i>S. cerevisiae</i>	0.000	0.000
	<i>T. delbrueckii</i>	1.562	0.446
	<i>M. pulcherrima</i>	0.534	0.209
	Mix: <i>S. c.-T. d.</i>	1.150	0.088
Πείραμα 2 (14.5 °Plato, 20 °C)	<i>S. cerevisiae</i>	0.000	0.000
	<i>T. delbrueckii</i>	0.092	0.084
	<i>M. pulcherrima</i>	1.559	0.914
	Mix: <i>S. c.-T. d.</i>	1.740	0.952

Η διαφοροποίηση του χρώματος σε σχέση με την πρότυπη μπίρα παρατηρείται ότι είναι πολύ μικρή και ιδιαίτερα στην περίπτωση του προϊόντος του πρώτου πειράματος που ζυμώθηκε με μίγμα μικροοργανισμών (*S. c. – T. d.*) ενώ στο δεύτερο πείραμα μικρότερες αποκλίσεις έδειξε η μπίρα που ζυμώθηκε με *T. delbrueckii*. Παρόλα αυτά το σύνολο των δειγμάτων δεν εμφάνισαν μεγάλες διαφοροποιήσεις.

B.6 Προσδιορισμός αιθανόλης.

Οι τιμές της περιεκτικότητας των τελικών προϊόντων σε αιθανόλη προσδιορίστηκαν με την μέθοδο της απόσταξης. Τα αποτελέσματα για τα δύο πειράματα παρουσιάζονται στον πίνακα 31:

Πίνακας 31: Περιεκτικότητα σε αιθανόλη (ABV) στις διαφορετικές μπίρες των δύο πειραμάτων.

	Περιεκτικότητα σε αιθανόλη % (v/v) (ABV).	
	Πείραμα 1 (12 °Plato, 24 °C)	Πείραμα 2 (14.5 °Plato, 20 °C)
<i>S. cerevisiae</i>	5.8	6.6
<i>T. delbrueckii</i>	5.5	6.2
<i>M. pulcherrima</i>	4.6	5.2
Mix: <i>S. c.-T. d.</i>	5.7	6.5

Μια τυπική μπίρα τύπου American Pale Ale έχει περιεκτικότητα σε αιθανόλη 4.5-6.2% v/v. Στην περίπτωση του 1^{ου} πειράματος όπου η αρχική πυκνότητα σακχάρων στο γλύκος ήταν 12.6° Plato, οι τιμές αιθανόλης κυμαίνονται μεταξύ 4.6 και 5.8% με χαμηλότερη τιμή στην

περίπτωση της *M. pulcherrima* όπου κατά αντιστοιχία παρατηρήθηκε και η μεγαλύτερη ποσότητα αζύμωτων σακχάρων (5.7° Plato). Στην περίπτωση του 2^{ου} πειράματος με αρχική πυκνότητα σακχάρων στο γλεύκος 14.5° Plato οι τιμές αιθανόλης κυμαίνονται μεταξύ 5.2 και 6.6%, με χαμηλότερη τιμή και σε αυτή την περίπτωση την μπίρα που ζυμώθηκε με τον ζυμομύκητα *M. pulcherrima* (5.5° Plato). Το υψηλότερο ποσοστό αλκοόλης εμφανίζεται και στα δύο πειράματα στην περίπτωση του συμβατικού σακχαρομύκητα το οποίο όμως δεν διαφέρει σημαντικά από τα προϊόντα ζύμωσης τόσο της *T. delbrueckii* όσο και του Mix.

Οι τιμές αιθανόλης που βρέθηκαν για την μπίρα που ζυμώθηκε από την *T. delbrueckii* και τη μικτή καλλιέργεια *S. cerevisiae* - *T. delbrueckii* σε αναλογία 1:10 μπορούν να συγκριθούν και με αντίστοιχες τιμές από την βιβλιογραφία, για την περίπτωση της *M. pulcherrima* όμως δεν βρέθηκαν αναφορές. Σε δημοσίευση όπου ελέγχθηκαν 10 διαφορετικά στελέχη *T. delbrueckii* βρέθηκε ότι για αρχική πυκνότητα σακχάρων 12 °P η τελική περιεκτικότητα της μπίρας κυμαινόταν από 0.87-4% v/v (Michel, et al., 2016). Παρατηρείται ότι στην περίπτωση αυτή τα ποσοστά αιθανόλης είναι αρκετά χαμηλά, με μόνο έναν από τα δέκα διαφορετικά στελέχη να μπορεί να ζυμώσει παράγοντας αιθανόλη σε περιεκτικότητα της τάξης του 4% v/v. Σύμφωνα με άλλη δημοσίευση όπου το αρχικό γλεύκος είχε πυκνότητα σακχάρων ίση με 12.7 °P και η ζύμωση πραγματοποιήθηκε στους 27 °C τα τελικά ποσοστά αιθανόλης των προϊόντων που ζυμώθηκαν με *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii* και μίγμα των δύο μικροοργανισμών σε αναλογία 1:10 ήταν 4.85, 2.66 και 4.68 αντίστοιχα (Canonico, et al., 2015). Παρατηρείται ότι και στην περίπτωση αυτή τα ποσοστά αιθανόλης του non-*Saccharomyces* μικροοργανισμού είναι χαμηλότερα σε σχέση με την παρούσα εργασία, ενώ η μπίρα που ζυμώθηκε με την μικτή καλλιέργεια έχει περιεκτικότητα σε αιθανόλη αντίστοιχη με αυτή που ζυμώθηκε με τον συμβατικό μύκητα.

B.7 Προσδιορισμός γλυκερίνης

Οι τιμές της περιεκτικότητας των τελικών προϊόντων σε γλυκερίνη προσδιορίστηκαν με ενζυμική μέτρηση. Τα αποτελέσματα για τα δύο πειράματα παρουσιάζονται στον πίνακα 32:

Πίνακας 32: Περιεκτικότητα σε γλυκερίνη στις διαφορετικές μπίρες των δύο πειραμάτων.

	Περιεκτικότητα σε γλυκερίνη (g/l)	
	Πείραμα 1 (12 °Plato, 24 °C)	Πείραμα 2 (14.5 °Plato, 20 °C)
<i>S. cerevisiae</i>	0.574	0.574
<i>T. delbrueckii</i>	0.574	0.335
<i>M. pulcherrima</i>	0.225	0.146
Mix: <i>S. c.</i> - <i>T. d.</i>	0.349	0.358

Όπως έχει ήδη αναφερθεί τα αναμενόμενα ποσοστά γλυκερίνης στην μπίρα είναι 1.1-2g/l (Michel, et al., 2016,b). Παρόλα αυτά η παραγωγή γλυκερίνης κατά την ζύμωση εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το είδος του μικροοργανισμού αλλά και από την θερμοκρασία ζύμωσης. Γενικά σε χαμηλότερες θερμοκρασίες ευνοείται το βιολογικό μονοπάτι παραγωγής της γλυκερίνης, κατά συνέπεια τα μικρά ποσά γλυκερίνης στο εν λόγω πείραμα πιθανά οφείλονται στις υψηλές θερμοκρασίες ζύμωσης.

B.8 Προσδιορισμός αρωματικού προφίλ

Στους πίνακες 33-36 παρουσιάζονται συγκριτικά οι ουσίες που παράχθηκαν στις μπίρες του πειράματος 1 από τον εκάστοτε μικροοργανισμό χωρισμένες σε κατηγορίες ενώσεων (αλκοόλες, οξέας εστέρες και υδρογονάνθρακες), ενώ στο παράρτημα παρατίθενται τα αντίστοιχα χρωματογραφήματα:

Πίνακας 33: Συγκριτικός πίνακας των αλκοολών που παράχθηκαν από κάθε σύστημα μικροοργανισμού στις μπίρες του Πειράματος 1 (αρχική πυκνότητα 12 °Plato, θερμοκρασία 24 °C).

COMPOUNDS	Συγκέντρωση (mg/L)			
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>T. delbrueckii</i>	<i>M. pulcherrima</i>	Mix: <i>S.cerevisiae.-</i> <i>T.delbrueckii</i>
Isoamyl alcohol	4.83 ± 0.13	4.47 ± 0.06	4.89 ± 0.87	4.62 ± 0.30
Active amyl alcohol	1.61 ± 0.04	1.59 ± 0.02	1.38 ± 0.27	1.52 ± 0.14
2,3-Butanediol	TRACES	NOT DETECTED	NOT DETECTED	NOT DETECTED
1-Propanol, 3-ethoxy-	TRACES	NOT DETECTED	NOT DETECTED	0.07 ± 0.07
Methionol	TRACES	0.16 ± 0.02	0.11 ± 0.01	NOT DETECTED
Phenylethyl Alcohol	14.36 ± 0.05	13.07 ± 0.48	13.43 ± 1.60	14.93 ± 0.14
Tryptophol	6.17 ± 0.05	0.73 ± 0.09	4.22 ± 0.47	1.82 ± 0.03

Από τα αποτελέσματα της αέριας χρωματογραφίας μάζας για το πείραμα 1 προκύπτει αρχικά ότι το σύνολο των μελετώμενων μικροοργανισμών παράγει σε παρόμοιες συγκεντρώσεις ισοαμυλική αλκοόλη και ενεργή αμυλική αλκοόλη, ενώσεις που προσδίδουν αρώματα ζυμέλαιου, μπανάνας και γλυκού αλκοολούχου ποτού, αλλά και φαινυλαιθυλική αλκοόλη, η οποία έχει χαρακτηριστικό άρωμα τριαντάφυλλου. Λίγο χαμηλότερη συγκέντρωση φαινυλαιθυλικής αλκοόλης παρατηρείται στην περίπτωση της μπίρας που ζυμώθηκε από την *M.pulcherrima*. Ακόμη παρατηρείται υψηλή συγκέντρωση τρυπτοφόλης (άρωμα αμυγδάλου, φρούτα) στην περίπτωση του συμβατικού ζυμομύκητα αλλά και της *M.pulcherrima*, 6.17 και 4.22 mg/L αντίστοιχα. Σε χαμηλότερη συγκέντρωση παρατηρείται στην περίπτωση της μικτής καλλιέργειας η 3-αιθοξυ, 1-προπανόλη, η οποία ενισχύει τα φρουτώδη αρώματα της συγκεκριμένης μπίρας, ενώ στην περίπτωση των μπυρών που ζυμώθηκαν από τους δυο μη συμβατικούς μικροοργανισμούς ανιχνεύθηκε η μεθειονόλη (κρεμμύδι, γλυκό, σούπα λαχανικών) σε συγκέντρωση υψηλότερη του ορίου ανίχνευσης

Πίνακας 34: Συγκριτικός πίνακας των οξέων που παράχθηκαν από κάθε σύστημα μικροοργανισμού στις μπύρες του Πειράματος 1 (αρχική πυκνότητα 12 °Plato, θερμοκρασία 24 °C).

COMPOUNDS	Συγκέντρωση (mg/L)			
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>T. delbrueckii</i>	<i>M. pulcherrima</i>	Mix: <i>S.cerevisiae-T. delbrueckii.</i>
Isobutyric acid	0.50 ± 0.01	NOT DETECTED	0.09 ± 0.02	0.32 ± 0.04
Butyric acid	TRACES	0.33 ± 0.02	TRACES	TRACES
Valeric acid	NOT DETECTED	TRACES	NOT DETECTED	NOT DETECTED
Isovaleric acid	0.18 ± 0.00	0.06 ± 0.06	0.11 ± 0.02	0.06 ± 0.06
Active valeric acid	0.12 ± 0.00	0.07 ± 0.07	NOT DETECTED	0.07 ± 0.07
Caproic acid	0.15 ± 0.00	0.28 ± 0.01	0.04 ± 0.06	TRACES
Caprylic acid	0.32 ± 0.01	0.44 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.21 ± 0.02
Capric acid	NOT DETECTED	TRACES	NOT DETECTED	NOT DETECTED

Στην περίπτωση των παραγόμενων οξέων παρατηρείται ότι το σύνολο των ουσιών που ανιχνεύθηκαν, παράχθηκαν σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες των αντίστοιχων ορίων ανίχνευσης. Μόνη εξαίρεση αποτελεί η παραγωγή ισοβουτυρικού οξέος από τον *S. cerevisiae*, καθώς και τη μικτή καλλιέργεια προσδίδοντας γλυκά αρώματα φράουλας. Κατά συνέπεια δεν μπορεί να θεωρηθεί ότι τα παραγόμενα οξέα συμβάλλουν στο αρωματικό προφίλ των μπυρών, συμβάλλουν όμως στην τελική οξύτητα των προϊόντων. Η μπίρα που ζυμώθηκε από τον συμβατικό ζυμομύκητα, για παράδειγμα παρουσιάζει σημαντικό αριθμό οξέων, και ταυτόχρονα όπως έχει ήδη αναφερθεί η μπίρα αυτή παρουσίασε την χαμηλότερη τιμή pH.

Πίνακας 35: Συγκριτικός πίνακας των εστέρων που παράχθηκαν από κάθε σύστημα μικροοργανισμού στις μπίρες του Πειράματος 1 (αρχική πυκνότητα 12 °Plato, θερμοκρασία 24 °C).

COMPOUNDS	Συγκέντρωση (mg/L)			
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>T. delbrueckii</i>	<i>M. pulcherrima</i>	Mix: <i>S.cerevisiae-T. delbrueckii..</i>
Isoamyl acetate	TRACES	0.03 ± 0.03	0.02 ± 0.02	NOT DETECTED
Ethyl caproate	TRACES	TRACES	NOT DETECTED	NOT DETECTED
Ethyl caprylate	TRACES	TRACES	TRACES	TRACES
Phenylethyl acetate	TRACES	0.04 ± 0.04	0.02 ± 0.03	0.03 ± 0.03
Ethyl 9-decenoate	TRACES	TRACES	NOT DETECTED	NOT DETECTED
Ethyl caprate	0.04 ± 0.04	TRACES	0.09 ± 0.07	TRACES
Ethyl laurate	TRACES	TRACES	TRACES	NOT DETECTED
Tryptophol acetate	NOT DETECTED	0.12 ± 0.12	NOT DETECTED	0.26 ± 0.02
Ethyl 9-hexadecenoate	NOT DETECTED	TRACES	TRACES	NOT DETECTED
Ethyl palmitate	TRACES	0.31 ± 0.18	0.16 ± 0.02	0.08 ± 0.08
Ethyl oleate	NOT DETECTED	NOT DETECTED	0.37 ± 0.23	NOT DETECTED
Ethyl linoleate	NOT DETECTED	TRACES	NOT DETECTED	NOT DETECTED
Ethyl stearate	NOT DETECTED	TRACES	NOT DETECTED	NOT DETECTED

Στην περίπτωση των εστέρων, επίσης παρατηρούνται πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, και συγκεκριμένα η πλειοψηφεία των ενώσεων που ανιχνεύθηκαν βρίσκονται σε ίχνη. Σε υψηλότερη συγκέντρωση (0.37mg/L), αλλά με μεγάλη τυπική απόκλιση, εμφανίζεται ο ελαϊκός αιθυλεστέρας (λιπαρό, κηρώδες, γάλα) στην μπίρα που ζυμώθηκε από την *M. pulcherrima*, του οποίου παρόλα αυτά το όριο ανίχνευσης δεν είναι διαθέσιμο. Τέλος σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις παράχθηκε ο οξικός τρυπτοφολεστέρας στις μπίρες που παράχθηκαν από την *T. delbrueckii* και την μικτή καλλιέργεια, παρόλα αυτά το όριο ανίχνευσης αυτού δεν είναι γνωστό.

Πίνακας 36: Συγκριτικός πίνακας των υδρογονανθράκων που παράχθηκαν από κάθε σύστημα μικροοργανισμού στις μπύρες του Πειράματος 1 (αρχική πυκνότητα 12 °Plato, θερμοκρασία 24 °C).

COMPOUNDS	Συγκέντρωση (mg/L)			
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>T. delbrueckii</i>	<i>M. pulcherrima</i>	Mix: <i>S.cerevisiae-T. delbrueckii.</i>
Disulfide, dimethyl	0.04 ± 0.00	TRACES	0.02 ± 0.02	TRACES
Methyl ethyl disulfide	0.06 ± 0.00	TRACES	0.06 ± 0.01	TRACES
p-Xylene	0.07 ± 0.00	TRACES	0.06 ± 0.01	TRACES
Diethyl disulfide	TRACES	TRACES	TRACES	TRACES
4-Vinylguaiacol	TRACES	0.38 ± 0.00	0.42 ± 0.05	TRACES
γ-Undecalactone	NOT DETECTED	NOT DETECTED	TRACES	TRACES
γ-Nonalactone	TRACES	NOT DETECTED	NOT DETECTED	NOT DETECTED
Caryophyllene	NOT DETECTED	NOT DETECTED	0.01 ± 0.00	NOT DETECTED
Tyrosol	0.24 ± 0.05	NOT DETECTED	0.26 ± 0.04	0.06 ± 0.06
Humulene	NOT DETECTED	TRACES	0.23 ± 0.03	TRACES
Isohumulone	0.14 ± 0.01	0.20 ± 0.20	1.26 ± 0.48	TRACES
Lupulon	NOT DETECTED	NOT DETECTED	0.90 ± 0.18	0.06 ± 0.06

Όσον αφορά στις ενώσεις του θείου που ανιχνεύθηκαν κατά την αέρια χρωματογραφία (Πίνακας 36), παρατηρείται ότι συγκέντρωση μεγαλύτερη του ορίου ανίχνευσης βρέθηκε στην περίπτωση του συμβατικού ζυμομύκητα, ο οποίος παρήγαγε διμεθυλοσουλφίδιο (μαγειρεμένο λαχανικό, λάχανο, σκόρδο) σε συγκέντρωση ίση με 0.06mg/L. Στην περίπτωση του μεθυλαιθυλ δισουλφιδίου η τιμή του ορίου ανίχνευσης δεν είναι διαθέσιμη, αλλά παρόλα αυτά οι συγκεντρώσεις που μετρήθηκαν είναι χαμηλές.

Στα προϊόντα ζύμωσης του συμβατικού ζυμομύκητα και της *M. pulcherrima* ανιχνεύθηκαν ακόμη σημαντικές ποσότητες τυροσόλης, ουσία η οποία μπορεί να προκαλέσει δυσάρεστη ταγγισμένη οσμή. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το αρωματικό προφίλ που σχηματίζεται από τις ενώσεις που ανιχνεύθηκαν στην περίπτωση της μπύρας που ζυμώθηκε από την *M. pulcherrima*, καθώς παρατηρούνται έντονα αρώματα λυκίσκου που προέρχονται από τις ενώσεις χουμουλόνη, ισοχουμουλόνη και λουλουπόνη αλλά και πικάντικα αρώματα και αρώματα ξύλου από την ένωση καρυοφυλλένιο.

Όσον αφορά στην ένωση βουτυλιωμένο υδροξυτολουένιο (BHT), όπως έχει ήδη αναφερθεί προέρχεται από τους διαλύτες και σε συνδυασμό με την 3-οκτανόλη διασφαλίζει την εγκυρότητα των αποτελεσμάτων και την ασφαλή σύγκριση των μεταξύ των αποτελεσμάτων των διαφορετικών δειγμάτων.

Στους πίνακες 37 έως 40 παρουσιάζονται σε ομάδες οι ουσίες που παράχθηκαν από κάθε μικροοργανισμό στις μπίρες του πειράματος 2. Στο παράρτημα παρατίθενται τα αντίστοιχα χρωματογραφήματα.

Πίνακας 37: Συγκριτικός πίνακας των αλκοολών που παράχθηκαν από κάθε σύστημα μικροοργανισμού στις μπίρες του Πειράματος 2 (αρχική πυκνότητα 14.5 °Plato, θερμοκρασία 20 °C).

COMPOUNDS	Συγκέντρωση (mg/L)			
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>T. delbrueckii</i>	<i>M. pulcherrima</i>	Mix: <i>S.cerevisiae-T. delbrueckii.</i>
Isoamyl alcohol	5.83 ± 0.48	8.07 ± 0.67	6.91 ± 0.84	7.61 ± 0.95
Active amyl alcohol	1.97 ± 0.16	TRACES	2.10 ± 0.14	2.44 ± 0.44
Methionol	NOT DETECTED	0.11 ± 0.01	0.02 ± 0.02	0.04 ± 0.06
Phenylethyl Alcohol	9.19 ± 0.54	9.73 ± 0.44	7.48 ± 0.14	16.67 ± 0.17
Tryptophol	3.33 ± 0.36	2.16 ± 0.04	0.61 ± 0.56	0.07 ± 0.09

Από τον πίνακα 37 παρατηρείται ότι το αρωματικό προφίλ διαμορφώνεται και παλι κυρίως από την ισοαμυλική και την ενεργή αμυλική αλκοόλη, την φαινυλαιθυλική αλκοόλη και την τρυπτοφόλη. Υψηλότερη συγκέντρωση φαινυλαιθυλικής αλκοόλης παρατηρείται στην περίπτωση της μπίρας που ζυμώθηκε από την μικτή καλλιέργεια (16.67), ενώ σημαντικά υψηλές συγκεντρώσεις τρυπτοφόλης εμφανίζονται στην περίπτωση του *S. cerevisiae* και της *T. delbrueckii*. Η ουσία 2-φουρανμεθανόλη εμφανίστηκε στην περίπτωση της *M. pulcherrima* (σε ένα από τα τρία δείγματα επανάληψης) η οποία, παρόλο που δεν είναι διαθέσιμο το όριο ανίχνευσης της, είναι γνωστό ότι προσδίδει αρνητικά αρώματα λαχανικών όπως το κουνουπίδι. Τέλος εμφανίζεται η ουσία μεθειονόλη (κρεμμύδι, γλυκό, σούπα λαχανικών), σε συγκεντρώση υψηλότερη του ορίου ανίχνευσης στην μπίρα που ζυμώθηκε από την *T. delbrueckii*.

Πίνακας 38: Συγκριτικός πίνακας των οξέων που παράχθηκαν από κάθε σύστημα μικροοργανισμού στις μπίρες του Πειράματος 2 (αρχική πυκνότητα 14.5 °Plato, θερμοκρασία 20 °C).

COMPOUNDS	Συγκέντρωση (mg/L)			
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>T. delbrueckii</i>	<i>M. pulcherrima</i>	Mix: <i>S.cerevisiae-T. delbrueckii.</i>
Isobutyric acid	0.58 ± 0.03	0.25 ± 0.01	0.03 ± 0.03	0.40 ± 0.01
Butyric acid	TRACES	0.04 ± 0.04	0.07 ± 0.00	NOT DETECTED
Isovaleric acid	0.22 ± 0.01	0.16 ± 0.00	0.08 ± 0.07	0.21 ± 0.01
Active valeric acid	NOT DETECTED	NOT DETECTED	0.03 ± 0.03	0.05 ± 0.06
Caproic acid	0.19 ± 0.01	NOT DETECTED	0.18 ± 0.15	NOT DETECTED
Caprylic acid	0.48 ± 0.03	0.87 ± 0.09	NOT DETECTED	0.38 ± 0.05
Capric acid	TRACES	0.19 ± 0.04	0.27 ± 0.05	NOT DETECTED
Lauric acid	NOT DETECTED	TRACES	0.01 ± 0.01	NOT DETECTED

Όσον αφορά στα οξέα στο πείραμα 2 παρατηρείται και στην περίπτωση αυτή ότι το σύνολο των οξέων που ανιχνεύθηκαν βρίσκονται σε ίχνη ή σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες του ορίου ανίχνευσης. Εξαίρεση αποτελεί το ισοβουτυρικό οξύ, το οποίο έχει όριο ανίχνευσης 0.23 mg/L και χαρακτηριστικά γλυκά αρώματα φράουλας, και εμφανίζεται στις μπίρες που ζυμώθηκαν από τους *S. cerevisiae* και *T. delbrueckii* σε συγκεντρώσεις 0.58 και 0.25 mg/L αντίστοιχα. Ακόμη είναι σημαντικό να σχολιασθούν οι πολύ υψηλές τυπικές αποκλίσεις στην περίπτωση της *M. pulcherrima* γεγονός που δείχνει ότι δεν υπήρξε καλή επαναληψιμότητα μεταξύ των δειγμάτων.

Πίνακας 39: Συγκριτικός πίνακας των εστέρων που παράχθηκαν από κάθε σύστημα μικροοργανισμού στις μπίρες του Πειράματος 2 (αρχική πυκνότητα 14.5 °Plato, θερμοκρασία 20 °C).

COMPOUNDS	Συγκέντρωση (mg/L)			
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>T. delbrueckii</i>	<i>M. pulcherrima</i>	Mix: <i>S.cerevisiae-T. delbrueckii.</i>
Isobutyl acetate	NOT DETECTED	NOT DETECTED	0.03 ± 0.01	NOT DETECTED
Ethyl butyrate	NOT DETECTED	NOT DETECTED	0.03 ± 0.01	NOT DETECTED
Isoamyl acetate	0.32 ± 0.01	0.41 ± 0.03	0.35 ± 0.05	0.21 ± 0.05
Ethyl caproate	NOT DETECTED	0.11 ± 0.00	0.16 ± 0.05	NOT DETECTED
Ethyl caprylate	0.07 ± 0.05	0.10 ± 0.02	0.97 ± 0.00	NOT DETECTED
Phenylethyl acetate	NOT DETECTED	0.30 ± 0.03	0.20 ± 0.01	0.22 ± 0.01
Ethyl caprate	NOT DETECTED	TRACES	0.02 ± 0.02	NOT DETECTED
Ethyl laurate	NOT DETECTED	TRACES	NOT DETECTED	NOT DETECTED
Tryptophol acetate	NOT DETECTED	0.11 ± 0.02	NOT DETECTED	0.07 ± 0.10

Στις μπίρες του πειράματος 2, όπως μπορεί να παρατηρηθεί στον πίνακα 39, ανιχνεύθηκε από τον αέριο χρωματογράφο ένας σημαντικός αριθμός εστέρων. Ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι συγκεντρώσεις των ουσιών, καπρωϊκός αιθυλεστέρας, καπρυλικός αιθυλεστέρας και οξικός φαινυλαιθυλεστέρας, στις μπίρες που παράχθηκαν από τους δύο μη συμβατικούς μύκητες, οι οποίες προσδίδουν αρώματα όπως μήλο, γλυκάνισο, βερίκοκο, μπανάνα, μπράντυ, αχλάδι και μέλι. Συγκεκριμένα στην περίπτωση της *M. pulcherrima* παρατηρείται πολύ υψηλή παραγωγή καπρυλικού αιθυλεστέρα (0.97mg/L). Ακόμη σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις, αλλά χαμηλότερες του ορίου ανίχνευσης, εμφανίζεται ο οξικός ισοαμυλεστέρας στο σύνολο των δειγμάτων ο οποίος επίσης χαρακτηρίζεται από φρουτώδη αρώματα αλλά και ο οξικός τρυπτοφολεστέρας από την *T. delbrueckii*. Παρόλα αυτά το όριο ανίχνευσης των ουσιών αυτών δεν είναι γνωστό.

Πίνακας 40: Συγκριτικός πίνακας των υδρογονανθράκων που παράχθηκαν από κάθε σύστημα μικροοργανισμού στις μπίρες του Πειράματος 2 (αρχική πυκνότητα 14.5 °Plato, θερμοκρασία 20 °C).

COMPOUNDS	Συγκέντρωση (mg/L)			
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>T. delbrueckii</i>	<i>M. pulcherrima</i>	Mix: <i>S.cerevisiae-T. delbrueckii.</i>
Acetal	NOT DETECTED	NOT DETECTED	0.03 ± 0.03	NOT DETECTED
Toluene	NOT DETECTED	0.14 ± 0.03	0.14 ± 0.01	NOT DETECTED
2-Methoxy-4-vinylphenol	NOT DETECTED	0.18 ± 0.02	0.16 ± 0.02	NOT DETECTED
Tyrosol	TRACES	0.03 ± 0.03	0.07 ± 0.07	NOT DETECTED
Isohumulone	NOT DETECTED	TRACES	0.28 ± 0.28	0.11 ± 0.15

Στις μπίρες του πειράματος 2 δεν ανιχνεύθηκε μεγάλος αριθμός υδρογονανθράκων. Αρχικά από τους δύο μη συμβατικούς μικροοργανισμούς, παράχθηκε τολουόλιο, ουσία που χαρακτηρίζεται από αρνητικά γλυκερά αρώματα που θυμίζουν διαλυτικό σε συγκεντρώσεις όμως χαμηλότερες του ορίου ανίχνευσης. Ακόμη οι δύο αυτές μπίρες χαρακτηρίζονται από αρώματα ξύλου, κέδρου και φιστικιού λόγω της ουσίας 2-μεθοξυ,4-βινυλφαινόλη. Στην περίπτωση του πειράματος αυτού ανιχνεύθηκε ισοχουμουλόνη (πικρό άρωμα) και ακετάλη (φυτικό άρωμα) στις μπίρες που παράχθηκαν από την *M. pulcherrima* και την μικτή καλλιέργεια με πολύ υψηλή όμως τυπική απόκλιση και στις δύο περιπτώσεις, καθώς ανιχνεύθηκε μόνο σε ένα από τα τρία δείγματα επανάληψης. Αντίστοιχα ανιχνεύθηκε και η τυροσόλη στις μπίρες που παράχθηκαν από τους δύο μη συμβατικούς μικροοργανισμούς, με αντίστοιχα πολύ υψηλή τυπική απόκλιση. Κατά συνέπεια για της δύο αυτές ουσίες τα αποτελέσματα δεν μπορούν να θεωρηθούν έγκυρα.

Σύγκριση πειραμάτων

Συνολικά από τα πειράματα 1 και 2 παρατηρείται ότι το σύνολο το μικροοργανισμών παράγει μεγάλες ποσότητες ισοαμυλικής, ενεργής αμυλικής και φαινυλαιθυλικής αλκοόλης, σε συγκεντρώσεις της τάξης 4-8,1-4 και 7-15 mg/L αντίστοιχα. Οι τιμές αυτές βρίσκονται εντός των αναμενόμενων ορίων εντός των οποίων εμφανίζονται οι ουσίες αυτές στην μπίρα. Συγκεκριμένα οι συνήθεις τιμές για την ισοαμυλική και ενεργή αμυλική αλκοόλη όταν μετρώνται μαζί είναι 8-30 mg/L ενώ για την φαινυλαιθυλική αλκοόλη 8-35 mg/L (Codern, 2013). Συγκρίνοντας τις τιμές μεταξύ των δύο πειραμάτων παρατηρείται ότι οι μικροοργανισμοί παράγουν περισσότερη ισοαμυλική αλκοόλη σε χαμηλότερες και πιο σταθερές θερμοκρασίες ζύμωσης (πείραμα 2), οδηγώντας σε πιο έντονα αρώματα ζυμέλαιου, ουσκιού και μπανάνας, αντίθετα οι συγκεντρώσεις ενεργής αμυλικής αλκοόλης είναι αντίστοιχες με αυτές του πειράματος 1, εκτός από την περίπτωση της *T. delbrueckii* όπου η ένωση εμφανίζεται σε ίχνη. Όσον αφορά στη φαινυλαιθυλική αλκοόλη μεγαλύτερη παραγωγή παρατηρήθηκε στο πείραμα 1 όπου η θερμοκρασία ζύμωσης ήταν υψηλότερη. Εξαίρεση αποτελεί η μικτή καλλιέργεια καθώς στην μπίρα του δεύτερου πειράματος η συγκέντρωση φαινυλαιθυλικής αλκοόλης ήταν μεγαλύτερη από ότι σε κάθε άλλη μπίρα. Ακόμη σε όλα τα δείγματα που μετρήθηκαν εμφανίζεται η ανώτερη αλκοόλη, τρυπτοφώλη.

Το σύνολο το μικροοργανισμών φαίνεται να παράγει τρυπτοφώλη σε μικρότερες συγκεντρώσεις όταν η ζύμωση πραγματοποιείται σε πιο σταθερή και ήπια θερμοκρασία (πείραμα 2), ενώ μόνο στην περίπτωση της *T. delbrueckii* ανιχνεύθηκαν χαμηλότερες συγκεντρώσεις το πείραμα 1. Οι συγκεντρώσεις στις οποίες συνήθως εμφανίζεται η ουσία αυτή στην μπίρα διαφέρουν σημαντικά ανάλογα με το είδος της μπίρας και τις συνθήκες παραγωγής της, αλλά γενικά κυμαίνονται μεταξύ 2-60 mg/L (Szlavko, 1973). Όσον αφορά στην παραγωγή αλκοολών, συμπεραίνεται ακόμη ότι σε πιο ήπιες συνθήκες ζύμωσης παράγεται μεγαλύτερος αριθμός αλκοολών, γεγονός το οποίο οδηγεί σε ένα πιο σύνθετο αρωματικό προφίλ.

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 μόνο οξύ που παράχθηκε σε συγκεντρώση υψηλότερη του ορίου ανίχνευσης είναι το ισοβουτυρικό οξύ στις μπίρες και των δύο πειραμάτων που ζυμώθηκαν από τον *S. cerevisiae* (0.58 και 0.50 mg/L) και την μικτή καλλιέργεια *S. cerevisiae* – *T. delbrueckii* (0.40 και 0.32 mg/L), και στην μπίρα του δεύτερου πειράματος που ζυμώθηκε από την *T. delbrueckii* (0.25 mg/L)

Η διαφορετική θερμοκρασία ζύμωσης φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά την παραγωγή εστέρων καθώς στην περίπτωση αυτή τα αποτελέσματα της αέριας χρωματογραφίας διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των δύο πειραμάτων. Στις υψηλότερες θερμοκρασίες του πρώτου πειράματος η πλειψηφία των ενώσεων βρέθηκε σε ίχνη ή σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, ενώ στο πείραμα 2 η παραγωγή του καπροϊκού αιθυλεστέρα, του καπρυλικού αιθυλεστέρα και του οξικού φαινυλαιθυλεστέρα βρέθηκε αυξημένη και συγκεκριμένα σε συγκεντρώσεις υψηλότερες του ορίου ανίχνευσης, προσδίδοντας ιδιαίτερα, κυρίως φρουτώδη, αρώματα στις μπίρες που παράχθηκαν από τους δύο μη συμβατικούς μύκητες. Τέλος σε σχετικά σημαντικές συγκεντρώσεις παράχθηκε ο οξικός τρυπτοφολεστέρας και στα δύο πειράματα στις μπίρες που παράχθηκαν από την *T. delbrueckii* και την μικτή καλλιέργεια, η παραγωγή του οποίου όμως φαίνεται να μειώνεται με την μείωση της θερμοκρασίας.

Ακόμη ένα χαρακτηριστικό των μπυρών που παράχθηκαν σε υψηλότερη θερμοκρασία ζύμωσης είναι η παρουσία ενώσεων του θείου σε αντίθεση με τις μπίρες του δεύτερου πειράματος. Γενικά οι ενώσεις του θείου προσδίδουν δυσάρεστα αρώματα στα αλκοολούχα ποτά, συγκεκριμένα το διμεθυλοσουλφίδιο προσδίδει αρώματα μαγειρεμένου λαχανικού, λάχανου και σκόρδου και οι συνήθεις τιμές στις οποίες εμφανίζεται στην μπίρα είναι 0.01-0.1mg/L (Codern, 2013). Στην παρούσα εργασία μικρές συγκεντρώσεις της ένωσης αυτής εμφανίζονται μόνο στο πείραμα 1 και μόνο στις μπίρες που ζυμώθηκαν από τον συμβατικό ζυμομύκητα (0.04mg/L) και την *M. pulcherrima* (0.02mg/L). Όσον αφορά στους υπόλοιπους υδρογονάνθρακες, μεγαλύτερο πλήθος τέτοιων ουσιών ανιχνεύθηκαν στην περίπτωση του πειράματος 1. Συγκεκριμένα στην περίπτωση της *M. pulcherrima* μόνο στο πείραμα 1 εμφανίζονται οι ενώσεις ισοχουμουλόνη, χουμουλόνη και λουλουπόννη, ουσίες που προέρχονται από τον λυκίσκο και προσδίδουν χαρακτηριστικά φυτικά αρώματα στο παραγόμενο προϊόν. Ακόμη στην πλειοψηφία των συστημάτων αλλά σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (υψηλότερες στο πείραμα 1) παράχθηκε η ένωση τυροσόλη η οποία χαρακτηρίζεται από αρνητικά αρώματα και σύμφωνα με την βιβλιογραφία ανάλογα με το είδος της μπίρας και τον τρόπο παρασκευής της ανιχνεύεται σε συγκεντρώσεις μεταξύ 6-100mg/L αντίστοιχα (Szlavko, 1973).

Συνολικά διαπιστώνεται ότι οι ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν σε χαμηλότερη και πιο ήπια θερμοκρασία (πείραμα 2) είχαν ως αποτέλεσμα προϊόντα με πιο πολύπλοκα αρωματικά χαρακτηριστικά. Συγκεκριμένα παρατηρείται ένας μεγαλύτερος αριθμός αρωματικών συστατικών στις μπίρες του δεύτερου πειράματος, διαφοροποιώντας έτσι σημαντικά τα προϊόντα των διαφορετικών καλλιιεργειών. Αντίθετα στην πιο γρήγορη ζύμωση του πειράματος 1 παρατηρείται μικρότερη παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών σε συγκεντρώσεις υψηλότερες του σημείου ανίχνευσης και κατά συνέπεια μικρότερη διαφοροποίηση μεταξύ των τελικών προϊόντων. Το συμπέρασμα αυτό είναι λογικό καθώς ζυμώσεις σε υψηλές θερμοκρασίες και με έντονες θερμοκρασιακές διακυμάνσεις έχουν ως αποτέλεσμα την γρήγορη κατανάλωση σακχάρων, μικρότερη παραγωγή παραπροϊόντων της ζύμωσης και ακόμη την πιθανή εξάτμιση των πτητικών αρωματικών συστατικών. Έτσι τα ένα τέτοιο είδος ζύμωσης οδηγεί συχνά σε προϊόντα με υψηλά ποσοστά αζύμωντων σακχάρων και μικρή αρωματική πολυπλοκότητα.

Συνολικά

Σε αντίθεση με τον συμβατικό ζυμομύκητα, η *T. delbrueckii* κατά την ζύμωση του ζυθογλεύκου παράγει σημαντικό αριθμό εστέρων όπως ο καπρικός και ο καπρυλικός αιθυλεστέρας, ο οξικός φαινυλαιθυλεστέρας και ο οξικός τρυπτοφολεστέρας. Η αυξημένη παραγωγή εστέρων από τον μύκητα αυτό προκύπτει και από την βιβλιογραφία (Canonico, et al., 2015). Παρόλο που παρατηρείται παραγωγή φαινυλαιθυλικής αλκοόλης και οξικού φαινυλαιθυλεστέρα, ουσίες με αρώματα τριαντάφυλλου, που χαρακτηρίζουν το μύκητα αυτό, οι συγκεντρώσεις τους δεν είναι ιδιαίτερα υψηλές ενώ στο πείραμα 1 στην περίπτωση της φαινυλαιθυλικής αλκοόλης η συγκέντρωσή της βρέθηκε χαμηλότερη από ότι στην περίπτωση του συμβατικού ζυμομύκητα. Ακόμη σημαντικό χαρακτηριστικό του μικροοργανισμού αυτού είναι η δυνατότητα μετατροπής των μοντερπινικών αλκοολών και η παραγωγή λιναλοόλης και α-τερπινεόλης, (Basso, et al., 2016). Στην παρούσα πειραματική μελέτη παρόλα αυτά δεν υπήρχε η δυνατότητα μέτρησης των ουσιών αυτών καθώς δεν διατίθεται η κατάλληλη στήλη αέριας χρωματογραφίας.

Η *M. pulcherrima* όπως και η *T. delbrueckii* παράγει ένα πλήθος εστέρων οι οποίοι προσδίδουν ένα γλυκό και φρουτώδες αρωματικό προφίλ στην παραγόμενη μπίρα. Ακόμη χαρακτηριστικό των μπιρών που παράχθηκαν από την *M. pulcherrima* είναι η υψηλή συγκέντρωση φαινυλαιθυλικής, ισοαμυλικής και ενεργής αμυλικής αλκοόλης, γεγονός το οποίο προκύπτει και από την βιβλιογραφία (Padilla, et al., 2016). Το αρωματικό προφίλ που διαμορφώνει ο μύκητας αυτός συμπληρώνεται από έντονα πικρικά και φυτικά αρώματα που προκύπτουν από τον λυκίσκο και συγκεκριμένα από τις ουσίες ισοχουμουλόνη, χουμουλόνη και λουλουπόνη αλλά και από αρώματα ξύλου που προέρχονται από την ένωση 2-μεθοξυ-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 *M. 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.

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

Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η δυνατότητα μεταβολισμού των βασικών σακχάρων του ζυθογλεύκου καθώς και τα βασικά χαρακτηριστικά των προϊόντων ζύμωσης δύο μη συμβατικών μικροοργανισμών, της *T. delbrueckii* και της *M. pulcherrima*, το εκάστοτε πείραμα πραγματοποιήθηκε επίσης και για ένα συμβατικό στέλεχος μικροοργανισμού το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως σύστημα αναφοράς.

Από την ζύμωση καθαρών σακχάρων από τους μη συμβατικούς μικροοργανισμούς που χρησιμοποιήθηκαν, το βασικό συμπέρασμα που προκύπτει είναι ότι και οι δύο διαθέτουν το ένζυμο μαλτάση που απαιτείται για τη διάσπαση και το μεταβολισμό του δισακχαρίτη μαλτόζη. Τα χαρακτηριστικά όμως της κάθε ζύμωσης και τα τελικά προϊόντα αυτής διαφέρουν σημαντικά. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφοροποιήσεις στο ρυθμό ζύμωσης των διαφορετικών σακχάρων και στις τελικές συγκεντρώσεις μικροοργανισμών στα διάφορα υποστρώματα, ενώ στις τελικές συγκεντρώσεις σακχάρων και αιθανόλης οι διαφοροποιήσεις δεν ήταν σημαντικές. Ακόμη διαφοροποιήσεις παρουσιάστηκαν στις τελικές τιμές pH των ζυμωμένων υποστρωμάτων και συγκεκριμένα στα υποστρώματα μίγματος σακχάρων που ζυμώθηκαν από την *T. delbrueckii* και την *M. pulcherrima*. Οι τελικές τιμές pH βρέθηκαν μικρότερες, 2.85 και 2.87, σε σχέση με τα υπόλοιπα συστήματα, όπου οι τιμές ήταν μεγαλύτερες του 3.

Όσον αφορά στη ζύμωση του ζυθογλεύκου παρατηρήθηκε ότι ο χρόνος ζύμωσης επηρεάζεται σημαντικά τόσο από το είδος του μικροοργανισμού όσο και από την αρχική πυκνότητα του γλεύκου και τη θερμοκρασία ζύμωσης αυτού. Συγκεκριμένα σε χαμηλότερη τιμή πυκνότητας (12.6°P) και μέση θερμοκρασία 24°C ο *S. cerevisiae* και η *M. pulcherrima* ολοκλήρωσαν την ζύμωση σε 7 ημέρες ενώ ο *T. delbrueckii* και η μικτή καλλιέργεια χρειάστηκαν 12 ημέρες. Στην περίπτωση του γλεύκου με αρχική πυκνότητα 14.5 °P και ζύμωση σε θερμοκρασία 20°C ο χρόνος ζύμωσης των μικροοργανισμών σχεδόν διπλασιάζεται σε κάθε περίπτωση. Συγκεκριμένα ο συμβατικός ζυμομύκητας και η *M. pulcherrima* χρειάστηκαν 14 και 18 ημέρες αντίστοιχα, ενώ η μικτή καλλιέργεια και η *T. delbrueckii*, 24 και 26 ημέρες αντίστοιχα. Συμπεραίνεται ότι η αρχική πυκνότητα του

γλεύκους και η θερμοκρασία επηρεάζουν σε πολύ μεγάλο βαθμό τον χρόνο ζύμωσης. Όσον αφορά στους διαφορετικούς μικροοργανισμούς το επιλεγμένο στέλεχος της *M. pulcherrima* φαίνεται να έχει ρυθμό ζύμωσης ανάλογο του συμβατικού ζυμομύκητα, ενώ στην περίπτωση της *T. delbrueckii* ο χρόνος ζύμωσης είναι αρκετά μεγαλύτερος καθώς παρατηρήθηκε ότι μετά τις δύο πρώτες ημέρες ζύμωσης (μεταβολισμός των μονοσακχαριτών) ο μικροοργανισμός απαιτεί ένα χρονικό διάστημα 7-8 ημερών μέχρι να αρχίσει να μεταβολίζει τη μαλτόζη.

Ακόμη πολύ σημαντικό γεγονός είναι ότι το σύνολο των μικροοργανισμών κατάφερε σε μεγάλο βαθμό να ζυμώσει το γλέυκος, μόνο στην περίπτωση της *M. pulcherrima* η τελική πυκνότητα σακχάρων ήταν υψηλότερη σε σχέση με τον συμβατικό ζυμομύκητα (5.6 και 5.7 °P στα πειράματα 1 και 2 αντίστοιχα) σε σύγκριση με 3.3 και 3.2 για τον *S. cerevisiae*. Όσον αφορά στη μεταβολή του pH υψηλότερες τιμές μετρήθηκαν και στα δύο πειράματα στην περίπτωση της *T. delbrueckii* και χαμηλότερες στον συμβατικό μύκητα. Οι τιμές pH στο σύνολο των συστημάτων που μελετήθηκαν κυμαίνονται μεταξύ 3.93-4.45. Ένα ακόμη σημαντικό χαρακτηριστικό της αλκοολικής ζύμωσης είναι η κατανάλωση αζώτου από τους μύκητες. Στην εν λόγω εργασία βρέθηκε ότι ο μικροοργανισμός που χρειάστηκε μεγαλύτερη ποσότητα αζώτου για την ανάπτυξη του είναι ο συμβατικός ζυμομύκητας, γεγονός θετικό για τους non-*Saccharomyces*. Μεταξύ των δύο πειραμάτων παρατηρήθηκε πολύ υψηλότερη κατανάλωση αζώτου στο πείραμα 1 γεγονός που αποδίδεται σε στρεσάρισμα των μικροοργανισμών λόγω των μεγάλων θερμοκρασιακών διακυμάνσεων.

Τέλος απαιτείται σύγκριση μεταξύ των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών που προσδίδουν οι διαφορετικοί μύκητες στην μπύρα. Συγκεκριμένα στην παρούσα εργασία μετρήθηκαν πειραματικά το χρώμα, η πικράδα και τα αρωματικά συστατικά των τελικών προϊόντων. Όσον αφορά στο χρώμα παρατηρήθηκε ότι δεν υπήρχε μεγάλη διαφοροποίηση μεταξύ των μπυρών που ζυμώθηκαν με τους non-*Saccharomyces* μικροοργανισμούς και αυτών που ζυμώθηκαν με τον συμβατικό ζυμομύκητα. Παρόλα αυτά στα δείγματα των μη συμβατικών μικροοργανισμών παρατηρήθηκε υψηλή θολερότητα που οφείλεται στο ότι οι δύο αυτοί μύκητες δεν καθιζάνουν επαρκώς κατά την ωρίμανση και σταθεροποίηση της μπύρας. Επίσης οι διαφοροποιήσεις στις τιμές πικράδας δεν ήταν ιδιαίτερα έντονες, με μοναδική εξαίρεση την μπύρα που ζυμώθηκε με την *M. pulcherrima* που παρουσίασε υψηλότερες τιμές στην συγκεκριμένη μέτρηση. Τέλος οι αναλύσεις των αρωματικών συστατικών έδειξαν ότι οι μελετώμενοι μη συμβατικοί μικροοργανισμοί καθώς και η μικτή καλλιέργεια έχουν την δυνατότητα παραγωγής ενός πλήθους αρωματικών ουσιών, διαμορφώνοντας ένα πολύπλοκο αρωματικό προφίλ με ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Συγκεκριμένα οι μπύρες που παράχθηκαν με τη χρήση της *T. delbrueckii* παρουσίασαν έντονα αρώματα φρούτων χάρη στην παρουσία εστέρων όπως ο καπρικός, ο καπρυλικός αιθυλεστέρας και ο οξικός φαινυλαιθυλεστέρας με ταυτόχρονα χαρακτηριστικά αρώματα τριαντάφυλλου λόγω της παραγωγής φαινυλαιθυλικής αλκοόλης αλλά και αρώματα ξύλου από την παραγωγή 2-μεθοξυ-4-βινυλοφαινόλη. Υψηλή παραγωγή εστέρων παρατηρήθηκε και στην περίπτωση της *M. 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 καρυφυλλένιο αλλά και αρώματα ξύλου που προέρχονται από την ένωση 2-μεθοξυ-4-βινυλοφαινόλη. Τέλος η μπύρα που ζυμώθηκε από τη μικτή καλλιέργεια παρουσίασε τη μικρότερη ποικιλία στην παραγωγή αρωματικών ουσιών και τα αρώματα που φαίνεται να κυριαρχούν προέρχονται από την ενεργή αμυλική, την

ισοαμυλική και την φαινυλαιθυλική αλκοόλη σε συνδυασμό με αρώματα φράουλας από το ισοβουτυρικό οξύ.

Σύμφωνα με τα παραπάνω γίνεται σαφές ότι τα στελέχη των non-*Saccharomyces* μικροοργανισμών που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία δίνουν πολύ θετικά αποτελέσματα για την παραγωγή μπύρας 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 στα τερπενοειδή, δίνοντας έτσι μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα για τις ουσίες που παράγει κάθε μικροοργανισμός και το αρωματικό προφίλ που διαμορφώνει. Για μια πιο ολοκληρωμένη μελέτη των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των προϊόντων ζύμωσης των μελετώμενων μικροοργανισμών, θα είχε ενδιαφέρον η συσχέτιση των αποτελεσμάτων των αναλυτικών μεθόδων με τα σχόλια ενός έμπειρου πάνελ δοκιμαστών.

Βιβλιογραφία

Albertin, W. και συν., 2014. *Winemaking and bioprocesses strongly shaped the genetic diversity of the ubiquitous yeast Torulaspora delbrueckii.* [Ηλεκτρονικό]

Available at: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0094246>

[Πρόσβαση 23 11 2017].

Andrew James, E., 2015. Analysis of Diacetyl and Other Vicinal Diketones (VDKs) in Alcoholic Beverages. *LCGC Special Issues. V35, I8*, 01 February, pp. 35-42.

Anon., 2015. ΠΕΙΡΑΜΑ 2: ΜΕΤΡΗΣΗ ΓΛΥΚΟΖΗΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΟΥ ΔΙΝΙΤΡΟΣΑΛΙΚΥΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ. Στο: «Βιοτεχνολογία και Περιβάλλον - Εργαστηριακές Ασκήσεις» Σημειώσεις. 1η επιμ. Αθήνα: Ε.Μ.Π., pp. 10-11.

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.

Beer Catalog, 2015. *Beer Catalog*. [Ηλεκτρονικό]

Available at: <https://www.beercatalog.gr/zithopoiisi/item/461-zythopoiisi>

[Πρόσβαση 27 10 2017].

Breandán Kearney, 2015. *15 COMMON OFF FLAVOURS IN BEER AND HOW TO IDENTIFY THEM*, Gent: Resources, Belgian Smaak..

Brison, T., 2014. *MILLENNIAL TYPE, Libation Illumination – Malt*. [Ηλεκτρονικό]

Available at: <http://millennialtype.com/libation-illumination-malt/>

[Πρόσβαση 18 December 2017].

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

Carr, N., 2016. *Learn Kegerator*. [Ηλεκτρονικό]

Available at: <https://learn.kegerator.com/off-flavors-in-beer/>

[Πρόσβαση 14 November 2017].

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. Typing of non-Saccharomyces yeasts with enzymatic activities of interest in wine-making.. *Int J Food Microbiol.*, 25 July, pp. 29-36.

Fix, G., 1999. *Principles of Brewing Science: A Study of Serious Brewing Issues*. 2η επιμ. Colorado: BREWERS ASSOCIATION.

Gupta, M., Abu-Ghannam, N. & Gallagher, E., 2010. Barley for Brewing: Characteristic Changes during Malting, Brewing and Applications of its By-Products. *Comprehensive REVIEWS in food science and food safety*, 29 4, pp. 318-328.

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

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

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

Available at: <http://www.gustodivino.it/allegati/The%20Role%20and%20Use%20of%20Non-Saccharomyces%20Yeasts%20in%20Wine%20Production.pdf>

[Πρόσβαση 3 10 2017].

KENNEDY, A. I., 1997. Fully Defined Medium for Yeast Fermentation. *Food Technol. Biotechnol.* 35 (4) , pp. 261-265.

Kennedy, A. I., Taidi, B., Dolan, J. L. & Hodgs, J. A., 1997. Optimisation of a Fully Defined Medium for Yeast Fermentation. *Food Technology and Biotechnology* 35(4) , pp. 261-265.

König, H., Uden, G. & Fröhlich, J., 2009. Yeasts. Στο: H. U. G. F. J. König, επιμ. *Biology of Microorganisms on Grape, in Must and in Wine*. Manattan: Springer, pp. 47-56.

Lewis, A., 1997. *Brew Your Own*. [Ηλεκτρονικό]

Available at: <https://byo.com/article/brew-beer-that-matches-your-water/>

[Πρόσβαση 28 10 2017].

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

Lewis, M. J. & Young, T. W., 2001. Overview of the brewing process. Στο: *Brewing*. Manhattan: Springer Science+Business Media, pp. 3-10.

Lutz, H. F., 1922. The beer in the ancient Orient. Στο: *Viticulture and brewing* . California: E. Stechert & co., pp. 73-96.

Meussdoerffer, F. G. & Eßlinger, D. H. M., 2009. Chapter 1. A Comprehensive History of Beer Brewing. Στο: H. M. Eßlinger, επιμ. *Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets..* Weinheim: WILEY-VCH, pp. 1-42.

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

Michel, M. και συν., 2016,b. Review: Pure non-*Saccharomyces* starter cultures for beer fermentation with a focus on secondary metabolites and practical applications. *Journal of the Institute of Brewing* 122, 15 9, pp. 569-587.

Mosher, R., 2006. MAJOR FLAVOR AND AROMA GROUPS IN BEER. *All About Beer Magazine - Volume 27, Issue 5, 1 November* , 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.
- Nicholson, P. T. & Shaw, I., 2000. Brewing and Baking. Στο: D. Samuel, επιμ. *Ancient Egyptian Materials and Technology*. Cambridge: Cambridge University Press, pp. 537-576.
- Nissen, P., Nissen, D. & Arneborg , N., 2003. Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by a cell-cell contact-mediated mechanism.. *US National Library of Medicine National Institutes of Health Yeast*. (4), 20 March, pp. 331-341.
- Oppenheim, A. L., 1964. A Hymn to the Beer Goddess and a Drinking Song. *Oriental Institute Press*, 7 6, pp. 67-89.
- Oro, L., Ciani, M. & Comitini, F., 2016. Antimicrobial activity of *Metschnikowia pulcherrima* on wine yeasts.. *J Appl Microbiol*. 116(5), 5 May, 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*. [Ηλεκτρονικό]
Available at: <https://www.tes.com/lessons/ztUU7PfnFY-T1Q/beer-making>
[Πρόσβαση 3 November 2017].
- Pires, E. J., Teixeira, J. A., Branyik, T. & Vicente, A., 2014. 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, March, pp. 1937-49.
- Rosa, R. D. L., 2010. *INTERMEDIATE BEER PRODUCTION*. [Ηλεκτρονικό]
Available at: <http://www.imperialbeverage.com>
[Πρόσβαση 13 November 2017].
- Schönberger, . C. & Kostecky, T., 2011. 125th Anniversary Review: The Role of Hops in Brewing. *Journal of the Institute of Brewing* 117 (3), pp. 259-267.
- Steiner, E., Becker, T. & Gastl , M., 2010. Turbidity and Haze Formation in Beer – Insights and Overview. *J. Inst. Brew*. 116(4), pp. 360-368.
- Strong Gordon; BEER JUDGE CERTIFICATION PROGRAM, 2015. *Beer Style Guidelines*. 2η επιμ. Minnesota: BJCB Inc..
- 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.
- van Breda, V., Jolly , N. & van Wyk , J., 2013. Characterisation of commercial and natural *Torulaspora delbrueckii* wine yeast strains.. *International Journal of Food Microbiology*, 163, pp. 80-88.

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

Xiros, C., Topakas, E. & Christakopoulos, P., 2013. Hydrolisys 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. Στο: J. F. Jackson & H. F. Linskens, επιμ. *Analysis of Taste and Aroma*. 2η επιμ. Cham: SPRINGER, pp. 29-45.

Αρβανιτίδου-Βαγιωνά, Μ., 2016. *Μικροβιολογία του νερού. Χαρακτηριστικά Βακτηρίων.*, Αθήνα: Watermico Προγραμμα κατάρτισης εξαποστάσεως.

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

Νεραντζής, Η., 2010. *Βιοτεχνολογία και βιομηχανικές ζυμώσεις*. 1η επιμ. Αθήνα: Έμβρυο.

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

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

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

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

Τζιά, Κ., Ωραιοπούλου, Β. & Ταύκης, Π., 2008. *Επιστήμη κα Μηχανική των Τροφίμων: Οδηγός Εργαστηριακών Ασκήσεων*. 1η επιμ. Αθήνα: Ε.Μ.Π..

Παράρτημα

Πίνακας Π.1: Συγκέντρωση κυττάρων του *S. cerevisiae* κατά την διάρκεια της ζύμωσης στα διάφορα υποστρώματα σακχάρων.

	Γλυκόζη	Φρουκτόζη	Μαλτόζη	Mix
Χρόνος (h)	Συγκέντρωση (10^6 κύτταρα/mL)			
0	5.80	3.40	5.10	3.40
18	9.20	10.30	10.80	11.90
43	16.00	16.00	15.50	16.55
70	26.40	20.00	22.20	24.10
92	34.50	24.40	27.20	26.85
115	40.50	27.20	29.90	29.20
139	46.00	31.00	30.00	33.40
163	45.30	33.00	33.00	37.90
185	46.20	38.00	35.80	38.10
211	-	45.00	36.00	37.40
235	-	45.40	35.20	-
258	-	45.20	-	-

Πίνακας Π.2: Συγκέντρωση κυττάρων της *T. delbrueckii* κατά την διάρκεια της ζύμωσης στα διαφορετικά υποστρώματα σακχάρων και μίγματος.

	Γλυκόζη	Φρουκτόζη	Μαλτόζη	Mix
Χρόνος (h)	Συγκέντρωση (10^6 κύτταρα/mL)			
0	5.7 ^o	2.80	5.5	4.00
19	61.50	54.50	6.3	63.75
43	78.00	71.50	8.8	65.25
70	94.50	87.00	9.6	66.90
92	103.30	95.50	9.4	77.50
115	113.00	106.00	9.5	79.75
139	122.60	105.50	36.9	79.00
163	123.00	103.50	41.6	77.50
185	121.80	104.00	47.4	77.85
211	120.00	106.00	55.4	87.75
235	-	-	59.2	99.25
258	-	-	58	113.50
280	-	-	60.6	126.50
304	-	-	-	142.55
329	-	-	-	142.00

Πίνακας Π.3: Συγκέντρωση κυττάρων της *M. pulcherrima* ζύμωσης στα διάφορα υποστρώματα σακχάρων και μίγματος.

	Γλυκόζη	Φρουκτόζη	Μαλτόζη	Mix
Χρόνος (h)	Συγκέντρωση (10^6 κύτταρα/mL)			
0	5.30	4.9	5.30	3.90
22	16.30	15.00	6.10	17.35
48	25.60	22.40	15.80	25.60
69	32.90	26.80	20.10	30.60
92	35.00	32.80	24.20	31.90
116	48.40	36.40	39.20	45.70
140	51.80	40.60	39.37	50.20
166	54.90	49.40	39.60	74.00
192	59.60	57.40	55.40	82.50
216	63.80	55.00	53.20	105.55
239	62.40	55.60	54.00	104.40
261	-	-	-	104.00

Πίνακας Π.4: %Βιωσιμότητα των κυττάρων του *S. cerevisiae* κατά την διάρκεια της ζύμωσης στα διάφορα υποστρώματα σακχάρων και μίγματος.

	Γλυκόζη	Φρουκτόζη	Μαλτόζη	Mix
Χρόνος (h)	%Βιωσιμότητα			
0	83	91	80	86
18	98	98	94	97
43	98	93	95	99
70	97	99	97	100
92	100	97	96	9
115	94	96	97	98
139	96	95	95	98
163	95	97	96	100
185	91	95	98	99
211	-	85	91	97
235	-	87	90	-
258	-	73	-	-

Πίνακας Π.5: %Βιωσιμότητα των κυττάρων της *T. delbrueckii* κατά την διάρκεια της ζύμωσης στα διαφορετικά υποστρώματα σακχάρων και μίγματος.

	Γλυκόζη	Φρουκτόζη	Μαλτόζη	Mix
Χρόνος (h)	% Βιωσιμότητα			
0	84	93	85	81
19	99	91	86	96
43	91	97	84	97
70	94	99	96	97
92	99	96	93	97
115	96	99	90	97
139	100	99	99	94
163	100	100	100	99
185	94	100	100	99
211	95	100	100	99
235	-	-	100	99
258	-	-	99	100
280	-	-	99	100
304	-	-	-	95
329	-	-	-	99

Πίνακας Π.6: %Βιωσιμότητα των κυττάρων της *M. pulcherrima* κατά την διάρκεια της ζύμωσης στα διαφορετικά υποστρώματα σακχάρων και μίγματος.

	Γλυκόζη	Φρουκτόζη	Μαλτόζη	Mix
Χρόνος (h)	% Βιωσιμότητα			
0	86	84	93	89
22	98	95	95	93
48	94	92	91	93
69	98	100	96	98
92	94	96	98	97
116	97	92	96	99
140	99	97	98	99
166	99	99	98	99
192	99	99	99	97
216	95	100	97	99
239	100	100	100	99
261	-	-	-	99

Πίνακας Π.7: Συγκεντρώσεις σακχάρων κατά την διάρκεια της ζύμωσης του *S. cerevisiae* στα διαφορετικά υποστρώματα σακχάρων και μίγματος.

Χρόνος (h)	Γλυκόζη		Φρουκτόζη		Μαλτόζη		Mix	
	Συγκέντρωση (mg/mL)	STDEV	Συγκέντρωση (mg/mL)	STDEV	Συγκέντρωση (mg/mL)	STDEV	Συγκέντρωση (mg/mL)	STDEV
0	120.99	0.916	116.54	1.494	117.76	0.793	90.68	2.582
18	93.98	0.458	107.42	3.436	170.66	1.783		
43	72.47	0.610	105.93	3.735	125.88	0.594	65.57	0.469
70	58.44	0.382	100.85	3.137	76.94	2.774		
92	40.43	0.229	66.94	0.299	55.41	1.090	40.22	0.000
115	14.79	0.382	47.14	1.419	32.92	0.594		
139	4.00	0.214	29.14	1.942	21.04	0.396	8.45	0.129
163	0.79	0.023	28.54	7.022	16.46	0.297		
185	0.74	0.031	18.00	0.299	9.38	0.347	3.05	0.018
211	-	-	16.17	0.261	1.89	0.000		
235	-	-	11.02	0.411	1.74	0.050	3.04	0.018
258	-	-	11.24	0.560	-	-	-	-

Πίνακας Π.8: Συγκεντρώσεις σακχάρων κατά την διάρκεια της ζύμωσης της *T. delbrueckii* στα διαφορετικά υποστρώματα σακχάρων και μίγματος.

Χρόνος (h)	Γλυκόζη		Φρουκτόζη		Μαλτόζη		Mix	
	Συγκέντρωση (mg/mL)	STDEV	Συγκέντρωση (mg/mL)	STDEV	Συγκέντρωση (mg/mL)	STDEV	Συγκέντρωση (mg/mL)	STDEV
0	116.87	1.984	120.27	1.046	118.55	0.793	92.09	0.704
19	84.98	4.883	97.27	3.137	166.10	2.774		
43	68.04	2.289	90.99	0.448	147.68	2.576		
70	41.65	0.076	40.94	0.299	139.35	2.576	63.22	0.000
92	18.53	1.373	28.46	1.868	101.71	12.878		
115	1.92	0.081	18.98	0.299	83.28	0.000	59.70	1.643
139	0.87	0.003	6.99	0.112	73.05	1.090		
163	0.71	0.029	1.52	0.067	36.79	1.882	31.61	2.347
185	0.73	0.014	1.07	0.013	19.24	0.000		
211	0.68	0.027	1.09	0.030	7.93	0.183	15.14	0.153
235	-	-	-	-	3.12	0.020		
258	-	-	-	-	2.63	0.183		
280	-	-	-	-	-	-	5.37	0.141
304	-	-	-	-	-	-		
329	-	-	-	-	-	-	5.36	0.047

Πίνακας Π.9: Συγκεντρώσεις σακχάρων κατά την διάρκεια της ζύμωσης της *M. pulcherrima* στα διαφορετικά υποστρώματα σακχάρων και μίγματος.

Χρόνος (h)	Γλυκόζη		Φρουκτόζη		Μαλτόζη		Mix	
	Συγκέντρωση (mg/mL)	STDEV	Συγκέντρωση (mg/mL)	STDEV	Συγκέντρωση (mg/mL)	STDEV	Συγκέντρωση (mg/mL)	STDEV
0	117.03	0.305	118.03	0.896	122.31	0.991	90.47	0.704
22	82.69	1.373	99.36	1.942	128.26	2.972		
48	71.55	2.136	82.92	3.436	159.96	9.312	59.96	0.704
69	68.74	1.831	76.05	1.046	195.23	4.161		
92	55.62	0.992	73.36	1.195	53.76	0.594	52.91	1.174
116	43.22	1.526	64.99	4.930	36.72	0.198		
140	25.93	1.145	60.06	0.598	34.31	0.991	15.78	0.352
166	3.77	0.080	34.36	0.149	11.26	0.050		
192	0.77	0.000	8.70	0.336	4.50	0.025	3.55	0.704
216	0.75	0.008	1.82	0.034	2.92	0.030		
239	0.69	0.014	1.84	0.004	2.87	0.109	1.18	0.012
261	-	-	-	-	-	-	1.18	0.006

Πίνακας Π.10: Παραγωγή αιθανόλης από τον *S. cerevisiae* στα διαφορετικά υποστρώματα σακχάρων και μίγματος.

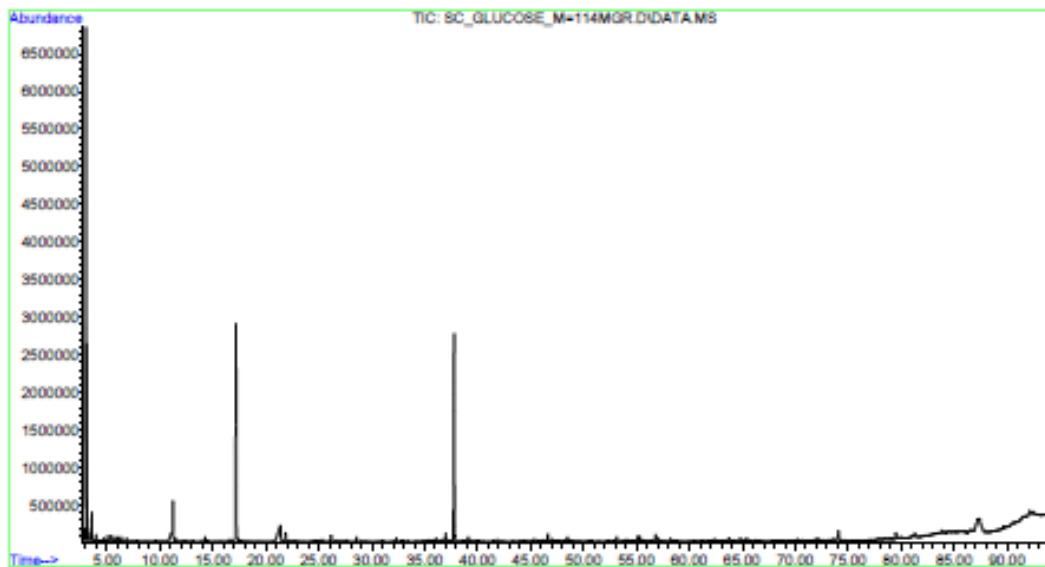
Χρόνος (h)	Μαλτόζη		Mix	
	Συγκέντρωση (mg/mL)	Περιεκτικότητα % v/v	Συγκέντρωση (mg/mL)	Περιεκτικότητα % v/v
0	0.013	0.002	0.014	0.002
18			0.334	0.042
70			10.138	1.284
92	15.437	1.956		
115			27.475	3.481
163			43.661	5.532
185	42.394	5.371		
211			42.739	5.415
235	43.200	5.474	-	-

Πίνακας Π.11: Παραγωγή αιθανόλης από την *T. delbrueckii* στα διαφορετικά υποστρώματα σακχάρων και μίγματος.

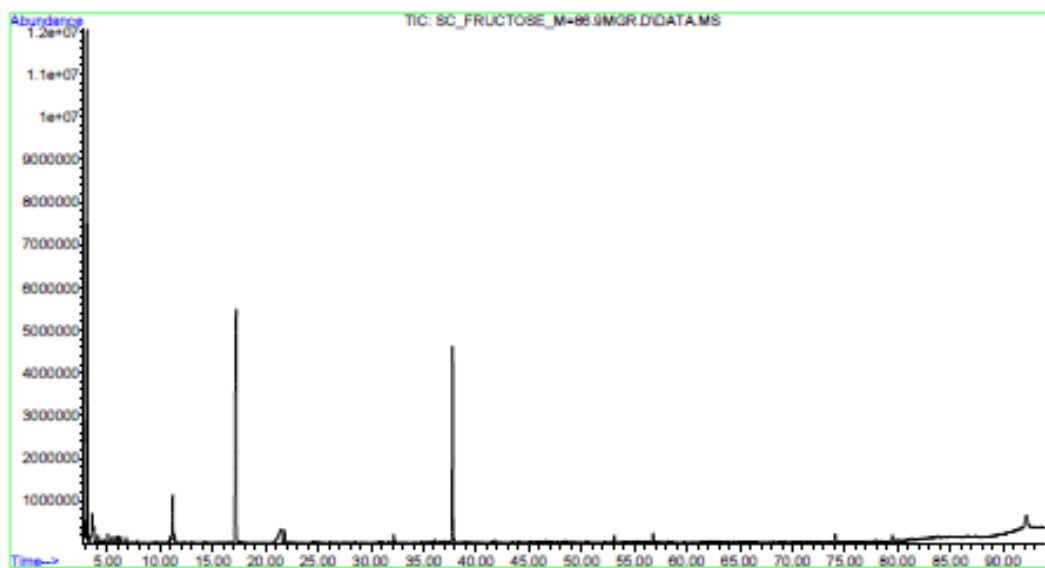
Χρόνος (h)	Μαλτόζη		Mix	
	Συγκέντρωση (mg/mL)	Περιεκτικότητα % v/v	Συγκέντρωση (mg/mL)	Περιεκτικότητα % v/v
0	0.001	0.000	0.003	0.000
19			0.334	0.042
43	0.438	0.055		
92			4.550	0.577
115	0.478	0.061		
139	9.850	1.248		
185			6.336	0.803
235	33.754	4.277	17.856	2.262
280	34.330	4.350	29.030	3.678
304	-	-	35.827	4.539
329	-	-	35.942	4.554

Πίνακας Π.12: Παραγωγή αιθανόλης από την *M. pulcherrima* στα διαφορετικά υποστρώματα σακχάρων και μίγματος.

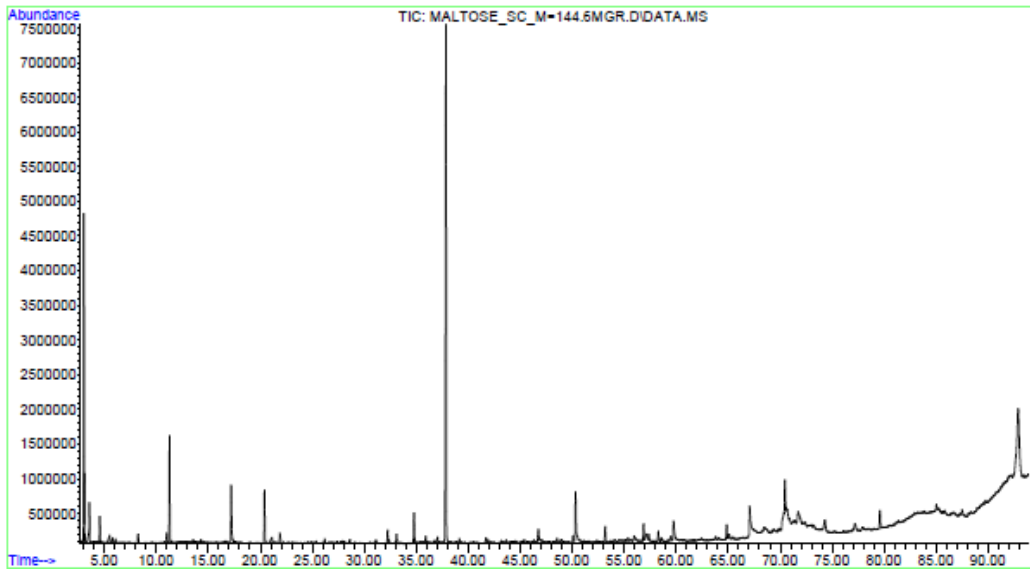
Χρόνος (h)	Μαλτόζη		Mix	
	Συγκέντρωση (mg/mL)	Περιεκτικότητα % v/v	Συγκέντρωση (mg/mL)	Περιεκτικότητα % v/v
0	0.009	0.001	0.006	0.001
22			1.907	0.242
48	0.438	0.055		
69			10.138	1.284
92	5.270	0.668		
116			14.400	1.825
166			20.275	2.569
192	19.699	2.496		
216	33.293	4.218	34.675	4.393
239	34.330	4.350		
261			36.058	4.569



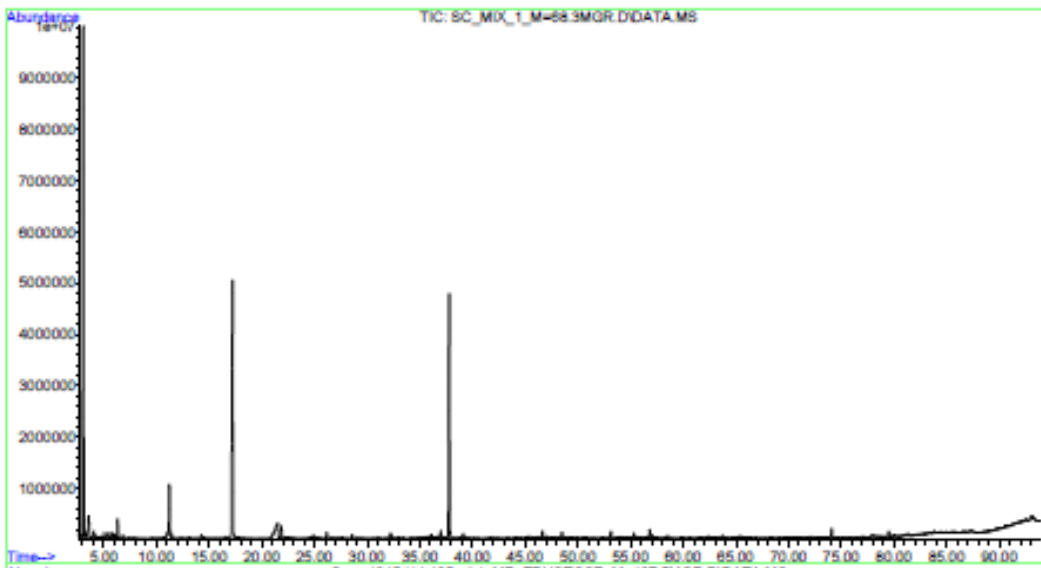
Εικόνα Π.1: Χρωματογράφημα του *S. cerevisiae* στο υπόστρωμα γλυκόζης.



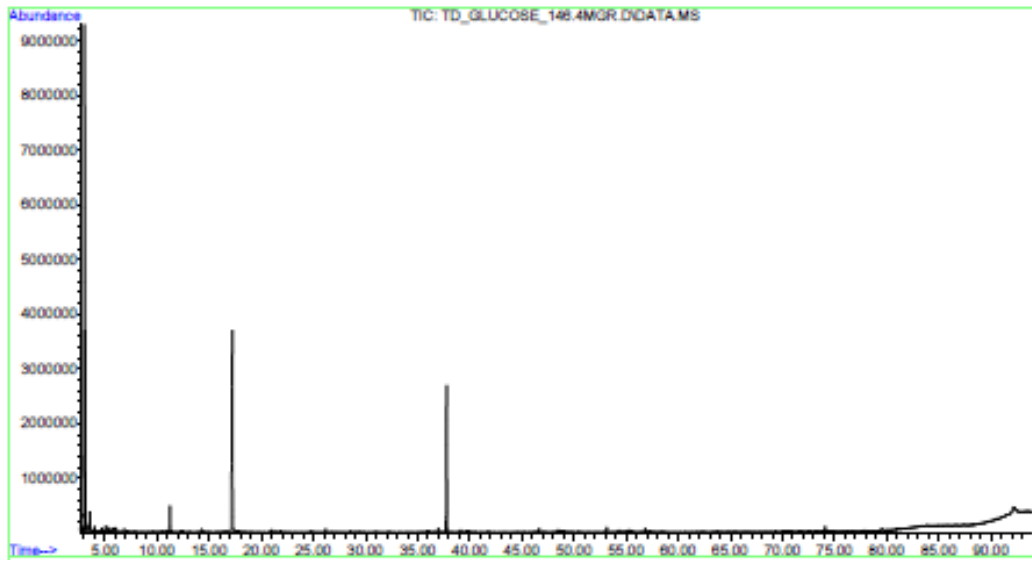
Εικόνα Π.2: Χρωματογράφημα του *S. cerevisiae* στο υπόστρωμα φρουκτόζης.



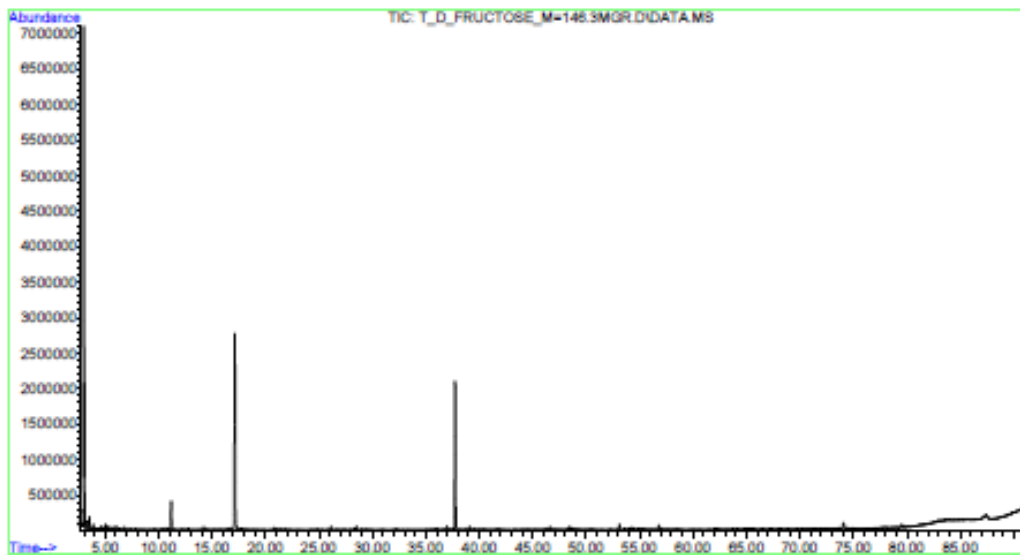
Εικόνα Π.3: Χρωματογράφημα του *S. cerevisiae* στο υπόστρωμα μαλτόζης.



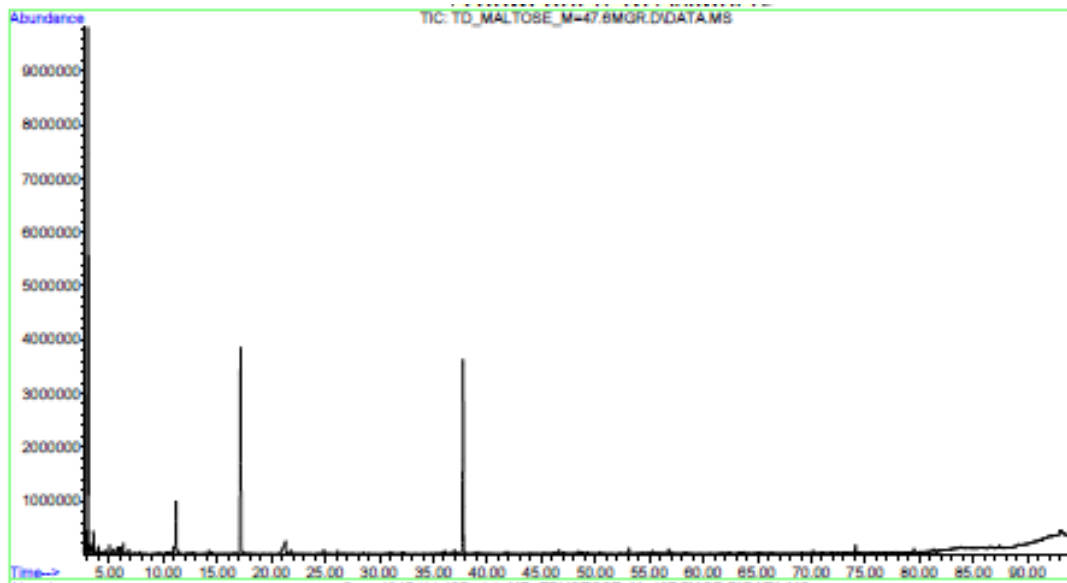
Εικόνα Π.4: Χρωματογράφημα του *S. cerevisiae* στο υπόστρωμα μίγματος σακχάρων.



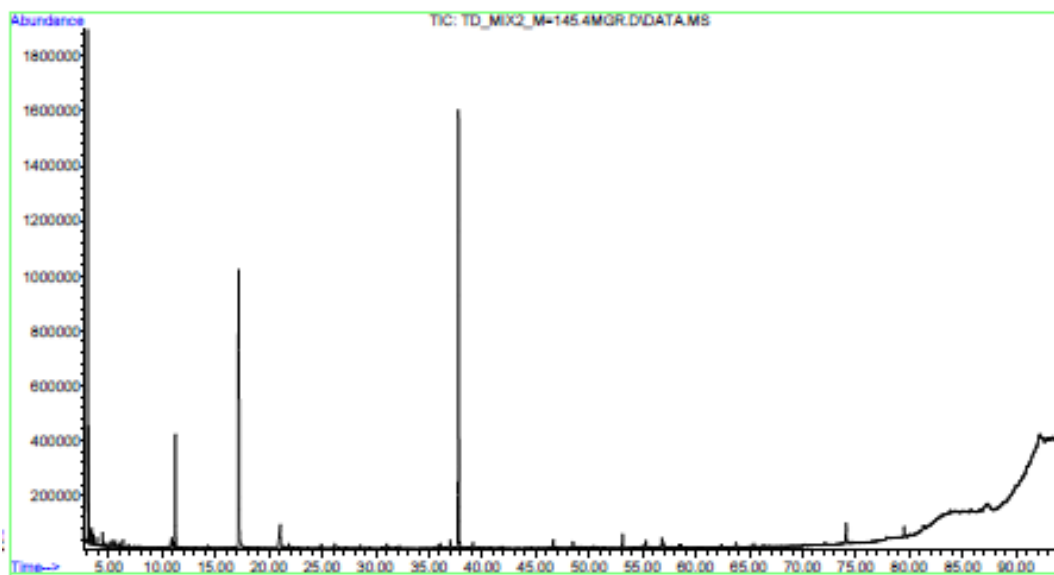
Εικόνα Π.5: Χρωματογράφημα του *T. delbrueckii* στο υπόστρωμα γλυκόζης.



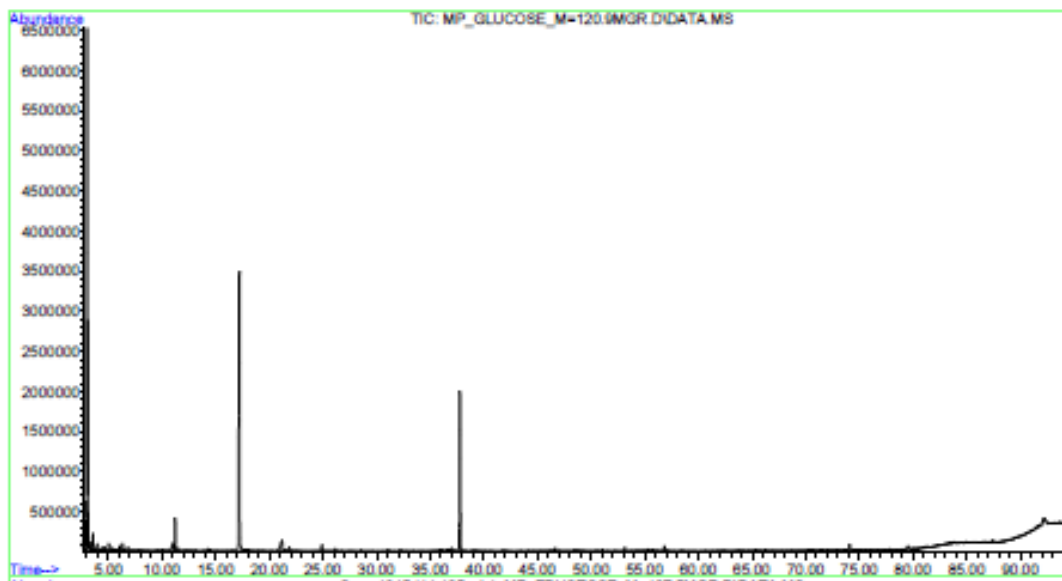
Εικόνα Π.6: Χρωματογράφημα του *T. delbrueckii* στο υπόστρωμα φρουκτόζης.



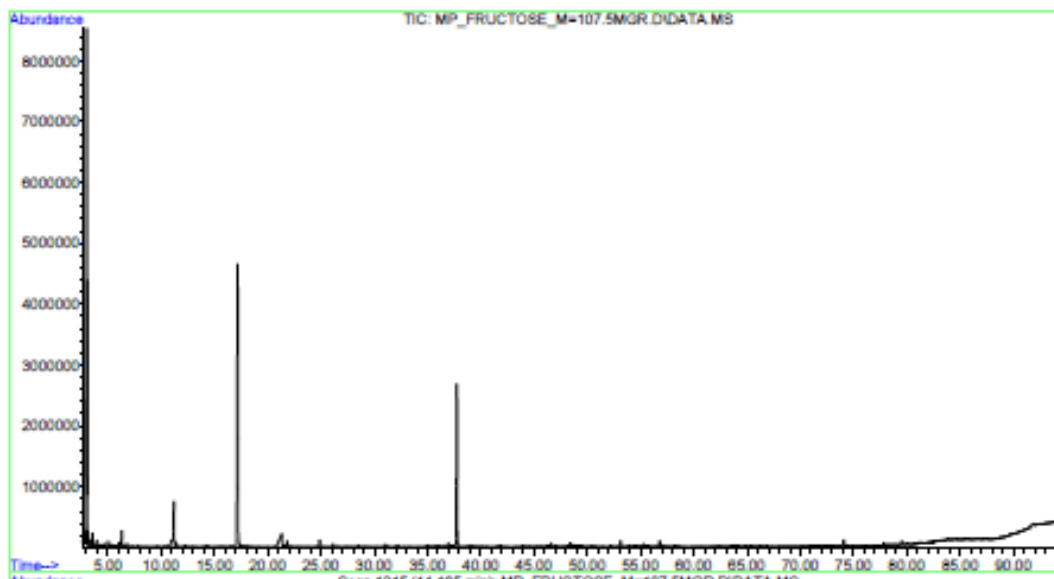
Εικόνα Π.7: Χρωματογράφημα του *T. delbrueckii* στο υπόστρωμα μαλτόζης.



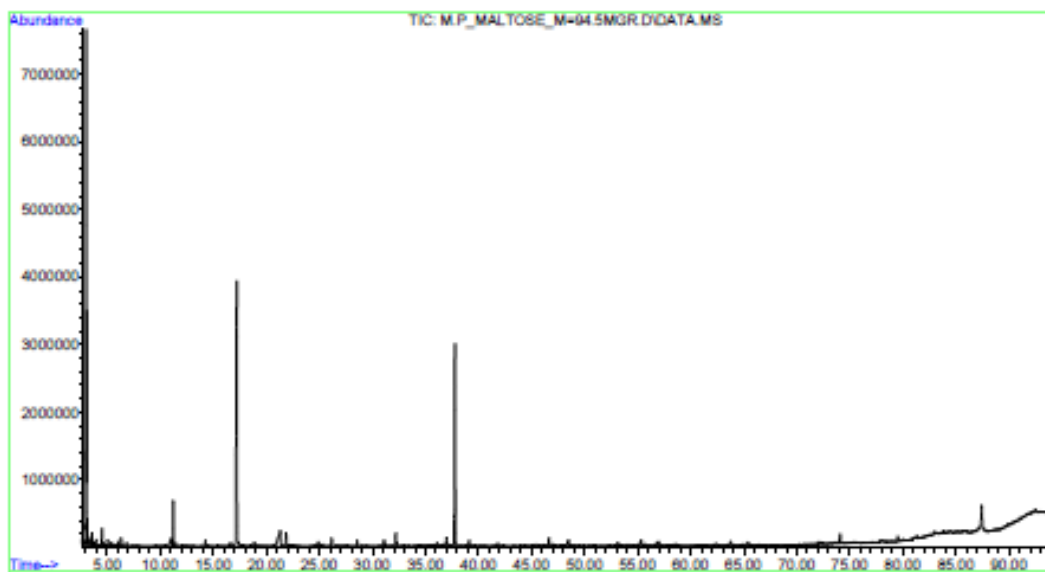
Εικόνα Π.8: Χρωματογράφημα του *T. delbrueckii* στο υπόστρωμα μίγματος σακχάρων.



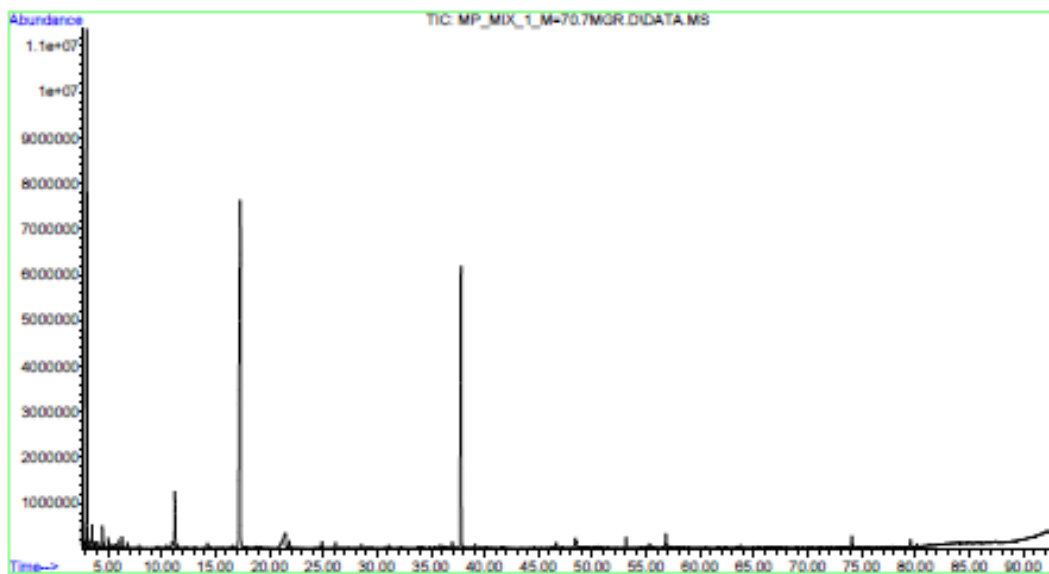
Εικόνα Π.9: Χρωματογράφημα του *M. pulcherrima* στο υπόστρωμα γλυκόζης.



Εικόνα Π.10: Χρωματογράφημα του *M. pulcherrima* στο υπόστρωμα φρουκτόζης.



Εικόνα Π.11: Χρωματογράφημα του *M. pulcherrima* στο υπόστρωμα μαλτόζης.



Εικόνα Π.12: Χρωματογράφημα του *M. pulcherrima* στο υπόστρωμα μίγματος σακχάρων.

Πίνακας Π.13: Ημερήσια καταγραφή της μείωσης της πυκνότητας σακχάρων στο ζυμώμενο γλεύκος στο Πείραμα 1.

Χρόνος (h)	<i>S. cerevisiae</i>		<i>T. delbrueckii</i>		<i>M. pulcherrima</i>		Mix <i>S. c.-T. d.</i>	
	° Plato	SG	° Plato	SG	° Plato	SG	° Plato	SG
0	12.6	1.051	12.6	1.051	12.6	1.051	12.6	1.051
14	10.3	1.041	11.5	1.046	12.6	1.051	11.4	1.046
38	4.6	1.018	11	1.044	12.1	1.049	10.2	1.041
61	3.7	1.014	10.7	1.043	6.5	1.026	7.4	1.029
86	3.4	1.013	10.8	1.043	5.6	1.022	5.4	1.021
110	3.7	1.014	10.7	1.043	5.7	1.022	4.4	1.017
133	3.3	1.013	10.7	1.043	5.7	1.022	3.7	1.014
156	3.3	1.013	10.2	1.041	5.7	1.022	4	1.016
180	-	-	8.1	1.032	-	-	3.6	1.014
208	-	-	5.25	1.021	-	-	3.5	1.014
232	-	-	5.1	1.020	-	-	3.4	1.013
256	-	-	4.3	1.017	-	-	3.2	1.013
280	-	-	4.3	1.017	-	-	3.4	1.013

Πίνακας Π.14: Ημερήσια καταγραφή της πυκνότητας σακχάρων στο ζυμώμενο γλεύκος στο Πείραμα 2.

Χρόνος (h)	<i>S. cerevisiae</i>		<i>T. delbrueckii</i>		<i>M. pulcherrima</i>		Mix: <i>S. c.-T. d.</i>	
	° Plato	S.G.	° Plato	S.G.	° Plato	S.G.	° Plato	S.G.
0	14.50	1.0590	14.50	1.0590	14.50	1.0590	14.50	1.0590
15	14.00	1.0568	13.80	1.0560	14.50	1.0590	14.50	1.0590
38	11.20	1.0450	12.00	1.0484	14.30	1.0581	12.10	1.0488
62	7.80	1.0310	12.20	1.0492	13.10	1.0530	11.00	1.0442
110	4.50	1.0177	12.00	1.0484	10.70	1.0429	10.50	1.0421
157	3.70	1.0145	12.10	1.0488	8.90	1.0355	10.40	1.0417
229	3.70	1.0145	11.90	1.0480	5.80	1.0229	8.60	1.0343
253	3.40	1.0133	10.90	1.0438	5.80	1.0229	7.50	1.0298
277	3.20	1.0125	9.40	1.0376	5.70	1.0225	6.80	1.0269
304	3.20	1.0125	6.20	1.0245	5.60	1.0221	5.70	1.0225
352	3.20	1.0125	5.80	1.0229	5.40	1.0213	5.60	1.0221
398	-	-	5.40	1.0213	5.60	1.0221	5.60	1.0221
422	-	-	5.00	1.0197	5.60	1.0221	4.90	1.0193
444	-	-	5.00	1.0197	-	-	4.60	1.0181
468	-	-	4.90	1.0193	-	-	4.40	1.0173
492	-	-	4.60	1.0181	-	-	4.60	1.0181
512	-	-	4.20	1.0165	-	-	4.20	1.0165
536	-	-	4.00	1.0157	-	-	4.00	1.0157
560	-	-	3.40	1.0133	-	-	4.00	1.0157
584	-	-	2.70	1.0105	-	-	-	-
608	-	-	2.70	1.0105	-	-	-	-

Πίνακας Π.15: Ημερήσια καταγραφή των τιμών pH στις ζυμώσεις του πειράματος 1.

Χρόνος (h)	<i>S. cerevisiae</i>	<i>T. delbrueckii</i>	<i>M. pulcherrima</i>	Mix <i>S. c.-T. d.</i>
0	5.42	5.42	5.42	5.42
14	4.45	4.65	5.35	4.61
38	3.92	4.42	4.43	4.27
61	4.1	4.4	3.98	4.10
86	4.02	4.35	4.02	4.06
110	4.1	4.37	4.03	3.94
133	4.07	4.44	4.07	4.01
156	4.11	4.39	4.07	4.08
180	-	4.35	-	4.09
208	-	4.31	-	4.12
232	-	4.32	-	4.12
256	-	4.38	-	4.10
280	-	4.36	-	4.12
324	3.94	-	3.93	-
448	-	4.22	-	4.03

Πίνακας Π.16: Ημερήσια καταγραφή των τιμών pH στις ζυμώσεις του πειράματος 2.

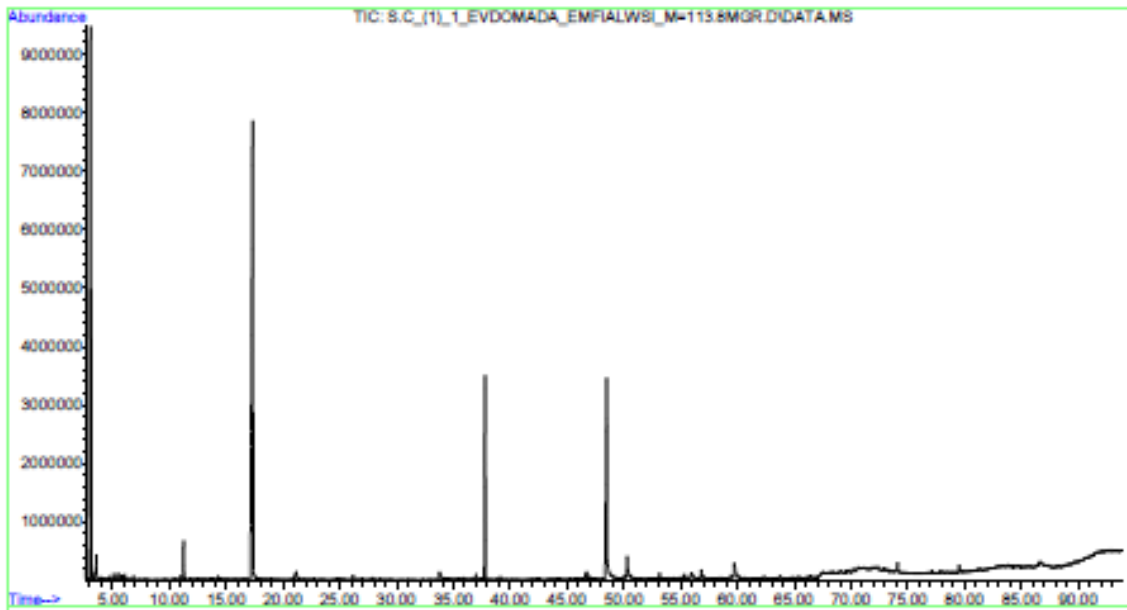
Χρόνος (h)	<i>S. cerevisiae</i>	<i>T. delbrueckii</i>	<i>M. pulcherrima</i>	Mix: <i>S. c.-T. d.</i>
0	5.7	5.7	5.7	5.7
15	5.12		5.59	
38	4.64	5.42	5.4	5.1
62	4.53	5.11	5.16	4.6
110	4.2	4.83	5.05	4.46
157	4.10	4.60	4.39	4.45
229	4.10	4.63	4.40	4.44
253	4.10	4.51	4.39	4.40
277	4.11	4.48	4.43	4.41
304	4.16	4.48	4.48	4.40
352	4.13	4.55	4.55	4.44
398	-	4.45	4.46	4.32
422	-	4.44	4.45	4.33
444	-	4.43	-	4.30
468	-	4.41	-	4.26
492	-	4.47	-	4.29
512	-	4.44	-	4.28
536	-	4.41	-	4.26
560	-	4.41	-	4.26
584	-	4.40	-	-
608	-	4.41	-	-

Πίνακας Π.17: Ημερήσια καταγραφή του διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου στο πείραμα 1.

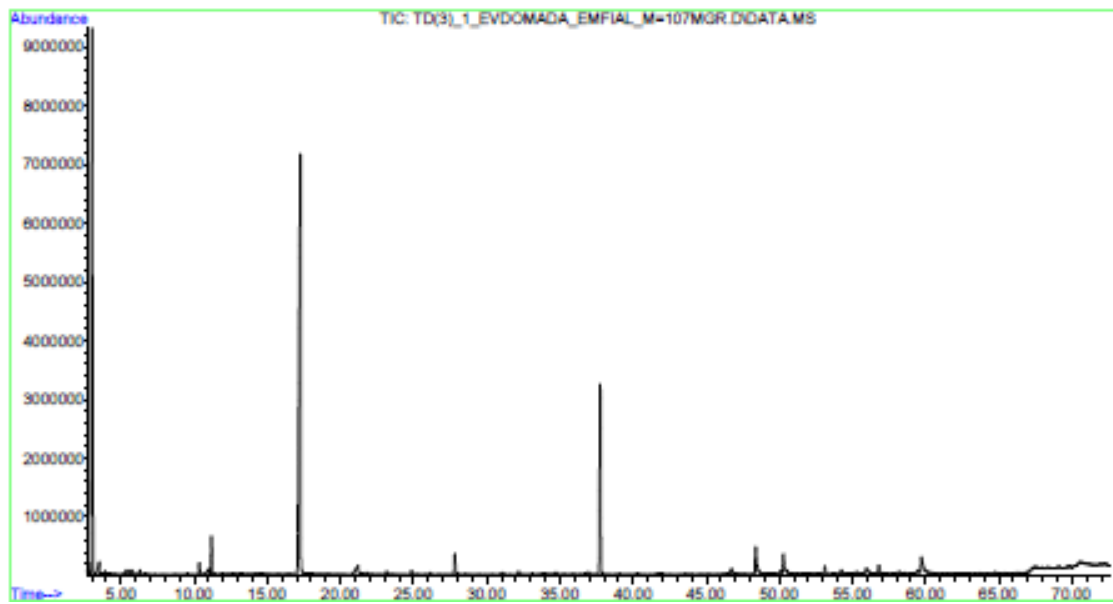
Χρόνος (h)	Διαθέσιμο αμμωνιακό άζωτο FAN (mg/L)							
	<i>S. cerevisiae</i>	STDEV	<i>T. delbrueckii</i>	STDEV	<i>M. pulcherrima</i>	STDEV	Mix: <i>S. c.-T. d.</i>	STDEV
0	124.37	1.759	124.37	1.999	124.37	1.759	124.37	4.576
14	44.16	1.429	123.76	0.549	74.62	0.952	53.00	1.201
38	28.33	1.101	121.80	6.304	44.67	0.981	58.55	1.667
61	31.60	0.558	108.62	1.158	44.60	0.633	53.09	1.709
86	26.96	0.334	121.88	3.326	37.13	0.271	37.26	3.337
110	23.96	0.281	117.84	5.870	39.23	1.068	55.40	2.296
133	34.20	0.866	118.54	3.914	38.14	0.560	58.66	3.941
156	33.38	0.611	102.95	1.207	37.71	0.247	59.30	2.035
180	-	-	99.38	3.081	-	-	57.36	2.363
208	-	-	80.92	0.387	-	-	52.36	1.904
232	-	-	73.62	0.396	-	-	50.59	4.110
256	-	-	74.94	2.277	-	-	52.09	1.387
280	-	-	72.85	0.625	-	-	51.45	0.547

Πίνακας Π.18: Ημερήσια καταγραφή του διαθέσιμου αμμωνιακού αζώτου στο πείραμα 2.

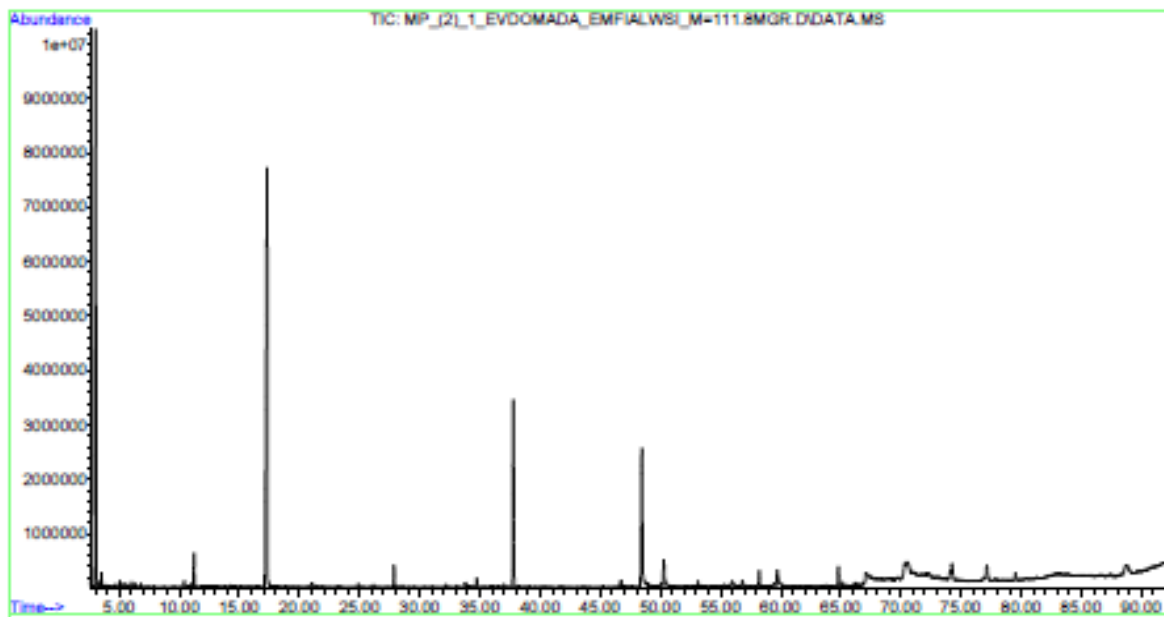
Χρόνος (h)	Διαθέσιμο αμμωνιακό άζωτο FAN (mg/L)							
	<i>S. cerevisiae</i>	STDEV	<i>T. delbrueckii</i>	STDEV	<i>M. pulcherrima</i>	STDEV	Mix: <i>S. c.-T. d.</i>	STDEV
0	126.36	4.166	126.36	4.636	126.20	1.369	126.36	3.804
15	170.78	0.380			141.55	1.921		
38	107.98	0.610	118.30	1.143	157.05	1.655	115.62	0.974
62	73.02	1.057			118.76	0.897		
157	48.60	0.974	106.20	1.103	77.05	0.828	116.44	1.155
229			110.16	0.762			106.43	3.318
253	53.45	2.225			72.64	1.369		
277			90.58	1.524			90.66	0.719
304	57.52	2.190			81.40	1.400		
352	58.85	1.712	69.66	1.958	78.53	3.804	88.49	0.290
444	-	-	70.55	2.082				
468	-	-			75.97	2.374	90.06	1.811
512	-	-	73.32	3.391	-	-	91.78	1.450
560	-	-	71.97	0.915	-	-	95.37	1.475
608	-	-	76.38	1.219	-	-	-	-



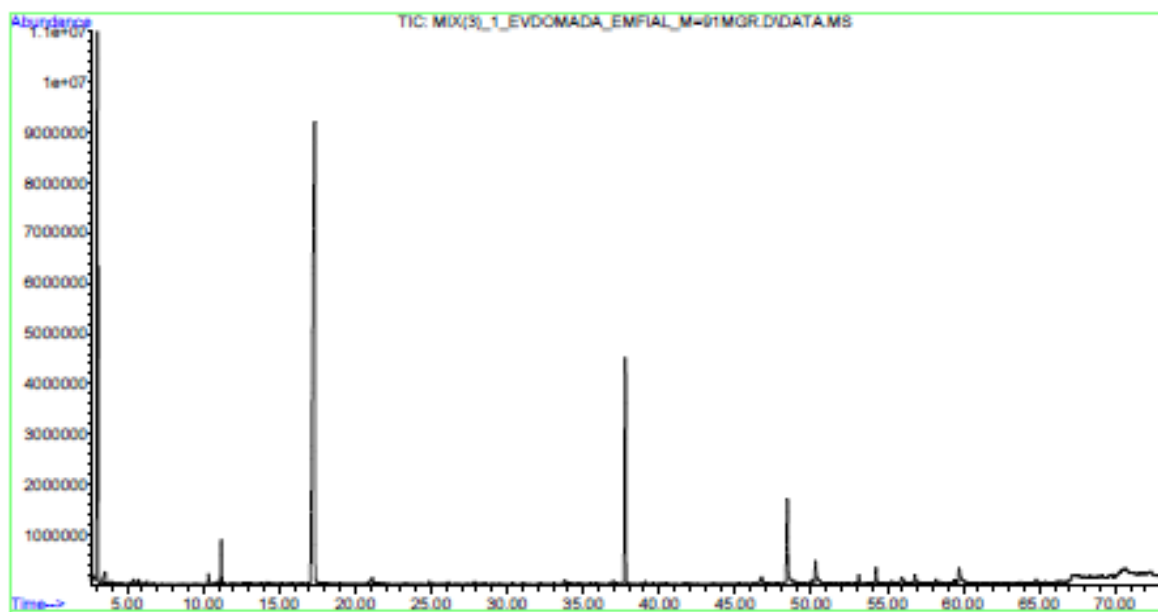
Εικόνα 20: Χρωματογράφημα του *S. cerevisiae* στο πείραμα 1.



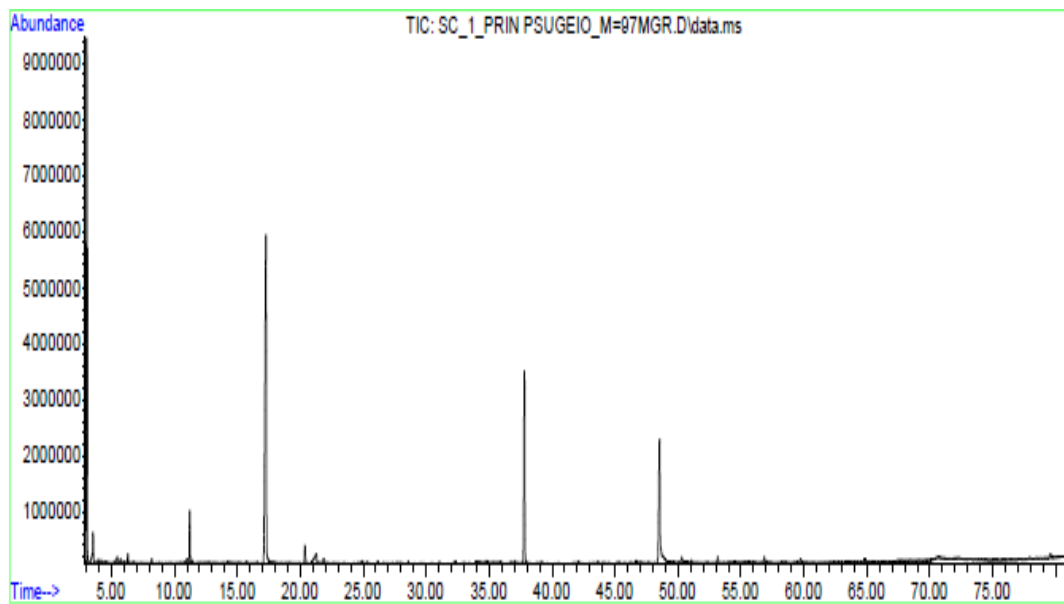
Εικόνα Π.15: Χρωματογράφημα της *T. delbrueckii* στο πείραμα 1.



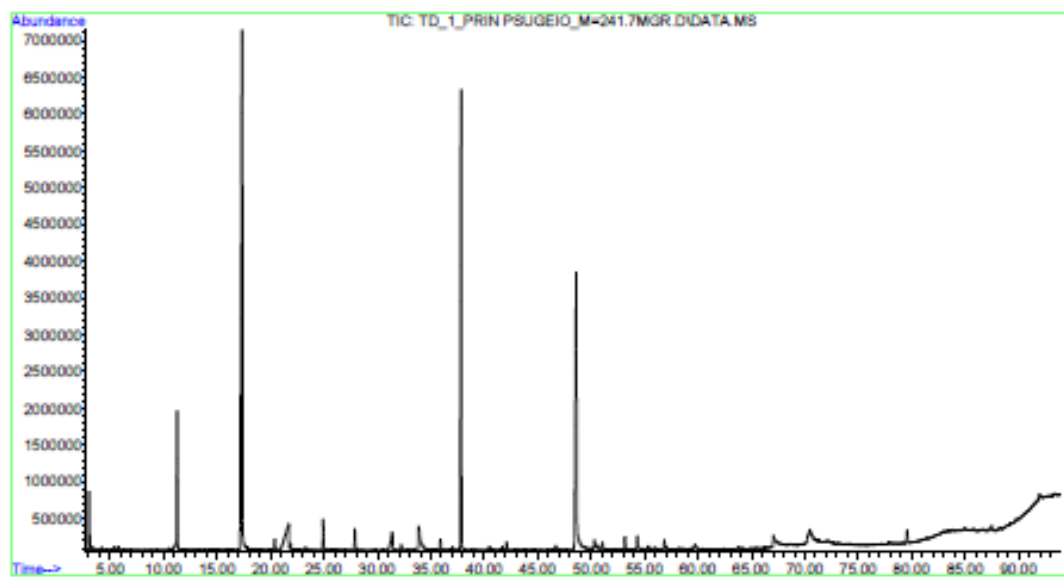
Εικόνα Π.15: Χρωματογράφημα της *M. pulcherrima* στο πείραμα 1.



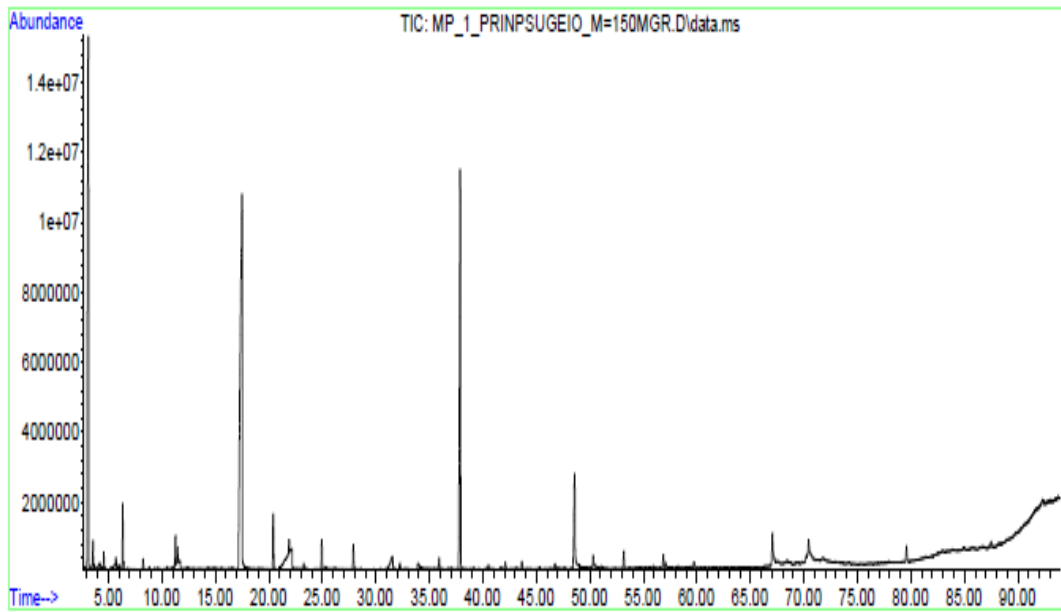
Εικόνα Π.16: Χρωματογράφημα της μικτής καλλιέργειας στο πείραμα 1.



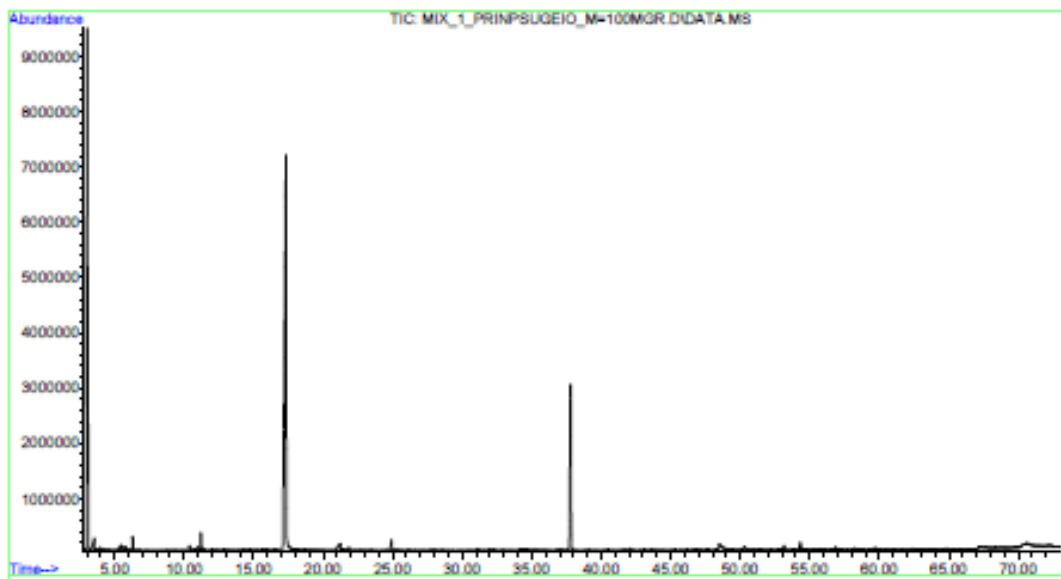
Εικόνα Π.17: Χρωματογράφημα του *S. cerevisiae* στο πείραμα 2.



Εικόνα Π.18: Χρωματογράφημα της *T. delbrueckii* στο πείραμα 2.



Εικόνα Π.19: Χρωματογράφημα της *M. pulcherrima* στο πείραμα 2.



Εικόνα Π.20: Χρωματογράφημα της μικτής καλλιέργειας στο πείραμα 2.