



Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu

mgr inż. Daria Cicha-Wojciechowicz

**Analiza związków aktywnych zapachowo kształtujących aromat
polskich miodów pitnych: wpływ surowca oraz procesów
fermentacji i dojrzewania.**

The analysis of odor-active compounds shaping the aroma of Polish meads:
the influence of the raw material and the fermentation and maturation
processes.

Rozprawa doktorska w dziedzinie nauk rolniczych
w dyscyplinie Technologii Żywności i Żywienia
Doctoral dissertation in the field of agricultural sciences
in the discipline of Nutrition and Food Technology

Promotor:

Prof. Dr hab. Małgorzata Anna Majcher

Pracownia Badania Związków Lotnych i
Aktywnych Sensorycznie, Katedra Technologii
Żywności Pochodzenia Roślinnego, Wydział
Nauk o Żywności i Żywieniu Uniwersytetu
Przyrodniczego w Poznaniu

Poznań, 2025

*Serdecznie dziękuję Pani Promotor, prof. dr hab.
Małgorzacie Majcher za danie mi szansy na realizację
marzenia, które nieśmiało towarzyszyło mi przez całe studia.
Dziękuję za ciągłą pomoc, dzielenie się doświadczeniem
i motywowanie zawsze wtedy, kiedy najbardziej było to
potrzebne. Bycie Pani doktorantką było ogromnym
zaszczytem i przyjemnością.*

*Ogromne podziękowania kieruję również do wszystkich
pracowników Pracowni Badania Związków Lotnych
i Aktywnych Sensorycznie oraz Pracowni Chemii
i Technologii Tłuszczów- za okazane mi wsparcie techniczne,
dzielenie się wiedzą i doświadczeniem, a także wspieranie
emocjonalne i podnoszenie na duchu.*

*Chciałabym również ogromnie podziękować koleżankom
i kolegom z pokoju doktorantów. Ta praca nigdy nie byłaby
tak przyjemna bez Was.*

*Dziękuję także doktorantom z dyscypliny Technologia
Żywności i Żywienia, którzy zawsze chętnie dzielili się
pomocą, pomagali mi pilnować wszystkich terminów
i wspierali zawsze, kiedy było to niezbędne.*

*Dziękuję również moim Rodzicom, bez których nie mogłabym
zrealizować tego marzenia. Wasza wiara we mnie i ciągle
wsparcie umożliwiło mi realizowanie wyznaczonych celów.*

*Ogromnie dziękuję również mojemu mężowi, który był moim
największym wsparciem, pomocą i motywacją w trakcie tej
drogi.*

Wykaz artykułów naukowych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

Prezentowana rozprawa doktorska omawia zagadnienia związane z identyfikacją oraz formowaniem związków aktywnych zapachowo w polskim tradycyjnym miodzie pitnym. Wyniki badań przedstawione w pracy tworzą cykl trzech publikacji:

1. Cicha-Wojciechowicz, D., Frank, S., Steinhaus, M., Majcher, M.A., 2024. Key Odorants Forming Aroma of Polish Mead: Influence of the Raw Material and Manufacturing Process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 72 (18), p. 10548-10557, <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.4c01276>,
2. Cicha-Wojciechowicz, D., Drabińska, N., Majcher, M.A., 2024. Influence of Honey Varieties, Fermentation Techniques and Production Process on Sensory Properties and Odor-Active Compounds in Meads. *Molecules*, 29 (24), <https://doi.org/10.3390/molecules29245913>
3. Cicha-Wojciechowicz, D., Kaczmarek, A., Juzwa, W., Drabińska, N., Majcher, M.A., Fermentation Strategies in Mead Production: A Multitechnique Approach to Volatile and Odor-active Compound Characterization.— publikacja załączona do cyklu jako manuskrypt wysłany do publikacji

Charakterystyka bibliometryczna artykułów składających się na rozprawę doktorską:

Publikacja	Czasopismo	Punkty MNSiW*	Współczynnik wpływu (IF)	Kwartyl	Udział doktorantki (%)
	<i>Journal of</i>				
Publikacja 1	<i>Agricultural and Food Chemistry</i>	140	5,7	Q1	70
Publikacja 2	<i>Molecules</i>	140	4,2	Q1	75
Publikacja 3	-	-	-	-	60
Suma		280	9,9	Średnia	68

*punkty MNSiW zgodne z rokiem opublikowania pracy

Źródła finansowania badań i opłat publikacyjnych

Wszystkie badania przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej były finansowane przez Narodowe Centrum Nauki, w ramach grantu Preludium Bis 1 o numerze UMO-2019/35/O/NZ9/00788.

Badania prezentowane w **Publikacji 1** częściowo realizowane były w trakcie 3-miesięcznego stażu zagranicznego w Leibniz Institute for Food Systems Biology at the Technical University of Munich we Fraisingu, który finansowany był przez Narodową Agencję Wymiany Akademickiej w ramach programu NAWA Preludium Bis 1 (numer umowy PPN/STA/2021/1/00032/U/00001).

Publikację 1 sfinansowano ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach Strategii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu w latach 2024-2026 w zakresie doskonalenia badań naukowych i prac rozwojowych w priorytetowych obszarach badawczych.

Spis treści

1. Wykaz skrótów	6
1.1. Skróty wykorzystane w rozprawie	6
1.2. Oznaczenia próbek oraz procesów produkcyjnych.....	7
2. Streszczenie w języku polskim.....	8
3. Streszczenie w języku angielskim.....	9
4. Wstęp	10
4.1. Miód pitny- charakterystyka produktu oraz opis procesu produkcji	10
4.2. Podejście sensomiczne w badaniach aromatu żywności.....	12
4.3. Uzasadnienie i charakterystyka problemu badawczego	16
5. Cel i zakres badań.....	19
6. Materiał i metody badawcze	21
7. Wyniki badań i ich interpretacja.....	27
7.1. Identyfikacja kluczowych związków zapachowych tworzących aromat miodu pitnego - wpływ surowca oraz procesu technologicznego	27
7.2. Wpływ odmiany miodu pszczelego, sposobów fermentacji i ogrzewania brzezki na właściwości sensoryczne oraz związki aktywne zapachowo w miodach pitnych....	32
7.3. Wyjaśnienie wpływu rodzaju fermentacji (spontanicznej i drożdżowej) na powstawanie związków aktywnych zapachowo oraz profil związków lotnych za pomocą analizy GC/MS i cytometrii przepływowej	37
8. Podsumowanie i wnioski.....	43
9. Spis literatury	47
10. Kopie prac wchodzących w skład zbioru.....	52
11. Oświadczenia doktoranta oraz współautorów dotyczące ich wkładu w przygotowanie artykułów naukowych.....	146

1. Wykaz skrótów

1.1. Skróty wykorzystane w rozprawie

AEDA (Aroma Extract Dilution Analysis)- analiza rozcieńczeń ekstraktu

DAP- fosforan dwuamonowy

FD Factor (Flavor Dilution Factor)- współczynnik rozcieńczenia zapachu

FID (Flame Ionization Detector)- detektor płomieniowo- jonizacyjny

GCxGC/MS- pełna dwuwymiarowa chromatografia gazowa ze spektrometrią mas

GC/MS- chromatografia gazowa ze spektrometrią mas

GCO- chromatografia gazowa z olfaktometrią

LLE (Liquid- Liquid Extraction) - ekstrakcja ciecz-ciecz

OAV (Odor Activity Value)- wartość aktywności aromatu

OTC (Odor Threshold Concentration)- stężenie progu wyczuwalności zapachu

PCA (Principal Component Analysis)- analiza głównych składowych

SAFE (Solvent Assisted Flavor Evaporation)- ekstrakcja związków lotnych
wspomagana rozpuszczalnikami

SPE (Solid Phase Extraction) – ekstrakcja do fazy stacjonarnej

SPME- Solid Phase Microextraction – mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej

1.2. Oznaczenia próbek oraz procesów produkcyjnych

ANS- miód pitny z miodu akacjowego, niesycony, fermentacja spontaniczna

ANSM- miód pitny z miodu akacjowego, niesycony, inokulacja pleśniami *Galactomyces Geotrichum*

ANY- miód pitny z miodu akacjowego, niesycony, inokulacja drożdżami *Saccharomyces cerevisiae*

ABY- miód pitny z miodu akacjowego, sycony, inokulacja drożdżami *Saccharomyces cerevisiae*

BNS- miód pitny z miodu gryczanego, niesycony, fermentacja spontaniczna

BNSM- miód pitny z miodu gryczanego, niesycony, inokulacja pleśniami *Galactomyces Geotrichum*

BNY- miód pitny z miodu gryczanego, niesycony, inokulacja drożdżami *Saccharomyces cerevisiae*

BBY- miód pitny z miodu gryczanego, sycony, inokulacja drożdżami *Saccharomyces cerevisiae*

TNS- miód pitny z miodu lipowego, niesycony, fermentacja spontaniczna

TNSM- miód pitny z miodu lipowego, niesycony, inokulacja pleśniami *Galactomyces Geotrichum*

TNY- miód pitny z miodu lipowego, niesycony, inokulacja drożdżami *Saccharomyces cerevisiae*

TBY- miód pitny z miodu lipowego, sycony, inokulacja drożdżami *Saccharomyces cerevisiae*

F1, F5, F10, F15, F30– pierwszy, piąty, dziesiąty, piętnasty i trzydziesty dzień fermentacji

M3, M6, M9, M12- trzeci, szósty, dziewiąty i dwunasty miesiąc dojrzewania

2. Streszczenie w języku polskim

Miód pitny to tradycyjny napój alkoholowy, powstający w wyniku fermentacji wodnego roztworu miodu pszczelego. Jego jakość organoleptyczna, w tym charakterystyczny aromat, jest determinowana przez szereg czynników, takich jak rodzaj surowca, szczep drożdży użyty do fermentacji oraz czas dojrzewania. Współczesnym standardem w badaniu związków zapachowych w żywności jest podejście sensomiczne, które dostarcza szczegółowej wiedzy na temat molekularnych podstaw aromatu produktów. Dotychczas metoda ta nie była stosowana do analizy miodu pitnego, co ograniczało pełne poznanie jego charakterystyki sensorycznej. W związku z powyższym głównym celem prezentowanych badań było zastosowanie podejścia sensomicznego w analizie aromatu miodu pitnego, które bada związki aktywne zapachowo na poziomie molekularnym i pozwala na identyfikację kluczowych związków zapachowych charakteryzujących jego aromat. Szczegółowa analiza zachowania tych związków, łącząca zarówno analizy celowane, jak i niecelowane, na każdym etapie produkcji wskazuje na możliwość wpływania na finalny aromat miodu pitnego za pomocą rodzaju surowca, ogrzewania brzezki, typu fermentacji czy czasu dojrzewania. W badaniach wyodrębniono 9 kluczowych związków zapachowych odpowiadających za aromat miodu pitnego typu trójniak, określono jego profil zapachowy oraz monitorowano zmiany stężeń związków zapachowych w czasie całego procesu produkcyjnego. W dalszym etapie przygotowano 12 modelowych miodów pitnych, różniących się odmianą miodu pszczelego (akacjowy, gryczany, lipowy), rodzajem fermentacji (spontaniczna, drożdżowa, inokulacja pleśniami *Galactomyces geotrichum*) oraz zastosowaniem ogrzewania brzezki. W każdej próbce określono istotne związki aktywne zapachowo i ich profile aromatyczne, co pozwoliło na ocenę wpływu poszczególnych zmiennych produkcyjnych na ostateczny charakter miodu pitnego. Największy wpływ na różnice w profilu zapachowym miała odmiana miodu pszczelego. Wykazano, że fermentacja spontaniczna prowadziła do zwiększonej produkcji związków z grupy zapachów owocowych i niepożądanych w porównaniu do fermentacji drożdżowej, natomiast miody pitne fermentowane z wykorzystaniem drożdży *Saccharomyces cerevisiae* cechowały się większą spójnością i przewidywalnością aromatu. Ponadto, w trakcie 12-miesięcznego okresu dojrzewania zaobserwowano znaczny spadek intensywności obu grup związków, co podkreśla istotną rolę tego procesu w kształtowaniu ostatecznego aromatu miodu pitnego.

Słowa kluczowe: związki aktywne zapachowo, chromatografia gazowa, olfaktometria, miód pitny

3. Streszczenie w języku angielskim

Mead is a traditional alcoholic beverage made by fermenting a water solution of bee honey. Its organoleptic quality, including its characteristic aroma, is determined by several factors such as the type of raw material, the strain of yeast used for fermentation, and the aging time. The contemporary standard in the study of odor compounds in food is the sensomic approach, which provides detailed knowledge about the molecular basis of product aromas. Until now, this method had not been applied to the analysis of mead, limiting the full understanding of its sensory characteristics. Therefore, the main aim of the presented research was to apply the sensomic approach in the analysis of mead aroma, which examines odor-active compounds at the molecular level and allows for the identification of key odor compounds characterizing its aroma. Detailed analysis of the behavior of these compounds, combining both targeted and untargeted analyses at each stage of production, indicates the possibility of influencing the final aroma of mead through the type of raw material, wort heating, type of fermentation, or aging time. The research identified 9 key odor compounds responsible for the aroma of trójniak-type mead, determined its odor profile, and monitored changes in the concentrations of odor compounds throughout the entire production process. In the next stage, 12 model meads were prepared, differing in the variety of bee honey (acacia, buckwheat, linden), type of fermentation (spontaneous, yeast, inoculation with *Galactomyces geotrichum* molds), and the use of wort heating. In each sample, significant odor-active compounds and their aromatic profiles were determined, allowing for the assessment of the impact of individual production variables on the final character of mead. The variety of bee honey had the greatest impact on differences in the odor profile. It was shown that spontaneous fermentation led to increased production of compounds from the fruity and undesirable odor groups compared to yeast fermentation, while meads fermented with *Saccharomyces cerevisiae* yeast were characterized by greater consistency and predictability of aroma. Additionally, during the 12-month aging period, a significant decrease in the intensity of both groups of compounds was observed, highlighting the important role of this process in shaping the final aroma of mead.

Key words: odor-active compounds, gas chromatography, olfactometry, mead

4. Wstęp

4.1. Miód pitny- charakterystyka produktu oraz opis procesu produkcji

Miód pitny to charakterystyczny napój alkoholowy znany dobrze na ziemiach polskich już od czasów średniowiecza. Pierwsze doniesienia dotyczące spożywania napojów alkoholowych przygotowanych na bazie miodu pszczelego sięgają nawet 7000 lat p.n.e. (Rasmussen, 2015). Jego największa popularność w Polsce przypada na okres średniowiecza, o czym świadczą częste wzmianki w wielu utworach literackich opowiadających o zwyczajach panujących wtedy na ziemiach polskich. W 2008 roku polskie miody pitne zostały zarejestrowane przez Komisję Europejską jako Gwarantowana Tradycyjna Specjalność. Według danych kolekcjonowanych przez Fortune Business Insights wartość rynku miódów pitnych w roku 2023 w Europie wyniósł nieco ponad 222 miliony dolarów i w najbliższych latach będzie wykazywał stały wzrost (Fortune Business Insights, 2024).

Technologia wytwarzania miodu pitnego opiera się na fermentacji alkoholowej miodu pszczelego zmieszanego z wodą w odpowiednich proporcjach. Miody pitne są cenione za swój charakterystyczny i bogaty aromat, a rosnące grono koneserów przyczynia się do wzrostu zainteresowania tym szlachetnym trunkiem zarówno w kraju, jak i za granicą. Do ich produkcji najczęściej stosuje się miód wielokwiatowy, a dla zwiększenia asortymentu często dodaje się zioła, przyprawy lub owoce, a także zastępuje część wody w brzeczce sokiem owocowym. W Polsce tradycyjnym podziałem miódów pitnych jest ten oparty na proporcjach miodu pszczelego i wody zastosowanych w procesie produkcyjnym. W podziale tym wyróżnia się półtoraki, w których stosunek objętości miodu do wody wynosi 1:0,5, dwójniaki, gdzie stosunek ten wynosi 1:1, trójniaki ze stosunkiem 1:2 oraz czwórniaki, w których udział miodu pszczelego jest najmniejszy i wynosi 1:3 (Czabaj i in., 2016). Kolejnym podziałem stosowanym w produkcji tego tradycyjnego trunku jest podział na miody sycone (gdzie brzeczka gotowana jest od kilkunastu do kilkudziesięciu minut) oraz niesycone, w których ten etap jest pomijany. W zależności od zastosowanych podczas produkcji dodatków miody pitne można podzielić również na miody pitne tradycyjne (przygotowane tylko z udziałem wody i miodu), pymenty (z udziałem winogron lub soku

winogronowego), cysery (z dodatkiem jabłek lub soku jabłkowego) czy methegliny, które zawierają dodatek różnego rodzaju przypraw.

Podstawowymi surowcami niezbędnymi do produkcji miodu pitnego są miód pszczeli oraz woda. Proces przygotowania brzezki miodowej polega na zmieszaniu określonej ilości miodu z wodą, a następnie poddaniu jej procesowi sycenia tj. gotowania brzezki z jednoczesnym usuwaniem powstającej piany. Proces ten nie jest jednak konieczny i coraz częściej w sprzedaży można spotkać miody pitne niesycone. Przygotowaną wcześniej brzezkę zaszczenia się drożdżami, najczęściej *Saccharomyces cerevisiae*, które odpowiadają za fermentację i produkcję etanolu. W celu optymalizacji procesu fermentacji często stosuje się dodatki, takie jak fosforan dwuamonowy oraz kompleksowe pożywki drożdżowe, zawierające m.in. komponenty ścian komórkowych drożdży oraz witaminę B1. Czas fermentacji zależy od rodzaju miodu pitnego i może wynosić od kilkunastu dni do kilku tygodni. Po zakończeniu tego etapu kluczową rolę w kształtowaniu jakości finalnego produktu odgrywa proces dojrzewania, który jest najbardziej czasochłonną fazą produkcji. Okres dojrzewania może trwać od kilku miesięcy do kilku lat, przy czym im wyższa jest zawartość miodu w stosunku do wody, tym dłuższy jest czas jego dojrzewania. W trakcie tego procesu zachodzą istotne zmiany chemiczne, takie jak wzrost stężenia glicerolu i etanolu (Czabaj i in., 2016). W przeszłości, aby poprawić zapach i smak miodów pitnych, często dodawano do nich zioła, owoce lub przyprawy. Obecnie, dzięki dynamicznemu rozwojowi miodosytnictwa i wzrostowi liczby miodosytni, rośnie zainteresowanie produkcją miodów pitnych bez dodatków. Miód pitny, wytwarzany wyłącznie z miodu pszczelego, pozwala skupić się na unikalnym charakterze surowca. Dzięki popularyzacji wiedzy na temat produkcji i poprawy jakości miodów pitnych, tradycyjne miody pitne zachowują wyjątkowy charakter miodu pszczelego, jednocześnie pozwalając na pełniejsze wydobycie jego walorów.

4.2. Podejście sensomiczne w badaniach aromatu żywności

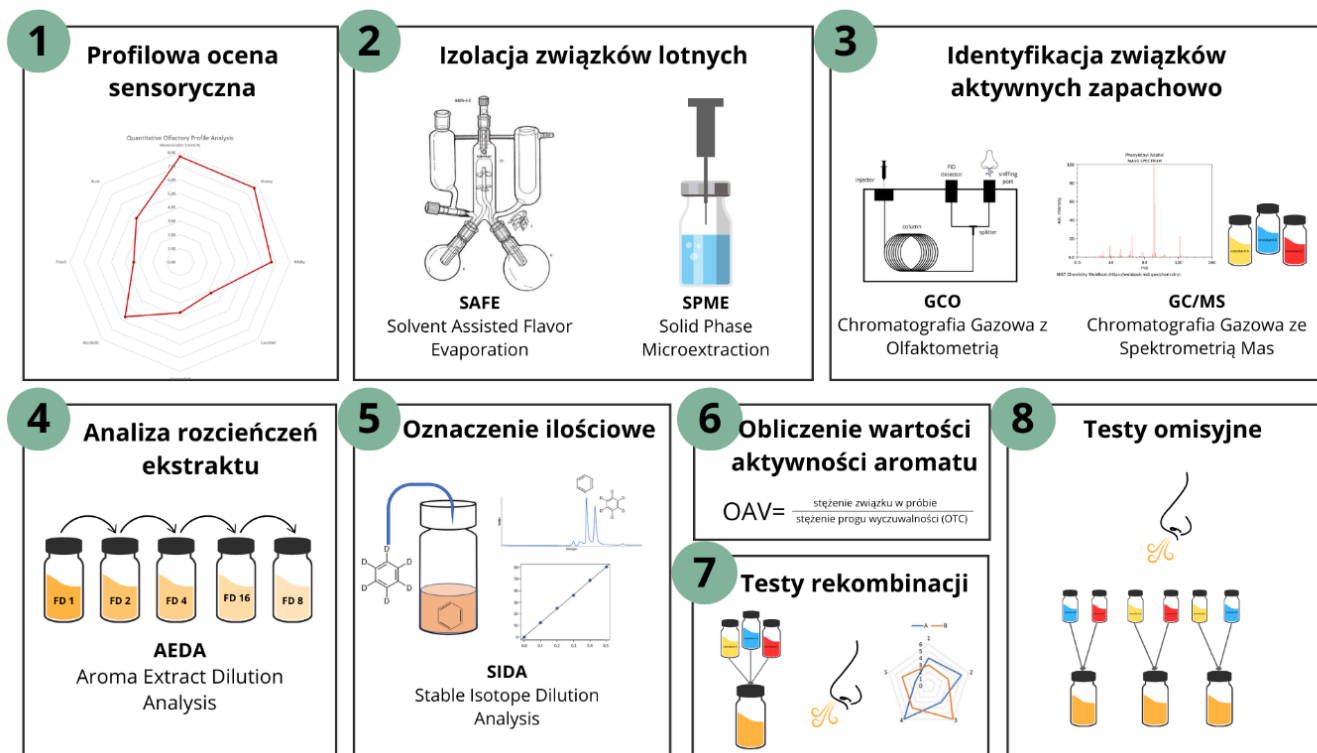
Chromatografia gazowa, najczęściej sprzężona ze spektrometrią mas, stanowi podstawową metodę badania związków lotnych występujących w żywności. Technika ta umożliwia precyzyjną identyfikację związków lotnych obecnych w analizowanym materiale i jest szeroko wykorzystywana, zwłaszcza w połączeniu z analizą niecelowaną, do określania profilu zapachowego produktów spożywczych. Należy jednak podkreślić, że analiza ta nie pozwala na pełne odzwierciedlenie rzeczywistego aromatu żywności, który wynika ze złożonej interakcji wielu substancji zapachowo aktywnych, często występujących w śladowych ilościach. Zastosowanie analizy niecelowanej może prowadzić do pominięcia marginalnych związków lotnych, które – mimo niskiego stężenia – mogą mieć istotne znaczenie dla percepcji finalnego aromatu produktu. Szacuje się, że spośród około 10 000 znanych związków lotnych mniej niż 3% wykazuje zdolność do oddziaływania z receptorami węchowymi człowieka (Dunkel i in., 2014). Wiele z tych związków wykazuje zdolność do wpływania na aromat produktu nawet przy stężeniach sięgających kilku nano czy mikrogramów, co sprawia, że są one wyjątkowo trudne w identyfikacji, szczególnie jeśli opiera się ona jedynie na analizie niecelowanej. Co więcej, badania psychofizyczne wykazały, że percepcja mieszanin substancji zapachowych nie jest jedynie sumą odbioru poszczególnych składników – każdy ze zidentyfikowanych związków może odgrywać kluczową rolę w kształtowaniu końcowego wrażenia zapachowego (Laing, 1994). Konieczność opracowania metody analitycznej o wyższej dokładności i precyzji w zakresie oceny aromatu doprowadziła do powstania tzw. podejścia sensomicznego, wykorzystującego zaawansowane techniki analityczne do kompleksowej oceny zapachu jego percepcji. Podejście sensomiczne zostało opracowane w latach 90. XX wieku przez prof. Petera Schieberle i prof. Thomasa Hofmanna i ich zespół na Uniwersytecie Technicznym w Monachium, w Niemczech. Głównym celem sensomiki było połączenie zaawansowanej analizy chemicznej z oceną sensoryczną, aby lepiej zrozumieć, które lotne związki zapachowe mają kluczowy wpływ na percepcję aromatu i smaku w różnych produktach. Od tej pory podejście to stało się szeroko stosowane w analizie aromatu żywności i uważane jest za jedno z najprecyzyjniejszych w tej dziedzinie (Schieberle & Hofmann, 2011). Według tego podejścia pełne określenie kluczowych związków odpowiedzialnych za aromat produktów spożywczych wymaga zastosowania następujących metod badawczych:

1. Profilowa ocena sensoryczna produktu, która dostarcza szczegółowych informacji na temat charakterystyki aromatu produktu poprzez określenie rodzaju, intensywności i jakości poszczególnych nut zapachowych. Analiza ta powinna być podstawą dalszych badań nad aromatem produktu i wskazywać obszary zapachowe, które dominują w aromacie.
2. Izolacja związków lotnych, do której wykorzystuje się metody takie jak SAFE (Solvent Assisted Flavor Evaporation), SPME (Solid Phase Microextraction), purge-and-trap, LLE (ekstrakcja ciecz-ciecz) czy SPE (Solid Phase Extraction), które powinny być dobrane w oparciu o charakter badanej próby.
3. Chromatografia gazowa połączona z olfaktometrią (GC-O) polega na wążaniu eluatu z kolumny chromatograficznej przez wyszkolonego oceniającego, który identyfikuje i ocenia intensywność oraz charakter zapachu poszczególnych lotnych związków zapachowych, wcześniej rozdzielonych metodą chromatografii gazowej. Dzięki połączeniu analizy instrumentalnej z percepcją sensoryczną człowieka metoda ta pozwala określić, które związki lotne są aktywne zapachowo i istotne dla ludzkich doznań węchowych. Podczas gdy GC-MS umożliwia wykrycie i ilościowe oznaczenie związków lotnych, tylko GC-O pozwala wskazać, które z nich rzeczywiście wpływają na odbiór aromatu.
4. Analiza rozcieńczeń ekstraktu- analiza AEDA (Aroma Extract Dilution Analysis), z wyznaczeniem współczynników rozcieńczenia aromatu (FD Factor, Flavor Dilution Factor). Współczynnik ten przyjmuje wartość najwyższego rozcieńczenia ekstraktu, w którym dany związek nadal był odczuwalny w analizie GCO i jest wyznaczany dla każdego zidentyfikowanego związku. Wysokość współczynnika rozcieńczenia informuje o tym, jaki jest potencjał danego związku do budowania finalnego aromatu produktu.
5. Oznaczenie ilościowe zidentyfikowanych związków aktywnych zapachowo. Precyzyjne oznaczenie ilościowe związków aktywnych zapachowo możliwe jest m.in. dzięki metodom wykorzystującym standardy znakowane stabilnymi izotopami, takim jak metoda SIDA (Stable Isotope Dilution Analysis). SIDA jest szczególnie polecana w analizie żywności, ponieważ pozwala na dokładne, selektywne i wiarygodne oznaczenie stężeń, eliminując wpływ matrycy żywności oraz zmienności procesu

ekstrakcji i analizy, co czyni ją jedną z najbardziej precyzyjnych metod ilościowych w badaniach związków zapachowych.

6. Obliczeniu wartości aktywności aromatu (OAV), wskaźnika określającego, na ile dany związek zapachowy przyczynia się do kształtowania aromatu produktu. Obliczenie OAV, czyli stosunku stężenia danego związku do jego progu wyczuwalności zapachowej, wskazuje, które związki mają największy potencjał do kształtowania aromatu. Przyjmuje się, że związki o $OAV > 1$ realnie wpływają na kształtowanie aromatu, a im wyższa wartość OAV, tym większy wpływ danego związku na zapach produktu.
7. Eksperymenty rekombinacyjne polegają na zmieszaniu wybranych związków w odpowiednich proporcjach, ustalonych na podstawie wcześniej określonych stężeń, i porównaniu ich z oryginalnym produktem. Pozwalają one zweryfikować, czy zestawienie tych substancji dokładnie odtwarza autentyczny aromat, a także sprawdzić, czy identyfikacja oraz analiza ilościowa zostały przeprowadzone poprawnie..
8. Eksperymentów omisyjnych, polegających na przygotowaniu wielu rekombinatów aromatu, z pominięciem jednego z wyznaczonych związków zapachowych w każdej kolejnej mieszaninie pozwala na określenie, które ze związków o wysokim OAV mają kluczowe znaczenie dla finalnego aromatu wynikające z odpowiednio wysokiego stężenia danego związku lub interakcji, do których dochodzi pomiędzy związkami obecnymi w mieszaninie. Testy omisyjne przeprowadzane są z wykorzystaniem oceny trójkątowej, a szacowanie istotności danego związku polega na porównaniu liczby prawidłowych identyfikacji identycznych par do liczby wszystkich wykonanych ocen dla mieszaniny, w której został on pominięty. Dzięki zastosowaniu tej analizy istnieje możliwość weryfikacji i prawidłowej oceny istotności każdego związku zidentyfikowanego w produkcie. Analiza ta jest niezwykle istotna dla prawidłowego wnioskowania, ponieważ część związków pomimo stosunkowo wysokiej wartości OAV wcale nie wykazuje istotności w kwestii finalnego aromatu produktu.

Pełną procedurę określającą kluczowe związki zapachowe ukazano na Rysunku 1.



Rysunek 1. Schemat przeprowadzanych analiz w wyznaczaniu kluczowych związków zapachowych przy użyciu podejścia sensomicznego [opracowanie własne na podstawie Dunkel i in., 2014].

Wiele badań wskazuje, że podejście sensomiczne jest obecnie najlepszym narzędziem do pełnego rozszyfrowania aromatu produktów spożywczych. Jednym z faktów potwierdzających tę tezę jest praca przeglądowa autorstwa Dunkela i in. (2014), która podsumowuje badania dotyczące wykorzystania chromatografii gazowej połączonej z olfaktometrią (GC-O), obliczania wartości aktywności aromatu (OAV) oraz eksperymentów rekombinacyjnych i omisyjnych w analizie aromatu. Podejście to pozwala na kompleksowe zrozumienie zarówno chemicznych, jak i sensorycznych aspektów percepcji aromatu żywności.

Przeprowadzenie tak szczegółowej analizy z wykorzystaniem różnych metod analitycznych jest niezbędne do identyfikacji związków zapachowych kluczowych dla danego produktu. Pominięcie każdego z wymienionych etapów może skutkować uzyskaniem niepełnych informacji dotyczących aromatu żywności oraz jego składowych. Jednak ze względu na szeroki zakres wymaganych badań oraz ich dużą czasochłonność technika ta nie była dotychczas w pełni zastosowana w analizie profilu zapachowego miódów pitnych. Znacznie częściej wykorzystywana jest niecelowana analiza profilu

związków lotnych, która jest analizą mniej czasochłonną. Takie podejście może jednak prowadzić do pominięcia istotnych składników aromatu, zwłaszcza tych trudnych do identyfikacji, np. ze względu na ich niską stabilność w wysokich temperaturach lub stężenie poniżej progu detekcji stosowanych urządzeń. Z tego powodu analiza oparta na podejściu sensomicznym stała się obecnie „złotym standardem” w badaniu kluczowych związków zapachowych. Interesującym kierunkiem badawczym jest jednak integracja danych sensomicznych z wynikami niecelowanej analizy związków lotnych. Takie połączenie może dostarczyć bardziej szczegółowych informacji na temat badanego produktu, szczególnie w kontekście zmian zachodzących podczas jego procesu produkcyjnego.

4.3. Uzasadnienie i charakterystyka problemu badawczego

Zapach jest jednym z kluczowych atrybutów ocenianych przez konsumentów podczas wyboru i akceptacji produktu spożywczego, dlatego stanowi przedmiot badań nie tylko technologów żywności, ale także neuropsychologów i psychologów. Badania nad związkami zapachowymi są istotne dla producentów żywności, którzy, aby sprostać wymaganiom konsumentów, muszą tworzyć produkty o wysokiej jakości, kontrolowanej na każdym etapie produkcji i przechowywania. Dzięki badaniom nad związkami zapachowymi możliwe jest nie tylko lepsze zrozumienie mechanizmów kształtujących aromat, ale także sterowanie procesem technologicznym w taki sposób, aby uzyskać produkt o określonym profilu zapachowym. Poznanie związków odpowiedzialnych za zapach żywności oraz wpływu poszczególnych zabiegów technologicznych na ich powstawanie pozwala na lepszą kontrolę procesu produkcyjnego i uzyskanie produktu, który w pełni spełnia wymagania konsumentów. Na końcowy aromat miodu pitnego może wpływać wiele czynników, takich jak zastosowany rodzaj miodu pszczelego, zastosowane dodatki czy wykorzystanie różnych procesów produkcyjnych. Li i Sun wykazali różnice w profilu związków lotnych w miodach pitnych przygotowanych na bazie miodów wielokwiatowych i akacjowych, szczególnie w stężeniach alkoholi i estrów (Li & Sun, 2019). Z kolei Wintersteen i in. zauważyli różnice w profilu związków lotnych w miodach pitnych gryczanych, które przygotowywane były poprzez podgrzewanie brzezki w niższych (60°C) i wysokich (100°C) temperaturach. Badania te wykazały wzrost stężenia p-krezolu o nieprzyjemnym, fekalnym zapachu, wywołane podgrzewaniem brzezki miodowej (Wintersteen i in., 2005). Kolejny ważny czynnik, jaki stanowi rodzaj użytych w procesie fermentacji mikroorganizmów badany był

w kontekście profilu związków lotnych. Schwarz i in. zastosowali 5 szczepów drożdży *Saccharomyces cerevisiae* o niskim zapotrzebowaniu na azot i zauważyli istotne różnice w profilach związków lotnych między miodami pitnymi fermentowanymi przy użyciu tych szczepów (Schwarz i in., 2020). Wyniki uzyskane przez Bénes i in. potwierdziły również związek między różnymi szczepami drożdży a składem lotnych związków w miodzie pitnym w przypadku *S. cerevisiae* var. *bayanus* (Bénes i in., 2015). Zagadnienie badania aromatu miodu pitnego z wykorzystaniem technik stosowanych w podejściu sensomicznym nie cieszyło się do tej pory dużym zainteresowaniem wśród naukowców. Najbliżej pełnej analizy sensomicznej byli Starowicz i Granvogl, którzy zastosowali analizę olfaktometryczną do identyfikacji substancji zapachowych w dwóch rodzajach miodów pitnych (z gotowaniem i bez gotowania brzezki) a także obliczyli OAV zidentyfikowanych związków zapachowych. W badaniach tych nie przeprowadzono jednak eksperymentów rekombinacyjnych oraz testów omisyjnych, co uniemożliwiło wyciągnięcie pełnych wniosków dotyczących kluczowych dla aromatu badanego miodu pitnego związków zapachowych (Starowicz & Granvogl, 2022). Pełne poznanie charakterystyki związków chemicznych odpowiedzialnych za zapach produktu pozwala na lepsze zrozumienie zmian zachodzących w trakcie jego produkcji, a także na polepszenie jakości produktu gotowego. W trakcie produkcji miodu pitnego możliwe jest zastosowanie wielu zmiennych (takich jak rodzaj miodu pszczelego, ogrzewanie brzezki, rodzaj fermentacji czy czas dojrzewania), które mogą prowadzić do formowania charakterystycznych związków aktywnych zapachowo. Poznanie wagi wpływu poszczególnych zmiennych produkcyjnych na aromat produktu gotowego pozwoli na lepsze zaplanowanie produkcji, poprawę jakości wyrobu, a także może doprowadzić do powstawania nowych produktów o niespotykanych dotychczas właściwościach.

Dogłębna analiza aromatu tego napoju alkoholowego, która jest przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej oparta na podejściu sensomicznym pozwoliła zarówno na określenie kluczowych związków zapachowych odpowiadających za jego charakterystyczny aromat, a także na określenie etapu ich powstawania podczas procesu produkcyjnego. Zaawansowane metody analityczne pozwalające na precyzyjne określenie zmian związków zapachowych na poziomie molekularnym połączone zostały ze szczegółową analizą sensoryczną produktu, która jest kluczowym aspektem badań nad jakością napojów alkoholowych. Badania te wypełniają istniejącą lukę w wiedzy naukowej, a także dostarczają podstawowych informacji na temat jednego z najstarszych napojów alkoholowych spożywanych zarówno w Polsce jak i na całym świecie. Dodatkowo

przeprowadzenie szczegółowych badań na każdym etapie produkcji pozwoliło na lepsze poznanie procesów zachodzących w produkcji podczas jego wytwarzania, a także pozwoliło na określenie wagi poszczególnych parametrów produkcyjnych na jakość sensoryczną wyrobu. Dlatego wiedza ta jest również niezwykle cenna z punktu widzenia miodosytników, którzy dzięki jej wykorzystaniu będą mogli lepiej zaplanować procesy produkcyjne oraz łatwiej nadzorować jakość miodu pitnego.

5. Cel i zakres badań

Głównym celem rozprawy doktorskiej była identyfikacja kluczowych związków zapachowych kształtujących aromat polskich tradycyjnych miodów pitnych, a także określenie wpływu surowca oraz procesów fermentacji i dojrzewania na ich powstawanie.

W trakcie prowadzonych badań wyróżnione zostały następujące cele szczegółowe:

1. Identyfikacja kluczowych związków zapachowych odpowiedzialnych za aromat miodu pitnego typu trójniak przy zastosowaniu podejścia sensomicznego, korelacja z profilem zapachowym oraz określenie zmian stężenia tych związków w trakcie produkcji.
2. Przeprowadzenie badań modelowych polegających na przygotowaniu 12 wariantów miodów pitnych w celu ustalenia wpływu odmiany miodu pszczelego, ogrzewania brzezki, trzech rodzajów fermentacji: spontanicznej, drożdżowej i z dodatkiem pleśni *Galactomyces geotrichum*, oraz etapu dojrzewania na profil zapachowy oraz zmiany zawartości kluczowych związków zapachowych.
3. Wykorzystanie zaawansowanych metod statystycznych do analizy wyników uzyskanych w badaniach modelowych, co umożliwi producentom miodów pitnych optymalizację procesów produkcyjnych i uzyskanie produktów o pożądanym profilu zapachowym.

Wyszczególnione cele badawcze pozwoliły na sformułowanie poniższych hipotez badawczych:

Hipoteza główna: Zastosowanie podejścia sensomicznego, które bada związki aktywne zapachowo na poziomie molekularnym, pozwala na identyfikację kluczowych związków zapachowych charakteryzujących aromat miodu pitnego. Szczegółowa analiza zachowania tych związków, łącząca zarówno analizy celowane, jak i niecelowane, na każdym etapie produkcji wskazuje na możliwość wpływania na finalny aromat miodu pitnego za pomocą rodzaju surowca, ogrzewania brzezki, typu fermentacji czy czasu dojrzewania.

Hipotezy szczegółowe:

- H1.** Związki zapachowe wykryte w miodzie pitnym typu trójniak, o wysokich wartościach OAV, mają kluczowy wpływ na jego charakterystyczny aromat, a ich stężenie zmienia się w trakcie procesu produkcji, w tym podczas fermentacji i dojrzewania.
- H2.** Różne odmiany miodu pszczelego, różne metody ogrzewania brzezki oraz rodzaje fermentacji (spontaniczna, drożdżowa, z dodatkiem pleśni *Galactomyces geotrichum*) wpływają na profil zapachowy miodu pitnego oraz na stężenie kluczowych związków zapachowych.
- H3.** Zastosowanie zaawansowanych metod statystycznych do analizy wyników uzyskanych w badaniach modelowych pozwala na identyfikację kluczowych czynników wpływających na profil zapachowy miodów pitnych, co umożliwia producentom optymalizację procesów produkcyjnych w celu uzyskania produktów o pożądanym cechach sensorycznych.

6. Materiał i metody badawcze

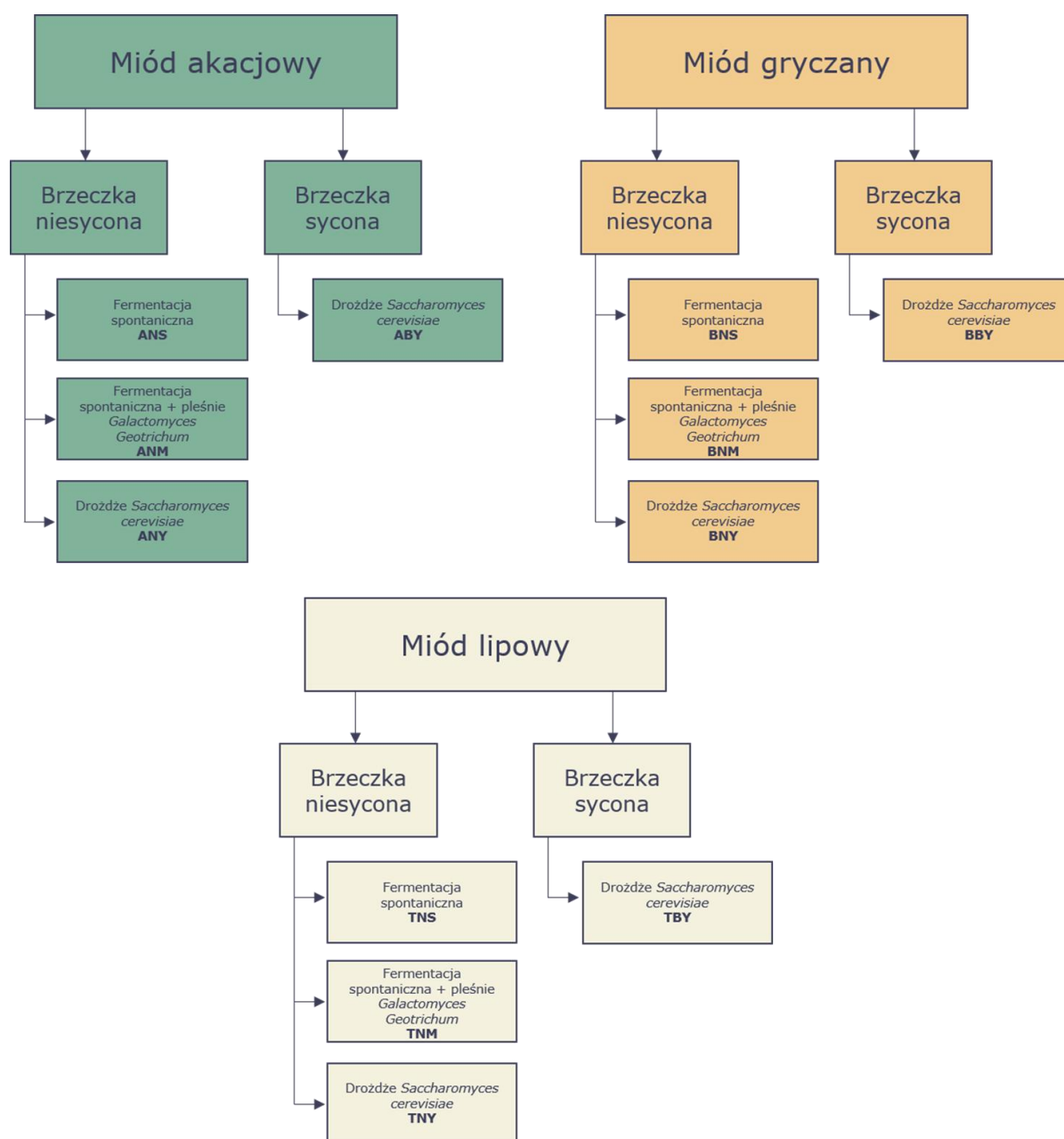
Materiał badawczy poddany badaniom stanowił:

1. miód pitny typu trójniak "Wczesny" (pokazany na zdjęciu 1) pochodzący od producenta (Augustowska Miodosytnia, Augustów, Polska), próbki miodu pszczelego z którego został przygotowany oraz próbki miodu pitnego pobierane na etapie produkcji (brzezka po syceniu, 1 dzień fermentacji, 30 dzień fermentacji). Próbki pobierane były bezpośrednio z linii produkcyjnej i natychmiast zamrażane, a następnie przechowywane w zamrażarce w -20°C aż do czasu analizy. Próbki miodu pszczelego oraz gotowy miód pitny przechowywane były w szczelnie zamkniętych pojemnikach, w temperaturze 4°C aż do momentu analizy. Materiał badawczy pochodzący z tej części eksperymentu wykorzystany został do przeprowadzenia analiz zaprezentowanych w publikacji 1 (**Publikacja 1**).



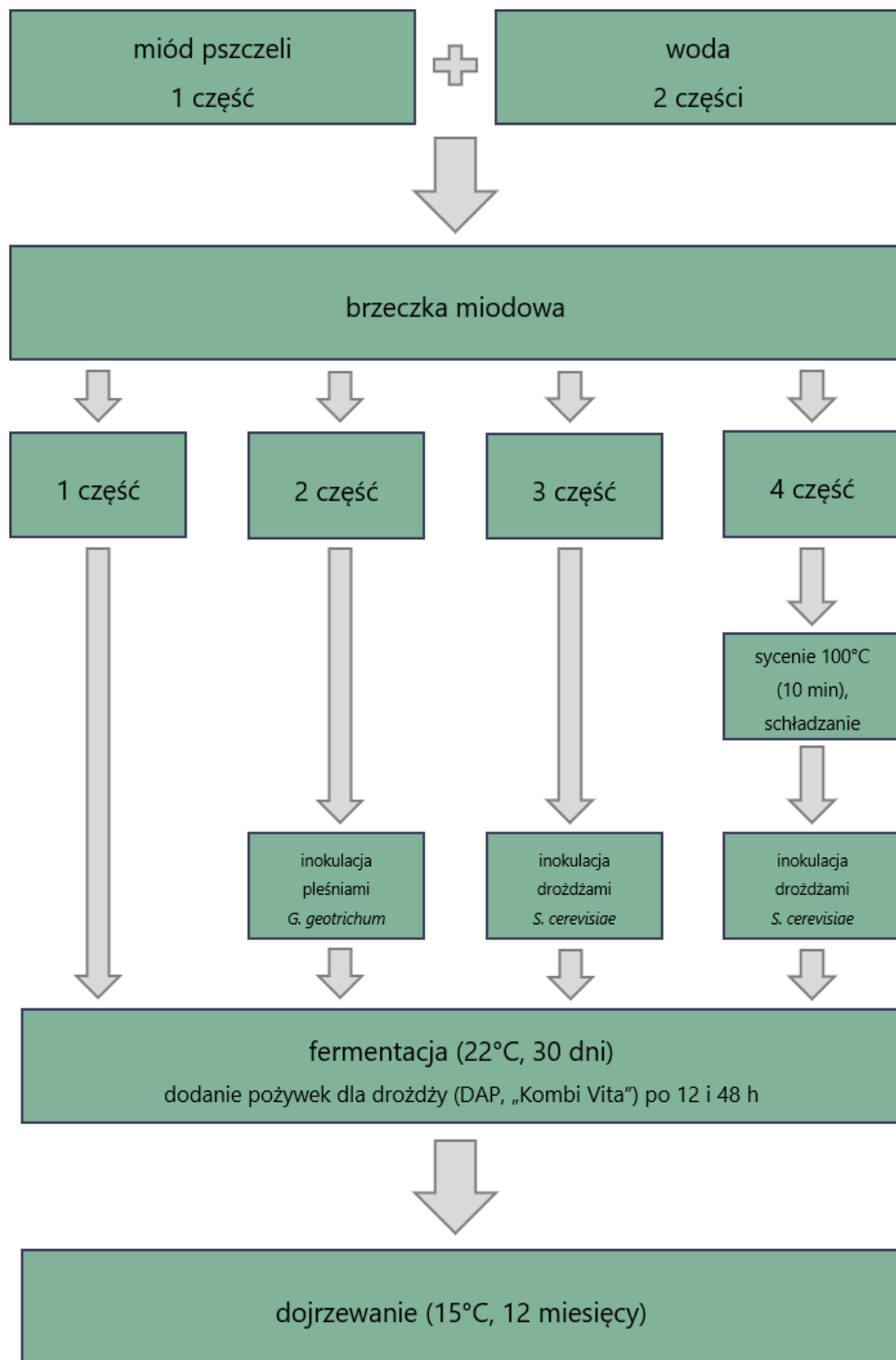
Zdjęcie 1. Miód pitny typu trójniak [fotografia własna].

2. miód pszczele odmianowy: akacjowy, gryczany zakupiony w pasiece Miody Szlaku Piastowskiego (Biskupice, woj. wielkopolskie) oraz lipowy zakupiony w pasiece Pasieki Rodziny Sadowskich (Biała, woj. mazowieckie, Polska). Dla potwierdzenia odmianowości miodów zlecona została analiza pyłkowa w Laboratorium Badania Jakości Produktów Pszczelich Instytutu Ogrodnictwa - Państwowego Instytutu Badawczego- Zakład Pszczelnictwa W Puławach (Puławy, Polska). Badanie zostało przeprowadzone zgodnie z Polską Normą PN-88/A-77626 “Miód pszczele”. Materiał stanowiły również próbki pobierane z modelowych nastawów miodów pitnych typu trójniak przygotowanych w 12 różnych wariantach (przedstawionych na Rysunku 2).



Rysunek 2. Schemat przygotowania modelowych miodów pitnych [opracowanie własne].

Każdy z 12 wariantów przygotowany został na bazie jednego z trzech miodów pszczelich odmianowych (akacjowy, gryczany, lipowy), z wykorzystaniem procesu sycenia brzezki lub z jego pominięciem i z zastosowaniem jednego z trzech wariantów fermentacji (fermentacja spontaniczna, zaszczerpienie pleśniami *Galactomyces Geotrichum* lub zaszczerpienie drożdżami *Saccharomyces cerevisiae*). Próbkę pobierano były podczas procesu produkcyjnego (brzezka, 1, 5, 10, 15, 30 dzień fermentacji, 3, 6, 9 miesiąc dojrzewania). Próbkę pochodzącą z procesu produkcyjnego pobierano zostały w czyste pojemniki typu Falcon i natychmiast mrożone, a następnie przechowywane w zamrażarce w -20°C aż do czasu analizy. Próbkę miodu pszczelego oraz gotowy miód pitny przechowywane były w szczelnie zamkniętych pojemnikach, w temperaturze 4°C aż do momentu analizy. Do procesu fermentacji wykorzystano komercyjne drożdże *Sachcharomyces cerevisiae* BC s103 (Fermentis, Lesaffre, Francja), które zostały przygotowane zgodnie z instrukcją producenta, liofilizowane pleśnie *Galactomyces Geotrichum* wyizolowane wcześniej z wielkopolskiego sera smażonego (liofilizat przygotowany w ramach badań (Szudera-Konćzał i in., 2020)) oraz pożywki winiarskie: fosforan dwuamonowy (DAP) oraz „Kombi Vita” (Browin, Polska). Schemat prowadzonego procesu produkcyjnego został pokazany na Rysunku 3. Materiał badawczy pochodzący z tej części eksperymentu wykorzystany został do przeprowadzenia analiz zaprezentowanych w publikacjach 2 i 3 (**Publikacja 2, Publikacja 3**).



Rysunek 3. Schemat produkcyjny modelowych miodów pitnych [opracowanie własne].

Zastosowane metody badawcze obejmowały:

1. Ekstrakcję związków lotnych z materiału badawczego (gotowe miody pitne, próbki pochodzące z procesów produkcyjnych, miód pszczeli, 12 wariantów miodów modelowych) przy użyciu ekstrakcji Solvent Assisted Flavor Evaporation (SAFE) (**Publikacja 1, Publikacja 2**).
2. Ekstrakcję związków lotnych z materiału badawczego (gotowe miody pitne, próbki pochodzące z procesów produkcyjnych, miód pszczeli) przy użyciu metody Solid Phase Microextraction (SPME) (**Publikacja 2, Publikacja 3**).
3. Identyfikację związków aktywnych zapachowo z materiału badawczego (gotowe miody pitne od producenta oraz 12 miodów modelowych) przy zastosowaniu chromatografii gazowej z olfaktometrią (GCO) oraz detektora płomieniowo- jonizacyjnego (FID) oraz chromatografii gazowej ze spektrometrią mas (GC/MS) i dwuwymiarowej chromatografii gazowej ze spektrometrią mas (GCxGC/MS) (**Publikacja 1, Publikacja 2**)
4. Oznaczenie stężenia związków aktywnych zapachowo z materiału badawczego (gotowe miody pitne od producenta oraz z 12 miodów modelowych, próbki pochodzące z procesów produkcyjnych, miód pszczeli) przy wykorzystaniu chromatografii gazowej ze spektrometrią mas (GC/MS) i dwuwymiarowej chromatografii gazowej ze spektrometrią mas (GCxGC/MS) oraz metod ilościowych wykorzystujących standardy znakowane izotopowo oraz metody półilościowe (**Publikacja 1, Publikacja 2, Publikacja 3**).
5. Przeprowadzenie profilowej oceny sensorycznej (Quantitative Sensory Profile Analysis) gotowych miodów pitnych (miód pitny typu trójniak „Wczesny” (Augustowska Miodosytnia) oraz 12 modelowych miodów pitnych (**Publikacja 1, Publikacja 2**).
6. Przeprowadzenie testów omisyjnych służących do wyłonienia kluczowych związków aktywnych zapachowo w miodzie pitnym typu trójniak „Wczesny” (Augustowska Miodosytnia) metodą trójkątową (**Publikacja 1**).
7. Oznaczenie stężeń cukrów (fruktoza i glukoza), glicerolu oraz mio-inozytolu w próbkach miodu pitnego oraz próbkach pochodzących z procesów produkcyjnych z zastosowaniem chromatografii gazowej ze spektrometrią mas (GC/MS) (**Publikacja 3**).

8. Określenie stosunku grup drobnoustrojów (drożdże i bakterie) odpowiedzialnych za proces fermentacji wybranych miodów modelowych przy wykorzystaniu cytometrii przepływowej (**Publikacja 3**).
9. Przeprowadzenie niecelowanej analizy związków lotnych i aktywnych zapachowo w wybranych modelowych miodach pitnych oraz próbkach pochodzących z procesów produkcyjnych z wykorzystaniem dwuwymiarowej chromatografii gazowej ze spektrometrią mas (GCxGC/MS) (**Publikacja 3**).
10. Analiza uzyskanych danych z użyciem odpowiednich narzędzi statystycznych: jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA), testu współczynnika korelacji Pearsona, analizy głównych składowych (PCA), analizy klastrowania hierarchicznego oraz częściowej analizy dyskryminacyjnej najmniejszych kwadratów (PLS-DA). Analizy statystyczne przeprowadzane były w programach Statistica, SIMCA oraz Python. (**Publikacja 1, Publikacja 2, Publikacja 3**).

7. Wyniki badań i ich interpretacja

7.1. Identyfikacja kluczowych związków zapachowych tworzących aromat miodu pitnego - wpływ surowca oraz procesu technologicznego

Aby poznać kluczowe związki aktywne zapachowo, które kształtują aromat miodu pitnego przeprowadzono szczegółową analizę związków zapachowych z wykorzystaniem podejścia sensomicznego. W pierwszym etapie, w celu odróżnienia związków zapachowych od tych pozbawionych zapachu, przeprowadzono analizę olfaktometryczną uzyskanych ekstraktów, a w celu wyłonienia związków zapachowych wykazujących najwyższy potencjał do tworzenia finalnego aromatu produktu przeprowadzono analizę rozcieńczeń aromatu (AEDA). Wyniki przedstawione w tabeli 1 (**publikacja 1**) wskazują, że połączenie szczegółowych analiz instrumentalnych oraz sensorycznych pozwoliło na zidentyfikowanie 29 związków aktywnych zapachowo, które należały do zróżnicowanych grup chemicznych, głównie estrów, aldehydów oraz kwasów. Związki te charakteryzowały się również zróżnicowanym współczynnikiem rozcieńczenia zapachu który osiągnął wartości od 1 do 16384. Zidentyfikowane związki aktywne zapachowo odpowiadają za zapachy owocowe, kwiatowe, miodowe oraz słodowe. Związkiem chemicznym o najwyższym współczynniku FD był alkohol fenyloetylowy o przyjemnym, kwiatowym zapachu. Inne związki o współczynnikach FD pomiędzy 8192 a 128 to kozieradkowy sotolon (8192), karmelowy furaneol (1024), owocowy propionian etylu (512), metional (512) o zapachu gotowanych ziemniaków, miętowy 4-metylquinazolin (512), słodowy 2- i 3-metylbutanol (256), kwas 2- i 3-metylomasłowy o zapachu potu (256), owocowy, jagodowy 3-metylobutanian etylu (128), prażona 2-acetylopyrolina (128) i owocowy octan etylu (128).

W kolejnym etapie przeprowadzono analizę ilościową związków o współczynniku FD ≥ 32 i obliczono dla nich wartość aktywności aromatu (odor activity value; OAV) jako stosunek stężenia danego związku w badanej próbce do stężenia progu jego wyczuwalności (OTC, Odor Threshold Concentration), których wartości pochodzą z bazy danych Leibniz Institute for Food Systems Biology at Technical University of Munich we Freisingu (Kreissl J, Mall V, Steinhaus P, 2022). Wartość OAV ≥ 1 wskazuje na to, że dany związek może odgrywać ważną rolę w kształtowaniu zapachu produktu. Uzyskane wyniki, zaprezentowane w tabeli 2 (publikacja 1), wskazały, że dla 15 związków wartość OAV była wyższa lub

równa 1. Najwyższą wartość OAV uzyskały: aldehyd fenylooctowy o zapachu miodowym (OAV 3100), furfural o zapachu karmelowym (OAV 1900), methional (OAV 890) o zapachu gotowanych ziemniaków i alkohol fenyloetylowy (OAV 680) o zapachu kwiatowym. Związki te, które powstają wskutek różnych procesów, takich jak ogrzewanie, aktywność mikroorganizmów w trakcie fermentacji czy utlenianie produktu są powszechnie kojarzone z fermentowanymi napojami alkoholowymi. Aldehyd fenylooctowy o zapachu miodowym identyfikowany był również w miodach pitnych produkowanych z dodatkiem pyłku pszczelego oraz napojach spirytusowych przygotowanych na bazie odmianowych miodów pszczelich (Pino & Fajardo, 2011; Roldán i in., 2011). Mimo że związek ten wiąże się z „przedwczesnym utlenianiem” win, jego miodowy zapach jest bardzo pożądanym w miodzie pitnym (Monforte i in., 2018). Głównym mechanizmem powstawania aldehydu fenylooctowego jest szlak Ehrlicha polegający na przemianach aminokwasu L-feniloalaniny poprzez transaminację a następnie dekarboksylację. Następnie aldehyd fenylooctowy może być dalej redukowany do alkoholu fenylooctowego lub utleniany do kwasu fenylooctowego (Etschmann i in., 2002). Procesy redukcji do alkoholu fenyloetylowego oraz utleniania do kwasu fenylooctowego zależą od warunków środowiskowych, aktywności enzymatycznej oraz dostępności tlenu i kofaktorów redoks (np. NADH/NAD⁺). Redukcja do alkoholu fenyloetylowego zachodzi głównie w warunkach beztlenowych (np. w trakcie fermentacji alkoholowej), natomiast utlenianie do kwasu fenylooctowego występuje głównie w warunkach tlenowych (np. podczas dojrzewania napojów fermentowanych). Aldehyd fenylooctowy może również powstawać w wyniku nieenzymatycznych reakcji Streckera, które zachodzą podczas dojrzewania napojów alkoholowych, czy też w procesach termicznych np. podczas podgrzewania brzezki w wyniku reakcji Maillarda (Marrufo-Curtido i in., 2022). Aldehyd fenylooctowy, alkohol fenyloetylowy i kwas fenylooctowy charakteryzują się podobnym, miodowo-różanym aromatem i często współwystępują podczas fermentacji, a ich łączny wpływ na profil zapachowy może być oceniany wspólnie. Szudera-Kończal i in. w swojej analizie kluczowych związków zapachowych powstających podczas fermentacji maślanki i serwatki przez pleśń *Galactomyces geotrichum* zauważyła, że zamiast analizować aldehyd fenylooctowy, alkohol fenyloetylowy i kwas fenylooctowy indywidualnie, warto traktować je jako całość, ponieważ wszystkie powstają w ramach jednej przemiany szlaku Ehrlicha, wspólnie odpowiadając za charakterystyczny miodowo-różany aromat (Szudera-Kończal i in., 2021). Związek o drugim najwyższym OAV to furaneol, o zapachu karmelu. Chociaż często jest opisywany jako związek wpływający na aromat win, to w miodzie pitnym został

on zidentyfikowany tylko raz (Starowicz & Granvogl, 2022). Jego stężenie w próbce miodu pitnego wynosiło 48,5 mg/L. Furaneol może powstawać zarówno w wyniku reakcji związków aminowych i cukrów redukujących (reakcja Maillarda), rozpadu cukrów podczas procesów termicznych ale może być również wytwarzany w wyniku biotransformacji przez mikroorganizmy (Zhu i in., 2019). Głównym prekursorem furaneolu jest fruktoza, będąca cukrem redukującym, która odgrywa kluczową rolę w jego produkcji, nadając miodowy, karmelowy i truskawkowy zapach zarówno owocom takim jak truskawki i ananas, jak i produktom przetworzonym termicznie, takim jak kawa, wata cukrowa czy ciemne piwo (Haag i in., 2021; Pérez i in., 1996). Methional o zapachu gotowanych ziemniaków jest często wiązany z zapachem leżakowanego piwa i utlenionych win. Powstaje głównie w wyniku degradacji metioniny podczas reakcji Maillarda lub obróbki termicznej, takiej jak pieczenie lub smażenie. Dodatkowo, methional może być produkowany podczas fermentacji, gdy mikroorganizmy, takie jak drożdże i bakterie, rozkładają metioninę, przyczyniając się do powstawania charakterystycznych aromatów w fermentowanych produktach spożywczych i napojach, takich jak piwo, wino i niektóre produkty mleczne (Quek i in., 2011). Kwiatowy alkohol fenyloetylowy jest powszechnie spotykany w napojach alkoholowych, takich jak wino, piwo, oraz w miodzie pszczelim, gdzie odgrywa ważną rolę w kształtowaniu aromatu. Jak wcześniej wspomniano, alkohol fenyloetylowy może powstawać w wyniku redukcji aldehydu fenylooctowego w ramach szlaku Ehrlicha, który obejmuje przemiany aminokwasów przez mikroorganizmy takie jak drożdże, podczas fermentacji. Jego obecność w napojach alkoholowych przyczynia się do tworzenia aromatu o bardziej kwiatowo różanym charakterze (Rahman i in., 2017; Reglitz i in., 2022). Pozostałe trzy związki o OAV od 290 do 230 to odpowiednio: sotolon, 2- i 3-metylbutanoli 3-metylobutanian etylu. Spośród nich, szczególnie 3-methylbutanol i 2-methylbutanol oraz 3-metylobutanian etylu opisane zostały jako powstające w czasie fermentacji napojów alkoholowych. 3-Methylbutanol powstaje z waliny, a 2-methylbutanol z izoleucyny, w wyniku dekarboksylacji i redukcji przez drożdże. Z kolei 3-metylobutanian etylu jest estrem, który powstaje w wyniku estryfikacji kwasu 3-methylbutanowego i etanolu, nadając napojom alkoholowym owocowy zapach. Ester ten opisywany był już jako jeden z istotnych związków zapachowych występujących w miodzie pitnym (Starowicz & Granvogl, 2022).

Profilowa analiza sensoryczna badanego miodu pitnego wykazała, że jego aromat został scharakteryzowany głównie jako miodowy, słodowy i alkoholowy, z subtelniejszymi nutami rumowymi, fermentacyjnymi, karmelowymi i kwiatowymi. Wyniki te znajdują odzwierciedlenie w danych pochodzących z analizy ilościowej, która wykazała, że

najwyższe wartości OAV osiągnęły związki chemiczne o zapachu miodowym (aldehyd fenylooctowy), karmelowym (furaneol), kozieradkowym (methional) i kwiatowym (alkohol fenyloetylowy). Aromat rumowy, który cechuje oceniany miód pitny, najprawdopodobniej wynika z oddziaływania wielu związków zapachowych, a nie z pojedynczego składnika. Podobne wyniki uzyskali Franitza i in., którzy wykazali, że za charakterystyczny zapach rumu odpowiadają takie kluczowe związki jak etanol, wanilina, (S)-2-metylobutanian etylu, (E)- β -damascenon, 2,3-butanedion, 3-metylbutanal i maślan etylu (Franitza i in., 2016). Również w ich badaniach nie stwierdzono obecności pojedynczego związku o zapachu rumowym.

Test rekombinacji aromatu wykazał wysokie podobieństwo względem badanej próby miodu pitnego, co poświadcza prawidłowość oznaczeń ilościowych związków aktywnych zapachowo. Natomiast, przeprowadzone testy omisyjne wykazały, że kluczowymi związkami aktywnymi zapachowo odpowiadającymi za aromat miodu pitnego są: methional, alkohol fenyloetylowy, furaneol, propionian etylu, 3-metylobutanian etylu, aldehyd fenylooctowy, kwas 2- i 3-metylomasłowy, sotolon, oraz wanilina.

Aby określić wpływ procesu produkcyjnego na powstawanie kluczowych związków zapachowych porównano ich zawartość na czterech etapach produkcji: w surowcu (miód wielokwiatowy), w próbkach pobranych pierwszego dnia fermentacji w celu zweryfikowania wpływu gotowania brzezki (F1), w próbkach pobranych 30 dnia fermentacji w celu zweryfikowania wpływu fermentacji (F30) oraz w produkcie końcowym w celu zweryfikowania wpływu dojrzewania (miód pitny po 1 roku dojrzewania). Analizując zebrane wyniki (tabela 4) można stwierdzić, że zmiany w stężeniach poszczególnych związków były silnie związane z grupami chemicznymi, do których należą oraz ścieżkami ich powstawania. W surowcu zidentyfikowano tylko część kluczowych związków zapachowych, takich jak aldehyd fenylooctowy, alkohol fenyloetylowy, sotolon, 2- i 3-metylbutanol, 3-metylobutanian etylu, p-krezol, kwas octowy, wanilina, furfural, kwas masłowy i 4-methylquinazolin, a ich stężenia były najniższe w porównaniu do innych etapów produkcji (z wyjątkiem 4-methylquinazolinu, którego stężenie w miodzie pszczelim było najwyższe). Ogrzewanie brzezki miodowej skutkowało wzrostem stężeń związków o przyjemnych zapachach: kwiatowym, miodowym i karmelowym, ale też powiązanych z niepożądanymi aromatami, takimi jak octowy czy fekalny. Procesy fermentacji i dojrzewania wywołały największe zmiany w stężeniach kluczowych związków zapachowych. W trakcie fermentacji zauważono wzrost stężeń związków z grupy estrów

o przyjemnych, owocowych zapachach (3-metylobutanian etylu, propionian etylu oraz octan etylu). Kolejnymi związkami, których zawartość wzrosła w trakcie fermentacji były aldehyd fenylooctowy (12 krotny wzrost), alkohol fenyloetylowy (30 krotny wzrost) 2- i 3-metylbutanol (ponad 130 razy wyższe stężenie po okresie fermentacji). Furaneol o przyjemnym, karmelowym zapachu wykazał stężenie 24,2 mg/L. Natomiast proces dojrzewania spowodował największe zmiany związków z grupy aldehydów, których stężenia były najwyższe po 12 miesiącach dojrzewania. Wyniki te mogą być związane ze wspomnianą wcześniej degradacją Streckera. Marrufo-Curtido i in. (2022) udowodnili, że stężenia związków takich jak methional i aldehyd fenylooctowy znacząco wzrosły podczas utleniania win (Marrufo-Curtido i in., 2022). Alkohol fenyloetylowy osiągnął maksymalne stężenie 95,9 mg/L w miodzie pitnym po dojrzewaniu, co może być wynikiem przemian L-fenyloalaniny, zachodzących w mechanizmie Ehrlicha (Câmara i in., 2006). Z drugiej strony jednak okres dojrzewania produktu spowodował spadek stężenia związków takich jak estry, najprawdopodobniej wskutek ich utleniania (Patrianakou & Roussis, 2013). Spadek stężeń zanotowano również dla wszystkich zidentyfikowanych kwasów, p-krezolu oraz 4-metylquinazolinu (o charakterystycznym, miętowym zapachu), który po raz pierwszy zidentyfikowany został w napojach alkoholowych.

Podsumowując, w badaniu przedstawionym w **Publikacji 1** scharakteryzowano kluczowe związki aktywne zapachowo miodu pitnego na poziomie molekularnym i wskazano wstępne podstawy formowania jego aromatu. W miodzie pitnym i pośrednich etapach jego produkcji zidentyfikowano osiemnaście ważnych związków zapachowych, a analizy ilościowe wykazały, że w trakcie procesu produkcji miodu pitnego widoczne były zmiany w stężeniu związków odpowiedzialnych za końcowy aromat produktu. Wyniki te wykazały, że choć każdy z etapów produkcyjnych (ogrzewanie brzezki, fermentacja i dojrzewanie) wnosi istotne zmiany w stężeniach kluczowych związków zapachowych to fermentacja i dojrzewanie odgrywają kluczową rolę w formowaniu charakterystycznego aromatu miodu pitnego.

Wyniki badań ukazane w **Publikacji 1** pozwoliły na potwierdzenie pierwszej hipotezy badawczej: **H1. Związki zapachowe wykryte w miodzie pitnym typu trójniak, o wysokich wartościach OAV, mają kluczowy wpływ na jego charakterystyczny aromat, a ich stężenie zmienia się w trakcie procesu produkcji, w tym podczas fermentacji i dojrzewania.** Są one również podstawą do przeprowadzenia dalszych, szczegółowych analiz mających na celu określenie wpływu poszczególnych parametrów

stosowanych w procesie produkcyjnym miodów pitnych na ich profil zapachowy oraz związki aktywne zapachowo.

7.2. Wpływ odmiany miodu pszczelego, sposobów fermentacji i ogrzewania brzezki na właściwości sensoryczne oraz związki aktywne zapachowo w miodach pitnych

W celu dokładnego określenia wagi wpływu parametrów produkcyjnych na aromat gotowego miodu pitnego, został szczegółowo zbadany wpływ trzech kluczowych czynników: odmiany miodu pszczelego (akacjowy, gryczany i lipowy), efektu podgrzewania brzezki oraz rodzaju fermentacji (z użyciem komercyjnych drożdży *S. cerevisiae*, fermentacji spontanicznej oraz zastosowania pleśni *G. geotrichum*). Procesowi fermentacji spontanicznej oraz zaszczerpieniu pleśniami *G. geotrichum* poddane zostały miody, których brzezki nie były sycone, natomiast inokulację drożdżami *S. cerevisiae* poddano oba rodzaje miodów (sycone i niesycone). Proces przygotowania modelowych miodów pitnych ukazany został na rycinie 6 (Publikacja 2). Zastosowanie pleśni *G. geotrichum* w procesie fermentacji miało na celu próbę zwiększenia zawartości związków o zapachu miodowo-różanym, takich jak alkohol fenyloetylowy, aldehyd fenylooctowy oraz kwas fenylooctowy, na podstawie badań przeprowadzonych w pracy doktorskiej Pani Kamilli Szudery-Kończal (Szudera-Kończal, 2023). Wyprodukowano dwanaście modelowych rodzajów miodu pitnego, a ich ekstrakty uzyskane metodą Solvent-Assisted Flavor Evaporation (SAFE) zostały poddane analizie olfaktometrycznej w celu identyfikacji związków aktywnych zapachowo. Następnie przeprowadzono ilościową analizę wybranych związków zapachowych metodą SPME-GC/MS w fazie nadpowierzchniowej. W końcowym etapie, w celu określenia, w jaki sposób każdy z parametrów produkcji wpływa na końcowy aromat miodu pitnego, zastosowano jednowymiarowe i wielowymiarowe analizy statystyczne, a także analizę korelacji między stężeniami związków zapachowych a cechami sensorycznymi miodów pitnych, a wyniki tych analiz zaprezentowane zostały na rycinie 5 (Publikacja 2).

Przeprowadzona profilowa analiza sensoryczna 12 rodzajów miodu pitnego wykazała, że ogólna intensywność zapachu miodów pitnych przygotowanych z tych samych rodzajów miodu była bardzo podobna w każdej grupie (rysunki 1, 2 i 3, **Publikacja 2**). Wyraźne różnice zauważalne były między miodami pitnymi przygotowanymi z różnych odmian miodu, nie tylko w ogólnej intensywności aromatu, ale także w intensywnościach indywidualnych deskryptorów. Wszystkie miody pitne na bazie gryki charakteryzowały się najwyższą ogólną intensywnością zapachu (od 7,5 do 8,6), kolejne były miody pitne na bazie lipy (zakres punktacji od 3,8 do 5,5). Najniższe wartości ogólnej intensywności zapachu odnotowano dla miodów pitnych na bazie akacji, których wyniki wahały się od 2,2 do 2,8. W aromacie miodów pitnych gryczanych dominowały takie zapachy jak: miodowy słodowy, rumowy, fermentacyjny i alkoholowy. Jednak odczucie zapachu kwiatowego było bardziej wyraziste w miodach lipowych i akacjowych i przewyższało zapachy rumowe, które dominowały w miodach gryczanych. Fermentacja spontaniczna natomiast wykazała (zarówno z udziałem *G. geotrichum*, jak i bez) wyższe wyniki w odniesieniu do cech miodowych, słodowych i drożdżowych.

W celu potwierdzenia obecności kluczowych związków zapachowych zidentyfikowanych w Publikacji 1 ekstrakty związków lotnych przygotowane ze wszystkich dwunastu miodów modelowych poddano analizie GCO. Zastosowanie analizy GCO pozwoliło na zidentyfikowanie 23 związków aktywnych zapachowo w dwunastu badanych próbkach miodu pitnego oraz stwierdzenie, że wszystkie zidentyfikowane związki aktywne zapachowo są zgodne z wynikami uzyskanymi w naszym poprzednim badaniu. Wyniki badań zebrane w tabeli 1 (**Publikacja 2**) pokazały, że znaczna większość zidentyfikowanych związków zapachowych znajdowała się we wszystkich analizowanych próbach, a niewielkie różnice w występowaniu poszczególnych związków wynikały jedynie z zastosowania różnych odmian miodu pszczelego, natomiast rodzaj fermentacji oraz ogrzewanie brzezki nie wykazywały większych różnic w identyfikacji związków zapachowych. Szczegółowa identyfikacja związków lotnych w miodach pitnych przygotowanych zarówno z wykorzystaniem różnych odmian surowca, sposobów fermentacji jak i różnego przygotowania brzezki wykazała, że na aromat miodów pitnych wpływają te same związki aktywne zapachowo, co w przypadku miodu pitnego pozyskanego od producenta, przygotowanego na bazie miodu wielokwiatowego. To potwierdza wyniki opisane w pracy przeglądowej Dunkel i in (2014). Autorzy zauważają, że aromat różnych produktów spożywczych, np. fermentowanych napojów alkoholowych, wynika z kombinacji

podobnych związków zapachowych, które występują w różnych stężeniach, tworząc charakterystyczny profil zapachowy dla danej grupy produktów.

Następnie, w każdym z 12 rodzajów miodu pitnego, określono stężenia zidentyfikowanych związków zostały następnie określone w każdym rodzaju miodu pitnego oraz wyznaczono również ich OAV. Wartości zostały przedstawione w tabelach 2, 3 i 4 (**Publikacja 2**). Najwyższe stężenia we wszystkich próbkach wykazały alkohol fenyloetylowy o zapachu kwiatowym, kwas fenylooctowy o zapachu miodowym oraz słodowy kwas 2- i 3-metylomasłowy. Pomędzy wszystkimi badanymi próbkami występowały widoczne różnice w ich stężeniach. Wartości OAV obliczone dla związków różniły się w zależności od badanych próbek. Najwyższymi wartościami OAV we wszystkich miódach wyróżniały się 2- i 3-metylbutanal, aldehyd fenylooctowy, alkohol fenyloetylowy, furaneol i kwas fenylooctowy, powiązane z takimi zapachami jak słodowy, miodowy, kwiatowy i karmelowy. Pomimo dominacji tych samych związków aktywnych zapachowo w miodach pitnych przygotowanych na bazie trzech odmian miodów pszczelich, poziomy stężenie tych związków we wszystkich badanych próbkach były różne. Najwyższe stężenia kwiatowego alkoholu fenyloetylowego odnotowano w miodach pitnych lipowych niesyconych, zaszczipianych drożdżami (TNY) i akacjowych niesyconych, fermentowanych spontanicznie (ANS) (odpowiednio 4,29 i 4,19 mg/l), a najniższe w miodzie pitnym gryczanym syconym, zaszczipianym drożdżami (BNY) (2,0 mg/l). Związek ten jest często identyfikowany w różnych napojach alkoholowych, takich jak miód pitny czy wino (Mayr i in., 2014). Widocznie wyższe stężenia słodowego 2- i 3-methyl-1-butanalu odnotowano w przypadku wszystkich miodów pitnych na bazie gryki w porównaniu z innymi rodzajami miodów pitnych. Różnice w stężeniach tego związku znajdują również odzwierciedlenie w ocenie sensorycznej omawianych miodów pitnych, ponieważ zapach słodowy dla wszystkich miodów pitnych na bazie gryki były widocznie wyższe niż te przedstawione dla pozostałych z akacji czy lipy. Analiza korelacji wykazała, że zapach rumowy skorelowany był ze stężeniem kwasu fenylooctowego, kwasu 2- i 3-metylomasłowego 2- i 3-metylbutanalu oraz kwasu masłowego. Podobne obserwacje poczynili Franitza i in., którzy zidentyfikowali kluczowe związki zapachowe w rumie, a wśród nich znalazł się m.in. 3-metylbutanal (Franitza i in., 2016).

Pomimo zauważalnych różnic w ocenie poszczególnych deskryptorów uzyskanych podczas analizy sensorycznej przygotowanych miodów pitnych, nie stwierdzono korelacji z konkretnymi związkami zapachowymi, gdy do fermentacji wykorzystano dodatek

G. geotrichum. Najsilniejsze różnice opisane przez osoby oceniające wykazano dla miodów pitnych na bazie akacji, co można wyjaśnić ich subtelnym i delikatnym aromatem, który nie jest przyćmiony przez dominujące zapachy słodowe lub kwiatowe, jak ma to miejsce w przypadku miodów gryczanych czy lipowych. Analiza zidentyfikowanych związków aktywnych zapachowo wśród 12 różnych wariantów miodów pitnych wykazała, że zaobserwowane różnice w profilach aromatów różnych miodów pitnych można przypisać nie tyle różnorodności związków aromatycznych, lecz raczej różnicom w ich stężeniach w obrębie badanych prób. Uzyskane wyniki sugerują, że identyfikacja związków aktywnych zapachowo dla każdego indywidualnego wariantu miodu pitnego może być zbędna. Zamiast tego korzystnym wydaje się być skupienie się na wyznaczeniu różnic w stężeniach kluczowych związków zapachowych, które określone zostały w **Publikacji 1**. Takie podejście może umożliwić skuteczną identyfikację różnic w profilach aromatów poprzez analizę ilościową, bez potrzeby wyczerpującej i czasochłonnej identyfikacji związków zapachowych dla każdego produktu.

Aby określić wpływ badanych parametrów technologicznych na cechy sensoryczne i ważne związki zapachowe dwunastu badanych miodów pitnych, zastosowano nienadzorowaną analizę głównych składowych (PCA), której wyniki zostały ukazane na rysunku 4 (**Publikacja 2**). Analiza ta potwierdziła, że rodzaj miodu miał najistotniejszy wpływ na właściwości sensoryczne miodu pitnego. Nie zaobserwowano wyraźnych zależności lub trendów wynikających z rodzaju fermentacji lub zastosowanego procesu ogrzewania. Wyniki te różnią się od tych, które do tej pory dostępne były w literaturze. Istnieją potwierdzenia, że rodzaj zastosowanego miodu pszczelego znacząco wpływa na profil związków lotnych w miodach pitnych (Li & Sun, 2019; Vidrih & Hribar, 2007), natomiast dotychczasowe badania wskazują również na znaczący wpływ zarówno procesu ogrzewania brzezki (Starowicz & Granvogl, 2022) jak i rodzaju fermentacji wykorzystujących drożdże inne niż *S. cerevisiae* (Pereira i in., 2019; Sottit i in., 2019). Różnice te mogą wynikać z faktu, że dotychczas wszystkie badania skupiały się na określeniu wpływu tylko jednego czynnika na związki lotne miodu pitnego w danym momencie. Uzyskane wyniki pokazują, że jedynie poprzez porównanie wszystkich kluczowych zmiennych w procesie produkcji można prawidłowo zidentyfikować ich rzeczywisty wpływ na różnice w aromacie produktu. Przeprowadzone badania wykazały, że tylko poprzez systematyczne badanie wpływu trzech krytycznych czynników — rodzaju miodu (akacja, gryka i lipa), ogrzewania brzezki i technik fermentacji (drożdże *S. cerevisiae*, fermentacja spontaniczna i inokulacja pleśniami *Galactomyces geotrichum*)

na powstawanie związków aktywnych zapachowo istnieje możliwość określenia wagi wpływu tych czynników na aromat gotowego miodu pitnego. Wyniki potwierdziły, że rodzaj miodu odgrywa najważniejszą rolę w określaniu właściwości sensorycznych miodu pitnego. Rodzaj zastosowanej fermentacji czy proces sycenia brzezki wywołują zdecydowanie mniejsze, choć nadal znaczące zmiany w stężeniu związków zapachowych, szczególnie w miodach pitnych przygotowanych na bazie miodu pszczelego o delikatniejszym i mniej dominującym charakterze (miód akacjowy i lipowy).

Zaprezentowane w **Publikacji 2** wnioski pozwoliły na przyjęcie hipotezy badawczej **H2. Różne odmiany miodu pszczelego, różne metody ogrzewania brzezki oraz rodzaje fermentacji (spontaniczna, drożdżowa, z dodatkiem pleśni *Galactomyces geotrichum*) wpływają na profil zapachowy miodu pitnego oraz na stężenie kluczowych związków zapachowych.** Wyniki przedstawionych badań dostarczają cennych spostrzeżeń na temat złożonych interakcji między rodzajem miodu pszczelego, ogrzewaniem brzezki i metodami fermentacji w kształtowaniu aromatu i cech sensorycznych miodu pitnego. Informacje te są niezwykle cenne z punktu widzenia producentów miodów pitnych, szczególnie tych chcących rozwijać nowe gamy produktów o unikalnych cechach sensorycznych. Uzyskane dane wskazują również na różnice a odbiorze aromatu przez panel sensoryczny w odniesieniu do dwóch rodzajów fermentacji- spontanicznej oraz drożdżowej w miodach pitnych na bazie miodu akacjowego i lipowego, wykazujących się delikatnym aromatem. Aby lepiej zgłębić to zagadnienie i dostarczyć szczegółowych danych charakteryzujących przebieg procesów produkcyjnych w obu rodzajach fermentacji zdecydowano się na dokonanie dogłębnych analiz wybranych miodów pitnych podczas całego procesu produkcyjnego, rozszerzając badania o niecelowaną analizę związków lotnych oraz określenie głównych grup drobnoustrojów (bakterie i drożdże) w całym procesie produkcyjnym.

7.3. Wyjaśnienie wpływu rodzaju fermentacji (spontanicznej i drożdżowej) na powstawanie związków aktywnych zapachowo oraz profil związków lotnych za pomocą analizy GC/MS i cytometrii przepływowej

W wyniku wcześniej przeprowadzonych analiz sensorycznych zauważono, że najwyższą zmiennością aromatu w miodzie pitnym (w kontekście porównania rodzajów fermentacji) cechowały się próby fermentowane na dwa sposoby: spontanicznie oraz po zaszczerpieniu drożdżami *S. cerevisiae* (nie poddane syceniu). Aby szczegółowo zbadać te różnice i dokładnie określić zmiany zachodzące między dwoma typami fermentacji, zastosowano połączenie zaawansowanych technik instrumentalnych, takich jak niecelowana analiza profilu związków lotnych oraz ocena stężeń związków aktywnych zapachowo, w połączeniu z monitorowaniem zmian w mikrobiocie za pomocą cytometrii przepływowej. Wyniki te zostały opracowane przy pomocy adekwatnych analiz statystycznych, aby wykazać zachodzące interakcje, wyjaśnić możliwe przyczyny różnic w ocenie sensorycznej prób oraz wykazać różnice w procesie produkcyjnym przy zastosowaniu dwóch metod fermentacji.

W celu kontroli prawidłowości zachodzących procesów produkcyjnych miodu pitnego i oceny efektywności fermentacji monitorowano podstawowe parametry, takie jak stopnie Brixu i pH oraz stężenia cukrów (glukoza i fruktoza) oraz glicerolu w trzech punktach produkcyjnych (w pierwszym dniu fermentacji, w 30 dniu fermentacji i w miodzie pitnym po okresie dojrzewania). Biorąc pod uwagę rodzaj fermentacji, widoczne jest, że miody pitne zaszczerpienie drożdżami *S. cerevisiae* zakończyły proces fermentacji w ciągu 30 dni, natomiast miody pitne fermentowane spontanicznie wymagały więcej czasu na zakończenie procesu fermentacji, który trwał w trakcie dojrzewania. Podobna sytuacja została odnotowana dla miodów przygotowywanych z różnymi dodatkami, które wykazały wzrost stężenia etanolu w czasie wielomiesięcznego dojrzewania (Czabaj i in., 2016). Również Bednarek i in. (2019) w swoich badaniach wskazują, że tempo wzrostu drożdży w miodach pitnych zaszczerpionych drożdżami *S. cerevisiae* jest dużo szybsze niż w przypadku zastosowania fermentacji spontanicznej (Bednarek i in., 2019). Tempo fermentacji cukrów zaobserwowane dla próbek fermentowanych spontanicznie było niższe, niż w przypadku miodów zaszczerpianych drożdżami, co może wskazywać na wolniejszą adaptację naturalnie występujących w miodzie mikroorganizmów.

Aby w pełni zrozumieć zmiany zachodzące w miodzie pitnym wynikające zarówno z prowadzonego procesu produkcyjnego jak i zastosowanych zmiennych (różne rodzaje fermentacji) próbki miodów pitnych zostały poddane niecelowanej analizie profilu związków lotnych. W celu dokładniejszego ustalenia zachodzących zmian analizie poddane zostały próby pobierane w 1, 5, 10, 15 i 30 dniu fermentacji oraz w 3, 6, 9 i 12 miesiącu dojrzewania. Do dalszej analizy wybrane zostały tylko te związki lotne, które wykazują potencjał zapachowy. W celu lepszej i bardziej przejrzystej interpretacji danych do zidentyfikowanych związków przypisano jedną z ośmiu kategorii grup chemicznych (kwas, alkohol, aldehyd, ester, furan, keton, lakton lub inny) oraz opis zapachu danego związku dostępny w źródłach literaturowych. Na podstawie opisu zapachu do każdego związku przydzielono jedną z siedmiu kategorii zapachowych (alkoholowy, kwiatowy, owocowy, miodowy, słodowy, zapach przypraw, niepożądany). Pośród wszystkich badanych próbek zidentyfikowano 109 związków o potencjale zapachowym należących do różnych grup chemicznych. Największą liczbą potencjalnych związków zapachowo aktywnych zidentyfikowanych we wszystkich próbkach były estry, które stanowiły około 1/3 wszystkich zidentyfikowanych substancji. Związki te są w większości związane z wrażeniami zapachowymi opisywanymi jako owocowe i miodowe, jak również odpowiadają za zapachy niepożądane. Drugą co do wielkości grupę stanowiły alkohole, charakteryzujące się różnymi zapachami, opisywanymi jako słodowy, kwiatowy, mydlany czy ostry, drażniący. W trakcie trwania procesu produkcyjnego intensywność potencjalnych związków zapachowo-aktywnych wahała się w zależności od konkretnego etapu. Niezależnie od rodzaju fermentacji, intensywność estrów wzrastała w trakcie fermentacji i malała w ciągu dwunastomiesięcznego okresu dojrzewania. Podobne zmiany zaobserwowano dla ketonów i furanów, których intensywność wzrastała podczas fermentacji i malała podczas dojrzewania. Aldehydy utrzymywały podobną intensywność przez cały proces produkcji, niezależnie od rodzaju fermentacji. Rosnąca intensywność wielu związków w trakcie fermentacji, takich jak estry lub kwasy, może być związana z ich formowaniem podczas wzrostu drożdży. Spontaniczna fermentacja wykazała maksymalne intensywności większości związków później niż fermentacja kontrolowana (odpowiednio w dziesiątym i piątym dniu fermentacji). Prawdopodobnie było to spowodowane tym, że fermentacja spontaniczna przebiega mniej gwałtownie i burzliwie niż fermentacja zaszczipiona drożdżami (co zostało również wykazane spadkiem stężeń cukrów).

Analiza potencjalnych związków zapachowych z uwzględnieniem przypisanych im kategorii zapachowych wykazała, że grupa zapachów określanych jako niepożądane (ang. off-flavors) obejmuje szeroki zakres związków z różnych grup chemicznych takich jak ketony, kwasy i estry, o zróżnicowanych deskryptorach zapachowych (siarkowe, octowe, mydlane, pleśniowe, rozpuszczalnikowe, stęchłe). Omawiana kategoria zapachów wykazała znaczny wzrost intensywności podczas procesu fermentacji w obu jej typach. Natomiast długi proces dojrzewania (trwający 12 miesięcy), spowodował znaczny spadek ich intensywności, co może wyjaśniać, dlaczego związki te nie zostały wcześniej zidentyfikowane w badanych próbkach przy wykorzystaniu metody GCO. Tak znaczące zmniejszenie intensywności niepożądanych związków zapachowych może również wskazywać jak ogromne znaczenie dla bukietu zapachowego ma ten czasochłonny etap produkcji. Związki skategoryzowane jako miodowe, alkoholowe, niepożądane i owocowe wykazały szybszy wzrost intensywności podczas procesu fermentacji w miodach pitnych przygotowanych z zaszczepieniem drożdżami *S. cerevisiae* w porównaniu do miodów pitnych fermentowanych spontanicznie (odpowiednio piąty i dziesiąty dzień fermentacji). Może to również potwierdzać wolniejszy przebieg procesu, gdy wykorzystywana jest fermentacja spontaniczna. Profilowa analiza sensoryczna przeprowadzona dla omawianych miodów pitnych w poprzednim badaniu (Publikacja 2) wykazała wyższe wrażenia słodowe i miodowe w miodach pitnych uzyskanych za pomocą fermentacji spontanicznej w obu typach miodów pitnych (na bazie akacji i lipy) w porównaniu z miodami pitnymi zaszczepianymi drożdżami. Różnice te zostały potwierdzone przez wyniki niecelowanej analizy profilu związków lotnych, które wykazały, że fermentacja spontaniczna skutkowała wyższymi intensywnościami związków o zapachach alkoholowych, słodowych, owocowych i miodowych.

Przeprowadzone analizy statystyczne wykazały, że zarówno procesy fermentacji, jak i dojrzewania są bardzo zróżnicowane pod względem występowania związków o potencjale zapachowym. Fermentacja spowodowała powstanie 95 związków, z których 25 jest unikalnych dla tego etapu, przy czym opisy zapachów tych związków są klasyfikowane głównie jako owocowe, niepożądane i przyprawowe. Z drugiej strony okres dojrzewania spowodował powstanie 14 związków, które nie zostały zidentyfikowane podczas fermentacji, które były głównie zapachami owocowymi, z mniejszym udziałem grupy zapachów niepożądanych, słodowych i przyprawowych. Wyniki te ukazują zmiany chemiczne, które zachodzą podczas procesu dojrzewania. Fakt, że dojrzewanie miodu pitnego wprowadza nowe związki, sugeruje, że proces ten jest kluczowy w budowaniu

złożoności aromatu miodu pitnego. Dojrzewanie może również prowadzić do zaniku lub modyfikacji niektórych związków lotnych powstałych w wyniku fermentacji, co wskazuje, że proces ten nie polega tylko na wzroście intensywności nowych związków.

Porównując dwa rodzaje fermentacji, widać wyraźnie, że fermentacja spontaniczna skutkuje obecnością większej liczby unikalnych, potencjalnie aktywnych zapachowo związków lotnych (27) niż fermentacja kontrolowana z zastosowaniem zaszczerpienia drożdżami *S. cerevisiae* (8). Fermentacja spontaniczna opiera się na mikroorganizmach naturalnie występujących w miodzie pszczelim i środowisku, co może prowadzić do szerszego spektrum reakcji chemicznych, a tym samym do produkcji większej różnorodności związków lotnych. Natomiast drożdże *S. cerevisiae*, mają tendencję do dominowania w procesie fermentacji, co prowadzi do bardziej kontrolowanego i przewidywalnego wyniku tego procesu. Obecność tylko 8 unikalnych związków w fermentacji drożdżowej wskazuje na bardziej jednolity proces chemiczny, skutkujący wytworzeniem mniejszej liczby specyficznych związków.

W celu zidentyfikowania głównych grup mikroorganizmów odpowiedzialnych za proces fermentacji oraz określenia zmian w ich liczebności, wszystkie próbki czterech badanych miodów pitnych na każdym etapie produkcji zostały przebadane za pomocą cytometrii przepływowej. Analiza obejmowała zdefiniowanie trzech głównych frakcji: debris (zanieczyszczenia niebędące komórkami drożdży i bakterii), bakterii i drożdży. Proporcje zawartości bakterii i drożdży w próbkach fermentowanych dwoma typami fermentacji, w odniesieniu do tych samych rodzajów miodu, w pierwszym dniu fermentacji były bardzo podobne i wynosiły 87,99% do 8,36% (odpowiednio bakterii do drożdży) w próbce ANS (miód akacjowy, fermentacja spontaniczna) i 88,18% do 8,52% w próbce ANY (miód akacjowy, fermentacja drożdżowa). Miody pitne na bazie lipy wykazały również podobieństwo między różnymi typami fermentacji: 81,13% bakterii i 15,80% drożdży w próbce TNS (fermentacja spontaniczna) i 81,91% bakterii i 15,19% drożdży w próbce TNY (fermentacja drożdżowa). Wzrost zawartości drożdży w próbkach zaszczerpionych *S. cerevisiae* był znacznie szybszy i bardziej gwałtowny w porównaniu do fermentacji spontanicznej w obu odmianach miodu, co może wskazywać, że czyste kultury *S. cerevisiae* wykazują lepszą tolerancję i odporność na wysokie stężenia cukru obecne w brzeczce miodowej.

Ilościowa analiza stężeń związków aktywnych zapachowo o wysokim OAV, które zidentyfikowane zostały we wcześniejszym etapie (Publikacja 2) pozwoliła na prześledzenie zmian stężeń tych związków w całym procesie produkcyjnym oraz zaobserwować różnice pomiędzy przebiegiem tych procesów w obu rodzajach fermentacji. Stężenia związków zmieniały się w zależności od etapów produkcji, przez cały okres wytwarzania miodu pitnego. Większość zmian była ściśle powiązana ze specyficznymi grupami chemicznymi związków i ścieżkami ich powstawania. Fermentacja spontaniczna wykazała również większą produkcję estrów w procesie fermentacji, co skutkowało ich wyższym stężeniem w miodach po okresie dojrzewania w porównaniu do próbek zaszczipionych drożdżami. Podobne obserwacje zostały wcześniej opisane w odniesieniu do win (Boban i in., 2022). Dodatkowo uzyskane dane wykorzystano do opracowania modelu pozwalającego na dyskryminację miodów pitnych w odniesieniu do sposobu ich fermentacji (spontaniczna i kontrolowana). Model osiągnął wysoką efektywność klasyfikacji, co pozwoliło na prawidłową dyskryminację ~90% typów fermentacji, przy uwzględnieniu stężeń zidentyfikowanych związków aktywnych zapachowo. Analiza ta pomogła wykazać, że różnice w fermentacjach są widoczne nie tylko w dynamice fermentacji cukrów, zmianach intensywności związków o potencjale zapachowym oraz w rozwoju drożdży i bakterii w trakcie procesów produkcyjnych, ale także na poziomie tych samych związków aktywnych zapachowo, różniących się jedynie stężeniami pomiędzy próbkami.

W celu dalszego zbadania związku pomiędzy zmianami zawartości bakterii i drożdży w trakcie procesu produkcyjnego a zmianą stężeń związków aktywnych zapachowo przeprowadzono analizę korelacji wymienionych danych. Analiza korelacji wykazała, że zawartość bakterii miała umiarkowany wpływ na produkcję ważnych związków aktywnych zapachowo, takich jak heksanian etylu (0,63), furfural (0,33) i kwas fenylooctowy (0,49), co sugeruje, że obecność bakterii przyczyniają się do powstawania niektórych związków lotnych. Związki te powiązane są z zapachami owocowymi, karmelowymi i miodowymi, co może uzasadniać wyższe oceny dla zapachu miodowego w przypadku miodów fermentowanych spontanicznie. Natomiast zmiany w liczebności bakterii wykazały ujemną korelację ze związkami takimi jak aldehyd fenylooctowy (-0,39), co sugeruje, że wyższa liczba bakterii może hamować powstawanie tego związku lub prowadzić do jego przekształcenia w inne produkty. Zmiana ilości drożdży podczas procesu produkcyjnego wykazała jedynie słabą korelację z aldehydem fenylooctowym (0,37), podczas gdy wykazywała ujemne korelacje z heksanianem etylu (-0,59), kwasem fenylooctowym (-0,50) i furfurałem (-0,47). Sugeruje to, że chociaż drożdże są głównym motorem fermentacji, ich

wzrost może prowadzić do zmniejszenia stężeń niektórych związków zapachowych związanych z bakteriami, prawdopodobnie z powodu konkurencji lub zmian metabolicznych.

Podsumowując, w tym badaniu (**Publikacja 3**) oceniono wpływ dwóch typów fermentacji (spontanicznej i drożdżowej) w trakcie trwania całego procesu produkcyjnego na rozwój lotnych związków organicznych i substancji zapachowych w miodach pitnych, wykorzystując szeroki zakres różnorodnych analiz instrumentalnych w połączeniu z zaawansowaną analizą statystyczną. Wyniki przeprowadzonych badań pozwoliły na przyjęcie hipotezy badawczej **H3. Zastosowanie zaawansowanych metod statystycznych do analizy wyników uzyskanych w badaniach modelowych pozwala na identyfikację kluczowych czynników wpływających na profil zapachowy miodów pitnych, co umożliwia producentom optymalizację procesów produkcyjnych w celu uzyskania produktów o pożądanых cechach sensorycznych.** Wyniki te pozwoliły ustalić znaczenie rodzaju fermentacji w odniesieniu do stężeń ważnych związków zapachowych w eksperymentalnych miodach pitnych. Badania pokazują, że fermentacja spontaniczna prowadzi do bardziej złożonego i zmiennego profilu związków lotnych, z większą liczbą unikalnych związków. Wiąże się to jednak z ryzykiem niepożądanych zapachów i braku powtarzalności. Proces ten może być bardziej odpowiedni dla producentów poszukujących wyjątkowości i złożoności w swoich miodach pitnych, z bardziej rzemieślniczym podejściem, które obejmuje nieprzewidywalność dzikiej fermentacji. Z drugiej strony kontrolowana fermentacja wykorzystująca drożdże *S. cerevisiae* daje bardziej przewidywalny miód pitny z mniejszą liczbą posmaków i spójnym owocowym aromatem. Choć może mu brakować złożoności i zmienności obecnej w fermentacji spontanicznej, oferuje większą kontrolę nad produktem końcowym i prawdopodobnie jest bardziej niezawodny w przypadku dłuższej produkcji. Uzyskane wyniki niewątpliwie przyczynią się do zwiększenia różnorodności profili aromatów miodów pitnych poprzez zastosowanie nowych rozwiązań. Przeprowadzone badania mają znaczącą wartość dla producentów miodów pitnych, ponieważ identyfikują istotne czynniki, które należy wziąć pod uwagę przy planowaniu cech produktu końcowego jeszcze przed rozpoczęciem produkcji.

8. Podsumowanie i wnioski

Niniejsza rozprawa doktorska, która jest zbiorem trzech publikacji objętych wspólnym tytułem: „Analiza związków aktywnych zapachowo kształtujących aromat polskich miodów pitnych: wpływ surowca oraz procesów fermentacji i dojrzewania.” Prezentuje, dzięki zastosowaniu podejścia sensomicznego, szczegółową identyfikację kluczowych związków zapachowych w tradycyjnym miodzie pitnym wraz z odniesieniem do jego profilu zapachowego. Zaprezentowane badania opisują również wpływ surowca oraz procesów fermentacji i dojrzewania na zmianę stężeń związków aktywnych zapachowo w modelowych miodach pitnych.

Na podstawie uzyskanych wyników sformułowano następujące wnioski:

1. Zastosowanie podejścia sensomicznego do analizy aromatu miodu pitnego umożliwiło identyfikację dziewięciu kluczowych związków zapachowych, spośród których największe znaczenie mają kolejno aldehyd fenylooctowy o zapachu miodowym, furaneol o zapachu karmelowym, metional o zapachu gotowanych ziemniaków, alkohol fenyloetylowy o zapachu kwiatowym, sotolon o zapachu kozieradki, 3-metylobutanian etylu (zapach owocowy) propionian etylu (zapach owocowy), kwas 2- i 3-metylomasłowy (zapach potu, słodowy) oraz wanilina o zapachu waniliowym.
2. Profil zapachowy miodu pitnego został określony jako miodowy, słodowy i alkoholowy, z subtelnymi nutami rumowymi, fermentacyjnymi, karmelowymi i kwiatowymi. Wrażenia te najprawdopodobniej wywołane były przez związki zapachowe o wysokim OAV, takie jak aldehyd fenylooctowy (OAV 3100) w przypadku nut miodowych, furaneol (OAV 1900) w przypadku nut karmelowych, alkohol fenyloetylowy (OAV 680) skutkujący odczuwaniem nut kwiatowych oraz 2- i 3-metylbutanol (OAV 240), wprowadzający do aromatu nuty słodowe. Wrażenia zapachowe scharakteryzowane jako rumowe oraz fermentacyjne są wywoływane najprawdopodobniej poprzez mieszaniny kilku związków aktywnych zapachowo.
3. Porównanie zawartości związków zapachowych na czterech etapach produkcji miodu wykazało, że podczas etapu ogrzewania brzezki nastąpił przyrost 7 związków zapachowych, przy czym największy przyrost odnotowany został dla alkoholu fenyloetylowego (79-krotny). W trakcie fermentacji nastąpił wzrost zawartości 11 związków, a najwyższe wzrosty odnotowano dla aldehydu

fenylooctowego (12-krotny), alkoholu fenyloetylowego (30-krotny) oraz furaneolu (karmelowy). Z kolei dojrzewanie skutkowało wzrostem zawartości 6 związków zapachowych, przy czym najwyższe wzrosty zaobserwowano dla aldehydu fenylooctowego (22-krotny), alkoholu fenyloetylowego (4-krotny) oraz furaneolu (2-krotny). Dodatkowo proces dojrzewania skutkował spadkiem zawartości estrów i kwasów.

4. Badania olfaktometryczne ekstraktów uzyskanych z 12 modelowych miódów pitnych wykazały, że różnice w ich profilach zapachowych wynikają przede wszystkim z różnic w stężeniach tych samych kluczowych związków zapachowych, a nie z obecności unikalnych związków charakterystycznych dla poszczególnych wariantów.
5. Na podstawie badań modelowych określono, że wpływ odmiany miodu pszczelego na zróżnicowanie profilu zapachowego i stężenia związków aktywnych zapachowo miódów pitnych jest najwyższy, a zastosowanie sycenia brzezki i trzech sposobów fermentacji ma drugorzędne znaczenie.
6. Niezależnie od sycenia brzezki oraz zastosowanego sposobu fermentacji miody pitne przygotowane na bazie miodu akacjowego charakteryzowały się zapachami miodowym i alkoholowym oraz najniższą intensywnością aromatu, miody pitne na bazie miodu lipowego wyróżniały się zapachem miodowym, kwiatowym i fermentowanym, natomiast miody pitne gryczane scharakteryzowane zostały jako słodowe, rumowe i miodowe. Miody gryczane wyróżniały się również najwyższą intensywnością aromatu.
7. Zastosowanie fermentacji spontanicznej skutkowało wzmocnieniem nut miodowych, słodowych, drożdżowych i rumowych w profilu zapachowym miódów pitnych, w porównaniu do nastawów przygotowanych z dodatkiem drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Niecelowana analiza profilu związków lotnych wykazała większą liczbę unikalnych związków lotnych (27) oraz bardziej złożony profil substancji zapachowych w przypadku fermentacji spontanicznej, podczas gdy fermentacja z udziałem drożdży wytworzyła bardziej spójny profil sensoryczny i mniejszą liczbę unikalnych związków lotnych (8).

8. Proces dojrzewania, trwający 12 miesięcy ma wpływ na poprawę aromatu miodu pitnego poprzez zmniejszenie intensywności związków lotnych o niepożądanym zapachu, a jego skrócenie mogłoby owocować obniżeniem jakości gotowego produktu.
9. Analiza statystyczna wykazała, że intensywność związków lotnych z grupy związków o zapachu owocowym oraz niepożądanym zwiększa się w trakcie procesu fermentacji, niezależnie od rodzaju zastosowanej fermentacji, natomiast proces dojrzewania skutkuje znaczącym obniżeniem intensywności tych związków. Do związków tych zaliczyć można estry o zapachu owocowym: octan etylu oraz heksanian etylu.
10. Analiza korelacji wykazała, że procentowy udział bakterii miał wpływ na produkcję ważnych związków aktywnych zapachowo, takich jak heksanian etylu (zapach owocowy, 0,63), furfural (zapach karmelowy, 0,33) i kwas fenylooctowy (zapach miodowy, 0,49), co może uzasadniać wyższe oceny dla zapachu miodowego w przypadku miodów fermentowanych spontanicznie. Procentowy wzrost udziału drożdży korelował dodatnio ze stężeniami aldehydu fenylooctowego (0,37), natomiast powodował spadek stężeń heksanianu etylu (-0,59), kwasu fenylooctowego (-0,50) i furfuralu (-0,47).

Przedstawione badania pozwalają na znaczne poszerzenie wiedzy dotyczącej związków zapachowych występujących w miodach pitnych z uwzględnieniem zarówno wielu zmiennych produkcyjnych (takich jak odmiana miodu pszczelego, ogrzewanie brzezki czy różne rodzaje fermentacji) jak i zmian zachodzących w procesie produkcyjnym. Dzięki zgromadzonym danym możliwe było: wyznaczenie głównych zmian w stężeniach związków zapachowych zachodzących w czasie fermentacji i dojrzewania produktu, określenie wagi wpływu poszczególnych parametrów produkcyjnych oraz określenie różnic w profilach zapachowych pomiędzy fermentacją spontaniczną oraz drożdżową. Typ zastosowanego miodu pszczelego określa główny charakter profilu zapachowego uzyskanego produktu oraz intensywność jego aromatu, natomiast zastosowanie różnych typów fermentacji pozwala na uwydatnienie określonych nut zapachowych, czego przykładem jest podbicie aromatów miodowych i kwiatowych w miodach pitnych z zastosowaną fermentacją spontaniczną. Zastosowanie różnorodnych odpowiednio dobranych i precyzyjnych metod instrumentalnych, określających aromat produktu na

poziomie molekularnym pomogło w dostarczeniu istotnych informacji na temat kształtowania się zapachu w tym tradycyjnym napoju alkoholowym, co z pewnością będzie przydatne nie tylko dla dalszych badań naukowych nad tematem, ale również pomocą dla producentów. Omawiane badania ukazują również ogromną wagę procesu dojrzewania, który dzięki swojej długości wywiera pozytywny wpływ na aromat miodów pitnych, a jego skrócenie mogłoby owocować pojawianiem się niepożądanych zapachów w produkcie i obniżeniem jego jakości.

Uzyskane wyniki prezentują również wysoką wartość praktyczną, umożliwiając producentom optymalizację aromatu ich miodu pitnego. Uzyskane wyniki niewątpliwie przyczynią się do zwiększenia różnorodności profili aromatów miodu poprzez zastosowanie nowych rozwiązań. Przeprowadzone badania ukazują, jakie odmiany miodu pszczelego powinny zostać zastosowane w celu osiągnięcia konkretnego charakteru aromatycznego gotowego wyrobu, a także pokazują, że zastosowanie fermentacji spontanicznej może pozwolić na uwydatnienie aromatów miodowych i kwiatowych. Istotnym aspektem badań jest również wskazanie konsekwencji skrócenia czasu dojrzewania produktu.

9. Spis literatury

- Bednarek, M., Szwengiel, A., Belén Flórez, A., Czarnecki, Z., & Mayo, B. (2019). Effect of different starter cultures on chemical and microbial parameters of buckwheat honey fermentation. *Food Microbiology*, 82, 294–302. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.03.006>
- Bénes, I., Furdíková, K., & Šmogrovičová, D. (2015). Influence of *Saccharomyces cerevisiae* strain on the profile of volatile organic compounds of blossom honey mead. *Czech Journal of Food Sciences*, 33(4), 334–339. <https://doi.org/10.17221/48/2015-CJFS>
- Boban, A., Vrhovsek, U., Carlin, S., Mucalo, A., & Budić-Leto, I. (2022). A Targeted and an Untargeted Metabolomics Approach to the Volatile Aroma Profile of Young ‘Maraština’ Wines. *Metabolites*, 12(12). <https://doi.org/10.3390/metabo12121295>
- Câmara, J. S., Alves, M. A., & Marques, J. C. (2006). Changes in volatile composition of Madeira wines during their oxidative ageing. *Analytica Chimica Acta*, 563(1-2 SPEC. ISS.), 188–197. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.10.031>
- Czabaj, S., Kawa-Rygielska, J., Dziuba, E., Foszczyńska, B., & Kliks, J. (2016). Proces Dojrzewania i Jego Wpływ na Jakość Miodów Pitnych. *Acta Scientiarum Polonorum*, 15(1), 5–14.
- Dunkel, A., Steinhaus, M., Kotthoff, M., Nowak, B., Krautwurst, D., Schieberle, P., & Hofmann, T. (2014). Nature’s chemical signatures in human olfaction: A foodborne perspective for future biotechnology. *Angewandte Chemie - International Edition*, 53(28), 7124–7143. <https://doi.org/10.1002/anie.201309508>
- Escudero, A., Hernández-Orte, P., Cacho, J., & Ferreira, V. (2000). Clues about the role of methional as character impact odorant of some oxidized wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9), 4268–4272. <https://doi.org/10.1021/jf991177j>
- Etschmann, M., Bluemke, W., Sell, D., & Schrader, J. (2002). Biotechnological production of 2-phenylethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-0992-x>

- Ferreira, V., Jarauta, I., López, R., & Cacho, J. (2003). Quantitative determination of sotolon, maltol and free furaneol in wine by solid-phase extraction and gas chromatography-ion-trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1010(1), 95–103. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00963-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00963-4)
- Fortune Business Insights. (2024). Mead Beverage Market Size, Share & Industry Analysis, By Type (Fruit Mead and Traditional Mead), Distribution Channel (Supermarkets/Hypermarkets, Specialty Stores, Online Sales Channels, and Others), and Regional Forecast. <https://www.fortunebusinessinsights.com/mead-market-102278>
- Franitza, L., Granvogl, M., & Schieberle, P. (2016). Characterization of the Key Aroma Compounds in Two Commercial Rums by Means of the Sensomics Approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(3), 637–645. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b05426>
- Haag, F., Hoffmann, S., & Krautwurst, D. (2021). Key Food Furanones Furaneol and Sotolone Specifically Activate Distinct Odorant Receptors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(37), 10999–11005. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c03314>
- Kreissl J, Mall V, Steinhaus P, S. M. (2022). Leibniz-LSB@TUM Odorant Database, Version 1.2. Leibniz-LSB@TUM Odorant Database, Version 1.2. <https://www.leibniz-lsb.de/en/datenbanken/leibniz-lsb-tum-odorant-database/odorantdb>
- Laing, D. G. (1994). Perceptual odour interactions and Analysis Objective Mixture. *Current*, 5, 75–80.
- Li, R., & Sun, Y. (2019). Effects of Honey Variety and Non-*Saccharomyces cerevisiae* on the Flavor Volatiles of Mead. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 77(1), 40–53. <https://doi.org/10.1080/03610470.2018.1546072>
- Marrufo-Curtido, A., Ferreira, V., & Escudero, A. (2022). Factors That Affect the Accumulation of Strecker Aldehydes in Standardized Wines: The Importance of pH in Oxidation. *Molecules*, 27(10). <https://doi.org/10.3390/molecules27103056>
- Mayr, C. M., Geue, J. P., Holt, H. E., Pearson, W. P., Jeffery, D. W., & Francis, I. L. (2014). Characterization of the key aroma compounds in shiraz wine by quantitation, aroma

- reconstitution, and omission studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(20), 4528–4536. <https://doi.org/10.1021/jf405731v>
- Monforte, A. R., Martins, S. I. F. S., & Silva Ferreira, A. C. (2018). Strecker Aldehyde Formation in Wine: New Insights into the Role of Gallic Acid, Glucose, and Metals in Phenylacetaldehyde Formation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(10), 2459–2466. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b00264>
- Patrianakou, M., & Roussis, I. G. (2013). Decrease of wine volatile aroma esters by oxidation. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 34(2), 241–245. <https://doi.org/10.21548/34-2-1100>
- Pereira, A. P., Mendes-Ferreira, A., Dias, L. G., Oliveira, J. M., Estevinho, L. M., & Mendes-Faia, A. (2019). Volatile composition and sensory properties of mead. *Microorganisms*, 7(10). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7100404>
- Pérez, A. G., Olías, R., Sanz, C., & Olías, J. M. (1996). Furanones in Strawberries: Evolution during Ripening and Postharvest Shelf Life. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(11), 3620–3624. <https://doi.org/10.1021/jf960099m>
- Pino, J. A., & Fajardo, M. (2011). Volatile composition and key flavour compounds of spirits from unifloral honeys. *International Journal of Food Science and Technology*, 46(5), 994–1000. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02586.x>
- Quek, J. M. B., Seow, Y. X., Ong, P. K. C., & Liu, S. Q. (2011). Formation of Volatile Sulfur-Containing Compounds by *Saccharomyces cerevisiae* in Soymilk Supplemented with L-methionine. *Food Biotechnology*, 25(4), 292–304. <https://doi.org/10.1080/08905436.2011.617254>
- Rahman, M. M., Alam, M. N., Fatima, N., Shahjalal, H. M., Gan, S. H., & Khalil, M. I. (2017). Chemical composition and biological properties of aromatic compounds in honey: An overview. *Journal of Food Biochemistry*, 41(6), 1–11. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12405>
- Rasmussen, S. C. (2015). From honey wine to the cultivation of the grape: An early history of fermented beverages. In ACS Symposium Series (Vol. 1211, pp. 89–138). <https://doi.org/10.1021/bk-2015-1211.ch004>

- Reglitz, K., Féchir, M., Mall, V., Voigt, J., & Steinhaus, M. (2022). The impact of caramel and roasted wheat malts on aroma compounds in top-fermented wheat beer. *Journal of the Institute of Brewing*, 128(4), 138–149. <https://doi.org/10.1002/jib.701>
- Roldán, A., van Muiswinkel, G. C. J., Lasanta, C., Palacios, V., & Caro, I. (2011). Influence of pollen addition on mead elaboration: Physicochemical and sensory characteristics. *Food Chemistry*, 126, 574–582. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.045>
- Schieberle, P., & Hofmann, T. (2011). Mapping the Combinatorial Code of. In *Food Flavors* (pp. 411–436). <https://doi.org/10.1201/b11187-19>
- Schwarz, L. V., Marcon, A. R., Delamare, A. P. L., Agostini, F., Moura, S., & Echeverrigaray, S. (2020). Selection of low nitrogen demand yeast strains and their impact on the physicochemical and volatile composition of mead. *Journal of Food Science and Technology*, 57(8), 2840–2851. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04316-6>
- Soares Da Costa, M., Gonçalves, C., Ferreira, A., Ibsen, C., Guedes De Pinho, P., & Silva Ferreira, A. C. (2004). Further insights into the role of methional and phenylacetaldehyde in lager beer flavor stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7911–7917. <https://doi.org/10.1021/jf049178l>
- Sottit, C., Salor-Torregrosa, J. M., Moreno-Garcia, J., Peinado, J., Mauricio, J. C., Moreno, J., & Garcia-Martinez, T. (2019). Using *Torulaspora delbrueckii*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* wine yeasts as starter cultures for fermentation and quality improvement of mead. *European Food Research and Technology*, 245(12), 2705–2714. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03384-z>
- Starowicz, M., & Granvogl, M. (2022). Effect of Wort Boiling on Volatiles Formation and Sensory Properties of Mead. *Molecules*, 27(3). <https://doi.org/10.3390/molecules27030710>
- Szudera-Kończal, K. (2023). *Wykorzystanie pleśni Galactomyces geotrichum do otrzymywania kompozycji aromatycznych z maślanki i serwatki. Charakterystyka związków aktywnych zapachowo w oparciu o podejście sensomiczne.*[Rozprawa doktorska, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu]

- Szudera-Konćzał, K., Myszka, K., Kubiak, P., & Majcher, M. A. (2020). The Use of Sour and Sweet Whey in Producing Compositions with Pleasant Aromas Using the Mold *Galactomyces geotrichum*: Identification of key odorants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(39), 10799–10807. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c03979>
- Szudera-Konćzał, K., Myszka, K., Kubiak, P., & Majcher, M. A. (2021). Analysis of the ability to produce pleasant aromas on sour whey and buttermilk by-products by mold *galactomyces geotrichum*: Identification of key odorants. *Molecules*, 26(20). <https://doi.org/10.3390/molecules26206239>
- Vidrih, R., & Hribar, J. (2007). Studies on the sensory properties of mead and the formation of aroma compounds related to the type of honey. *Acta Alimentaria*, 36(2), 151–162. <https://doi.org/10.1556/AAlim.36.2007.2.2>
- Wintersteen, C. L., Andrae, L. M., & Engeseth, N. J. (2005). Effect of heat treatment on antioxidant capacity and flavor volatiles of mead. *Journal of Food Science*, 70(2), 119–126. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb07071.x>
- Zhu, L. X., Zhang, M. M., Liu, Z., Shi, Y., & Duan, C. Q. (2019). Levels of furaneol in Msalais wines: A comprehensive overview of multiple stages and pathways of its formation during Msalais winemaking. *Molecules*, 24(17), 18–21. <https://doi.org/10.3390/molecules24173104>

10. Kopie prac wchodzących w skład zbioru

Publikacja 1

Cicha-Wojciechowicz, D., Frank, S., Steinhaus, M., Majcher, M.A., 2024. Key Odorants Forming Aroma of Polish Mead: Influence of the Raw Material and Manufacturing Process. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 72 (18), p. 10548-10557, <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.4c01276>

Key Odorants Forming Aroma of Polish Mead: Influence of the Raw Material and Manufacturing Processes

Published as part of *Journal of Agricultural and Food Chemistry* virtual special issue "13th Wartburg Symposium on Flavor Chemistry and Biology".

Daria Cicha-Wojciechowicz, Stephanie Frank, Martin Steinhaus, and Małgorzata Anna Majcher*



Cite This: *J. Agric. Food Chem.* 2024, 72, 10548–10557



Read Online

ACCESS |



Metrics & More



Article Recommendations



Supporting Information

ABSTRACT: Mead was analyzed by using the concept of molecular sensory science for the identification of key odorants. A total of 29 odor-active compounds were identified in mead by using gas chromatography olfactometry (GCO). Flavor dilution (FD) factors of identified compounds ranged from 1 to 16,384, compounds with FD factors ≥ 32 were quantitated by using stable isotopically substituted odorants as internal standards or external standard method, and odor activity values (OAVs) were calculated. Fifteen compounds showed OAVs ≥ 1 : aldehydes (2-phenylacetaldehyde, 3-(methylsulfanyl)propanal), 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde), esters (ethyl 3-methylbutanoate, ethyl propanoate, ethyl octanoate), alcohols (2-phenylethan-1-ol, 3- and 2-methylbutan-1-ol, 3-(methylsulfanyl)propan-1-ol), furanones (4-hydroxy-2,5-dimethylfuran-3(2H)-one, 3-hydroxy-4,5-dimethylfuran-2(5H)-one), acids (3- and 2-methylbutanoic acid, acetic acid), 1,1-diethoxyethane, and 4-methylphenol. 2-Phenylacetaldehyde (OAV, 3100) was suggested as the compound with the biggest influence on the aroma of mead, followed by 4-hydroxy-2,5-dimethylfuran-3(2H)-one (OAV, 1900), 3-(methylsulfanyl)propanal (OAV, 890), and 2-phenylethan-1-ol (OAV, 680). Quantitative olfactory profile analysis revealed strong honey, malty, and alcoholic impressions. Omission experiments revealed that 3-(methylsulfanyl)propanal, 2-phenylethan-1-ol, 4-hydroxy-2,5-dimethylfuran-3(2H)-one, ethyl propanoate, ethyl 3-methylbutanoate, 2-phenylacetaldehyde, 3- and 2-methylbutanoic acid, 3-hydroxy-4,5-dimethylfuran-2(5H)-one, and 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde were the key odorants in the mead. Determining concentrations of key odorants in important production steps showed that the fermentation and maturation stages had the strongest effect on the formation of mead aroma.

KEYWORDS: mead, GC-O, aroma extract dilution analysis (AEDA), stable isotopically substituted odorant, key odorants

INTRODUCTION

Mead is a traditional alcoholic beverage known since the Middle Ages throughout Europe, Asia, and Africa.¹ Poland has a long and rich history of mead production, dating back to ancient times, when it was already produced by the Slavic peoples who inhabited the region before the arrival of Christianity. Mead is a highly valued beverage in Polish culture, and it is often served at important celebrations and ceremonies. Since then, the way of production has not changed significantly and nowadays it is obtained by alcoholic fermentation of honey diluted with water in a proper ratio.² Its final alcohol content can vary from 8 to 18%.³ To attract final taste and aroma, manufacturers use the addition of fruits or fruit juices, spices, and herbs.⁴

Despite a long tradition of production, its popularity in Poland has decreased over the centuries in favor of wine, beer, and vodka. In 2019, the production of mead in Poland reached 7100 hectoliters. Over recent years, however, there has been an increase in domestic demand, as well as an increase in foreign exports of this alcoholic beverage.⁵ Presently, mead has a vast number of enthusiasts primarily due to its distinctive and unique flavor profile, described as ethanolic, honey-like, and fruity.¹¹

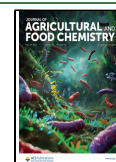
The aroma of food products is one of the most important properties considered by the consumer. The final aroma of the mead may be influenced by many factors. One of the most important is believed to be the type of honey used in the production process. Li and Sun⁶ showed differences in the odor active volatile compounds between multifloral and acacia honeys, especially in concentrations of alcohols and esters. The traditional production process of mead may include heating of wort before inoculating with yeast, which can lead to changes in volatile compounds. Wintersteen et al.⁷ reported differences in volatile compounds of low- and high-heated buckwheat meads, showing that the total amount of volatiles was significantly lower in low-heated than in high-heated buckwheat mead (109.42 and 129.99 mg/L respectively). This study showed that wort heating resulted in a higher total volatile amount in mead and also increased the concentration of 4-methylphenol with a phenolic, horse stable-like odor.

Received: February 8, 2024

Revised: April 9, 2024

Accepted: April 10, 2024

Published: April 26, 2024



Another important factor influencing the final quality of the mead is the type of yeast strain used in the fermentation process. Schwarz et al.⁸ selected yeast strains with low nitrogen demand and reported significant differences in volatile compounds between meads fermented with those strains. Differences in identified volatile compounds among meads fermented with different yeast strains were also shown by Teramoto et al.⁹ Studies on mandarin orange mead showed differences in dominant volatile compounds depending on the *Saccharomyces cerevisiae* strain used. Results obtained by Benes et al.¹⁰ also confirmed the relationship between different yeast strains and volatile compound composition in mead in the case of *S. cerevisiae* var. *bayanus*.

Although mead is recognized as one of the most traditional alcoholic beverages in Poland, to the best of our knowledge, there is a lack of scientific data about the formation of important odorants that are responsible for the final mead aroma. Most of the research results to date focus on the analysis of the volatile compounds in mead overlooking olfactometric analysis, which is proven to be crucial for the determination of odor-active compounds that affect the aroma of this alcoholic beverage.¹¹ Additionally, there are no data available regarding changes in the concentrations of important odorants during the production process. To the best of our knowledge, only Starowicz and Granvogl² applied olfactometric analysis for the identification of odorants in two types of mead (with and without wort boiling) by calculating OAVs. However, no reconstitution experiments were done. Taking this into consideration, we can conclude that the influence of major stages of manufacturing processes on important odorants of mead is still unrevealed. Choice of honey, heating of wort, fermentation process, and long maturation period are key production steps, which in our beliefs determine the final aroma of meads. In our opinion, knowledge of the impact of each stage of the production process is of key importance to the final aroma of this traditional alcoholic beverage.

The presented study aimed first to characterize key odorants of the Polish traditional mead and second to determine the influence of the manufacturing process on their formation. For this purpose, important odorants were identified by gas chromatography with olfactometry and aroma extract dilution analysis (AEDA) in combination with GC–MS and quantitated using stable isotopically substituted odorants as internal standards and semiquantitated by an external standard method. The odor activity values (OAVs) were calculated, and the aroma reconstitution model and omission experiments were performed. The influence of the manufacturing process on the mead's final aroma was investigated by determining the concentration of important odorants in honey, in samples on the first and 30th day of fermentation, and in mead.

MATERIALS AND METHODS

Mead and Honey Samples. Honey samples and samples from the production stages, first day of fermentation (F.1), 30th day of fermentation (F.30), and ready mead, were obtained from the mead producer in Augustów, Poland. Multifloral honey collected from the northeastern part of Poland was used for the mead production. To prepare wort, one part of honey was dissolved in two parts of water and boiled. After the wort was cooled, yeasts were added, and the fermentation process was held at 22 °C for 30 days. After fermentation, mead was matured for 12 months in 15 °C. Honey and mead samples were stored at 4 °C, and samples from the first and 30th day of fermentation were frozen at –21 °C until the day of analysis.

Reference Odorants. Pure reference odorants of compounds 1, 4–10, 12–23, and 26–29 were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Compounds 2 and 3 were obtained from Thermo Scientific (Waltham, MA). Compound 11¹² was synthesized according to the method described in the literature. Compound 24 was obtained from abcr GmbH (Karlsruhe, Germany).

Stable Isotopically Substituted Odorants. The following stable isotopically substituted standards were used: (²H₅)-3, (²H₅)-12, (²H₃)-15, (²H₃)-19, and (¹³C₂)-22 were purchased from EPTES (Vevey, Switzerland), (²H₃)-14, (²H₃)-17, (¹³C₂)-18, (²H₉)-19, and (²H₃)-20 were obtained from aromaLAB (Martinsried, Germany), and (²H₈)-naphthalene was obtained from Merck.

Gas Chromatography–Olfactometry and Compound Identification. A GC coupled with a cold on-column injector, a flame ionization detector, a sniffing port, and DB–FFAP (30 m × 0.32 mm i.d., film thickness 0.25 μm; Agilent, Waldbronn, Germany) or DB–5 (30 m × 0.32 mm i.d., film thickness 0.25 μm; Agilent) columns was used for GC–O analyses. Identification was performed using a GC–O/FID system, a GC–GC–MS (Pegasus III) system, a heart-cut GC–GC–HRMS system, and a GC–QQQ–MS (MRM mode) system. Detailed specifications of the GC systems used are provided in the [Supporting Information](#).

Structure proposals were developed using GC–O by comparing odor descriptors of detected odorants and their RIs to the data of reference compounds available at the Leibniz-LSB@TUM Odorant Database.¹³ The proposed structures were confirmed by analyzing proper reference compounds in an adjusted dilution and comparing them to those present in mead volatile isolates using two columns of different polarities (DB–FFAP and DB–5). The final identification was performed by a GC–GC–MS (Pegasus III) system, a heart-cut GC–GC–HRMS system in the EI and CI modes, and a GC–QQQ–MS (MRM mode) system.

Isolation of Mead Volatiles. Mead (50 mL) was extracted with dichloromethane (50 mL × 3). Combined organic phases were washed with saturated sodium chloride (150 mL × 3) and dried over anhydrous sodium sulfate. Nonvolatiles were removed by automated solvent-assisted flavor evaporation (aSAFE)¹⁴ at 40 °C using an open/closed time combination for the pneumatic valve of 0.2 s/10 s. The distillate was concentrated to a final volume of 0.5 mL using a Vigreux column. Mead volatile isolates were stored at –20 °C until analysis.

At all stages of mead volatile isolation, the odor was monitored. The extract, distillate, and concentrated mead isolate were orthonasally tested on a strip of filter paper. The characteristic odor of mead was perceivable at all stages of mead volatiles isolation.

AEDA. The mead volatile isolate was prepared as described above and then stepwise diluted with dichloromethane to obtain 1:2, 1:4, 1:8, ..., and 1:16,392 dilutions. Each isolate dilution was analyzed by a GC–O/FID system. Each odorant was assigned an FD factor representing the dilution factor of the highest diluted sample, in which the odor-active compound was detected during the GC–O/FID system.

Odorant Quantitation. For the quantitation, compounds with an FD factor higher than or equal to 32 were chosen. To the different volumes of mead, F.1, and F.30 (0.5–150 mL), stable isotopically substituted odorants of the target analytes dissolved in dichloromethane (in concentration ranges from 1 to 30 μg/mL) were added. After stirring for 30 min at room temperature for equilibration, the samples were extracted with dichloromethane (total volume ranged from 3 to 450 mL), washed with saturated sodium chloride, and dried over anhydrous sodium sulfate. Honey samples (10–100 mL) were diluted with water (10–100 mL) and stirred until dissolved. Then, stable isotopically substituted odorants of the target analytes dissolved in dichloromethane (in concentrations ranges from 1 to 30 μg/mL) were added. After stirring for 30 min at room temperature for equilibration, the samples were extracted with dichloromethane (total volume ranged from 30 to 450 mL) and dried over anhydrous sodium sulfate. Volatile compounds from all samples were isolated by SAFE. Distillates were concentrated to final volumes from 0.5 to 1 mL. The concentrates were analyzed using GC–GC–MS (Pegasus 4D) system

Table 1. Odor-Active Compounds Identified among Volatiles Isolated from Mead

no.	odorant ^a	CAS	odor quality	RI ^b		FD factor ^c
				FFAP	DB-5	
1	1,1-diethoxyethane	105-57-7	fruity	931	736	64
2	3-methylbutanal	590-86-3	malty	933	683	8
	2-methylbutanal	96-17-3				
3	ethyl propanoate	105-37-3	fruity, glue-like	950	717	512
4	butane-2,3-dione	431-03-8	butter-like	981	621	1
5	ethyl butanoate	105-54-4	fruity	1039	804	8
6	ethyl 2-methylbutanoate	7452-79-1	fruity	1055	854	8
7	ethyl 3-methylbutanoate	108-64-5	fruity, blueberry-like	1073	858	128
8	ethyl pentanoate	539-82-2	fruity	1140	898	1
9	3-methylbutan-1-ol	123-51-3	malty, solvent-like	1211	739	256
	2-methylbutan-1-ol	137-32-6				
10	ethyl hexanoate	123-66-0	fruity, pineapple-like	1236	1004	8
11	1-(3,4-dihydro-2H-pyrrol-5-yl)ethan-1-one	85213-22-5	popcorn-like, roasty	1348	936	128
12	ethyl octanoate	106-32-1	fruity, green	1436	1194	128
13	acetic acid	64-19-7	vinegar-like	1457	632	32
14	3-(methylsulfanyl)propanal	3268-49-3	cooked potato-like	1464	909	512
15	furan-2-carbaldehyde	98-01-1	sweet	1477	831	32
16	2-methylpropanoic acid	79-31-2	sweaty	1564	811	8
17	butanoic acid	107-92-6	sweaty	1630	804	32
18	2-phenylacetaldehyde	122-78-1	floral, honey-like	1650	1056	32
19	3-methylbutanoic acid	503-74-2	sweaty	1670	892	256
	2-methylbutanoic acid	116-53-0				
20	3-(methylsulfonyl)propan-1-ol	505-10-2	cooked potato-like	1724	982	64
21	(2E)-1-(2,6,6-trimethylcyclohexa-1,3-dien-1-yl)but-2-en-1-one	255058-92-5	cooked apple-like	1822	1387	16
22	2-phenylethan-1-ol	60-12-8	floral, honey-like	1917	1119	16,384
23	4-hydroxy-2,5-dimethylfuran-3(2H)-one	3658-77-3	caramel-like	2046	1078	1024
24	4-methylphenol	106-44-5	faecal, horse stable-like	2091	1076	64
25	4-methylquinazoline	700-46-9	mint-like, foxy	2115	1357	512
26	2-methoxy-4-(prop-2-en-1-yl)phenol	97-53-0	clove-like	2179	1362	1
27	3-hydroxy-4,5-dimethylfuran-2(5H)-one	28664-35-9	fenugreek-like	2213	1111	8192
28	phenylacetic acid	103-82-2	honey-like, beeswax-like	2572	1267	8
29	4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde	121-33-5	vanilla-like, sweet	2593	1404	32

^aStructure assignment was based on odor quality, RIs (DB-FFAP, DB-5), and mass spectrum; data were compared with the data obtained for reference compounds analyzed under the same conditions. ^bRetention index; calculated by linear interpolation of retention time of the odorant and adjacent *n*-alkanes. ^cFlavor dilution factor.

(1, 3, 7, 12, 14, 15, 17–20, 22) and GC–QQQ–MS system (9, 13, 24, 29). Peak areas of the target compounds and the internal standards were collected from the extracted ion chromatograms using unique quantifier ions. The concentrations of target compounds were calculated based on area counts of the target compound peak, the area counts of the stable isotopically substituted odorant peak, the amount of the sample used, and the amount of the stable isotopically substituted odorant added. The calibration line for every target compound was obtained by analysis of mixtures of the analyte and stable isotopically substituted odorant in five ratios (5:1, 2:1, 1:1, 1:2, and 1:5). For compounds 23, 25, and 27, an external standard quantitation method was applied. 150 mL of mead, F.1, and F.30 were extracted with dichloromethane (total volume 450 mL), washed with saturated sodium chloride, and dried over anhydrous sodium sulfate. The honey sample (75 mL) was diluted with water (75 mL) and stirred until it was dissolved. The sample was extracted with dichloromethane (total volume of 450 mL) and dried over anhydrous sodium sulfate. Volatile compounds from all samples were isolated by SAFE. Distillates were concentrated to final volumes of 0.5 mL and analyzed using a GC–QQQ–MS (MRM mode) system. Peak areas of the target compounds were collected from the selected transition from the MRM mode. The concentrations of target compounds were calculated based on area counts of the target compound peak and the amount of the sample used. The calibration line for every target compound was obtained by analysis of the analytes in five

concentrations. Details of the quantitation are available in the Supporting Information (Tables S1 and S2).

Quantitative Olfactory Profile Analysis. For the mead sample, quantitative olfactory profile analysis was performed in a sensory room at 22 ± 1 °C. The sensory panel consisted of 18 experienced assessors (12 females and 6 males, aged from 25 to 55), who were trained weekly. Odor descriptors were chosen in the preliminary experiments. Before the final analysis, assessors experienced a training session with the chosen odor descriptors and their descriptions. Odor descriptors were obtained from Givoudan (Vernier, Switzerland). For quantitative olfactory profile analysis, the panelists were asked to rate each odor quality using a 10 cm linear scale from 0 (not perceivable) to 10 (strongly perceivable). Samples (20 mL) were presented in covered glass vessels at room temperature.

Odor Reconstitution Model Preparation. For odor reconstitution model evaluation, 12% ethanol (v/v) solution containing 120 g/L of sugar and 5.5 g/L of glycerol and pH 3.6 was prepared. To the solution were added all odorants with an OAV of ≥1 (odorants were prepared in an ethanol solution). The final odorant concentrations in the model represent the concentrations previously determined in the mead. The odor reconstitution model was analyzed as described above by five experienced assessors (3 females and 2 males, aged from 27 to 60).

Omission Experiments. Three-alternative forced choice (3-AFC) tests were performed to determine the influence of particular odorants on the final aroma of the mead. The complete odor reconstitution

Table 2. Concentration, OTC, and OAV for Odorants in Mead

no. ^a	odorant	concentration (mg/L) ^b	OTC (mg/L) ^c	OAV ^d
18	2-phenylacetaldehyde	16.2	0.0052 ¹³	3100
23	4-hydroxy-2,5-dimethylfuran-3(2H)-one	48.5	0.025 ⁴⁸	1900
14	3-(methylsulfanyl)propanal	0.384	0.00043 ¹³	890
22	2-phenylethan-1-ol	95.9	0.14 ¹³	680
27	3-hydroxy-4,5-dimethylfuran-2(5H)-one	0.448	0.0017 ¹³	290
9	3- and 2-methylbutan-1-ol	53.8	0.22 ¹³	240
7	ethyl 3-methylbutanoate	0.497	0.0022 ¹³	230
1	1,1-diethoxyethane	19.0	0.72 ¹⁶	26
3	ethyl propanoate	0.126	0.0049 ¹³	26
12	ethyl octanoate	0.164	0.0087 ¹³	19
20	3-(methylsulfanyl)propan-1-ol	0.304	0.036 ¹³	8.4
24	4-methylphenol	0.00696	0.0039 ¹³	1.8
19	3- and 2-methylbutanoic acid	0.868	0.49 ¹³	1.8
13	acetic acid	7.90	5.6 ¹³	1.4
29	4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde	0.0546	0.053 ¹³	1.0
15	furan-2-carbaldehyde	1.72	3.0 ⁴⁹	<1
17	butanoic acid	0.349	2.4 ¹³	<1
25	4-methylquinazoline	0.0000378	0.00043 ¹³	<1

^aCompounds were ordered according to decreasing OAVs calculated for the mead sample. ^bConcentration (mg/L); mean of triplicates; coefficients of variation of all odorants were <10% and together with quantitation details are given in the Supporting Information (Table S3).

^cOdor threshold concentration in water; reference numbers represent OTCs in water from literature. ^dOdor activity value; calculated as the ratio of the concentration in mead to OTC.

model was prepared as described above. The incomplete models each lacking one aroma-active compound (OAV ≥ 1) were prepared and orthonasally tested against complete reconstitution models in (3-AFC) tests performed by eight experienced assessors (5 females and 3 males, aged 27 to 60). Statistical significance evaluation was based on the total number of participants and the correctly identified samples, according to Jellinek.¹⁵

RESULTS AND DISCUSSION

Screening for Odor-Active Compounds and Structure Identification. Gas chromatography with olfactometry (GC–O/FID system), a GC–GC–MS (Pegasus III) system, a heart-cut GC–GC–HRMS system, and a GC–QQQ–MS (MRM mode) system was applied for the identification of odor-active compounds in the mead sample.

The application of GC–O/FID analyses and AEDA showed a total of 29 odor-active compounds in the tested mead sample. All identified odor-active compounds coupled to AEDA results are shown in Table 1.

Identified compounds can be divided into different groups according to their chemical structures. The largest group was esters with a pleasant, fruity odor (3, 5, 6, 7, 8, 10, and 12). Esters are known for being formed during microbial fermentation of beverages. Ethyl esters produced during fatty acid metabolism in the reaction of ethanol with acyl-CoA¹⁶ were previously found in other studies on mead volatiles.^{17,18} Li and Sun⁶ found 23 esters contributing to the fruity aroma of mead. Their concentrations varied due to the different honey sources used for mead production. Esters are also believed to be responsible for the fruity aroma of young wines.¹⁹ The second largest group of odor-active compounds in mead samples was aldehydes. Odor impressions caused by this group of compounds were more diverse. Malty odor (2) was followed by cooked potato-like (14), sweet (15), floral, honey-like (18), and vanilla-like (29). Those compounds, as well as esters, are produced in food during fermentation processes or the Maillard reaction.²⁰ Aldehydes were also found in other mead volatiles studies.²¹ The next groups identified during the

study were acids, represented by (13) with vinegar-like odor, sweaty (16, 17, 19), and honey, beeswax-like (28). This group of volatiles was also found in sparkling, boiled, and pollen-nourished meads.^{2,22,23} Other compounds identified in the mead sample were fruity (1), butter-like (4), malty, solvent-like (9), popcorn-like, roasty (11), cooked potato-like (20), cooked apple-like (21), floral, honey-like (22), caramel-like (23), faecal, horse stable-like (24), mint-like (25), clove-like (26), and fenugreek-like (27). 4-Methylquinazoline (25) has never been identified in alcoholic beverages before. Previously, it was found in pan-fried white mushrooms²⁴ (*Agaricus bisporus* L.), gluten-free rice bread,²⁵ and matsutake mushroom²⁶ (*Tricholoma matsutake* Sing.). Although data on its sources are very limited, this odor-active compound was recently discovered to be an important airborne biomolecule emitted by brown recluse spider²⁷ (*Loxosceles reclusa*). Its formation was also linked with the degradation of the tryptophan metabolite indole-3-acetic acid by *Pseudomonas aeruginosa*.²⁵

The FD factors ranged between 1 and 16,384. The highest FD factor was obtained for 2-phenylethan-1-ol (16,384) with a floral, honey-like odor. Other compounds with FD factors between 8192 and 128 were fenugreek-like 3-hydroxy-4,5-dimethylfuran-2(5H)-one (8192), caramel-like 4-hydroxy-2,5-dimethylfuran-3(2H)-one (1024), fruity, glue-like ethyl propanoate (512), cooked potato-like 3-(methylsulfanyl)propanal (512), mint-like, foxy 4-methylquinazoline (512), malty, solvent-like 3- and 2-methylbutan-1-ol (256), sweaty 3- and 2-methylbutanoic acid (256), fruity, blueberry-like ethyl 3-methylbutanoate (128), roasty 1-(3,4-dihydro-2H-pyrrol-5-yl)ethan-1-one (128), and fruity, green ethyl octanoate (128).

Quantitation of Odorants in Mead and OAV Calculation. For quantitation purposes, a total of 18 compounds with FD factor ≥ 32 were analyzed using stable isotopically substituted odorants as internal standards or an external standard method (details in Supporting Information). Their OAVs were calculated as a ratio of their concentration to the OTC in water collected from the literature. According to

quantitation experiments, the highest concentrations were determined for odorants **22** (95.9 mg/L), **9** (53.8 mg/L), and **23** (48.5 mg/L). Mead quantitation results for all quantified compounds, their OTCs, and their OAVs are shown in Table 2. Fifteen of the analyzed compounds showed OAVs ≥ 1 . The highest OAVs were calculated for 2-phenylacetaldehyde (**18**, OAV 3100), 4-hydroxy-2,5-dimethylfuran-3(2H)-one (**23**, OAV 1900), 3-(methylsulfanyl)propanal (**14**, OAV 890), and 2-phenylethan-1-ol (**22**, OAV 680). Those compounds are linked with odor qualities like honey-like, caramel-like, cooked potato-like, and floral. Other compounds with high or moderate OAVs were 3-hydroxy-4,5-dimethylfuran-2(5H)-one (**27**, OAV 290, fenugreek-like), 3-methylbutan-1-ol and 2-methylbutan-1-ol (**9**, OAV 240, malty, solvent-like), ethyl 3-methylbutanoate (**7**, OAV 230, fruity, blueberry-like), 1,1-diethoxyethane (**1**, OAV 26, fruity), ethyl propanoate (**3**, OAV 26, fruity), ethyl octanoate (**12**, OAV 19, fruity), and 3-(methylsulfanyl)propan-1-ol (**20**, OAV 8.4, cooked potato-like). Four compounds only slightly exceeded their OTCs: 4-methylphenol (**24**, OAV 1.8, fecal, horse stable-like), 3-methylbutanoic acid, and 2-methylbutanoic acid (**19**, OAV 1.8, sweaty), acetic acid (**13**, OAV 1.4, vinegar-like), and 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde (**29**, OAV 1.0, vanilla-like, sweet). Only three of the identified compounds reached OAVs < 1 , including furan-2-carbaldehyde (**15**) with a concentration of 1.72 mg/L and butanoic acid (**17**) with a concentration of 0.349 mg/L. Surprisingly, 4-methylquinazoline (**25**) despite a high FD factor (FD factor 512) had a concentration below its OTC (0.0000378 mg/L). This exemplifies the importance of the quantitation and the calculation of OAVs for the substantiation of GC-O data.²⁹

2-Phenylacetaldehyde (**18**) according to the highest OAV was suggested to have a major influence on the final aroma of mead. This compound with a floral, honey-like odor is present in honey, independent of its origin. It was previously identified in mead nourished with bee pollen.²³ Pino and Fajardo²⁸ obtained OAV for this compound in the range from 3 to 5 in spirits made by distillation of unifloral meads. Although 2-phenylacetaldehyde is associated with the “premature oxidation” of wines,³⁰ its honey-like odor is highly desirable in mead. The compound with the second highest OAV was 4-hydroxy-2,5-dimethylfuran-3(2H)-one (**23**). Although together with 3-hydroxy-4,5-dimethylfuran-2(5H)-one (**27**), it is often described as a compound influencing the aroma of wines,³¹ and in meads, those compounds were identified only once, by Starowicz and Granvogl.² Concentration of compound **23** in the mead sample was 48.5 mg/L, which is in agreement with concentrations of 4-hydroxy-2,5-dimethylfuran-3(2H)-one in Msalais wine quantitated by Zhu et al.³² Caramel-like (**23**) was also found in red wines.^{33,34} Cooked potato-like smelling 3-(methylsulfanyl)propanal (**14**) was the compound with the third highest OAV in the mead sample. This compound is believed to be associated with the flavor of aged beer²⁰ and oxidized wines.³⁵ Floral-like (**22**) is commonly found in alcoholic beverages such as beers,³⁶ wines,³³ and meads.³⁷ It is also present in honey.³⁸ In our studies, the concentration of 2-phenylethan-1-ol in mead was 95.9 mg/L, and on the contrary, Starowicz and Granvogl² quantified 2-phenylethan-1-ol (**22**) at much lower levels: 0.82 mg/L for mead prepared with unheated wort and 0.551 mg/L for mead where the heating process was applied. Pascoal et al.²² noted more similar concentrations for mead prepared with combined fining agents (49.6 mg/L). Other compounds with high OAV

were also previously found in alcoholic beverages. 3-Methylbutan-1-ol and 2-methylbutan-1-ol (**9**) are widely identified compounds responsible for the aroma of meads. Pereira et al.¹⁷ showed concentrations of these compounds ranging from 78.8 to 125 mg/L and from 8.79 to 16.6 mg/L, respectively, in meads fermented with different *S. cerevisiae* strains and conditions. Pascoal et al.²² noted similar results in meads prepared with different fining agents. In addition, Sottit et al.³⁹ revealed that the concentration of 2-methylbutan-1-ol differed significantly in mead samples fermented with *Torulaspora delbrueckii*, *Saccharomyces bayanus*, and *S. cerevisiae* and ranged from 97.1 to 120 mg/L. The concentration level of both compounds (quantitated as a mixture) in this research was lower than those achieved in the studies mentioned above and reached 53.8 mg/L. The concentration of ethyl 3-methylbutanoate (**7**) was determined with 0.497 mg/L, being the ethyl ester with the highest OAV in the mead sample. This compound with a fruity, blueberry-like odor was previously described as one of the most important odor-active molecules in meads prepared with or without wort boiling.² Its concentration in this study was quite similar to this presented here and reached 0.25 mg/L. As shown in previous studies, aroma of mead may be influenced by many factors, such as honey type,⁶ microflora used for fermentation,^{8,9} and different parameters of production.^{2,7} Although the formation pathways of odor-active compounds may be similar, their final concentrations will depend on the production parameters used.

Quantitative Olfactory Profile Analysis. A quantitative olfactory profile analysis of the mead sample was performed to characterize its sensory attributes. Analysis was performed by trained assessors, and descriptors were chosen in preliminary experiments. The results of the analysis are shown in Figure 1. Mead samples showed strong general odor intensity. The sensory panel characterized the aroma of mead as predominantly honey-like, malty, and alcoholic, with subtler notes of rum, fermented, caramel, and floral. The results are in correlation with the OAV of quantitated compounds, as for the honey-like and floral odor note compounds **18** and **22**

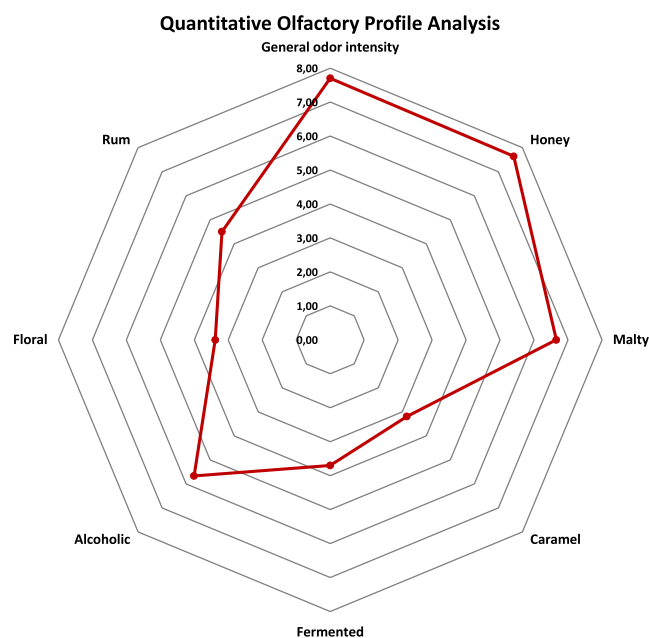


Figure 1. Quantitative olfactory profile analysis of mead.

reached OAVs of 3100 and 680, respectively. Malty, solvent-like 9 had an OAV of 240. Caramel-like 23 showed the second highest OAV of 1900.

Odor Reconstitution Model Evaluation. To verify that the identification and quantitation of odor-active compounds was performed correctly, an odor reconstitution model was analyzed. Odorants with an OAVs ≥ 1 were added to water/ethanol solution (88/12 by volume) in concentrations quantitated in the presented study. Sugar and glycerol concentrations of the model matrix were established similar to those in meads, and the pH was adjusted to 3.6. Trained assessors analyzed the odor reconstruction model, as it was described above. A comparison of the odor reconstruction model and mead analysis is shown in Figure 2. The odor

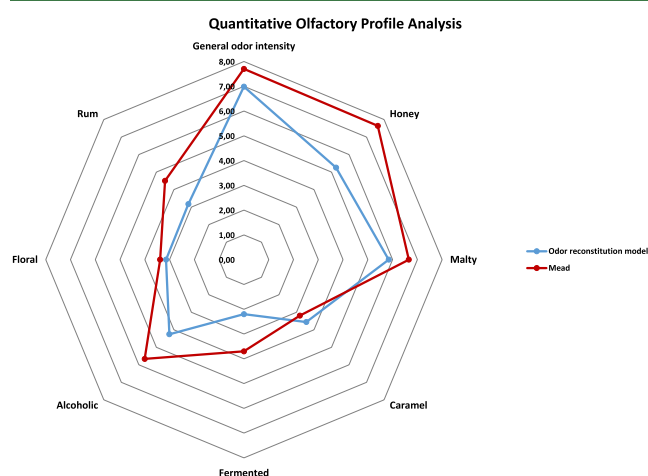


Figure 2. Quantitative olfactory profile analysis of odor reconstitution model and mead.

reconstruction model showed good similarity compared to the mead sample. The overall general intensity was rated similarly, as far as floral, alcoholic, caramel, malty, and rum descriptors are concerned. The biggest difference between those two samples was noticed for the honey odor. All in all, the resulting quantitative olfactory profiles revealed good agreements between the model and the mead sample, thus providing evidence that all major aroma contributing compounds in the mead were correctly identified and quantitated.

Omission Experiments. To confirm the importance of the quantitated odorants for the mead aroma, omission experiments were performed. The mead odor reconstitution model containing all odorants with OAVs ≥ 1 was compared with model mixtures of odorants, where one odorant was missing (results presented in Table 3). Very highly significant differences ($p < 0.1\%$) between evaluated samples were shown for 3-(methylsulfanyl)propanal (14) and 2-phenylethan-1-ol (22). Highly significant differences ($1\% \geq p \geq 0.1\%$) were noted for 4-hydroxy-2,5-dimethylfuran-3(2H)-one (23), and significant differences ($5\% \geq p > 1\%$) were noted for ethyl propanoate (3), ethyl 3-methylbutanoate (7), 2-phenylacetaldehyde (18), 3- and 2-methylbutanoic acid (19), 3-hydroxy-4,5-dimethylfuran-2(5H)-one (27), and 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde (29). For compounds 1, 9, 12, 13, 20, and 24, no significant differences were observed. Referring to the presented results, we can conclude that compounds 3, 7, 14, 18, 19, 22, 23, 27, and 29 were the key odorants forming the aroma of mead.

Table 3. Omission Tests Applied to the Mead Model

odorant omitted ^a	correct answers/ assessors ^b	p-value (%)	significance level ^c
18	6/8	2.0	*
23	7/8	0.3	**
14	8/8	0.0	***
22	8/8	0.0	***
27	6/8	2.0	*
9	3/8	53	—
7	6/8	2.0	*
1	4/8	26	—
3	6/8	2.0	*
12	1/8	96	—
20	2/8	80	—
24	5/8	8.8	—
19	6/8	2.0	*
13	3/8	53	—
29	6/8	2.0	*

^aCompounds were ordered according to Table 2. ^bNumber of correct answers resulting from the 3-AFC test and total number of assessors participating. ^c—, not significant ($p > 5\%$). * significant ($5\% \geq p > 1\%$). ** highly significant ($1\% \geq p \geq 0.1\%$). *** very highly significant ($p < 0.1\%$).

Influence of the Manufacturing Process on the Mead Aroma Formation.

To verify the influence of the manufacturing process on the aroma of mead, the quantitation of odor-active compounds was conducted at four different production stages: in raw material (multifloral honey), in samples at first day of fermentation to verify the influence of wort boiling, (F.1), in samples at 30th day of fermentation to verify the influence of fermentation, (F.30), and in the final product to verify the influence of maturation (mead after 1 year of maturation). Compounds were quantitated as described above. The results of the quantification of the four production points are shown in Table 4. Details of quantitation and coefficients of variation can be found in the Supporting Information.

8 out of the 18 quantitated compounds were found in every stage of production (18, 22, 9, 7, 13, 29, 15, and 25). Boiling of wort increased the concentrations of compounds 18, 22, 20, 24, 13, 29, and 15, while after fermentation, we noticed an increase in the concentrations of compounds 18, 23, 14, 22, 27, 9, 7, 1, 3, 12, 20, 19, 13, and 17. The concentration of honey-like 2-phenylacetaldehyde (18) was over 12 times higher than that of the sample before fermentation. Floral-like 22 increased its concentration almost 80 times after wort boiling, and the fermentation process increased the production of this compound almost 30 times. Another compound that showed a high increase in its concentration was malty, solvent-like 9 with over 130 times higher concentration after the fermentation period. A high concentration of 23 with a pleasant, caramel-like odor (24.2 mg/L) was noted, even though it was not detected before fermentation. Ethyl esters (7, 3, and 12) as well as fruity 1 and cooked potato-like 14 increased their concentrations clearly during this manufacturing process. The maturation process caused increases in the concentrations of compounds 18, 23, 14, 22, 27, 1, 24, 29, and 15. 2-Phenylacetaldehyde (18) reached a concentration of 16.2 mg/L, which is twenty-two times higher than this quantitated after fermentation. A high increase of concentration in comparison with the postfermentation point was also observed for caramel-like 15 (33 times higher), vanilla-like 29 (over 7

Table 4. Concentration of Odorants in Honey, F.1, F.30, and Mead

no. ^a	odorant	concentration (mg/L) ^b			
		honey	F.1	F.30	mead
18	2-phenylacetaldehyde	0.0142	0.0569	0.725	16.2
23	4-hydroxy-2,5-dimethylfuran-3(2 <i>H</i>)-one	≤0.00224 ^c	≤0.00308 ^c	24.2	48.5
14	3-(methylsulfanyl)propanal	≤0.00209 ^c	≤0.00196 ^c	0.0871	0.384
22	2-phenylethan-1-ol	0.00888	0.704	20.6	95.9
27	3-hydroxy-4,5-dimethylfuran-2(5 <i>H</i>)-one	0.137	≤0.00702 ^c	0.145	0.448
9	3- and 2-methylbutan-1-ol	0.582	0.499	66.0	53.8
7	ethyl 3-methylbutanoate	0.611	0.212	0.550	0.497
1	1,1-diethoxyethane	≤0.0152 ^c	≤0.0168 ^c	6.79	19.0
3	ethyl propanoate	≤0.000175 ^c	≤0.000147 ^c	0.279	0.126
12	ethyl octanoate	≤0.000458 ^c	≤0.000211 ^c	1.85	0.164
20	3-(methylsulfanyl)propan-1-ol	≤0.00187 ^c	0.00828	0.582	0.304
24	4-methylphenol	0.0269	0.0452	≤0.00135 ^c	0.00696
19	3- and 2-methylbutanoic acid	≤0.000987 ^c	≤0.00184 ^c	1.85	0.868
13	acetic acid	0.589	0.812	13.3	7.90
29	4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde	0.00897	0.00964	0.00750	0.0546
15	furan-2-carbaldehyde	0.0680	0.142	0.0516	1.72
17	butanoic acid	≤0.00191 ^c	≤0.00112 ^c	1.87	0.349
25	4-methylquinazoline	0.00176	0.000481	0.0000509	0.0000378

^aCompounds were ordered according to Table 2. ^bConcentration (mg/L); mean of triplicates; coefficients of variation of all odorants were <10% and together with quantitation details are given in the Supporting Information (Table S4). ^cNo analyte peak was observed; values were derived from the integration of the background noise.

times higher), cooked potatoes-like 14, and floral 22 (over 4 times higher each). On the other hand, compounds 9, 7, 3, 12, 20, 19, 13, 17, and 25 showed a decrease in their concentrations. Concentration levels of particular compounds were mostly associated with their formation pathways. Concentrations of aldehydes (18, 14, 29, 15), 4-hydroxy-2,5-dimethylfuran-3(2*H*)-one, and 3-hydroxy-4,5-dimethylfuran-2(5*H*)-one (23 and 27) were the highest in mead after the maturation period. Compounds 23 and 14 were not detectable in honey and F.1 samples, and compound 27 was not detectable in the F.1 sample. In these cases, the obtained results suggest that the fermentation step may be an important factor for their formation. Compound 23 normally forms during the heating stage of processing, but it may be also produced by biotransformation pathways by microbes.³² For compounds 23, 14, and 27, clear changes in the rest of the described group were visible after 12 months of maturation of mead. Those results may be associated with the postfermentative formation of Strecker aldehydes, which takes place, for example, in wines. Marrufo-Curtido et al.⁴⁰ proved that 3-(methylsulfanyl)propanal and 2-phenylacetaldehyde concentrations significantly grew during the oxidation of wines. The increase of concentration of 3-(methylsulfanyl)propanal may be associated with oxidation mechanisms based on peroxidation of acetaldehyde.⁴¹ Higher concentration of 2-phenylacetaldehyde after maturation period can be explained by the presence of metals and oxygen, during the phenolic oxidation.³⁰ Due to long time of storage, oxygen can also cause oxidation of 3-(methylsulfanyl)propan-1-ol.⁴² By the oxidation of compound 20, we can observe a decrease of its concentration and an increase of 3-(methylsulfanyl)propanal. The same changes were observed by Ferreira et al. during oxidative aging of wines.⁴³ 4-hydroxy-2,5-dimethylfuran-3(2*H*)-one (23) concentration increased 2 times during the maturation period and increased from 24.2 to 48.5 mg/L. These results are in agreement with Zhu et al.³² who observed a significant increase in 4-hydroxy-2,5-dimethylfuran-3(2*H*)-

one level after the fermentation and storage process. According to the authors, the formation of this compound during storage of wine at room temperature can be caused by chemical transformations.

Two alcohols identified during the study (22 and 9) showed clear differences in their concentrations during production steps. Big increases in their concentrations were noted after wort boiling (22) and the fermentation process (22 and 9). Changes were also visible for 2-phenylethan-1-ol (22) after fermentation and the maturation period. 2-Phenylethan-1-ol (22) reached the maximum level of 95.9 mg/L in mead after maturation and 3- and 2-methylbutan-1-ol (9) had the highest concentration level in the F.30 sample (66.0 mg/L). Alcohols are one of the largest groups of compounds formed during the fermentation process. 2-Phenylethan-1-ol with floral odor is derived from phenylalanine and is considered desirable in wines; on the other hand, higher concentrations of 3- and 2-methylbutan-1-ol derived from branched-chain amino acids associated with malty and solvent odors may be considered as off-flavor. In addition to that 3-(methylsulfanyl)propan-1-ol (20) derived from methionine was not detected in the honey sample and reached maximum concentration for the F.30 sample. This compound with a cooked potato-like odor may be also considered as not desirable in wines and other alcoholic beverages.⁴⁴ The increase of 2-phenylethan-1-ol in the presented study may be associated with oxidative deamination of the free amino acids precursor, phenylalanine in the Ehrlich mechanism.⁴⁵

Acids quantified during the presented study (19, 13, and 17) associated with sweaty and vinegar-like odors changed their concentrations during the manufacturing process. 3- and 2-methylbutanoic acid as well as butanoic acid was not detected in honey and F.1 samples. After fermentation, they reached similar concentrations (1.85 and 1.87 mg/L respectively). Acetic acid did not show big changes in its concentration between the honey and F.1 samples, but the same as previous acids scored the highest concentration in the F.30 sample (13.3

mg/L). This compound may be produced during the fermentation process and as a result of ethanol oxidation. Moreover, in fermentation conducted by *S. cerevisiae* yeast, a direct relationship between glycerol and acetic acid production has been proven.⁴⁶ All three acids reduced their concentrations after 12 months of the maturation process.

Ethyl esters (3, 7, 12) responsible for fruity odors in mead showed changes in their concentration levels in the four tested samples. Ethyl propanoate and ethyl octanoate (3 and 12) were not detected in honey and F.1 samples and then reached maximal concentrations in sample F.30 (0.279 and 1.85 mg/L, respectively). After 12 months of maturation, concentration of those two compounds decreased to 0.126 and 0.164 mg/L, respectively. Ethyl 3-methylbutanoate showed differences in concentration levels among all tested points. This compound had the highest concentration in the honey sample (0.611 mg/L), decreased to 0.212 mg/L in F.1, and increased to 0.55 mg/L after fermentation. For the other esters, after the maturation process, the concentration decreased to 0.497 mg/L. Esters are mostly produced by yeast by alcoholic fermentation. Decreases in some ethyl esters can be observed during the aging of wines. Patrianakou and Roussis⁴⁷ proved that ethyl esters oxidized during the aging of the wine.

4-Methylphenol (24) with fecal, horse stable-like odor may be recognized as off-flavor in meads, wines, and other alcoholic beverages. This compound reached the highest concentration (0.0452 mg/L) in the F.1 sample, and this value was different from that detected for the honey sample. The increase in this compound in the F.1 sample may be explained by heat treatment of the wort. Wintersteen et al.⁷ showed that the concentration of 4-methylphenol increased significantly in highly heated buckwheat and soy meads. The lowest concentration of this compound was detected for the ready mead sample, although it was not detected in the F.30 sample.

4-Methylquinazoline (25) was identified in alcoholic beverages for the first time. The highest concentration of this compound was noted for the honey sample (0.00176 mg/L), and then, it decreased between tested samples to reach 0.0000378 mg/L, suggesting that honey could be a source of this mint-like compound. The data of its sources are very limited, and it is not clear why it was present in honey. Foulks et al.²⁷ found this compound in pheromones emitted by brown saculose spiders.

In conclusion, in this study, the molecular background of mead was elucidated, and the key odorants were characterized. Eighteen important aroma compounds were identified in the mead and its intermediate stages of the production. Quantitative analyses revealed that during the mead production process, changes in the concentration of compounds responsible for the final aroma of the product were visible. This knowledge provides valuable insights into aroma development throughout the production process, enabling beverage manufacturers to optimize the aroma of their mead, a crucial factor in consumer satisfaction.

■ ASSOCIATED CONTENT

SI Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.4c01276>.

Miscellaneous chemicals and materials; GC system details, and experimental data of quantitation parameters (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Malgorzata Anna Majcher – Faculty of Food Science and Nutrition, Poznań University of Life Sciences, 60-624 Poznań, Poland; orcid.org/0000-0003-4234-7881; Email: malgorzata.majcher@up.poznan.pl

Authors

Daria Cicha-Wojciechowicz – Faculty of Food Science and Nutrition, Poznań University of Life Sciences, 60-624 Poznań, Poland

Stephanie Frank – Leibniz Institute for Food Systems Biology at the Technical University of Munich (Leibniz-LSB@TUM), 85354 Freising, Germany; orcid.org/0000-0001-5853-4839

Martin Steinhaus – Leibniz Institute for Food Systems Biology at the Technical University of Munich (Leibniz-LSB@TUM), 85354 Freising, Germany; orcid.org/0000-0002-9879-1474

Complete contact information is available at: <https://pubs.acs.org/10.1021/acs.jafc.4c01276>

Funding

This study was supported by the National Science Centre (Poland) under grant no. UMO-2019/35/O/NZ9/00788 and Polish National Agency for Academic Exchange, contract number PPN/STA/2021/1/00032/U/00001. The publication was financed by the Polish Minister of Science and Higher Education as part of the Strategy of the Poznań University of Life Sciences for 2024–2026 in the field of improving scientific research and development work in priority research areas.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Piotr Piłsiewicz and Paweł Kotwica from Augustowska Miodosytia for their cooperation. The authors thank Julia Bock, Julia Schweiger, Jörg Stein, and Martyna Wieczorek for their technical support.

■ ABBREVIATIONS

3-AFC, tests, three-alternative forced choice tests; AEDA, aroma extract dilution analysis; aSAFE, automated solvent-assisted flavor evaporation; CI, chemical ionization; EI, electron ionization; FD factor, flavor dilution factor; FFAP, free fatty acid phase; FID, flame ionization detector; GC, gas chromatography; GC × GC, comprehensive two-dimensional gas chromatography; HRMS, high resolution mass spectrometry; GC–QQQ/MS, gas chromatography triple quad mass spectrometry; GC–O, gas chromatography–olfactometry; MRM mode, multiple reaction monitoring mode; MS, mass spectrometry; OAV, odor activity value; OTC, odor threshold concentration; RI, retention index; SIDA, stable isotope dilution assay

■ REFERENCES

- (1) Rasmussen, S. C. From Honey Wine to the Cultivation of the Grape: An Early History of Fermented Beverages. *Chemical Technology in Antiquity*; ACS Symposium Series; ACS Publications: Washington, DC, 2015; Vol. 1211, pp 89–138.
- (2) Starowicz, M.; Granvogel, M. Effect of Wort Boiling on Volatiles Formation and Sensory Properties of Mead. *Molecules* **2022**, 27 (3), 710–721.

- (3) Navratil, M.; Šturdík, E.; Gemeiner, P. Batch and continuous mead production with pectate immobilised, ethanol-tolerant yeast. *Biotechnol. Lett.* **2001**, *23* (12), 977–982.
- (4) Plust, D.; Marciniak, E.; Czerniejewska-Surma, B.; Surma, O.; Zapletal, P. Ocena aktywności przeciwutleniającej miodów pitnych dwójniak i zmiany tej aktywności w wyniku przechowywania. *ŻYWNOSĆ. Nauka. Technologia. Jakość.* **2018**, *115* (2), 120–127.
- (5) Bartoszewicz, A.; Oblakowska, K. Rynek i spożycie napojów alkoholowych w Polsce: podstawowe dane dla polityki społeczno-gospodarczej. *Zeszyty Naukowe Polskiego Towarzystwa Ekonomicznego w Zielonej Górze* **2021**, *15*, 61–83.
- (6) Li, R.; Sun, Y. Effects of Honey Variety and Non-Saccharomyces cerevisiae on the Flavor Volatiles of Mead. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **2019**, *77* (1), 40–53.
- (7) Wintersteen, C. L.; Andrae, L. M.; Engeseth, N. J. Effect of heat treatment on antioxidant capacity and flavor volatiles of mead. *J. Food Sci.* **2005**, *70*, 119–126.
- (8) Schwarz, L. V.; Marcon, A. R.; Delamare, A. P. L.; Agostini, F.; Moura, S.; Echeverrigaray, S. Selection of low nitrogen demand yeast strains and their impact on the physicochemical and volatile composition of mead. *J. Food Sci. Technol.* **2020**, *57* (8), 2840–2851.
- (9) Teramoto, Y.; Sato, R.; Ueda, S. Characteristics of fermentation yeast isolated from traditional Ethiopian honey wine ogol. *Afr. J. Biotechnol.* **2005**, *4*, 160–163.
- (10) Bénes, I.; Furdíková, K.; Šmogrovičová, D. Influence of *Saccharomyces cerevisiae* strain on the profile of volatile organic compounds of blossom honey mead. *Czech J. Food Sci.* **2015**, *33*, 334–339.
- (11) Schieberle, P.; Hofmann, T. Mapping the combinatorial code of food flavors by means of molecular sensory science approach. *Food Flavors*; CRC Press: Boca Raton, FL, 2011; pp 413–438.
- (12) Buttery, R. G.; Ling, L. C.; Juliano, B. O.; Turnbaugh, J. G. Cooked Rice Aroma and 2-Acetyl-1-Pyrroline. *J. Agric. Food Chem.* **1983**, *31*, 823–826.
- (13) Kreissl, J.; Mall, V.; Steinhaus, P.; Steinhaus, M. *Leibniz-LSB@TUM Odorant Database, Version 1.2*; Leibniz Institute for Food Systems Biology at the Technical University of Munich: Freising, Germany, 2022. <https://www.leibniz-lsb.de/en/databases/leibniz-lsb-tum-odorant-database>.
- (14) Schlumpberger, P.; Stübner, C. A.; Steinhaus, M. Development and evaluation of an automated solvent-assisted flavour evaporation (aSAFE). *Eur. Food Res. Technol.* **2022**, *248*, 2591–2602.
- (15) Jellinek, G. Sensory Evaluation of Food, Theory and Practice. *Food Science and Technology*; VCH Verlagsgesellschaft: Weinheim, Germany, 1985.
- (16) Frantza, L.; Granvogel, M.; Schieberle, P. Characterization of the Key Aroma Compounds in Two Commercial Rums by Means of the Sensomics Approach. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64* (3), 637–645.
- (17) Pereira, A. P.; Mendes-Ferreira, A.; Dias, L. G.; Oliveira, J. M.; Estevinho, L. M.; Mendes-Faia, A. Volatile Composition and Sensory Properties of Mead. *Microorganisms* **2019**, *7* (10), 404–420.
- (18) Schwarz, L. V.; Marcon, A. R.; Delamare, A. P. L.; Agostini, F.; Moura e Silva, S.; Echeverrigaray, S. Aromatic and sensorial characterization of “Moscato pyments”: an innovative beverage. *J. Food Sci. Technol.* **2022**, *59*, 3530–3539.
- (19) Antalick, G.; Perello, M. C.; de Revel, G. Esters in Wines: New Insight through the Establishment of a Database of French Wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **2014**, *65* (3), 293–304.
- (20) Soares da Costa, M.; Gonçalves, C.; Ferreira, A.; Ibsen, C.; Guedes de Pinho, P.; Silva Ferreira, A. C. Further Insights into the Role of Methional and Phenylacetaldehyde in Lager Beer Flavor Stability. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 7911–7917.
- (21) Chitarrini, G.; Debiasi, L.; Stuffer, M.; Ueberegger, E.; Zehetner, E.; Jaeger, H.; Robatscher, P.; Conterno, L. Volatile Profile of Mead Fermenting Blossom Honey and Honeydew Honey with or without *Ribes nigrum*. *Molecules* **2020**, *25* (8), 1818–1833.
- (22) Pascoal, A.; Anjos, O.; Feás, X.; Oliveira, J. M.; Estevinho, L. M. Impact of fining agents on the volatile composition of sparkling mead. *J. Inst. Brew.* **2019**, *125* (1), 125–133.
- (23) Roldán, A.; van Muiswinkel, G. C. J.; Lasanta, C.; Palacios, V.; Caro, I. Influence of pollen addition on mead elaboration: Physicochemical and sensory characteristics. *Food Chem.* **2011**, *126* (2), 574–582.
- (24) Grosshauser, S.; Schieberle, P. Characterization of the key odorants in pan-fried white mushrooms (*Agaricus bisporus* L.) by means of molecular sensory science: comparison with the raw mushroom tissue. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 3804–3813.
- (25) Boeswetter, A. R.; Scherf, K. A.; Schieberle, P.; Koehler, P. Identification of the key aroma compounds in gluten-free rice bread. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 2963–2972.
- (26) Pueschel, V. A.; Schieberle, P. Changes in the key aroma compounds of matsutake mushroom (*Tricholoma matsutake* Sing.) from Canada during pan-frying elucidated by application of the sensomics approach. *Eur. Food Res. Technol.* **2021**, *247*, 51–65.
- (27) Foulks, Z.; Parks, J.; Stoeker, W.; Kristensen, C.; Hebets, E. A.; Shi, H. Identification and quantification of 11 airborne biochemicals emitted by the brown recluse and another primitive hunting spider using headspace solid-phase microextraction-GC/MS. *Anal. Bioanal. Chem.* **2021**, *413* (26), 6605–6615.
- (28) Pino, J. A.; Fajardo, M. Volatile composition and key flavour compounds of spirits from unifloral honeys. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2011**, *46*, 994–1000.
- (29) Steinhaus, M. Chromatography–Olfactometry: Principles, Practical Aspects and Applications in Food Analysis. *Advanced Gas Chromatography in Food Analysis*; Peter Q Tranchida, 2019; pp 337–399.
- (30) Monforte, A. R.; Martins, S. I. F. S.; Silva Ferreira, A. C. Strecker Aldehyde Formation in Wine: New Insights into the Role of Gallic Acid, Glucose, and Metals in Phenylacetaldehyde Formation. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66* (10), 2459–2466.
- (31) Ferreira, V.; Jarauta, I.; López, R.; Cacho, J. Quantitative determination of sotolon, maltol and free 4-hydroxy-2,5-dimethyl-2(2H)-furanone in wine by solid-phase extraction and gas chromatography–ion-trap mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2003**, *1010* (1), 95–103.
- (32) Zhu, L.-X.; Zhang, M.-M.; Liu, Z.; Shi, Y.; Duan, C.-Q. Levels of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-2(2H)-furanone in Msalais Wines: A Comprehensive Overview of Multiple Stages and Pathways of Its Formation during Msalais Winemaking. *Molecules* **2019**, *24* (17), 3104.
- (33) Nicolotti, L.; Mall, V.; Schieberle, P. Characterization of Key Aroma Compounds in a Commercial Rum and an Australian Red Wine by Means of a New Sensomics Based Expert System (SEBES)-An Approach to Use Artificial Intelligence in Determining Food Odor Codes. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67* (14), 4011–4022.
- (34) Frank, S.; Wollmann, N.; Schieberle, P.; Hofmann, T. Reconstitution of the Flavor Signature of Dornfelder Red Wine on the Basis of the Natural Concentrations of Its Key Aroma and Taste Compounds. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 8866–8874.
- (35) Escudero, A.; Hernández-Orte, P.; Cacho, J.; Ferreira, V. Clues about the Role of Methional As Character Impact Odorant of Some Oxidized Wines. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 4268–4272.
- (36) Reglitz, K.; Féchir, M.; Mall, V.; Voigt, J.; Steinhaus, M. The impact of caramel and roasted wheat malts on aroma compounds in top-fermented wheat beer. *J. Inst. Brew.* **2022**, *128* (4), 133–187.
- (37) Pereira, A. P.; Mendes-Ferreira, A.; Oliveira, J. M.; Estevinho, L. M.; Mendes-Faia, A. High-cell-density fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* for the optimization of mead production. *Food Microbiol.* **2013**, *33* (1), 114–123.
- (38) Rahman, M. M.; Alam, M. N.; Fatima, N.; Shahjalal, H. M.; Gan, S. H.; Khalil, M. I. Chemical composition and biological properties of aromatic compounds in honey: An overview. *J. Food Biochem.* **2017**, *41* (6), No. e12405.
- (39) Sottit, C.; Salor-Torregrosa, J. M.; Moreno-Garcia, J.; Peinado, J.; Mauricio, J. C.; Moreno, J.; Garcia-Martinez, T. Using *Torulaspora delbrueckii*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* wine yeasts as starter cultures for fermentation and quality improvement of mead. *Eur. Food Res. Technol.* **2019**, *245*, 2705–2714.

- (40) Marrufo-Curtido, A.; Ferreira, V.; Escudero, A. Factors That Affect the Accumulation of Strecker Aldehydes in Standardized Wines: The Importance of pH in Oxidation. *Molecules* **2022**, *27* (10), 3056–3069.
- (41) Pons, A.; Lavigne, V.; Landais, Y.; Darriet, P.; Dubourdieu, D. Identification of a Sotolon Pathway in Dry White Wines. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58* (12), 7273–7279.
- (42) Silva Ferreira, A. C.; Rodrigues, P.; Hogg, T.; Guedes de Pinho, P. Influence of some technological parameters on the formation of dimethyl sulfide, 2-mercaptoethanol, methionol, and dimethyl sulfone in port wines. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 727–732.
- (43) Ferreira, V.; Escudero, A.; Fernandez, P. E.; Cacho, J. Changes in the profile of volatile compounds in wines stored under oxygen and their relationship with the browning process. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*. **1997**, *205*, 392–396.
- (44) Cordente, A. G.; Espinase Nandorfy, D.; Solomon, M.; Schulkin, A.; Kolouchova, R.; Francis, I. L.; Schmidt, S. A. Aromatic Higher Alcohols in Wine: Implication on Aroma and Palate Attributes during Chardonnay Aging. *Molecules* **2021**, *26*, 4979.
- (45) Câmara, J.; Alves, M. A.; Marques, J. C. Changes in volatile composition of Madeira wines during their oxidative ageing. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *563* (1–2), 188–197.
- (46) Chidi, B. S.; Bauer, F. F.; Rossouw, D. Organic Acid Metabolism and the Impact of Fermentation Practices on Wine Acidity - A Review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **2018**, *39* (2), 315–329.
- (47) Patrianakou, M.; Roussis, I. G. Decrease of Wine Volatile Aroma Esters by Oxidation. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **2016**, *34* (2), 241–245.
- (48) Steinhaus, P.; Schieberle, P. Characterization of the key aroma compounds in soy sauce using approaches of molecular sensory science. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 6262–6269.
- (49) Buttery, R. G.; Orts, W. J.; Takeoka, G. R.; Nam, Y. Volatile Flavor Components of Rice Cakes. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 4353–4356.

Publikacja 2

Cicha-Wojciechowicz, D., Drabińska, N., Majcher, M.A., 2024.
Influence of Honey Varieties, Fermentation Techniques and
Production Process on Sensory Properties and Odor-Active
Compounds in Meads. *Molecules*, 29 (24),
<https://doi.org/10.3390/molecules29245913>

Article

Influence of Honey Varieties, Fermentation Techniques, and Production Process on Sensory Properties and Odor-Active Compounds in Meads

Daria Cicha-Wojciechowicz , Natalia Drabińska  and Małgorzata Anna Majcher * 

Faculty of Food Science and Nutrition, Poznań University of Life Sciences, Wojska Polskiego 31, 60-624 Poznań, Poland; daria.cicha@up.poznan.pl (D.C.-W.); natalia.drabinska@up.poznan.pl (N.D.)

* Correspondence: malgorzata.majcher@up.poznan.pl; Tel.: +48-618487398

Abstract: This study investigates the impact of key factors on the formation of odorants and sensory properties in mead. The effects of the honey type (acacia, buckwheat, linden), wort heating, and the fermentation method (commercial *Saccharomyces cerevisiae* yeasts, spontaneous fermentation, *Galactomyces geotrichum* molds) were examined. Twelve model mead batches were produced, matured for 12 months, and analyzed using gas chromatography–olfactometry (GC–O) and headspace SPME–GC/MS to identify odor-active compounds. Results confirmed that the honey type plays a significant role in sensory profiles, with distinct aroma clusters for buckwheat, acacia, and linden honey. Compounds like phenylacetic acid, 2- and 3-methylbutanal, and butanoic acid were identified as the most important odorants, correlating with sensory attributes such as honey-like, malty, and fermented aromas. Univariate and multivariate analyses, followed by correlation analysis, highlighted how production parameters affect mead aroma, providing insights to optimize sensory quality.

Keywords: mead aroma; sensory analysis; odor-active compounds; gas chromatography; olfactometry



Citation: Cicha-Wojciechowicz, D.; Drabińska, N.; Majcher, M.A. Influence of Honey Varieties, Fermentation Techniques, and Production Process on Sensory Properties and Odor-Active Compounds in Meads. *Molecules* **2024**, *29*, 5913. <https://doi.org/10.3390/molecules29245913>

Academic Editor: Yanping L. Qian

Received: 8 November 2024

Revised: 8 December 2024

Accepted: 12 December 2024

Published: 14 December 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Mead, an ancient alcoholic beverage made from honey, water, and yeast, has attracted considerable consumer interest for its unique and attractive aroma. It also serves as a captivating research subject for many scientists, who are particularly interested in understanding the factors that influence the development of mead's characteristic aroma. Studies indicate that several factors can affect the aroma of mead, with one of the most frequently studied being the variety of honey used in its preparation. Li and Sun (2019) compared the volatile compound profiles of meads prepared from vitex, acacia, multi-floral, linden, and jujube honey. In their studies, they showed that the honey type had a significant impact on the abundance of alcohols, esters, and acids, which were the main groups of volatiles identified among meads [1]. Differences in meads prepared from chestnut, lime, and honeydew varieties of honey were also described by Vidrih and Hribar (2007) [2]. The type of honey can also influence other chemical parameters of mead, such as antioxidant capacity and phenolic compounds profile [3].

The fermentation of honey wort is one of the most important steps in mead production. Many important odor-active compounds such as esters, alcohols, ketones, or acids are produced by yeast activity. *Saccharomyces cerevisiae* are the most popular yeasts used in mead production, although a few studies were conducted to characterize aroma profiles of meads produced mostly with the use of non-*Saccharomyces* strains. In the study on mead prepared from multi-floral honey and rosehips, three yeast strains (two *S. cerevisiae* (var. *bayanus*) and *Torulaspora delbrueckii*) were employed. This study revealed that the yeast strain used for mead preparation can significantly affect volatile concentrations in the product, especially with the use of *T. delbrueckii* [4]. Similar experiments concerning the use of different yeast strains were also conducted by other researchers [5,6]. Recently, there

has been a growing desire to improve the sensory properties of fermented beverages by using new species of microorganisms, such as molds. One of the examples is *Galactomyces geotrichum* mold, which, according to our previous studies, has the ability to improve the formation of odorants 2-phenylethan-1-ol, phenylacetic acid, and 2-phenylacetaldehyde with strong rose-like, honey aroma [7]. These molds are also capable of synthesizing volatile compounds such as 3-methylbutan-1-ol and 2-phenylethan-1-ol, which can significantly influence the aroma profile of alcoholic beverages [8].

Another factor that may affect the final attributes of mead is the heating of honey wort. This step may improve fermentation by inactivation of naturally occurring microbiota, which is represented by lactic acid bacteria groups and wild yeast strains [9]. On the other hand, wort boiling may increase the concentration of some off-flavors, such as 4-methylphenol, which smells like a horse stable [10]. Starowicz and Granvogl (2022) applied the molecular sensory science concept to verify the effect of wort boiling on the sensory analysis and volatile formation of meads. Although the authors compared the OAV of both meads, they did not discuss which odorants could be responsible for the difference in the sensory profiles [11]. Czabaj et al. (2017) showed that heat treatment of honey wort is highly correlated with the total antioxidant capacity and total phenolic content of meads, as the highest antioxidant capacity and phenolic content were observed for gently boiled mead samples [12].

In our previous studies, we successfully identified and quantified the key odorants of triple mead purchased from the producer at each production step, providing valuable insights into the evolution of these compounds during the production process [13]. These molecular-level findings have laid the groundwork for further investigation into the factors that influence the formation of key odorants in mead, which play a crucial role in shaping the sensory properties of the beverage. Consequently, the studies presented in this research aim to delve deeper into this subject by conducting model studies to elucidate the impact of various elements not only on the formation of important odorants in mead but also on its sensory properties. By systematically examining these variables, it is possible to enhance our understanding of the mechanisms driving the development of mead's characteristic aroma and to identify potential strategies for optimizing its sensory qualities.

To the best of our knowledge, this study represents the first comprehensive identification and quantification of odorants in mead using gas chromatography–olfactometry (GC–O), while simultaneously examining numerous variables in the production process. This provides a detailed analysis of how these factors influence the overall aroma profile and which one has the greatest potential to change the mead's aroma profile. For the first time, *G. geotrichum* molds have been utilized in the production of mead. This species was recently described as a fermenter of glucose and xylose and showed the ability of ethanol production from sugars present in the sugarcane bagasse hydrolysate [14,15]. Given their known ability to grow on glucose and galactose and their resistance to different ethanol and glucose concentrations (up to 14% ethanol and 65% glucose), there is a potential to harness these molds for improving the sensory properties of mead, introducing the novel method of the enhancement of rose-like, floral notes [16]. This innovative approach represents a significant advancement in the enrichment of mead aroma.

Numerous studies have investigated the impact of specific factors on either the sensory properties or the volatile composition of mead. However, to the best of our knowledge, no research has simultaneously investigated such a vast range of production parameters on both the sensory profile and aroma-active compounds of meads. Such comprehensive studies are not only scientifically significant but also hold practical value for mead producers. Understanding the changes in sensory properties during production is crucial for ensuring that the final product meets consumer expectations and preferences, thereby enabling the design of products with specific, desired features.

In detail, we investigated the influence of three critical factors: the type of honey (acacia, buckwheat, and linden honey), the effect of wort heating, and the type of fermentation (using commercial *S. cerevisiae* yeasts, spontaneous fermentation, and the use of *G.*

geotrichum molds). Twelve model batches of mead were produced (including 12 months maturation) and their Solvent-Assisted Flavor Evaporation (SAFE) extracts were screened for odor-active compounds using gas chromatography–olfactometry. Following this, quantitation of the selected odorants using headspace SPME-GC/MS has been performed. Finally, to decode how each production parameter affects the final aroma of the mead, both univariate and multivariate analyses were applied, followed by the correlation analysis between the important odorants and the sensory attributes.

2. Results and Discussion

2.1. Quantitative Profile Sensory Analysis

In order to provide a comprehensive understanding of the aromatic profile of all twelve model mead products, quantitative profile sensory analysis was carried out by a qualified team of experts. The results of the sensory evaluation, categorized by the type of honey used in the preparation, are shown in Figures 1–3.

It has been noted that the general odor intensity of meads prepared from the same types of honey was very similar in each group. Evident differences can be noted between meads from different honey sources not only in overall aroma intensity but also in individual descriptors. All buckwheat-based meads (BNS, BNSM, BNY, and BBY) were noted for the highest general odor intensity (from 7.5 to 8.6), followed by tilia-based meads (TNS, TNSM, TNY, and TBY, score range from 3.8 to 5.5). The lowest values for general odor intensity were noted for acacia-based meads (ANS, ANSM, ANY, and ABY) with scores ranging from 2.2 to 2.8. Based on the profile sensory analysis, the buckwheat mead aroma was dominated by such attributes as honey (maximum score 8.6 for BNY), malty (maximum score 6.2 for BBY), rum (maximum score 6.1 for BNSM), fermented (maximum score 5.5 for BNS), and alcoholic (maximum score 5.5 for BNY). Floral and yeasty were slightly less perceptible (maximum scores of 3.0 and 4.0 for BBY and BNS, respectively). On the other hand, the sensation of floral aroma was more pronounced in tilia and acacia meads and exceeded that of rum, which was dominant in buckwheat mead. Considering the effect of wort boiling on the final aroma of the meads, it has been seen that boiling increased the honey and malty sensation, while it decreased the alcoholic aroma sensation. This effect has been observed in buckwheat and linden meads but not so much in acacia. Meads prepared from acacia honey showed greater variability in the aroma caused by the different types of fermentation. As shown in Figure 1, spontaneous fermentation, both with and without *G. geotrichum*, gave higher scores in honey, malty, and yeasty descriptors. In general, all meads with spontaneous fermentation were characterized by stronger yeasty, fermented, and, in the case of tilia mead, alcoholic aromas. The addition of *G. geotrichum* during fermentation noticeably increased the floral and rum sensation in acacia mead, floral and fermented in buckwheat mead, and rum, alcoholic, and honey in tilia meads.

2.2. Odor-Active Compounds Identification

To understand which specific compounds are responsible for the characteristic aroma of meads and what makes a product attractive to consumers, a screening for odor-active compounds was performed. In the first stage of the research, all twelve safe extracts were subjected to GC–O analysis. The application of GC–O analyses showed a total of 23 odor-active compounds in twelve tested mead samples. All identified odor-active compounds are listed in Table 1, and they are consistent with those obtained in our previous study [13]. 2- and 3-Methyl-1-butanal (malty), 2- and 3-methylbutan-1-ol (malty, solvent-like), ethyl octanoate (fruity), acetic acid (vinegar-like), 3-(methylsulfanyl)propanal (cooked potatoes-like), propanoic acid (sour, sweaty), butanoic acid (sweaty), 2-phenylacetaldehyde (honey-like), 2- and 3-methylbutanoic acid (malty, solvent-like), 2-phenylathan-1-ol (floral), 4-methylphenol (horse stable-like), phenylacetic acid (honey-like, beeswax-like), and 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde (vanilla-like) were identified in all tested mead samples. Ethyl hexanoate (fruity, pineapple-like) was identified in only two mead samples undergoing spontaneous fermentation: ANS and BNS. 1-(3,4-Dihydro-2*H*-pyrrol-5-yl)ethan-1-one

(roast-like) was found in only one sample (ANS). Among identified compounds, aldehydes 2- and 3-methyl-1-butanal (malty), 3-(methylsulfanyl)propanal (cooked potatoes-like), furan-2-carbaldehyde (sweet, cereal-like), 2-phenylacetaldehyde (honey-like), and 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde (vanilla-like) were the biggest group together with the acids acetic acid (vinegar-like), propanoic acid (sour, sweaty), butanoic acid (sweaty), 2- and 3-methylbutanoic acid (malty, sweaty), and phenylacetic acid (beeswax-like). The third largest group was esters, ethyl pentanoate (fruity), ethyl hexanoate (fruity, pineapple-like), and ethyl octanoate (fruity), together with alcohols: 2- and 3-methylbutan-1-ol (malty, solvent-like), 3-(methylsulfynyl)propan-1-ol (cooked potatoes-like), and 2-phenylathan-1-ol (floral). Two compounds, 3-(methylsulfynyl)propan-1-ol (cooked potatoes-like) and (2*E*)-1-(2,6,6-trimethylcyclohexa-1,3-dien-1-yl)but-2-en-1-one (cooked apple-like), were identified only in meads prepared from acacia honey, in all fermentation types. 4-Methylquinazoline, an odorant with a characteristic mint-like odor was identified in all fermentation samples made from buckwheat and tilia honey but was absent in all samples prepared using acacia honey. This compound was also detected in our previous research on mead made from multifloral honey, where its concentration was highest in the honey sample, suggesting that honey may be its source [13]. The results of this study indicate that acacia honey, unlike buckwheat and tilia honey, does not contain this odor-active compound. Additionally, 3-hydroxy-4,5-dimethylfuran-2(5*H*)-one, which has a fenugreek-like odor, was identified exclusively in three samples made from buckwheat honey: BNS, BNSM, and BNY. Sweet furan-2-carbaldehyde was identified in all samples prepared from tilia honey and one sample made from buckwheat honey: BNS.

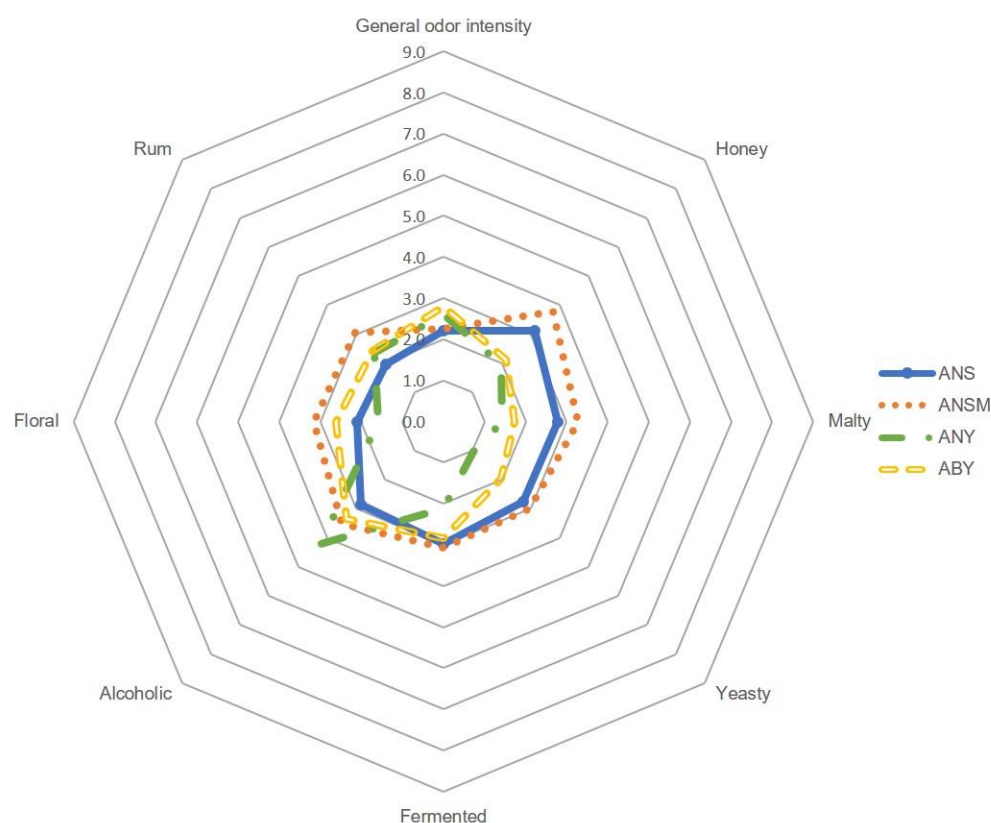


Figure 1. Quantitative olfactory profile analysis of acacia-based meads.

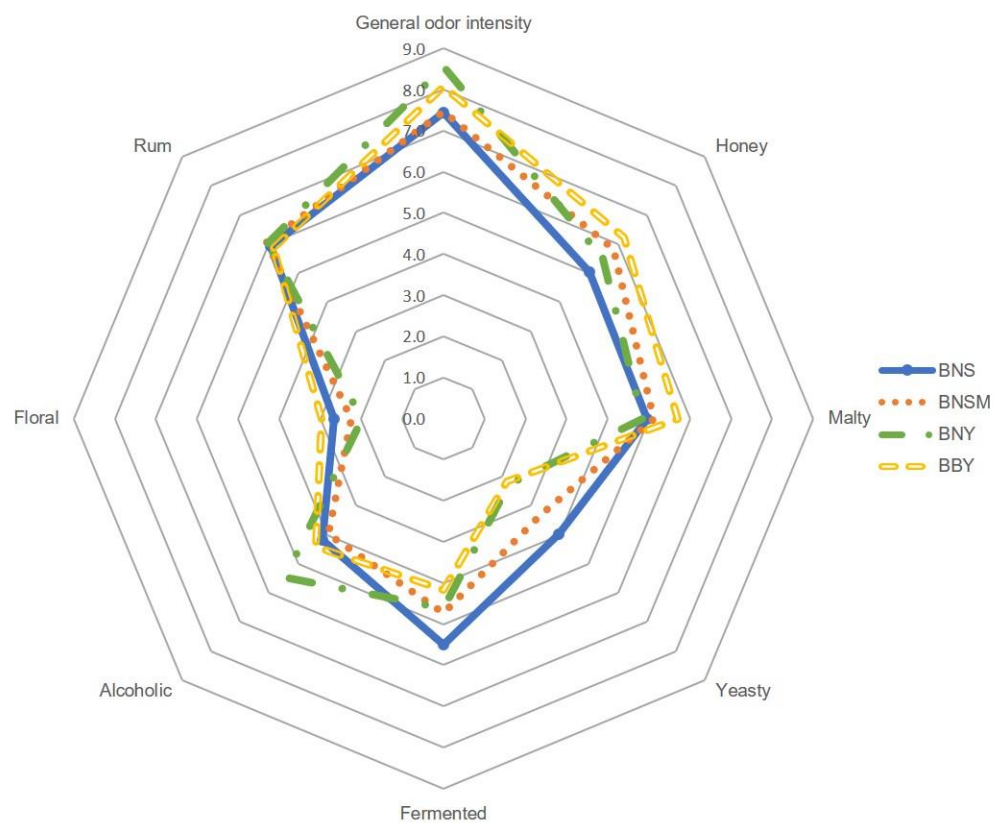


Figure 2. Quantitative olfactory profile analysis of buckwheat-based meads.

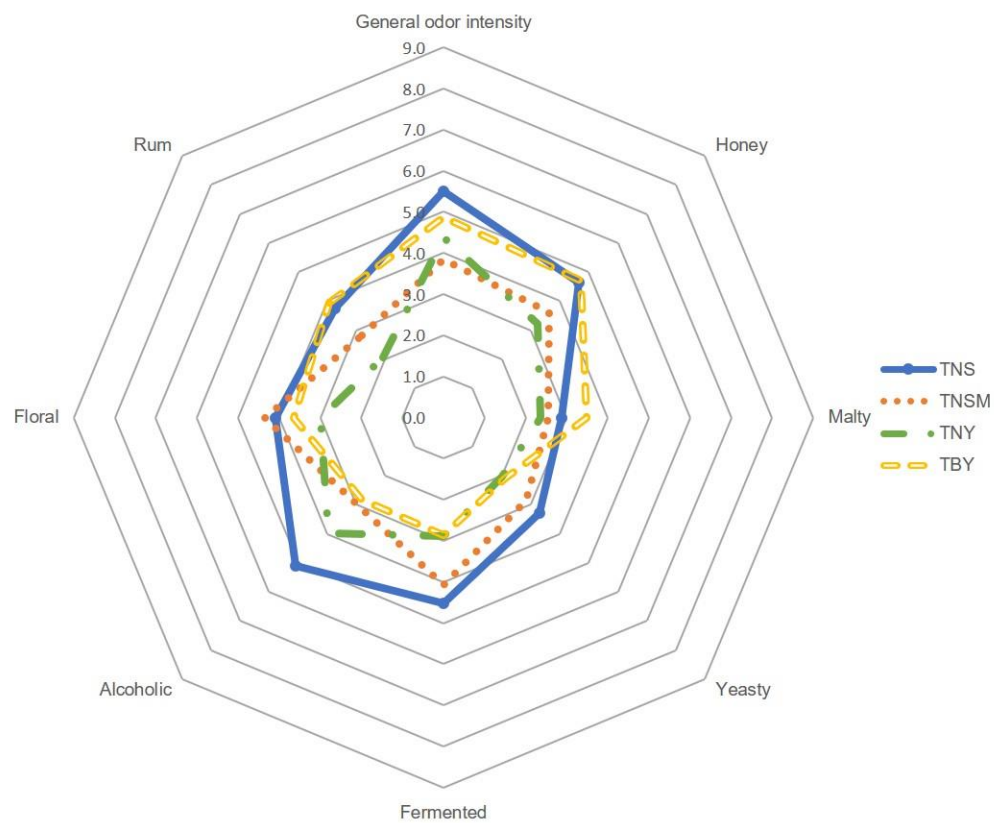


Figure 3. Quantitative olfactory profile analysis of tilia-based meads.

Table 1. Odor-active compounds identified among volatiles isolated from meads.

Odorant ¹	CAS Number	Odor Quality	RI ²		Detection in Samples											
			FFAP	DB-5	ANS	ANSM	ANY	ABY	BNS	BNSM	BNY	BBY	TNS	TNSM	TNY	TBY
2-methyl-1-butanol	96-17-3	malty	933	683	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
3-methyl-1-butanol	590-86-3															
butane-2,3-dione	431-03-8	butter-like	981	621	*	*	*	nd	*	*	*	*	*	*	nd	*
ethyl pentanoate	539-82-2	fruity	1140	898	nd	nd	nd	nd	*	nd	nd	nd	*	*	nd	nd
2-methylbutan-1-ol	137-32-6	malty, solvent-like	1211	739	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
3-methylbutan-1-ol	123-51-3															
ethyl hexanoate	123-66-0	fruity, pineapple-like	1236	1004	*	nd	nd	nd	*	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
1-(3,4-dihydro-2 <i>H</i> -pyrrol-5-yl)ethan-1-one	85213-22-5	roast-like	1348	936	*	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
ethyl octanoate	106-32-1	fruity	1436	1194	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
acetic acid	64-19-7	vinegar-like	1457	633	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
3-(methylsulfanyl)propanal	3268-49-3	cooked potatoes-like	1464	909	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
furan-2-carbaldehyde	98-01-1	sweet, cereal-like	1477	831	nd	nd	nd	nd	*	nd	nd	nd	*	*	*	*
propanoic acid	79-09-4	sour, sweaty	1535	820	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
butanoic acid	107-92-6	sweaty	1630	804	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
2-phenylacetaldehyde	122-78-1	honey-like	1650	1056	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
2-methylbutanoic acid	116-53-0	malty, sweaty	1670	892	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
3-methylbutanoic acid	503-74-2															
3-(methylsulfonyl)propan-1-ol	505-10-2	cooked potatoes-like	1724	982	*	*	*	*	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
(2 <i>E</i>)-1-(2,6,6-trimethylcyclohexa-1,3-dien-1-yl)but-2-en-1-one	23726-93-4	cooked apple-like	1822	1387	*	*	*	*	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2-phenylethan-1-ol	60-12-8	floral	1917	1119	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
2,5-dimethyl-3(2 <i>H</i>)-furanone	3658-77-3	caramel-like	2046	1078	*	*	*	*	*	*	*	*	*	nd	*	*
4-methylphenol	106-44-5	horse stable-like	2091	1076	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
4-methylquinazoline	700-46-9	mint-like, foxy	2115	1357	nd	nd	nd	nd	*	*	*	*	*	*	*	*
3-hydroxy-4,5-dimethylfuran-2(5 <i>H</i>)-one	28664-35-9	fenugreek-like	2213	1111	nd	nd	nd	nd	*	*	*	nd	nd	nd	nd	nd
phenylacetic acid	103-82-2	honey-like, beeswax-like	2572	1267	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde	121-33-5	vanilla-like	2593	1404	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

(¹) Structure assignment was based on odor quality, RIs (DB-FFAP, DB-5), and mass spectrum; data were compared with the data obtained for reference compounds analyzed under the same conditions. (²) Retention index, calculated by linear interpolation of retention time of the odorant and adjacent n-alkanes. *—odorant detected in the sample; nd—odorant not detected in the sample.

2.3. Odorants Quantitation

To determine the specific volatile constituents responsible for the overall aroma profile of a model meads a total of 11 compounds were quantified in response to calibration curves made for (²H₈)-naphthalene as the internal standard and Headspace Solid Phase Micro-Extraction coupled with gas chromatography–time-of-flight–mass spectrometry (GC–ToF–MS) (details in Supplementary Materials). Their odor activity values (OAVs) were calculated as the ratio of their concentration to the odor threshold concentrations (OTCs) in water collected from the literature.

Odor-active compounds' quantitation for twelve mead samples, their OTCs, and their OAVs are shown in Tables 2–4. The highest concentrations among all samples were determined for floral 2-phenylethan-1-ol, honey-like phenylacetic acid, and malty 2- and 3-methylbutanoic acid, and there are visible differences in their concentrations between all samples.

Table 2. Concentration, OTC, and OAV for odorants in acacia-based meads.

Odorant	OTC ¹ (mg/L)	ANS		ANSM		ANY		ABY	
		Concentration ² (mg/L)	OAV ³	Concentration (mg/L)	OAV	Concentration (mg/L)	OAV	Concentration (mg/L)	OAV
1	0.0005	0.00173 ^c	3	0.0172 ^b	34	0.0246 ^a	49	0.000615 ^c	1
3	0.015	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-
5	0.0012	0.00520	4	nd	-	nd	-	nd	-
7	0.0087	0.00309 ^b	<1	0.00142 ^c	<1	0.00085 ^c	<1	0.00624 ^a	<1
10	3	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-
12	2.4	0.553 ^a	<1	0.391 ^b	<1	0.339 ^{b,c}	<1	0.267 ^c	<1
13	0.0052	0.0744 ^a	14	0.0512 ^b	10	0.0693 ^a	13	0.0702 ^a	13
14	0.49	0.0144 ^b	<1	0.0249 ^b	<1	0.101 ^b	<1	1.26 ^a	3
17	0.14	4.19 ^a	30	3.71 ^{a,b}	26	3.27 ^b	23	2.05 ^c	15
18	0.025	0.351 ^b	14	0.318 ^b	13	0.352 ^b	14	1.54 ^a	62
22	0.068	1.10 ^{a,b}	16	1.28 ^a	19	0.902 ^b	13	1.19 ^a	17

(¹) Odor threshold concentration (OTC) in water. OTCs according to Leibniz-LSB@TUM Odorant Database [17].

(²) Concentration (mg/L), mean of triplicates, and coefficients of variation of all odorants were <20% and, together with quantitation details, are given in the Supplementary Materials (Table S2); nd—not detected; different letters in superscript in the same line indicate a significant difference ($p < 0.05$) based on the post hoc Fisher's least significant difference (LSD) test. (³) Odor activity value, calculated as the ratio of the concentration in mead to OTC.

Table 3. Concentration, OTC, and OAV for odorants in buckwheat-based meads.

Odorant	OTC ¹ (mg/L)	BNS		BNSM		BNY		BBY	
		Concentration ² (mg/L)	OAV ³	Concentration (mg/L)	OAV	Concentration (mg/L)	OAV	Concentration (mg/L)	OAV
1	0.0005	0.0334 ^b	67	0.0387 ^{a,b}	77	0.0413 ^{a,b}	83	0.0462 ^a	92
3	0.015	0.00468	<1	nd	-	nd	-	nd	-
5	0.0012	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-
7	0.0087	0.00517 ^c	<1	0.00714 ^a	<1	0.0041 ^d	<1	0.00658 ^b	<1
10	3	1.12	<1	nd	-	nd	-	nd	-
12	2.4	0.838 ^b	<1	1.04 ^a	<1	0.828 ^b	<1	0.529 ^c	<1
13	0.0052	0.0713 ^c	14	0.0990 ^a	19	0.0836 ^b	16	0.0955 ^a	18
14	0.49	1.54 ^b	3	2.48 ^a	5	2.62 ^a	5	0.547 ^c	1
17	0.14	2.96 ^a	21	2.64 ^a	19	2.00 ^b	14	2.54 ^a	18
18	0.025	0.395 ^b	16	1.40 ^a	56	nd	-	0.342 ^b	14
22	0.068	3.33 ^b	49	4.05 ^a	60	3.76 ^a	55	3.32 ^b	49

(¹) Odor threshold concentration (OTC) in water. OTCs according to Leibniz-LSB@TUM Odorant Database [17].

(²) Concentration (mg/L), mean of triplicates, and coefficients of variation of all odorants were <20% and, together with quantitation details, are given in the Supplementary Materials (Table S2); nd—not detected; different letters in superscript in the same line indicate a significant difference ($p < 0.05$) based on the post hoc Fisher's least significant difference (LSD) test. (³) Odor activity value, calculated as the ratio of the concentration in mead to OTC.

Table 4. Concentration, OTC, and OAV for odorants in tilia-based meads.

Odorant	OTC ¹ (mg/L)	TNS		TNSM		TNY		TBY	
		Concentration ² (mg/L)	OAV ³	Concentration (mg/L)	OAV	Concentration (mg/L)	OAV	Concentration (mg/L)	OAV
1	0.0005	0.0218 ^b	44	0.00188 ^c	4	0.0298 ^a	60	0.000748 ^c	1
3	0.015	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-
5	0.0012	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-
7	0.0087	0.0138 ^a	2	0.00326 ^c	<1	0.00445 ^b	<1	0.00521 ^b	<1
10	3	0.617 ^b	<1	nd	-	0.568 ^b	<1	3.03 ^a	1
12	2.4	0.00251 ^c	<1	0.236 ^b	<1	0.350 ^a	<1	0.274 ^b	<1
13	0.0052	0.0560 ^b	11	0.0835 ^a	16	0.0514 ^b	10	0.101 ^a	20
14	0.49	0.129 ^b	<1	0.0760 ^c	<1	0.265 ^a	<1	0.251 ^a	<1
17	0.14	2.99 ^b	21	2.70 ^b	19	4.29 ^a	31	2.30 ^b	16
18	0.025	0.334 ^b	13	nd	-	0.390 ^a	16	0.407 ^a	16
22	0.068	1.22 ^a	18	0.857 ^c	13	nd	-	0.961 ^b	14

(¹) Odor threshold concentration (OTC) in water. OTCs according to Leibniz-LSB@TUM Odorant Database [17].

(²) Concentration (mg/L), mean of triplicates, and coefficients of variation of all odorants were <20% and, together with quantitation details, are given in the Supplementary Materials (Table S2); nd—not detected; different letters in superscript in the same line indicate a significant difference ($p < 0.05$) based on the post hoc Fisher's least significant difference (LSD) test. (³) Odor activity value, calculated as the ratio of the concentration in mead to OTC.

OAVs of quantitated compounds are different among tested samples. For meads made of acacia, buckwheat, and tilia honey, the highest OAVs were noted for 2- and 3-methyl-1-butanol, 2-phenylacetaldehyde, 2-phenylathan-1-ol, 2,5-dimethyl-3(2H)furanone, and phenylacetic acid, which are associated with odor descriptors described as malty, honey-like, floral, caramel-like, and beeswax-like. These results are in agreement with results obtained by sensory assessors, as ratings of descriptors honey, malty, and floral were rated relatively high in those meads. Despite the dominance of the same odor-active compounds in meads made of tilia, buckwheat, and acacia honeys, concentration levels for those compounds were different in all tested samples. The highest concentrations of floral 2-phenylethan-1-ol were noted for TNY and ANS meads (4.29 and 4.19 mg/L, respectively) and the lowest for BNY mead (2.0 mg/L). A high concentration of this floral odorant in the ANS sample resulted in the highest OAV for all compounds, which suggests it is the most important odorant in this type of mead. Floral 2-phenylathan-1-ol is a widely identified compound in meads and wines [18,19], and it is derived from phenylalanine in the fermentation process [20].

Visibly higher concentrations of malty, solvent-like 2- and 3-methyl-1-butanol were noted for buckwheat-based meads when compared to other mead types. The highest concentration was determined for BBY (0.0462 mg/L), followed by BNY (0.0413 mg/L), BNSM (0.0387 mg/L), and BNS (0.0334 mg/L). The differences in the concentrations of this compound are also reflected in the sensory evaluation of the discussed meads, as the notes of the malty descriptor for all buckwheat-based meads were visibly higher than those presented for other meads. Malty, solvent-like 2- and 3-methyl-1-butanol also showed the highest OAVs in all buckwheat-based meads, making it the most important and characteristic odor-active compound in meads prepared from buckwheat honey. It was also an important odor compound for two acacia-based meads, ANSM and ANY (OAV, 34 and 49, respectively), and two tilia-based meads, TNS and TNY (OAV, 44 and 60, respectively). In the rest of the tested samples, the concentration of this compound only slightly exceeded its odor threshold. The second important aldehyde identified in tested meads was 2-phenylacetaldehyde with a honey-like odor. This compound was detected in all tested mead samples, and its OAVs were comparable among all meads. The highest OAV was noted for TBY (20) and the lowest for ANSM and TNY equally (10). The concentration ranged from 0.0512 mg/L to 0.101 mg/L. Honey-like 2-phenylacetaldehyde formed during Strecker degradation is reported to be an important odorant in wines [21]. The last of

quantitated aldehydes was furan-2-carbaldehyde, which was detected in one buckwheat-based mead (BNS) and three tilia-based meads (TNS, TNY, and TBY). Its concentration did not exceed its odor threshold in almost all cases (except the TBY sample, in which its OAV was equal to 1), which suggests that this compound did not have a meaningful influence on the final aroma of tested meads.

Acids represented by sweaty butanoic acid, malty and sweaty 2- and 3-methylbutanoic acid, and honey- and beeswax-like phenylacetic acid were determined in almost all tested samples (the only exception was phenylacetic acid in the TNY sample). Concentrations of butanoic acid in all tested samples were below its odor threshold concentration, but 2- and 3-methylbutanoic acid scored concentrations above its odor threshold in all buckwheat-based meads and in the ABY sample, with the highest value of 2.62 mg/L for the BNY sample. Those results are in agreement with sensory evaluation data, as all buckwheat-based meads had relatively high malty scores. Concentrations of 2- and 3-methylbutanoic acid for buckwheat-based meads are relatively higher than those obtained in our previous research for mead made from multi-floral honey (0.868 mg/L) [13]. The last of the quantified acids with a pleasant, beeswax-like odor was an important odorant in almost all tested samples (except TNY). The concentration of this compound was visibly higher for buckwheat-based meads when compared to acacia- and tilia-based meads. Higher concentrations resulted in high OAVs, making it the second most important odor-active compound in buckwheat-based meads. Those concentrations (ranging from 4.05 mg/L for the BNSM sample to 3.32 mg/L for the BBY sample) are visibly higher than those observed by Starowicz and Granvogl for meads prepared from heated and unheated wort (0.748 mg/L and 0.77 mg/L, respectively). Meads prepared from acacia and tilia honey scored concentrations of phenylacetic acid similar to or slightly higher than those observed by Starowicz and Garnvogl [11].

Caramel-like 2,5-dimethyl-3(2H)furanone was detected in almost all tested meads, except BNY and TNSM samples. The concentration of this compound was very diverse among samples and ranged from 0.318 mg/L (ANSM) to 1.54 mg/L (ABY). In those samples where 2,5-dimethyl-3(2H)furanone was detected the concentration was above its odor threshold, and OAVs ranged from 13 (ANSM and TNS) to 62 (ABY). A high concentration of this caramel-like compound suggests that it was important for the final aroma of almost all meads. This compound is known to form easily in heated and fermented foods, and it was detected in many kinds of food products such as popcorn, non-alcoholic beverages, and wines [22].

The last group of odor-active compounds detected in tested mead samples were esters, which showed the biggest differentiation in the presence of particular compounds among all samples. Fruity ethyl octanoate was the only ester identified in all samples. Its concentration was above its odor threshold in all samples. Fruity, pineapple-like ethyl hexanoate was detected only in the ANS sample, and its concentration slightly exceeded its odor threshold (0.0052 mg/L, OAV 4). The last ester, identified in only one sample (BNS), was ethyl pentanoate, with a fruity odor. Its concentration was above the odor threshold concentration (0.00468 mg/L, OAV < 1). Additional esters (ethyl pentanoate and ethyl hexanoate) were identified only in samples fermented by wild yeasts present in acacia and buckwheat honey (spontaneous fermentation). Despite their low concentrations, not exceeding odor threshold concentrations, these compounds may affect the final aroma of the product [23].

Despite noticeable differences in aroma descriptors from sensory analysis of the prepared meads, no correlation to specific odor-active compounds was found when *G. geotrichum* was added. The strongest differences described by sensory assessors were shown for acacia-based meads, which may be explained by their subtle and delicate aroma, which is not overshadowed by dominant sensory descriptors. Further advanced research is necessary to elucidate the interactions in this context.

In summary, the observed differences in the aroma profiles of various meads could be attributed not to the diversity of aromatic compounds but rather to variations in their

concentrations within specific groups of compounds. Consequently, the obtained results suggest that the identification of odor-active compounds for each individual product might be unnecessary. Instead, focusing on the primary product might be sufficient, with determining differences between variants through quantitative analysis alone. This approach may allow for the efficient identification of differences in aroma profiles through quantitative analysis, without the need for exhaustive compound identification for every product.

2.4. Effect of Honey Varieties, Fermentation Techniques, and Production Process on the Sensory Attributes and Important Odorants Formation

To determine the effect of technological parameters on the sensory attributes and important aroma compounds of twelve tested meads, an unsupervised principal component analysis (PCA) was applied. Multivariate analysis confirmed that the type of honey had the most significant impact on the sensory properties of mead. Those results are in agreement with Li and Sun (2019), who observed significant differences in the flavor volatiles in meads prepared with vitex, acacia, linden, multi-floral, and jujube honey [1]. The clear clustering was achieved for the analyzed data (Figure 4A). Buckwheat-based meads, irrespective of the processing type, were positioned on the left side of the plot, while tilia- and acacia-based meads were located on the right side. Interestingly, there was no clear separation between acacia- and tilia-based meads. No distinct dependencies or trends for fermentation type or heating process implementation were observed. Opposite observations were noted by Pereira et al. (2019). When two strains of *S. cerevisiae* (QA23 and ICV D47) in free and immobilized form were compared, significant differences in some characteristics of the products, such as pH, fructose concentration, volatile acidity, and volatile compound concentrations, were observed [24]. Czabaj and Rygielska (2017) and Starowicz and Granvogl (2022) also discerned that heating of mead wort results in important changes in antioxidant activity and aroma quality [11,12]. These differences may be due to the fact that, so far, all studies have focused on determining the impact of only one factor on the mead's volatiles at a given time. This shows that, only by comparing all key variables in the production process, the real impact of these variables on the differences in the aroma of mead can be correctly identified.

BNS mead was the most associated with fermented, honey, malty, rum, and general odor intensity attributes, while BNY and BNSM were associated with the concentration of phenylacetic acid, 2- and 3-methylbutanal, 2- and 3-methylbutanoic acid, and butanoic acid. TNS mead was associated with the presence of furan-2-carbaldehyde. Hierarchical analysis confirmed the clustering of the analyzed meads into two groups (Figure 4B). Interestingly, TNY was more similar to acacia-based meads than to other tilia-based products (Figure 5). These meads were associated with the concentration of 2-phenylethan-1-ol and ethyl hexanoate.

Moreover, to confirm the effect of individual important odorants on the perception of odor attributes, a correlation analysis between sensory attributes and the concentration of each important odorant was performed. General odor intensity was strongly correlated with the concentrations of phenylacetic acid, 2- and 3-methyl-1-butanol, 2- and 3-methylbutanoic acid, and butanoic acid. These compounds (except sweaty butanoic acid) showed high concentrations and high OAV values in tested samples in all honey types used. Despite lower concentrations of butanoic acid, the correlation between overall aroma intensity was significant, which may suggest that this compound interacts with other odorants even in lower concentrations. These compounds also contributed to the perception of a malty aroma, with phenylacetic acid contributing the most ($r = 0.88$). Three of these compounds, 2- and 3-methyl-1-butanol, 2- and 3-methylbutanoic acid, and phenylacetic acid, are connected with odors that are honey-like, beeswax-like, and malty. The perception of a honey odor was strongly associated with the concentrations of phenylacetic acid and 2- and 3-methyl-1-butanol. Both compounds are produced mainly during the fermentation and maturation processes [25,26]. The perception of fermented aroma was strongly correlated with compound phenylacetic acid ($r = 0.75$) and mildly correlated with

compound 2- and 3-methylbutanoic acid ($r = 0.59$). The perception of an alcoholic odor was associated with the concentration of compound 2- and 3-methyl-1-butanol ($r = 0.79$). Notably, a negative correlation was observed between a floral aroma and butanoic acid.

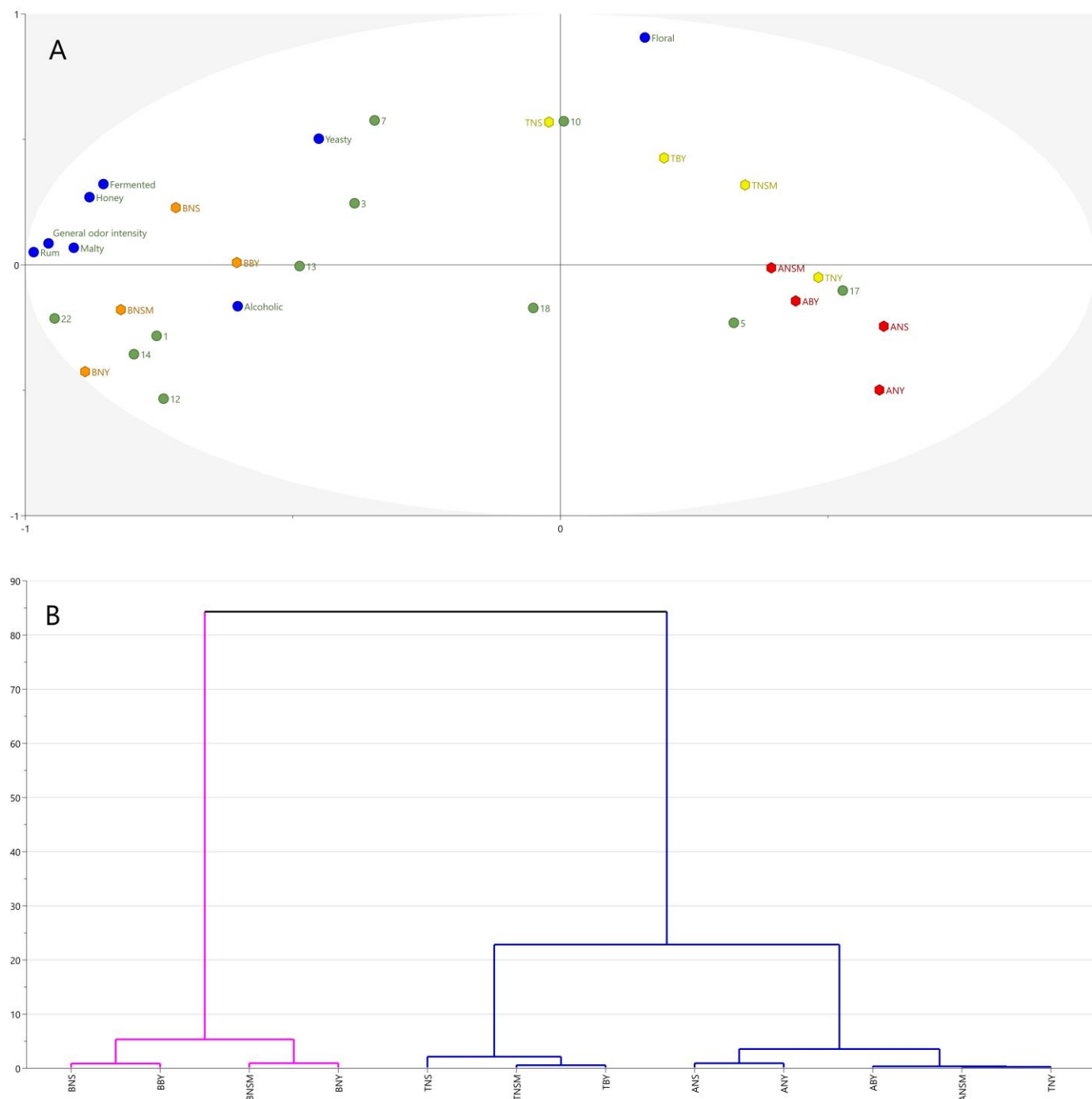


Figure 4. Multivariate analysis of odorant concentrations and sensory attributes of meads. The results of the multivariate analysis of important odorant concentrations and sensory attributes of the meads obtained with different technologies. (A) Biplot from principal component analysis (PCA). PC1 and PC2 explain 58% of the variance. Different colors represents different mead samples. (B) Dendrogram from hierarchical analysis. Different colors represents different clusters.

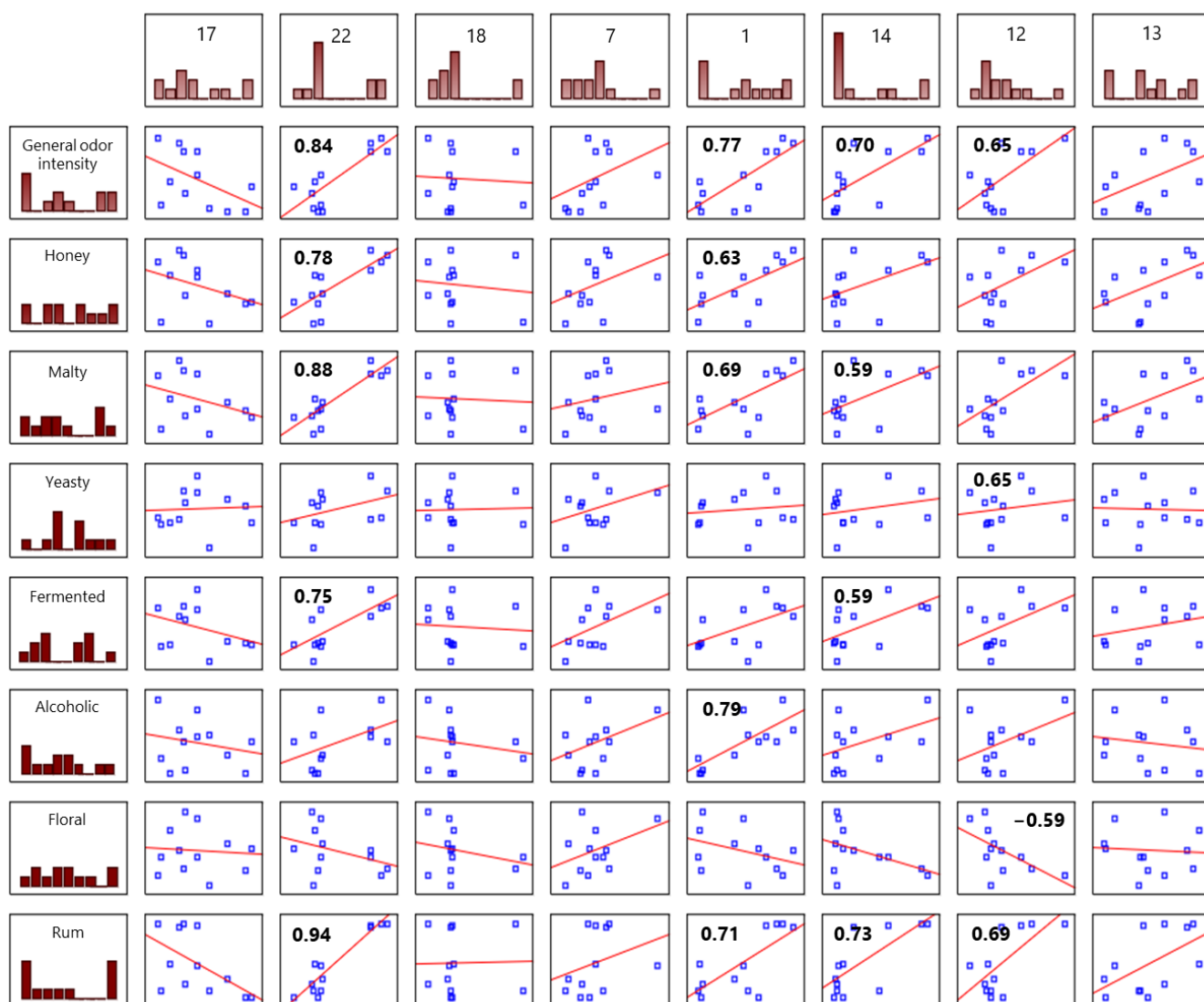


Figure 5. Correlations between odorant concentrations and sensory attributes. The results of correlation analysis between the important odorant concentrations and sensory attributes obtained using the Pearson correlation coefficient test. Exact values are given only for significant correlations (p -value < 0.05).

3. Materials and Methods

3.1. Honey Samples

Three types of honey, acacia (*Robinia pseudoacacia* L.), buckwheat (*Fagopyrum* Mill.), and tilia (*Tilia*), were purchased from local beekeepers in the Wielkopolska region. The botanical origin of each honey was confirmed by pollen analysis according to the criteria described in Polish standard [27]. PN-88/A-77626 “Miód pszczeli”. Honey samples were stored at 4 °C until the mead preparation.

3.2. Yeast and Mold Preparation

Commercially available yeasts *S. cerevisiae* BC s103 (Fermentis, Lesaffre, France) were prepared according to the producer’s instructions. *G. geotrichum* molds used for the fermentation were previously isolated from the Wielkopolski fried cheese produced in Poznań (Poland), and thirty-nine strains were identified by amplification of the 18S rRNA coding sequence and then lyophilized by Szudera-Kończal et al. [7]. For the experiment purposes, strain 32 was chosen, according to its ability to produce 2-phenylacetaldehyde and 2-phenylethan-1-ol in the most desirable ratio, and ready lyophilizate was used. To the

3 mL vial with mold lyophilizate containing 9×10^{-7} colony-forming units (CFU), distilled water was added to the volume of 4 mL right before inoculation. To the four mead batches, 1 mL (each) of hydrated lyophilizate was added.

3.3. Mead Preparation

To prepare honey wort, one part of each honey was diluted with two parts of tap water (*v/v*) to reach 34°Brix. From each honey, four wort batches (2 L each) were prepared: three were not heated and one batch was boiled for 10 min. After cooling the boiled batch to room temperature (around 25 °C), tap water was added to reach 34°Brix. To three unheated batches (one from every type of honey), inoculated *G. geotrichum* mold was added. To three unheated and three heated batches (two from every type of honey), *S. cerevisiae* yeast inoculum (1.5 g/L) was added. The last three batches (one from every type of honey) were not inoculated. The production process of all batches is presented in Figure 6. All wort batches were mixed and closed with a fermentation pipe. Diammonium phosphate (DAP) and the commercial nutrient “Kombi Vita” (Browin, Poland) containing diammonium hydrogen phosphate, yeast cell wall components, and thiamine hydrochloride were added to each batch in two equal parts (1 g/L and 1.5 g/L, respectively, in total) after 12 and 48 h of fermentation. Fermentation was carried out at 22 °C for 30 days. After 30 days of fermentation, meads were decanted from the yeast sediment, closed with fermentation pipes, and kept at 15 °C for 12 months for maturation. Decanting from the sediment was repeated at 3 and 6 months of maturation. Labeling of the samples was set to include honey and fermentation type and heating/not heating of the wort. All sample labels together with a precise description of the parameters used are shown in Table 5.

Table 5. Mead sample labeling.

Sample Code	Honey Type	Manufacturing Process	Fermentation Type
ANS	acacia	not boiled	spontaneous
ANSM			spontaneous + <i>G. geotrichum</i> molds
ANY		boiled	<i>S. cerevisiae</i> yeasts
ABY			
BNS	buckwheat	not boiled	spontaneous
BNSM			spontaneous + <i>G. geotrichum</i> molds
BNY		boiled	<i>S. cerevisiae</i> yeasts
BBY			
TNS	tilia	not boiled	spontaneous
TNSM			spontaneous + <i>G. geotrichum</i> molds
TNY		boiled	<i>S. cerevisiae</i> yeasts
TBY			

3.4. Reference Odorants

Pure reference odorants of 2- and 3-methylbutanal, butane-2,3-dione, ethyl pentanoate, 2-and 3-methylbutan-1-ol, ethyl hexanoate, ethyl octanoate, acetic acid, 3-(methylsulfanyl) propanal, furan-2-carbaldehyde, propanoic acid, butanoic acid, 2-phenylacetaldehyde, 2-and 3-methylbutanoic acid, 3-(methylsulfynyl)propan-1-ol, (2*E*)-1-(2,6,6-trimethylcyclohexa-1,3-dien-1-yl)but-2-en-1-one, 2-phenylethan-1-ol, 2,5-dimethyl-3(2*H*)furanone, 4-methyl quinazoline, phenylacetic acid, and 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Compound 1-(3,4-dihydro-2*H*-pyrrol-5-yl)ethan-1-one was obtained from aromaLAB (Martinsried, Germany), and compounds 4-methylphenol and 3-hydroxy-4,5-dimethylfuran-2(5*H*)-one were obtained from Thermo Scientific (Waltham, MA, USA). (²H₈)-naphthalene was obtained from Merck.

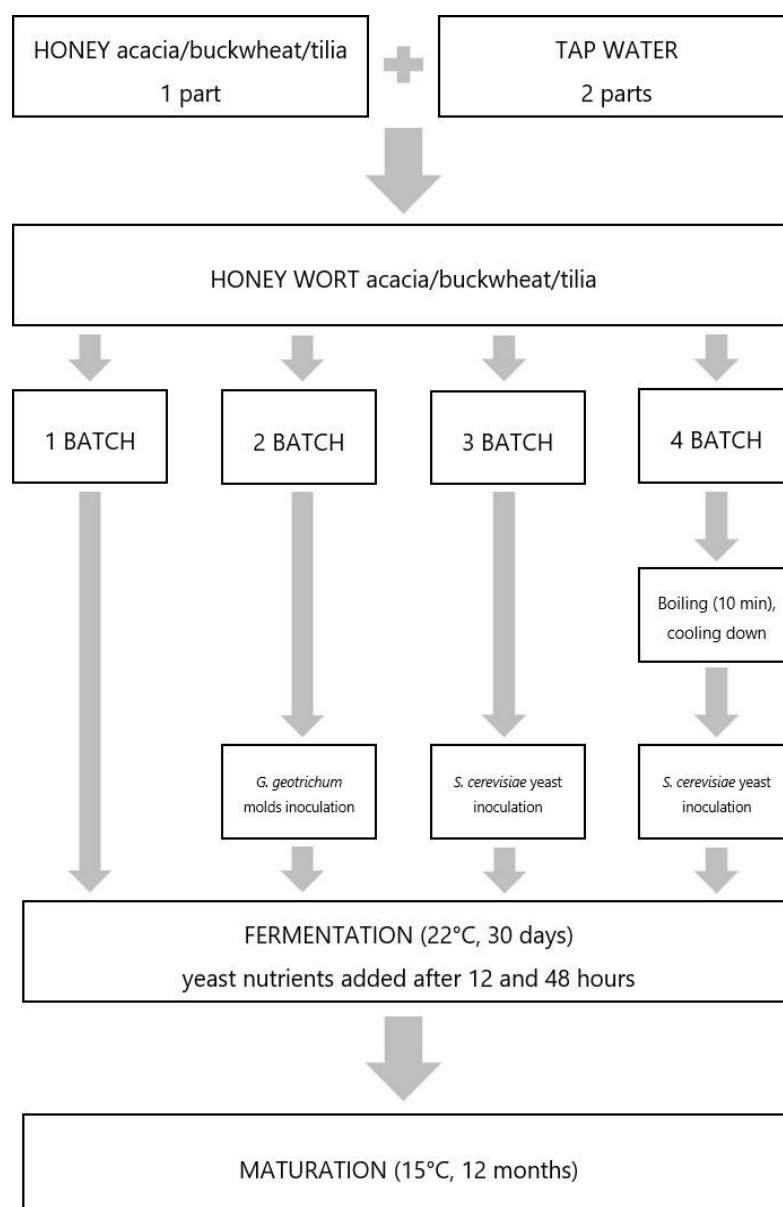


Figure 6. Scheme of the production process of twelve mead types.

3.5. Quantitative Olfactory Profile Analysis

For all mead samples, quantitative olfactory profile analysis was performed. The sensory panel consisted of 9 experienced assessors (6 females and 3 males, aged from 25 to 55). Odor descriptors were chosen in the previous study [13]. Before the final analysis, assessors experienced a training session with the chosen odor descriptors and their descriptions. Odor descriptors were obtained from Givoudan (Vernier, Switzerland). For quantitative olfactory profile analysis, the panelists were asked to rate each odor quality using a 10 cm linear scale from 0 (not perceivable) to 10 (strongly perceivable). Samples (20 mL) were presented in covered glass vessels at room temperature. For the sensory analysis, all panelists gave their consent, and ethical permission was not required.

3.6. Isolation of Mead Volatiles

Meads (50 mL each) were extracted with dichloromethane (50 mL $\times$ 3, each). Combined organic phases were washed with saturated sodium chloride (150 mL $\times$ 3, each) and dried over anhydrous sodium sulfate. Nonvolatiles were removed by solvent-assisted

flavor evaporation (SAFE) at 40 °C. The distillates were concentrated to a final volume of 0.5 mL using a Vigreux column (Chemland, Poland). Mead volatile isolates were stored at −20 °C until analysis. At all stages of mead volatile isolation, the odor was monitored. The extracts, distillates, and concentrated mead isolates were orthonasally tested on a strip of filter paper. The characteristic odor of mead was perceivable at all stages of the isolation of the mead's volatiles.

3.7. Gas Chromatography–Olfactometry and Odor-Active Compounds Identification

A GC coupled with a cold on-column injector, a flame ionization detector (FID), a sniffing port, and DB–FFAP (30 m × 0.32 mm i.d., film thickness 0.25 µm; Agilent, Waldbronn, Germany) or DB–5 (30 m × 0.32 mm i.d., film thickness 0.25 µm; Agilent) columns was used for the identification of odor-active compounds. Identification was performed using a GC–O/FID system and a GC–ToF–MS system. Detailed specifications of the GC systems used are provided in the Supplementary Materials.

Structure proposals were developed using GC–O by the comparison of odor descriptors of detected odorants and their RIs to the data of reference compounds available in the Leibniz-LSB@TUM Odorant Database [17]. The proposed structures were confirmed by analyzing proper reference compounds in an adjusted dilution and comparing them to those present in mead volatile isolates using two columns of different polarities (DB–FFAP and DB–5). The final identification was performed by comparing the mass spectra of the compounds identified in mead volatile isolates and proper reference standards on a GC–ToF–MS system.

3.8. Odorant Quantitation

2- and 3-Methyl-1-butanol, ethyl pentanoate, ethyl hexanoate, ethyl octanoate, furan-2-carbaldehyde, butanoic acid, 2-phenylacetaldehyde, 2- and 3-methylbutanoic acid, 2-phenylethan-1-ol, 2,5-dimethyl-3(2H)-furanone, and phenylacetic acid were quantitated using HS-SPME-GC–ToF–MS, and (²H₈)-naphthalene was used as the internal standard. A total of 5 mL of each mead sample was added to 20 mL glass vials, and 3 g of sodium chloride was added. Mead samples were spiked with the internal standard dissolved in ethanol (in concentration ranges from 0.001 to 0.1 µg/mL). Vials were closed with crimp caps, and Divinylbenzene/Carboxen/Polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) fiber was used for the extraction. Extraction was held at 40 °C for 40 min. All analyses were performed in triplicates.

Peak areas of the target compounds and the internal standard were collected from the extracted ion chromatograms using unique quantifier ions. The concentrations of target compounds were calculated based on the area counts of the target compound peak, the area counts of the internal standard peak, the amount of the sample used, and the amount of the internal standard added. The calibration line for every target compound was obtained by the analysis of mixtures of the analyte and (²H₈)-naphthalene in five ratios (5:1, 2:1, 1:1, 1:2, and 1:5). Details of the quantitation are available in the Supplementary Materials (Table S1).

3.9. Statistical Analysis

All the analyses were conducted in triplicates unless stated differently. The differences between the study groups were compared using one-way ANOVA with Fisher's LSD test as a post hoc, after testing the normality using the Shapiro–Wilk test. The differences with a *p*-value < 0.05 were considered significant. Correlations between parameters were analyzed using the Pearson correlation coefficient test. All the statistical analyses were performed using STATISTICA version 13.3 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA) software.

An unsupervised principal component analysis (PCA) was applied to classify the analyzed mead samples and to evaluate the effect of technological parameters on the sensory attributes and important aroma compounds. The PCA model was built with the SIMCA 17 software package (Umetrics, Umea, Sweden).

4. Conclusions

The findings from the presented research provide valuable insights into the complex interactions between honey type, wort heating, and fermentation methods in shaping the aroma and sensory characteristics of mead. By systematically investigating the impact of these three critical factors—honey type (acacia, buckwheat, and linden), wort heating, and fermentation techniques (commercial *Saccharomyces cerevisiae*, spontaneous fermentation, and spontaneous fermentation with the inoculation of *Galactomyces geotrichum* molds)—on the formation of odor-active compounds, this study contributes to a deeper understanding of mead aroma development.

The results confirmed that the type of honey plays the most significant role in determining the sensory properties of mead, with distinct clusters of aroma profiles for buckwheat, acacia, and linden honeys. Buckwheat-based meads were associated with intense honey, malty, and rum-like aromas, while acacia and linden-based meads shared a lighter, more floral profile. Despite this clear influence of honey type, no consistent trends were observed for the effects of wort heating or the fermentation method on the overall aroma, indicating that while these factors can influence specific compounds, their impact is secondary to that of honey type.

Through the use of gas chromatography–olfactometry (GC–O) and headspace SPME–GC/MS quantitation, this study identified several odor-active compounds, including phenylacetic acid, 2- and 3-methylbutanal, and butanoic acid, which were strongly correlated with sensory attributes such as honey-like, malty, and fermented aromas. Compounds like phenylacetic acid, 2- and 3-methyl-1-butanol, 2- and 3-methylbutanoic acid, and 2-phenylethan-1-ol were particularly influential in driving the perception of honey, malty, beeswax-like, and floral odors. The application of the molecular sensory science concept led to the suggestion that the identification of odor-active compounds for each individual product might be unnecessary in the case of meads. This approach may allow for efficient identification of differences in aroma profiles through quantitative analysis, without the need for exhaustive compound identification for every product. Those findings may form the basis for establishing easier and faster methods for controlling the quality parameters of meads and determining the correctness of the fermentation process by monitoring odor-active compounds. In conclusion, this research highlights the critical role of honey selection in crafting a mead's characteristic aroma and provides mead producers with strategic guidance for optimizing sensory profiles. By understanding the contributions of odor-active compounds and their correlation with sensory attributes, producers can tailor their processes to enhance desired aromas, such as honey-like or malty notes, while controlling for less desirable characteristics.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/molecules29245913/s1>, Miscellaneous Chemicals and Materials, detailed GC systems specifications, Table S1: Experimental Data of Quantitation with Internal Standard (Quantifier Ions, Calibration Lines); Table S2: Coefficients of Variance of Odorants Quantitation of Meads.

Author Contributions: Conceptualization, D.C.-W. and M.A.M.; methodology, D.C.-W., M.A.M. and N.D.; validation, M.A.M.; formal analysis, N.D.; investigation, D.C.-W.; resources, D.C.-W. and M.A.M.; data curation, D.C.-W.; writing—original draft preparation, D.C.-W. and N.D.; writing—review and editing, M.A.M.; visualization, D.C.-W. and N.D.; supervision, M.A.M.; project administration, M.A.M. and D.C.-W.; funding acquisition, M.A.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the National Science Centre (Poland), grant number UMO-2019/35/O/NZ9/00788.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The original contributions presented in this study are included in the article/Supplementary Materials. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

Conflicts of Interest: Malgorzata Anna Majcher reports financial support was provided by the National Science Centre (Poland). Malgorzata Anna Majcher reports a relationship with the National Science Centre (Poland) that includes funding grants and paid expert testimony. Other authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. Li, R.; Sun, Y. Effects of Honey Variety and Non-Saccharomyces cerevisiae on the Flavor Volatiles of Mead. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **2019**, *77*, 40–53. [CrossRef]
2. Vidrih, R.; Hribar, J. Studies on the sensory properties of mead and the formation of aroma compounds related to the type of honey. *Acta Aliment.* **2007**, *36*, 151–162. [CrossRef]
3. Akalin, H.; Bayram, M.; Anli, R.E. Determination of some individual phenolic compounds and antioxidant capacity of mead produced from different types of honey. *J. Inst. Brew.* **2017**, *123*, 167–174. [CrossRef]
4. Avîrvarei, A.-C.; Pop, C.R.; Mudura, E.; Ranga, F.; Hegheş, S.-C.; Gal, E.; Zhao, H.; Fărcaş, A.C.; Chiş, M.S.; Coldea, T.E. Contribution of Saccharomyces and Non-Saccharomyces Yeasts on the Volatile and Phenolic Profiles of Rosehip Mead. *Antioxidants* **2023**, *12*, 1457. [CrossRef] [PubMed]
5. Sottit, C.; Salor-Torregrosa, J.M.; Moreno-Garcia, J.; Peinado, J.; Mauricio, J.C.; Moreno, J.; Garcia-Martinez, T. Using Torulaspora delbrueckii, Saccharomyces cerevisiae and Saccharomyces bayanus wine yeasts as starter cultures for fermentation and quality improvement of mead. *Eur. Food Res. Technol.* **2019**, *245*, 2705–2714. [CrossRef]
6. Van Mullem, J.J.; Zhang, J.; Dias, D.R.; Schwan, R.F. Using wild yeasts to modulate the aroma profile of low-alcoholic meads. *Braz. J. Microbiol.* **2022**, *53*, 2173–2184. [CrossRef] [PubMed]
7. Szudera-Konczal, K.; Myszk, K.; Kubiak, P.; Majcher, M.A. The Use of Sour and Sweet Whey in Producing Compositions with Pleasant Aromas Using the Mold Galactomyces geotrichum: Identification of key odorants. *J. Agric. Food Chem.* **2020**, *68*, 10799–10807. [CrossRef] [PubMed]
8. Grygier, A.; Myszk, K.; Rudzińska, M. Galactomyces geotrichum-Moulds from dairy products with high biotechnological potential. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* **2017**, *16*, 5–16. [CrossRef] [PubMed]
9. Mustar, S.; Ibrahim, N. A Sweeter Pill to Swallow: A Review of Honey Bees and Honey as a Source of Probiotic and Prebiotic Products. *Foods* **2022**, *11*, 2102. [CrossRef]
10. Wintersteen, C.L.; Andrae, L.M.; Engeseth, N.J. Effect of heat treatment on antioxidant capacity and flavor volatiles of mead. *J. Food Sci.* **2005**, *70*, 119–126. [CrossRef]
11. Starowicz, M.; Granvogl, M. Effect of Wort Boiling on Volatiles Formation and Sensory Properties of Mead. *Molecules* **2022**, *27*, 710. [CrossRef] [PubMed]
12. Czabaj, S.; Kawa-Rygielska, J.; Kucharska, A.Z.; Kliks, J. Effects of mead wort heat treatment on the mead fermentation process and antioxidant activity. *Molecules* **2017**, *22*, 803. [CrossRef] [PubMed]
13. Cicha-Wojciechowicz, D.; Frank, S.; Steinhaus, M.; Majcher, M.A. Key Odorants Forming Aroma of Polish Mead: Influence of the Raw Material and Manufacturing Processes. *J. Agric. Food Chem.* **2024**, *72*, 10548–10557. [CrossRef]
14. Wu, Q.; Xu, Y.; Chen, L. Diversity of yeast species during fermentative process contributing to chinese maotai-flavour liquor making. *Lett. Appl. Microbiol.* **2012**, *55*, 301–307. [CrossRef] [PubMed]
15. Lamounier, K.F.R.; Rodrigues, P.d.O.; Pasquini, D.; dos Santos, A.S.; Baffi, M.A. Ethanol Production and Other Bioproducts by Galactomyces geotrichum from Sugarcane Bagasse Hydrolysate. *Curr. Microbiol.* **2020**, *77*, 738–745. [CrossRef]
16. Valinhas, R.V.; Pantoja, L.A.; Maia, A.C.F.; Miguel, M.G.C.P.; Vanzela, A.P.F.C.; Nelson, D.L.; Santos, A.S. Xylose fermentation to ethanol by new Galactomyces geotrichum and Candida akabensis strains. *PeerJ* **2018**, *6*, e4673. [CrossRef] [PubMed]
17. Kreissl, J.; Mall, V.; Steinhaus, P.S.M. Leibniz-LSB@TUM Odorant Database. Available online: <https://www.leibniz-lsb.de/en/datenbanken/leibniz-lsb-tum-odorant-database/odorantdb> (accessed on 5 May 2024).
18. Starowicz, M.; Granvogl, M. Trends in food science & technology an overview of mead production and the physicochemical, toxicological, and sensory characteristics of mead with a special emphasis on flavor. *Trends Food Sci. Technol.* **2020**, *106*, 402–416. [CrossRef]
19. Mayr, C.M.; Geue, J.P.; Holt, H.E.; Pearson, W.P.; Jeffery, D.W.; Francis, I.L. Characterization of the key aroma compounds in shiraz wine by quantitation, aroma reconstitution, and omission studies. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 4528–4536. [CrossRef] [PubMed]
20. Cordente, A.G.; Nandorfy, D.E.; Solomon, M.; Schulkin, A.; Kolouchova, R.; Francis, I.L.; Schmidt, S.A. Aromatic higher alcohols in wine: Implication on aroma and palate attributes during chardonnay aging. *Molecules* **2021**, *26*, 4979. [CrossRef]
21. Monforte, A.R.; Martins, S.I.F.S.; Silva Ferreira, A.C. Strecker Aldehyde Formation in Wine: New Insights into the Role of Gallic Acid, Glucose, and Metals in Phenylacetaldehyde Formation. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66*, 2459–2466. [CrossRef]

22. Zhu, L.X.; Zhang, M.M.; Liu, Z.; Shi, Y.; Duan, C.Q. Levels of furaneol in Msalais wines: A comprehensive overview of multiple stages and pathways of its formation during Msalais winemaking. *Molecules* **2019**, *24*, 3104. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Lytra, G.; Tempere, S.; Le Floch, A.; De Revel, G.; Barbe, J.C. Study of sensory interactions among red wine fruity esters in a model solution. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 8504–8513. [[CrossRef](#)]
24. Pereira, A.P.; Mendes-Ferreira, A.; Dias, L.G.; Oliveira, J.M.; Estevinho, L.M.; Mendes-Faia, A. Volatile composition and sensory properties of mead. *Microorganisms* **2019**, *7*, 404. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Huang, Y.; Tippmann, J.; Becker, T. A Kinetic Study on the Formation of 2- and 3-Methylbutanal. *J. Food Process Eng.* **2017**, *40*, e12375. [[CrossRef](#)]
26. Mihal', M.; Červeňanský, I.; Markoš, J. Production of phenylacetic acid from L-phenylalanine in dual reactor membrane hybrid system. *Chem. Eng. Process.-Process Intensif.* **2016**, *110*, 114–122. [[CrossRef](#)]
27. PN-88/A-77626; Miód Pszczeli. Polski Komitet Normalizacyjny: Warsaw, Poland, 1988.

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Publikacja 3

Cicha-Wojciechowicz, D., Kaczmarek, A., Juzwa, W.,
Drabińska, N., Majcher, M.A., Fermentation Strategies in Mead
Production: A Multitechnique Approach to Volatile and Odor-active
Compound Characterization.– publikacja załączona do cyklu jako
manuskrypt wysłany do publikacji

Publikacja dołączona razem z plikiem Supplementary Material

Food Chemistry

Fermentation Strategies in Mead Production: A Multitechnique Volatilomic Approach to Aroma Characterization

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	FOODCHEM-D-25-03894
Article Type:	Research Article (max 7,500 words)
Keywords:	aroma evolution; odor-active compounds; flow cytometry; fermentation metabolomics; volatilomics; flavoromics; mead
Corresponding Author:	Małgorzata Anna Majcher, Professor Poznań University of Life Sciences Faculty of Food Science and Nutrition Poznań, Polska POLAND
First Author:	Daria Cicha-Wojciechowicz
Order of Authors:	Daria Cicha-Wojciechowicz
	Anna Kaczmarek
	Wojciech Juzwa
	Natalia Drabińska
	Małgorzata Anna Majcher, Professor
Abstract:	This study compares spontaneous and yeast-inoculated mead fermentations, analyzing their effects on sensory and chemical profiles. Using advanced instrumental techniques: untargeted analysis of odorants, quantitation of odor-active compounds, and flow cytometry—this research identifies key fermentation-driven changes. Sensory analysis demonstrated enhanced honey, malty, yeasty, and rum notes in spontaneous fermentation, showing a need to explain chemical background of those differences. Untargeted analysis revealed a more complex volatile profile in spontaneous fermentation, characterized by unique fruity esters and off-flavors, whereas yeast-inoculated fermentation produced more consistent profiles. Statistical analysis identified distinct compounds linked to fermentation type and stage, with microbial dynamics influencing odor-active compound formation. Bacterial content correlated with ethyl hexanoate (0.63), furfural (0.33), and phenylacetic acid (0.49), while yeasts displayed correlations with 2-phenylacetaldehyde (0.37), ethyl hexanoate (-0.59), phenylacetic acid (-0.50), and furfural (-0.47). These findings enhance understanding of fermentation strategies' impact on mead aroma, aiding production control and sensory quality optimization.

Fermentation Strategies in Mead Production: A Multitechnique Volatilomic Approach to Aroma Characterization

Daria Cicha-Wojciechowicz^a, Anna Kaczmarek^a, Wojciech Juzwa^a, Natalia Drabińska^a,
Małgorzata Anna Majcher^a

*^aFaculty of Food Science and Nutrition, Poznań University of Life Sciences, Wojska Polskiego
31, 60-624 Poznań, Poland*

*Corresponding author: Małgorzata Anna Majcher, Faculty of Food Science and Nutrition,
Poznań University of Life Sciences, Wojska Polskiego 31, 60-624 Poznań, Poland, e-mail:
malgorzata.majcher@up.poznan.pl*

ABSTRACT: This study compares spontaneous and yeast-inoculated mead fermentations, analyzing their effects on sensory and chemical profiles. Using advanced instrumental techniques: untargeted analysis of odorants, quantitation of odor-active compounds, and flow cytometry—this research identifies key fermentation-driven changes. Sensory analysis demonstrated enhanced honey, malty, yeasty, and rum notes in spontaneous fermentation, showing a need to explain chemical background of those differences. Untargeted analysis revealed a more complex volatile profile in spontaneous fermentation, characterized by unique fruity esters and off-flavors, whereas yeast-inoculated fermentation produced more consistent profiles. Statistical analysis identified distinct compounds linked to fermentation type and stage, with microbial dynamics influencing odor-active compound formation. Bacterial content correlated with ethyl hexanoate (0.63), furan-2-carbaldehyde (0.33), and phenylacetic acid (0.49), while yeasts displayed correlations with 2-phenylacetaldehyde (0.37), ethyl hexanoate (-0.59), phenylacetic acid (-0.50), and furan-2-carbaldehyde (-0.47). These findings enhance understanding of fermentation strategies' impact on mead aroma, aiding production control and sensory quality optimization.

Keywords: aroma evolution, odor-active compounds, flow cytometry, fermentation metabolomics, volatilomics, flavoromics, mead

1. Introduction

Mead is an alcoholic beverage made from honey and water, with its distinctive aroma and unique flavor developed during the alcoholic fermentation and maturation periods. Its popularity peaked during the Middle Ages, but the earliest evidence of honey used in alcoholic beverage production dates back to 7000-5500 BCE in China (Rasmussen, 2015). Over thousands of years, the basic production method of mead has remained largely unchanged: honey must be diluted with water in appropriate ratios to allow yeast to grow and ferment the sugars into alcohol. Meads were fermented by the naturally occurring yeast in honey, which are predominantly osmophilic. Historically, spontaneous fermentation has been employed in mead production and other traditional beverages; however, it is now less common among modern producers. This fermentation process, driven by indigenous microbiota, contributes to the development of complex and unique volatile profiles in alcoholic beverages. While it can result in products with distinctive sensory characteristics (Luzzini et al., 2021), it also introduces variability and unpredictability. In contrast, controlled fermentation with selected yeast strains enhances reproducibility, efficiency, and targeted aroma development. Recently, there has been increasing interest in the use of non-*Saccharomyces* yeast strains, either alone or in co-culture, as they enable the development of novel aromatic profiles that arise from yeast interactions and are not present in pure cultures. (Bordet et al., 2023)

Most researchers investigating the aroma profile of alcoholic beverages utilize untargeted volatilome analysis. While this approach is informative and provides tools to differentiate beverages produced from various raw materials or methods, it does not fully address the complexity of aroma perception. Targeted analysis of odor-active compounds, including olfactometric evaluation combined with precise compound quantification and sensory assessment, provides deeper insights into both the chemical composition of aroma and its perception by consumers. However, despite their high value, targeted analyses are time-

consuming and often omitted. Only a few studies have integrated both untargeted and targeted analyses of odor compounds, primarily in wine research (Boban et al., 2022; Monforte et al., 2020) often excluding olfactometry. The present study is the first to comprehensively characterize the aroma of mead by integrating both untargeted and targeted analyses, including olfactometry, precise compound quantification, and sensory assessment, across the entire production process.

While the changes during the production processes of wines, distilled spirits, and beers are well-established, there is a significant lack of comprehensive knowledge about the changes in aroma compounds in meads. Although there are some similarities in the production processes of wines and meads, the differences in the chemical composition of the raw materials used are substantial. Therefore, it is crucial to conduct detailed studies on these changes to better understand the unique characteristics of mead. The influence of some variables such as different honey varieties, heating of wort or different microorganisms used in the production on the aroma of mead was previously studied (Li & Sun, 2019; Sottile et al., 2019; Starowicz & Granvogl, 2022), however these studies only identified differences at a single point in the production process. None of them assessed the changes in odor-active compounds throughout the entire, lengthy process of mead production concerning different variables.

In our previous study, we identified key odorants in traditional polish mead and evaluated their changes throughout the production process. Furthermore, in order to identify how the aroma of mead is formed during the production process, 12 model meads were produced, allowing for a detailed investigation of the impact of different honey varieties, fermentation methods, and wort boiling on the development of odor-active compounds (Cicha-Wojciechowicz, Drabińska, et al., 2024). Olfactometric experiments revealed that the differences in mead aroma were driven by varying concentrations of the same odor-active compounds rather than the presence of unique compounds. While the type of honey played a key role in shaping the overall aromatic

profile, sensory analysis demonstrated that fermentation type significantly influenced the final flavor characteristics. Mead produced through spontaneous fermentation exhibited a distinct sensory profile compared to that made with yeast inoculation, suggesting underlying biochemical and microbial processes at play. To uncover the mechanisms behind these differences, this study employed advanced instrumental techniques, including untargeted analysis of potential odorants, quantification of odor-active compounds, and flow cytometry combined with statistical analysis, enabling a comprehensive examination of fermentation-driven changes throughout mead production.. To gain a deeper understanding of the processes occurring during fermentation and maturation, mead samples were analyzed at multiple stages of production. Two types of honey (acacia and tilia) and two fermentation methods (spontaneous fermentation and inoculation with the commercially available yeast *Saccharomyces cerevisiae*) were used. Samples were collected at five fermentation time points (1st, 5th, 10th, 15th, and 30th day) and four maturation stages (3rd, 6th, 9th, and 12th month). Throughout the entire production process, untargeted analysis of potential odor-active compounds was conducted. Additionally, flow cytometry was applied to assess the influence of the two main microbial groups, bacteria and yeast, on the formation of these compounds. We believe that this extensive research provides a foundation not only for a deeper understanding of the chemical changes shaping mead's aroma during production but also for the development of predictive approaches to control and optimize its final sensory profile. To the best of our knowledge, this is the first study to comprehensively examine mead production from fermentation through maturation, considering both different honey varieties and fermentation strategies while applying an extensive experimental design. A key novelty of this research lies in the application of microbial enumeration using flow cytometry, allowing for the first-time correlation between microbial dynamics and the formation of odor-active compounds in mead.

Additionally, the integration of targeted and untargeted volatilomics across multiple production stages offers unprecedented insights into the transformation of aroma compounds over time.

2. Materials and methods

2.1. Mead samples

Four distinct mead samples were used in the experiment, each prepared from a specific type of varietal bee honey—acacia or tilia. For both honey types, meads were produced using two different fermentation methods: spontaneous fermentation and fermentation inoculated with *Saccharomyces cerevisiae* yeast. The samples were labeled as follows: ANS (acacia using spontaneous fermentation), ANY (acacia using the inoculation of *S. cerevisiae* yeast), TNS (tilia using spontaneous fermentation), and TNY (tilia using the inoculation of *S. cerevisiae* yeast). This approach allowed for a comprehensive examination of how honey variety and fermentation strategy influence the development of volatile and odor-active compounds. The specific production conditions and methodologies applied in their preparation were described in our previous study (Cicha-Wojciechowicz, Drabińska, et al., 2024). These four meads were particularly interesting from a scientific point of view for observing how fermentation type influences the sensory profile of the final product, as they exhibited significant differences in both sensory evaluation and the concentrations of key odor-active compounds. For the purposes of this study, samples were collected throughout the entire production process—during fermentation: on days 1, 5, 10, 15, and 30 (F1, F5, F10, F15, F30) and during maturation: at 3, 6, 9, and 12 months (M3, M6, M9, M12). The samples were stored in a freezer at -20 ° C immediately after collection until analysis.

2.2. Brix degrees and pH

Samples from three stages of production (F1, F30, and M12) were analyzed for Brix and pH levels right after collection. An optic refractometer Optika Microscopes (Ponteranica, Italy) was used to measure Brix degrees, while a Elmetron CP-411 pH meter (Zabrze, Poland) was employed for pH evaluation

2.3. Reference chemicals

Pure reference odorants of 2-methyl-1-butanal, 3-methyl-1-butanal, ethyl hexanoate, ethyl octanoate, furfuran-2-carbaldehyde, 2-phenylacetaldehyde, 2-phenylethan-1-ol, 2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanone and phenylacetic acid were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). (²H₈)-naphthalene, glucose, fructose, maltose, *mio*-inositol, glycerol, methoxylamine-hydrochloride, pyridine, (N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide and 1,4-dibromobenzene pure standards were obtained from Merck.

2.4. The analysis of primary metabolites

The standard stock solution was prepared by dissolving approx. 20 mg of glycerol, fructose, glucose and *mio*-inositol in methanol in 20 mL measuring flask.

Meat or production samples were diluted with ethanol and the aliquot of 50 µL was dried in 2 mL vials under a gentle stream of nitrogen. Then the derivatization was performed automatically in a 7696A Sample Prep WorkBench (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Firstly, 45 µL of methoxylamine-hydrochloride solution (20 mg/mL in pyridine) were added and methoximation reaction was carried out for 2 h at 60 °C. Then, 60 µL of (N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide were added and the silylation reaction was carried out for 1 h at 60 °C. Finally, the mixture was spiked with 20 µL of 1,4-dibromobenzene (1 g/L in methylene chloride) as internal standard and the 75 µL of methylene chloride were added up to a final volume of 200 µL.

The derivatized analytes were analyzed using an GC/MS system. Agilent 7890A gas chromatograph coupled to a 5975C mass spectrometer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). The compounds were separated on a SLB-5ms nonpolar column (30 m × 250 μm × 0.5 μm; Supelco, Bellefonte, PA). The injection port was operated in a splitless mode at 230 °C. Sugars, glycerol and myo-inositol were identified and quantified using standards for each compound and normalized in relation to the internal standard. Detailed specifications of the GC system used are described in Supplementary Material. Details of the quantitation are available in the Supplementary Material (Table S1).

2.5. Untargeted analysis of potential odorants

Volatile Organic Compounds (VOCs) from all samples were extracted by the means of the solid-phase micro-extraction (SPME). 5 mL of each sample was added to 20 mL glass vials and 3 g of sodium chloride was added. Vials were closed with crimp caps and Divinylbenzene/Carboxen/Polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) fiber was used for the extraction. Extraction was held at 40°C for 45 minutes. The separation of VOCs was performed using an Agilent 6890N gas chromatograph (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) with an Agilent GC sampler 80 (detailed specifications of the GC system used are provided in the Supplementary Material). Data were collected and processed using LECO ChromaTOF version 4.40 (LECO, St. Joseph, MI, USA). The compounds were tentatively identified using the NIST library (version 2.0) and using the linear retention indices (LRIs) calculated based on a series of alkanes (C5–C20). The criterion for tentative identification of compounds using the NIST library was $\text{hit} \geq 800$. The peak areas of modulated peaks of the same unique mass were summarized for each of the identified compound. Compounds that were present in fewer than 50% of samples were eliminated. Peak areas were calculated based on TIC chromatograms, and the same signal-to-noise ratio ($s/n \geq 50$) was applied to analyses processed. For the statistical analysis only compounds with the potential to be odor-active were chosen.

2.6. Flow cytometry

Flow cytometric evaluation of yeast vs bacterial cells was performed using the imaging flow cytometer Amnis FlowSight™ (Luminex Corp., USA), equipped with 3 lasers (405 nm, 488 nm and 642 nm), 9 fluorescence channels, brightfield (BF) and side scatter (SSC) detectors (acquisition by a multi-channel CCD camera) was used for the analysis. Samples were also stained with Syto9 fluorescent dye (emission maximum = 500 nm) to discriminate microbial cells (yeast and bacteria) from cellular and non-cellular debris. The post-acquisition analysis of imaging flow cytometric (IFC) data was based on 5 000 events recorded per analysis using the IDEAS software (Luminex Corp., USA). To improve the discrimination of debris vs microbial cells and subsequent evaluation of yeast vs bacterial cells involved in the fermentation process, a machine learning (ML) module was engaged. The Machine Learning (ML) module is incorporated in to the IDEAS® 6.3. software. The ML assisted the discrimination started with the selection of the representative sub-populations (through the manual indication of images of objects - the "truth" populations; at least 25 objects images were selected). Then the IDEAS software using linear discriminant analysis (LDA - Linear Discriminant Analysis) created a "super parameter" - classifier to discriminate between the indicated sub-populations. The classifier consists of individual parameters, each assigned a specific weight specifying the discrimination power between the indicated sub-populations. The resulting debris vs microbial cells, bacteria vs yeast cells and debris and yeast vs bacterial cells and debris classifiers contained a series of 16, 7 and 90 differentially weighted features (parameters), respectively. The cell classifier was plotted into histogram and events with values higher than zero belong to images that are best represented by specified sub-population. Histograms presenting 3 classifiers generated using Machine Learning (ML) module are shown in Figure 1. Detailed information about individual parameters and their weight specifying the discrimination power used for creation of the 'super parameter' are presented in Supplementary Material (Table S2).

2.7. Quantitation of odorants

Compounds 2-methyl-1-butanol, 3-methyl-1-butanol, ethyl hexanoate, ethyl octanoate, furfuran-2-carbaldehyde, 2-phenylacetaldehyde, 2-phenylethan-1-ol, 2,5-dimethyl-3(2H)-furanone and phenylacetic acid were previously identified in tested mead samples with the use of gas chromatography-olfactometry and gas chromatography-mass spectrometry and chosen for the quantitation purposes according to their high Odor Activity Values (OAV) in tested samples (Cicha-Wojciechowicz, Drabińska, et al., 2024). Chosen compounds were quantitated using HS-SPME-GC-ToF-MS with (2H_8)-naphthalene as the internal standard. 5 mL of each mead sample was added to 20 mL glass vials and 3 g of sodium chloride was added. Mead samples were spiked with internal standard dissolved in ethanol (in concentration ranges from 0.001 to 0.1 $\mu\text{g/mL}$). Vials were closed with crimp caps and Divinylbenzene/Carboxen/Polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) fiber was used for the extraction. Extraction was held at 40°C for 40 minutes. All analyses were performed in triplicates.

Peak areas of the target compounds and the internal standard were collected from the extracted ion chromatograms using unique quantifier ions. The concentrations of target compounds were calculated based on area counts of the target compound peak, the area counts of internal standard peak, the amount of the sample used, and the amount of the internal standard added. The calibration line for every target compound was obtained by analysis of mixtures of the analyte and (2H_8)-naphthalene in five ratios (5:1, 2:1, 1:1, 1:2, and 1:5). Details of the quantitation are available in the Supplementary Material (Table S3).

2.8. Statistical analysis

All statistical analyses were performed in Statistica version 14.1.04 and the Python environment using the pandas libraries for data processing and numpy for numerical calculations. Data

visualization was performed using the matplotlib.pyplot and seaborn libraries, which allow the generation of graphs, including cluster maps and graphs of the results of statistical analyses.

Hierarchical clustering analysis was performed using the clustermap function of the seaborn library, using the average linkage method and a custom Euclidean distance metric that accounts for missing values. To improve the interpretation of the results, the data were standardized with a z-score, which allowed the comparison of variables with different scales.

Complex relationships between categorical variables and their co-occurrences were visualized using UpSet plots generated using the upsetplot library. Peak areas of volatile compounds were binarized, converting numeric data into presence/absence matrix, allowing the identification of unique and common volatiles under different fermentation conditions.

Pearson correlation coefficients were calculated to estimate the relationship between the amount of volatile compounds, and their significance was estimated. Also, Principal Component Analysis (PCA) was used to assess the relationship between variables. The parametric Student's T-test and non-parametric Whitney's U-Mann test were used to estimate the significance of differences between the mean volatile compound contents

Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) was used to analyze differences in volatile compound profiles by fermentation type. PLS-DA is a supervised multivariate statistical method that extends Partial Least Squares Regression (PLS-R) for classification problems. It is particularly useful when the number of predictor variables is high and when strong collinearity exists among them. The objective of the method is to maximize the separation between predefined classes while modeling the relationship between predictor variables (volatile compounds) and a categorical response variable (fermentation type). The PLS-DA model was constructed with two components, which captured the maximum variance while maintaining class separability, using the sklearn.cross_decomposition library and the

predictor variables were previously standardised using StandardScaler. The results of the analysis were verified using cross-validation (stratified K-fold, k=5), calculating the mean value of the coefficient of determination (R^2 score) and the classification accuracy (accuracy score). In order to identify the most important variables influencing the classification, Variable Importance in Projection (VIP) scores were calculated to evaluate the importance of each volatile compound in the differentiation of fermentation types.

3. Results and discussion

3.1. Determination of fermentation efficiency

To control the quality parameters of mead and assess fermentation efficiency, basic parameters such as Brix degrees and pH were monitored at three production points (F1, F30, and M12) for each mead variety. Among all tested meads, pH values varied according to the honey variety used. These results are detailed in the Supplementary Material (Table S4).

When considering fermentation type, it is evident that meads inoculated with *S. cerevisiae* yeast completed the fermentation process within 30 days, as the Brix degrees for samples after 30 days of fermentation and after maturation remain unchanged. Meads prepared with spontaneous fermentation required more time to complete the fermentation process, which continued during maturation. This ongoing fermentation of sugars in honey wort during maturation was also observed by Czabaj et al. (2016), who noted an increase in ethanol concentration after 37 months of maturation in meads prepared with different additives.

Meads made from two honey varieties with spontaneous fermentation had higher Brix degrees than those inoculated with yeast, suggesting lower fermentation efficiency in meads fermented by native microbiota present in the tested honeys.

3.2. *The analysis of primary metabolites*

To evaluate chemical changes ongoing during fermentation process, concentrations of most important sugars and glycerol were measured. Changes in glucose and fructose concentrations during production process are presented in Figure 2.

The most significant reduction in sugar concentrations occurred after the fermentation period for all samples tested. Samples with yeast inoculation exhibited greater variations in glucose levels after the fermentation, though the levels were only slightly different after the maturation. For meads made with acacia honey using spontaneous fermentation a decrease in glucose levels was noted after 12 months of maturation. The change in fructose levels after the fermentation was consistent across all samples, except for mead prepared from acacia honey and spontaneous fermentation (ANS). These changes and their rates are linked to the conversion of sugars into ethyl alcohol and carbon dioxide through the fermentation process by various microorganisms (Iglesias et al., 2014).

Myo-Inositol, a minor sugar alcohol typically found in grape must, was detected in tilia-based meads, as well as in the ANS sample, after both fermentation and maturation. It was also present in the mead prepared from acacia honey and yeast-inoculated fermentation (ANY) sample after the maturation. The concentrations of myo-inositol were noticeably lower in meads made from acacia honey compared to those made from tilia. The highest concentration of this sugar was observed in the mead prepared from tilia honey and yeast-inoculated fermentation (TNY) immediately after fermentation. During maturation, its concentration slightly decreased in tilia-based meads. Myo-Inositol is a characteristic component of natural and concentrated grape musts (CMs) and is considered a marker for the authenticity of rectified concentrated must (Paolini et al., 2023). As a dietary supplement, myo-inositol acts as an effective anticarcinogenic, antioxidant, hypolipidemic, and antidiabetic agent. It also plays unique roles

in plant development and has been previously found in blueberry fruits (Song et al., 2016) and honey (Sanz et al., 2004).

Glycerol, a byproduct of alcoholic fermentation, was not found in F1 samples, as expected. After fermentation, glycerol concentrations ranged from 6.87 g/L in the ANS sample to 17.31 g/L in the mead prepared from tilia honey and spontaneous fermentation (TNS). These concentrations were noticeably higher in all tilia-based meads, as well as in the ANY sample, compared to acacia mead that underwent spontaneous fermentation. There were no significant changes in glycerol concentrations after the maturation period. The glycerol levels observed in this study were higher than those reported by Czabaj et al. (2016) and previously noted in wines (Czabaj et al., 2016; Gomes et al., 2013). Those differences may result from varying fermentation efficiencies and the additives used during production. Detailed concentrations of *myo*-inositol and glycerol in tested samples are shown in Supplementary Material (Table S5).

3.3. Untargeted analysis of potential odorants

Our previous study identified differences in the sensory evaluation of meads produced using two distinct fermentation techniques: spontaneous fermentation and yeast-inoculated fermentation. Notably, higher values for honey, malty, and rum descriptors were observed in meads produced via spontaneous fermentation (Cicha-Wojciechowicz, Drabińska, et al., 2024). To investigate the causes of these aromatic differences and understand the changes occurring during the manufacturing process, the samples were subjected to untargeted analysis of volatile compounds using headspace SPME coupled with GCxGC-ToF-MS. All potential odorants tentatively identified in samples are listed in Supplementary Material (Table S6). To every compound specific category of its chemical group (acid, alcohol, aldehyde, ester, furan, ketone, lactone or other) and odor descriptions were assigned according to the data available in the literature (Kreissl J, Mall V, Steinhaus P, 2022). Odor descriptions were further categorized into

specific groups (alcoholic, floral, fruity, honey-like, malty, off-flavor or spices) in terms of their odor descriptions and odor descriptors used in previous study.

To correlate the analytical data with sensory analysis, the interpretation of experimental data was divided into comparisons of the behavior of specific compound groups throughout the production process and the characteristic odor groups they form. Given that aroma is not only the primary focus of this study but also a key differentiator for consumers, we integrated both untargeted and targeted analyses, including olfactometry, precise compound quantification, and sensory assessment. We believe that tracking changes in these specific categories provides the most efficient approach for data interpretation, while also facilitating comparisons with previously discussed sensory evaluation results.

Among all tested samples 109 potential odorants belonging to the different chemical groups were identified. The largest number of potentially odor-active compounds identified in all samples were esters, which constituted about 1/3 of all identified potential odorants. Those compounds are mostly related to the odor impressions described as fruity and honey like (for example 3-methylbutyl acetate, ethyl 2-hydroxypropanoate, ethyl butanoate, ethyl hexanoate and 2-phenylethyl acetate) or off-flavors (sweaty, soapy methyl decanoate, sulfuric ethyl 3-methylsulfanylpropanoate or solvent-like ethyl acetate). The second largest group were alcohols, with diverse odor descriptors, such as malty, floral, soapy, pungent. Similar results were observed by Senn et al. (2021), which identified 43 volatile compounds with esters and alcohols being the largest groups among 41 meads purchased from American meaderies (Senn et al., 2021). The same groups of compounds were also the most abundant in the research on the mead fermented with *Cannabis sativa* L. (Romano et al., 2021).

Changes in the intensity of the potential odor-active compounds divided by their chemical group according to the fermentation type are presented on the Figure 3.

Throughout the production process, the intensity of potential odor-active compounds fluctuated depending on the specific stage. Regardless of the fermentation type, esters increased in intensity during fermentation (F1 to F30) and decreased over the twelve-month maturation period (M3 to M12). However, the peak intensity of these fruity-scented compounds varied: in spontaneous fermentation, it was highest in sample F10, whereas in meads inoculated with *S. cerevisiae* yeast, the maximum intensity was observed earlier, at sample F5. The. A similar pattern was observed for ketones and furans, which increased in intensity during fermentation and decreased during maturation. Aldehydes maintained similar intensities throughout the entire production process, irrespective of the fermentation type. Higher alcohol intensity was observed in meads fermented spontaneously after 12 months of maturation. The increasing intensity of many compounds, such as esters or acids, may be linked to their formation during yeast growth. Spontaneous fermentation showed maximal peak intensities later than controlled fermentation (F10 and F5, respectively), probably due to the fact, that spontaneous fermentation proceeds less rapidly and turbulently than yeast-inoculated fermentation (which was also demonstrated by decreases in sugars concentrations).

Changes in intensity of potential odorants, divided by odor group according to the fermentation type, are presented in the Figure 4.

The first group of odors, classified as off-flavors (according to their odor descriptions available in the literature), includes a wide range of compounds from different chemical groups with diverse odor descriptors, such as ketones (causing smoky, sulfuric and rubber-like odor impressions), acids (vinegar-like, soapy, moldy and pungent impressions) and esters (sulfuric, solvent-like, musty and soapy impressions). Seven compounds were shared among samples from both fermentation types (1-(furan-2-yl)ethenone, 1-phenylethanone, 2-methylthiolan-3-one, acetic acid, decanoic acid, ethyl decanoate and propan-1-ol), two compounds were found only in the yeast-inoculated samples (1-methyl-4-prop-1-en-2-ylbenzene and nonanoic acid)

and six compounds were formed only in the spontaneously fermented samples (2-methyl-5-propan-2-ylphenol, ethyl 3-methylsulfanylpropanoate, ethyl acetate, methyl 2-hydroxybenzoate, methyl decanoate and octanoic acid). The off-flavor group shows a significant increase in intensity during the fermentation process in both types of fermentation. In both fermentation types, this group of compounds decreases in intensity during the long maturation process, which may explain why these compounds were not previously identified in tested samples during gas chromatography-olfactometry experiments (Cicha-Wojciechowicz, Drabińska, et al., 2024). Our previous research investigating the creation of key odorants during the production process of meads also showed the decrease of off-flavor compound 4-methylphenol (horse stable-like odor) after the maturation time (Cicha-Wojciechowicz, Frank, et al., 2024). Such a substantial decrease in compounds from this odor category may also justify the importance of this time-consuming production step to the overall aroma of meads.

Compounds grouped as honey-like, alcoholic, off-flavor, and fruity showed a faster increase in intensity during the fermentation process in meads prepared with yeast inoculation compared to meads with spontaneous fermentation (F5 and F10, respectively). This may also confirm the slower fermentation process when spontaneous fermentation is involved.

Quantitative sensory profile analysis, performed according to the methodology described in the previous publication (Cicha-Wojciechowicz, Drabińska, et al., 2024) for those meads (presented on Figure 5) showed higher malty and honey-like impressions in aged meads from spontaneous fermentations in both (acacia- and tilia-based) mead types compared to yeast-inoculated meads. These differences were confirmed by results from untargeted analysis of potential odorants, which showed that spontaneous fermentation resulted in higher peak intensities of alcoholic, malty, fruity, and honey-like odors. Yeast-inoculated samples showed higher intensities of compounds categorized as spices and off-flavor.

UpSet plots of potential odorants divided into the production process or the type of fermentation together with unique compounds are shown in Supplementary Material (Figure S7). Those results revealed that both fermentation and maturation processes are very varied in terms of potential odorants appearance. Fermentation introduces 95 volatile compounds, with 25 of them being unique to this stage, with odor descriptions of those compounds mostly classified as fruity, off-flavor and spices, with smaller amount of floral and malty group. On the other hand maturation period resulted in the appearance of 14 compounds that were not identified during the fermentation, which were mostly fruity odors, with smaller share of off-flavor, malty and spices group. This results highlights the ongoing chemical changes that occur during the aging process. The fact that maturation introduces new compounds suggests that the aging process is crucial in adding complexity to the mead. Some of these compounds may arise from the breakdown of compounds formed during fermentation, or the interaction between the mead and any aging containers (e.g., wood), which was observed previously in wines (Fernández De Simón et al., 2014). Maturation may also lead to the disappearance or modification of certain volatile compounds from fermentation, indicating that the aging process is not just about the accumulation of new compounds, but also about the transformation and reduction of others. This situation was well demonstrated by reduction of intensities of compounds categorized as off-flavors to the levels that were not detected by the consumers and in the olfactometry assessment. Finally, the presence of specific unique volatile compounds formed during fermentation and maturation steps can be a key area for innovation in mead production. By understanding which compounds are produced at each stage and how they contribute to the final flavor profile, producers could potentially engineer fermentation and maturation conditions (e.g., yeast strains, fermentation temperature, or maturation time) to emphasize desired flavors and aromas and optimize production time and costs without sacrificing product quality.

When two types of fermentation were compared it is clear that spontaneous fermentation results in the presence of higher number of unique potentially odor-active compounds (27) than controlled fermentation with the inoculation of *S. cerevisiae* yeast (8), as shown in the Figure S7. Compounds that were uniquely identified in the samples fermented spontaneously showed the presence of many different chemical groups with the predominant share of odors classified as fruity, however the second largest group were off-flavors. Spontaneous fermentation relies on naturally occurring yeasts and microbes from the environment (such as wild yeast strains, bacteria, and other microorganisms), which can lead to a broader spectrum of chemical reactions and thus the production of a greater variety of volatile compounds. This is characteristic of wild fermentation, which often results in more complex and unpredictable flavor profiles. In contrast, *S. cerevisiae* yeast, when inoculated, tends to dominate the fermentation process, leading to a more controlled and predictable outcome. The presence of only 8 unique compounds in the controlled fermentation indicates a more streamlined and uniform chemical process, as the yeast strain likely ferments the sugars in a more consistent and efficient manner, producing fewer, more specific compounds. In the samples fermented by the yeast inoculation group of uniquely identified compounds was clearly smaller and dominated by fruity odors, followed by off-flavors. Analysis of compounds found in the samples where different fermentation methods were used showed that spontaneous fermentation may be an interesting alternative to the commercial yeast inoculation, especially when multiple fruity aroma are desired. However, the significant formation of the off-flavors should not be overlooked, and new strategies for reducing this group of compounds should be explored. The increased number of unique compounds and the broader array of odors in spontaneous fermentation suggest that this method could lead to a more complex and variable flavor profile. On the other hand, manufacturers opting to employ this type of fermentation should be aware of potential complications and hazards arising from this fermentation type.

Because spontaneous fermentation depends on the natural microbiota, the results can be highly variable from batch to batch, making it difficult to predict the final flavor. This unpredictability might be attractive to producers seeking a unique, “wild” or artisanal product but could pose challenges in ensuring product consistency. In comparison, the controlled fermentation with *S. cerevisiae* offers more predictability and consistency in the final product, that is highly valuable among professional manufacturers producing well-known and valued product ranges, for which, the elimination of risks such as microbiological contamination leading to product spoilage is a priority.

Ultimately, the choice between spontaneous and controlled fermentation depends on the desired characteristics of the final mead. If complexity, uniqueness, and variability are prioritized, spontaneous fermentation could be the preferred method. If consistency, quality control, and a cleaner flavor profile are the goals, controlled fermentation with *S. cerevisiae* would be more suitable.

Untargeted analysis of volatile organic compounds (VOCs) has previously been employed primarily to assess differences between meads produced from various honey varieties or production methods, such as boiled and unboiled wort. This approach has proven valuable in determining the origin of the honey used in mead production, as well as verifying the mode of its preparation, including whether it underwent heat treatment (Kuś et al., 2022). Additionally, this method has been used to distinguish aging stages in Chinese rice wine (Wang et al., 2020).

However, our study presents a novel contribution by expanding the application of untargeted VOC analysis to explore and compare the volatile profiles between two different fermentation methods—spontaneous and controlled fermentation using *S. cerevisiae* yeast—as well as the subsequent maturation phase during mead production. We observed distinct differences in the volatile compound profiles between the two fermentation types, with spontaneous fermentation resulting in a higher number of unique, potentially odor-active compounds (27 compared to 8

in controlled fermentation). These compounds were predominantly fruity in nature, but a significant portion of them also contributed off-flavors, which added complexity to the profile. In contrast, controlled fermentation yielded fewer unique compounds, primarily fruity, with off-flavors present but less pronounced.

Further, our results highlight the role of maturation in shaping the final flavor profile of mead. During maturation, we identified 14 unique compounds that were not present during fermentation, underscoring the chemical transformations that occur as the mead ages. The maturation phase, therefore, contributes to the complexity and refinement of the mead, with certain compounds from fermentation evolving or being replaced by others, further altering the aroma and flavor characteristics.

This study provides new insights into how both the type of fermentation and maturation processes contribute to the overall volatile profile of mead. By comparing spontaneous versus controlled fermentation alongside the maturation phase, our results offer a deeper understanding of how these stages influence the sensory characteristics of mead, providing valuable information for producers looking to tailor flavor profiles and improve product consistency.

3.4. Flow cytometry

To identify main groups of microorganisms responsible for fermentation process and define changes in their count all samples of four tested meads on every step of the production were tested by flow cytometry.

A major advancement in flow cytometric techniques is imaging flow cytometry (IFC), which merges the advantages of both fluorescence microscopy and flow cytometry. IFC addresses the limitations of conventional flow cytometry by integrating its statistical power with the imaging capabilities of microscopy within a single system. While traditional flow cytometers primarily measure fluorescence signal intensities, IFC takes it a step further by correlating fluorescence

data with digitally processed images of analyzed cells. Additionally, IFC provides spatial insights into the distribution of fluorescent signals within individual cells or particles (Barteneva et al., 2012; Hildebrand et al., 2016). By linking fluorescence intensity data with cellular morphology and hundreds of pixel-based parameters, IFC utilizes a charge-coupled device (CCD) camera to capture multiple high-resolution images of each cell in flow, including brightfield (BF), side scatter (SSC), and up to 10 fluorescent markers. These images are then analyzed using specialized software, incorporating machine learning (ML) and artificial intelligence (AI) modules to enhance data classification and interpretation (Konieczny et al., 2021).

During the analysis three main fractions (debris, bacteria and yeast) were defined according to their morphological attributes and dying features. Changes in the bacteria and yeast ratio during the time of the production in terms of different fermentation types (spontaneous and yeast-inoculated) are shown of Figure 6.

Ratios of the bacteria and yeast content in the samples fermented by two types of fermentation when the same honey types were used were very similar on the first day of the fermentation and counted 87,99% to 8,36% (bacteria to yeast, respectively) in ANS sample and 88,18% to 8,52% in ANY sample. Tilia-based meads also showed good similarity between different fermentation types, counting 81,13% of bacteria and 15,80% of yeast in TNS sample and 81,91% of bacteria and 15.19% of yeast in TNY sample. Increase in yeast content in samples inoculated by *S. cerevisiae* was much faster and more rapid when compared to the spontaneous fermentation in both honey variations, which may indicate that the commercially available and pure cultures of *S. cerevisiae* show better tolerance and resistance to the high sugar concentrations present in mead wort. This tendency was also confirmed by the differences in sugars (fructose and glucose) consumptions by yeasts controlled during the production process. Maximal yeast content in the yeast-inoculated meads was noted in the 10th day of the

fermentation (for acacia and tilia-based meads) while in spontaneous fermentation maximal content was noted in 30th day of the fermentation (TNS sample) and at the end of the maturation process (ANS sample). High content of bacteria in all mead samples and its changing ratio illustrates the importance of the bacteria activity and presence during the fermentation process.

3.5. Quantitation of odorants

To identify and understand changes in odor-active compounds with high OAV throughout the production processes, 8 odor-active compounds, previously identified using sensomic approach, were quantified using Headspace Solid Phase Micro-Extraction coupled with GC-ToF-MS. Calibration curves were created using (²H₈)-naphthalene as an internal standard. Detailed information on the instruments and quantitation methods are provided in the Supplementary Material.

The quantified odorants belong to different chemical groups: three aldehydes (2- and 3-methyl-1-butanal, furan-2-carbaldehyde, and 2-phenylacetaldehyde), two esters (ethyl hexanoate and ethyl octanoate), one acid (phenylacetic acid), one alcohol (2-phenylethan-1-ol), and one furanone (2,5-dimethyl-3-(2H)-furanone). These compounds were associated with odors such as malty, fruity, honey-like, floral, and caramel-like, and most were previously identified as key odorants in mead (Cicha-Wojciechowicz, Frank, et al., 2024).

The concentrations of the compounds, which are shown in Supplementary Material (Table S8, S9), varied according to the production steps and throughout the entire manufacturing period. Most of the changes were closely linked to the specific chemical groups of the compounds and their formation pathways. Esters identified among the tested mead samples (ethyl hexanoate and ethyl octanoate), which have a pleasant, fruity odor, were not detected in any sample from the first day of fermentation in any mead type. The highest concentrations of these odorants

were observed immediately after the fermentation period and significantly decreased after twelve months of maturation. Both meads fermented spontaneously showed higher production of esters during the fermentation process which resulted in their higher concentration in the ready product after maturation period when compared to yeast-inoculated samples. Higher concentrations of esters was also noticed by Boban et al. (2022) in wines prepared with spontaneous fermentation regardless of grape origin used (Boban et al., 2022). Ethyl esters are formed intracellularly by yeast cells during active growth. The observed decrease in their concentration was observed before and is likely due to their oxidation (Cicha-Wojciechowicz, Frank, et al., 2024; Patrianakou & Roussis, 2013).

The second group of compounds quantified in the tested model meads were aldehydes (2- and 3-methyl-1-butanal, furan-2-carbaldehyde, and 2-phenylacetaldehyde), which have diverse odors such as malty, sweet, and honey-like. Malty 2- and 3-methyl-1-butanal and honey-like 2-phenylacetaldehyde were detected in all mead samples, regardless of the honey type or production methods used. Their concentrations varied significantly across almost all production stages in each mead. Honey-like 2-phenylacetaldehyde was previously considered one of the most important odorants contributing to the aroma of mead, due to its high odor activity value (OAV) (Cicha-Wojciechowicz, Frank, et al., 2024). Furan-2-carbaldehyde, with a sweet, cereal-like odor, was abundant in all acacia-based meads. Aldehydes can be formed through several pathways, with the most likely being Maillard reactions, Strecker degradation, or secretion by fermenting yeast (Gernat et al., 2020).

Acids, another important group of compounds, were represented by honey-like phenylacetic acid. This compound was not detected in any mead sample on the first day of fermentation. Its concentration significantly increased during the maturation period for most of the tested samples. This compound was previously identified in mead and wines (Cicha-Wojciechowicz, Frank, et al., 2024; Fang & Qian, 2005).

2-Phenylathan-1-ol, characterized by its floral aroma, was detected in all meads after both the fermentation and maturation periods, with its highest concentrations observed immediately after fermentation. 2-Phenylethan-1-ol is derived from phenylalanine through yeast amino acid metabolism via the Ehrlich pathway. During the maturation period, the concentrations of this floral compound decreased, contrary to the observations made in our previous study (Cicha-Wojciechowicz, Frank, et al., 2024). This decrease may be partially attributed to the oxidation of the alcohol into the corresponding aldehyde and the partial evaporation of this volatile compound from the mead during maturation (Ugliano, 2013).

2,5-Dimethyl-3(2*H*)-furanone, characterized by its pleasant, caramel-like odor, was found in all honeys and in most mead samples, suggesting that honey may be the source of this compound. In all meads where this odorant was detected, its concentrations significantly increased after fermentation. This compound can be formed through various pathways, including the Maillard reaction, chemical transformation, and biosynthesis by yeast and bacteria (Zhu et al., 2019). After the maturation period, a significant decrease in its concentration was observed.

Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) was performed to investigate the potential of differentiation between two fermentation types (spontaneous vs yeast-inoculated) by the concentration of odor-active compounds identified in samples. The results are shown in Figure 7.

Presented model showed high classification efficiency, which allowed for the proper classification of ~90% of the fermentation types when considering the concentrations of identified odor-active compounds. VIP analysis revealed that phenylacetic acid, ethyl hexanoate, and 2-phenylacetaldehyde are very important (VIP score >1), and ethyl octanoate and 2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanone are moderately important (VIP score 0.8-1.0) factors when it comes for the fermentation types differentiation. This analysis helped demonstrate that

differences in fermentations are evident not only in the dynamics of sugars fermentation, changes in the intensity of the potential odorants evaluated by the untargeted analysis of VOCs, and the development of yeast and bacteria during the production processes, but also at the level of the same compounds differing only in their concentrations among samples.

3.6. Assessment of microorganisms activity and odorants creation relation

To further investigate the relation of bacteria and yeast ratio changes to the formation of odor-active compounds during the whole production process of the mead the flow cytometric evaluation of both main groups of microorganisms involved in fermentation (yeast and bacteria) was compared to the concentrations of odor-active compounds determined in all tested samples and assessed by statistical analysis. Results of the analysis are presented in Figure 8.

Correlation analysis revealed that bacterial content moderately influenced the production of important odor-active compounds such as ethyl hexanoate (0.63), furan-2-carbaldehyde (0.33), and phenylacetic acid (0.49), indicating that bacteria contribute to the formation of some volatile compounds. In contrast, bacterial content showed a negative correlation with 2-phenylacetaldehyde (-0.39), suggesting that higher bacterial presence may inhibit the formation of this compound or lead to its transformation into other products. Yeast concentration during fermentation showed only a weak correlation with phenylacetaldehyde (0.37), while it exhibited negative correlations with ethyl hexanoate (-0.59), phenylacetic acid (-0.50), and furan-2-carbaldehyde (-0.47). This suggests that while yeast is the primary driver of fermentation, its increase may lead to a reduction in certain bacterial-associated volatile compounds, possibly due to competition or metabolic shifts. The interplay between yeast and bacteria likely contributes to this enhanced aroma complexity, where fermentation-derived esters provide fruity and floral notes, while maturation-related compounds (such as furan-2-carbaldehyde and phenylacetic acid) contribute deeper honey, malty, and aged characteristics.

Comparison of the particular compounds concentration changes resulted with noticing very strong positive correlations between esters with other compounds: ethyl hexanoate and 2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanone, and ethyl hexanoate and 2-phenylethan-1-ol (0.88, 0.81, respectively), and ethyl octanoate and 2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanone (0.84), as long as the strongest correlation was observed for both esters (0.93). This result is probably due to the same pathway of formation of these compounds during fermentation process. On the other hand, ethyl hexanoate showed moderate correlation with phenylacetic acid (0.62) and moderate negative correlation with 2-phenylacetaldehyde (-0.70). Another moderate correlations (positive and negative) were observed between furan-2-carbaldehyde and three other compounds: 2- and 3-methyl-1-butanol (0.76), phenylacetic acid (0.75) and 2-phenylacetaldehyde (-0.63). The presence of important volatile compounds, particularly esters and aldehydes, translated into a significant increase in floral, rum, honey, malty, yeast, and fermented odor perceptions in sensory evaluations.

4. Conclusions

To summarize, this study evaluated the impact of two fermentation types (spontaneous and yeast-inoculated) and two honey varieties (acacia, and tilia) on the development on the volatile organic compounds and odorants in meads. A wide range of diverse instrumental analyses, such as HS-SPME-GC/MS, flow cytometry, and quantification of odorants by HS-SPME-GC/MS, combined with advanced statistical analysis, were performed on four varieties of meads and their intermediate production stages, leading to a better understanding of the chemical changes occurring during mead production. These results allowed to establish the importance of fermentation type on the concentrations of crucial odorants in experimental meads. Study shows, that spontaneous fermentation leads to a more complex and variable volatile profile, with a higher number of unique compounds. However, it comes with the risk of unwanted off-flavors and a lack of consistency. This process may be more suited for

producers looking for uniqueness and complexity in their meads, with a more artisanal approach that embraces the unpredictability of wild fermentation. On the other hand controlled fermentation with *S. cerevisiae* yeast produces a cleaner, more predictable mead with fewer off-flavors and a consistent fruity aroma. While it may lack the complexity and variability of spontaneous fermentation, it offers greater control over the final product and is likely more reliable for consistent production. The combination of various advanced scientific methods allowed for the discovery of relationships between numerous production variables and the expansion of existing knowledge about the chemical and microbial interactions occurring in mead during its production. Those considerations showed that not only yeast play important role in the meads aroma shaping, but bacteria play a specific role in forming important volatile compounds.

This knowledge provides valuable insights into aroma development throughout the production process and the influence of different production variables, enabling beverage manufacturers to optimize the aroma of their mead. The obtained results will undoubtedly contribute to enhancing the diversity of honey aroma profiles through the use of new solutions. The conducted research holds significant value for mead producers by identifying the essential factors to consider when planning the final product's characteristics even before production begins.

Author contributions

Daria Cicha-Wojciechowicz: experiment design, method development, chemical analyses, data processing and interpretation, manuscript writing (draft)

Anna Kaczmarek: data processing and interpretation, manuscript writing (draft)

Wojciech Juzwa: experiment design, method development, data processing and interpretation, manuscript writing (draft)

Natalia Drabińska: chemical analyses, data processing

Malgorzata Anna Majcher: experiment design, method development, data interpretation, manuscript editing (draft), project PI (beneficiary of financial support within a NCN project provided)

Funding sources

This work was supported by the National Science Centre (Poland) under grant no. UMO-2019/35/O/NZ9/00788.

Declaration of interest

The authors declare no conflict of interest.

Supplementary material contents

Miscellaneous Chemicals and Materials, detailed GC systems specifications, Table S1 (Experimental Data of Quantitation With Internal Standard (Quantifier Ions, Calibration Lines), S2 (Coefficients of Variance of Odorants Quantitation of Meads), S3 (Individual Parameters and Their Specific Weight Specifying the Discrimination Power Used for Creation of the ‘Super Parameter’), S4 (pH and Brix Degrees of Meads During Production Process), S5 (Concentration of Mio-inositol and Glycerol in Mead Samples), S6 (List of the Potential Odorants Tentatively Identified in Mead Samples by Untargeted HS-SPME-GCxGC-MS Analysis), Figure S7 (Relationships Between Categorical Variables and Their Co-occurrences), S8 (Concentration of the Odor-active Compounds in Meads During the Production Process), and S9 (Standard Deviations of Odor-active Compounds Quantitation in Meads During the Production Process).

References

- Barteneva, N. S., Fasler-Kan, E., & Vorobjev, I. A. (2012). Imaging Flow Cytometry: Coping with Heterogeneity in Biological Systems. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 60(10), 723–733. <https://doi.org/10.1369/0022155412453052>
- Boban, A., Vrhovsek, U., Carlin, S., Mucalo, A., & Budić-Leto, I. (2022). A Targeted and an Untargeted Metabolomics Approach to the Volatile Aroma Profile of Young ‘Maraština’ Wines. *Metabolites*, 12(12). <https://doi.org/10.3390/metabo12121295>
- Bordet, F., Romanet, R., Bahut, F., Ballester, J., Eicher, C., Peña, C., Ferreira, V., Gougeon, R., Julien-Ortiz, A., Roullier-Gall, C., & Alexandre, H. (2023). Expanding the diversity of Chardonnay aroma through the metabolic interactions of *Saccharomyces cerevisiae* cocultures. *Frontiers in Microbiology*, 13(February), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1032842>
- Cicha-Wojciechowicz, D., Drabińska, N., & Majcher, M. A. (2024). Influence of Honey Varieties, Fermentation Techniques, and Production Process on Sensory Properties and Odor-Active Compounds in Meads. *Molecules*, 29(24). <https://doi.org/10.3390/molecules29245913>
- Cicha-Wojciechowicz, D., Frank, S., Steinhaus, M., & Majcher, M. A. (2024). Key Odorants Forming Aroma of Polish Mead: Influence of the Raw Material and Manufacturing Processes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 72(18), 10548–10557. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.4c01276>
- Czabaj, S., Kawa-Rygielska, J., Dziuba, E., Foszczyńska, B., & Kliks, J. (2016). Proces Dojrzewania i Jego Wpływ na Jakość Miodów Pitnych. *Acta Scientiarum Polonorum*, 15(1), 5–14.

- Fang, Y., & Qian, M. (2005). Aroma compounds in Oregon Pinot Noir wine determined by aroma extract dilution analysis (AEDA). *Flavour and Fragrance Journal*, 20(1), 22–29. <https://doi.org/10.1002/ffj.1551>
- Fernández De Simón, B., Martínez, J., Sanz, M., Cadahía, E., Esteruelas, E., & Muñoz, A. M. (2014). Volatile compounds and sensorial characterisation of red wine aged in cherry, chestnut, false acacia, ash and oak wood barrels. *Food Chemistry*, 147, 346–356. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.158>
- Gernat, D. C., Brouwer, E., & Ottens, M. (2020). Aldehydes as Wort Off-Flavours in Alcohol-Free Beers—Origin and Control. *Food and Bioprocess Technology*, 13(2), 195–216. <https://doi.org/10.1007/s11947-019-02374-z>
- Gomes, T., Barradas, C., Dias, T., Verdial, J., Morais, J. S., Ramalhosa, E., & Estevinho, L. M. (2013). Optimization of mead production using Response Surface Methodology. *Food and Chemical Toxicology*, 59, 680–686. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.06.034>
- Hildebrand, M., Davis, A., Abbriano, R., Pugsley, H. R., Traller, J. C., Smith, S. R., Shrestha, R. P., Cook, O., Sánchez-Alvarez, E. L., Manandhar-Shrestha, K., & Alderete, B. (2016). Applications of imaging flow cytometry for microalgae. *Methods in Molecular Biology*, 1389(January), 47–67. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3302-0_4
- Iglesias, A., Pascoal, A., Choupina, A. B., Carvalho, C. A., Feás, X., & Estevinho, L. M. (2014). Developments in the fermentation process and quality improvement strategies for mead production. *Molecules*, 19(8), 12577–12590. <https://doi.org/10.3390/molecules190812577>
- Konieczny, M., Rhein, P., Czaczyk, K., Białas, W., & Juzwa, W. (2021). Imaging flow cytometry to study biofilm-associated microbial aggregates. *Molecules*, 26(23), 1–12. <https://doi.org/10.3390/molecules26237096>

- Kreissl J, Mall V, Steinhaus P, S. M. (2022). *Leibniz Odorant Database*. Leibniz-LSB@TUM Odorant Database. <https://www.leibniz-lsb.de/en/databases/leibniz-lsb-tum-odorant-database>
- Kuś, P. M., Czabaj, S., & Jerković, I. (2022). Comparison of Volatile Profiles of Meads and Related Unifloral Honeys: Traceability Markers. *Molecules*, 27(14). <https://doi.org/10.3390/molecules27144558>
- Li, R., & Sun, Y. (2019). Effects of Honey Variety and Non-Saccharomyces cerevisiae on the Flavor Volatiles of Mead. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 77(1), 40–53. <https://doi.org/10.1080/03610470.2018.1546072>
- Luzzini, G., Slaghenauhi, D., Pasetto, F., & Ugliano, M. (2021). Influence of grape composition and origin, yeast strain and spontaneous fermentation on aroma profile of Corvina and Corvinone wines. *Lwt*, 143(October 2020), 111120. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111120>
- Monforte, A. R., Martins, S. I. F. S., & Silva Ferreira, A. C. (2020). Impact of Phenolic Compounds in Strecker Aldehyde Formation in Wine Model Systems: Target and Untargeted Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(38), 10281–10286. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b02674>
- Paolini, M., Perini, M., Allari, L., Tonidandel, L., Finato, F., Guardini, K., & Larcher, R. (2023). Myo-Inositol, Scyllo-Inositol, and Other Minor Carbohydrates as Authenticity Markers for the Control of Italian Bulk, Concentrate, and Rectified Grape Must. *Molecules*, 28(3609).
- Patrianakou, M., & Roussis, I. G. (2013). Decrease of wine volatile aroma esters by oxidation. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 34(2), 241–245. <https://doi.org/10.21548/34-2-1100>

- Rasmussen, S. C. (2015). From honey wine to the cultivation of the grape: An early history of fermented beverages. In *ACS Symposium Series* (Vol. 1211, pp. 89–138).
<https://doi.org/10.1021/bk-2015-1211.ch004>
- Romano, R., Aiello, A., De Luca, L., Sica, R., Caprio, E., Pizzolongo, F., & Blaiotta, G. (2021). Characterization of a new type of mead fermented with *Cannabis sativa* L. (hemp). *Journal of Food Science*, 86(3), 874–880. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15614>
- Sanz, M. L., Sanz, J., & Martínez-Castro, I. (2004). Presence of some cyclitols in honey. *Food Chemistry*, 84(1), 133–135. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00200-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00200-0)
- Senn, K., Cantu, A., & Heymann, H. (2021). Characterizing the chemical and sensory profiles of traditional American meads. *Journal of Food Science*, 86(3), 1048–1057.
<https://doi.org/10.1111/1750-3841.15607>
- Song, F., Su, H., Yang, N., Zhu, L., Cheng, J., Wang, L., & Cheng, X. (2016). Myo-Inositol content determined by myo-inositol biosynthesis and oxidation in blueberry fruit. *Food Chemistry*, 210, 381–387. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.099>
- Sottil, C., Salor-Torregrosa, J. M., Moreno-Garcia, J., Peinado, J., Mauricio, J. C., Moreno, J., & Garcia-Martinez, T. (2019). Using *Torulaspora delbrueckii*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* wine yeasts as starter cultures for fermentation and quality improvement of mead. *European Food Research and Technology*, 245(12), 2705–2714.
<https://doi.org/10.1007/s00217-019-03384-z>
- Starowicz, M., & Granvogl, M. (2022). Effect of Wort Boiling on Volatiles Formation and Sensory Properties of Mead. *Molecules*, 27(3).
<https://doi.org/10.3390/molecules27030710>

Ugliano, M. (2013). Oxygen contribution to wine aroma evolution during bottle aging.

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61(26), 6125–6136.

<https://doi.org/10.1021/jf400810v>

Wang, N., Chen, S., & Zhou, Z. (2020). Age-dependent characterization of volatile organic compounds and age discrimination in Chinese rice wine using an untargeted GC/MS-based metabolomic approach. *Food Chemistry*, 325(September 2019), 126900.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126900>

Zhu, L. X., Zhang, M. M., Liu, Z., Shi, Y., & Duan, C. Q. (2019). Levels of furaneol in Msalais wines: A comprehensive overview of multiple stages and pathways of its formation during Msalais winemaking. *Molecules*, 24(17), 18–21.

<https://doi.org/10.3390/molecules24173104>

Tables and figures

Figure 1. Discrimination of Debris, Bacteria and Yeast in Tested Samples.

Histograms presenting 3 classifiers generated using Machine Learning (ML) module (incorporated in to the IDEAS® 6.3. software) to discriminate i) debris from microbial cells (classifier debris) and ii) subsequent evaluation of yeast (classifier yeast) vs bacterial cells (classifier bacteria). Generated classifiers are composed of specified features chosen by the ML module together with the weights of each feature expressed in percent's contained a series of 16, 7 and 90 differentially weighted features (parameters) for classifiers debris, yeast and bacteria, respectively (supplementary). Events with values higher than zero belong to cell images that are best represented by the classifier (A). Example histograms (sample TNY_F15) presenting the discrimination of debris vs microbial cells and subsequent evaluation of yeast vs bacterial cells; the percentages of the discriminated sub-populations are shown under the histograms (B).

Figure 2. Concentrations of Sugars in Mead Samples During Production Process.

A)Glucose; B)Fructose

Sample type: ANS-acacia and spontaneous fermentation; ANY- acacia and yeast-inoculated fermentation; TNS- tilia and spontaneous fermentation; TNY- tilia and yeast-inoculated fermentation. Production point: F1- 1st day of fermentation; F30- 30th day of fermentation, M12- 12th month of maturation

Figure 3. Changes in the Intensity of the Potential Odorants Chemical Groups in Mead Samples.

Intensities are presented as the mean value of peak areas of triplicates in mead samples grouped by the potential odorants chemical group in two fermentation types: A) spontaneous

fermentation; B) yeast-inoculated fermentation. Production point: F1, F5, F10, F15, F30- 1st, 5th, 10th, 15th, 30th day of fermentation; M3, M6, M9, M12- 3rd, 6th, 9th, 12th month of maturation.

Figure 4. Changes in the Intensity of the Potential Odorants Odor Groups in Mead Samples.

Intensities are presented as the mean value of peak areas of triplicates in mead samples grouped by the potential odorants odor group in two fermentation types: A) spontaneous fermentation; B) yeast-inoculated fermentation. Production point: F1, F5, F10, F15, F30- 1st, 5th, 10th, 15th, 30th day of fermentation; M3, M6, M9, M12- 3rd, 6th, 9th, 12th month of maturation.

Figure 5. Quantitative Olfactory Profile Analysis of Four Mead Varieties.

Sample type: ANS-acacia and spontaneous fermentation; ANY- acacia and yeast-inoculated fermentation; TNS- tilia and spontaneous fermentation; TNY- tilia and yeast-inoculated fermentation.

Figure 6. Changes in the Microbial Content in Mead Samples Divided by Fermentation Type. A)Spontaneous Fermentation; B)Yeast-inoculated Fermentation.

Sample type: ANS-acacia and spontaneous fermentation; ANY- acacia and yeast-inoculated fermentation; TNS- tilia and spontaneous fermentation; TNY- tilia and yeast-inoculated fermentation. Production point: F1, F5, F10, F15, F30- 1st, 5th, 10th, 15th, 30th day of fermentation; M3, M6, M9, M12- 3rd, 6th, 9th, 12th month of maturation.

Figure 7. Differences in Volatile Compound Profiles by Fermentation Type.

Results of the differentiation of fermentation type of mead by volatile compound profiles. A) Biplot from Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA). B) Variable Importance in Projection (VIP) scores.

Figure 8. Correlations Between Odor-active Compounds Concentrations and Microbial Activity.

The results of correlation analysis between the important odor-active compounds concentration and microbial activity obtained using Pearson correlation coefficient test.

Malgorzata Majcher
Faculty of Food Science,
Poznań University of Life Sciences,
Wojska Polskiego 31,
60-624 Poznań, Poland

November 17th of March

Dear Editor-in-Chief,

We wish to submit a new manuscript entitled “Fermentation Strategies in Mead Production: A Multitechnique Volatilomic Approach to Aroma Characterization” for consideration by the Food Chemistry Journal.

We confirm that this work is original and has not been published elsewhere nor is it currently under consideration for publication elsewhere.

Our study focuses on understanding the biochemical and microbial mechanisms behind differences in mead produced through spontaneous fermentation versus yeast inoculation. Through a comprehensive experimental design, we analyzed mead samples at multiple production stages using untargeted volatilomics, quantification of odor-active compounds, and flow cytometry combined with statistical analysis. This research enabled us to establish correlations between microbial dynamics and the formation of key aroma compounds, leading to novel insights into mead’s sensory profile development. Notably, this study is the first to integrate microbial enumeration using flow cytometry with volatilomic analysis across multiple fermentation and maturation stages, expanding our understanding of aroma transformations over time.

By leveraging advanced analytical methodologies, we have gained expertise in instrumental techniques such as HS-SPME-GCXGC-ToF-MS and flow cytometry, alongside strong data analysis skills. We believe that our study contributes significantly to the field of food chemistry and fermentation sciences by providing a deeper understanding of aroma development throughout the mead production process.

We believe this work will be of great interest to researchers and professionals working in the areas of fermentation science, flavor chemistry, and beverage production. Thank you for considering our manuscript, and we look forward to your feedback.

We hope that the manuscript will meet the standards of your journal.

Thank you for your consideration of this manuscript.

Sincerely,
Malgorzata Majcher

HIGHLIGHTS:

- Aroma profiles of spontaneous and yeast-inoculated fermentations were compared
- Untargeted and targeted analysis of VOCs and flow cytometry were combined
- Spontaneous fermentation produced a more complex and variable volatile profile
- yeast-inoculation exhibited greater consistency and reproducibility in the aroma

A

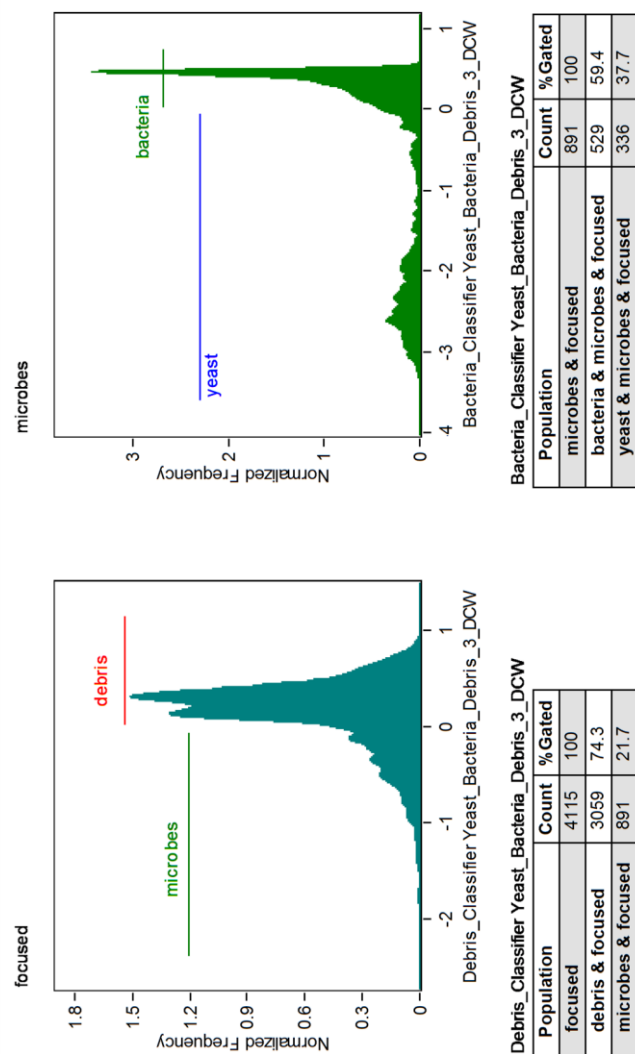
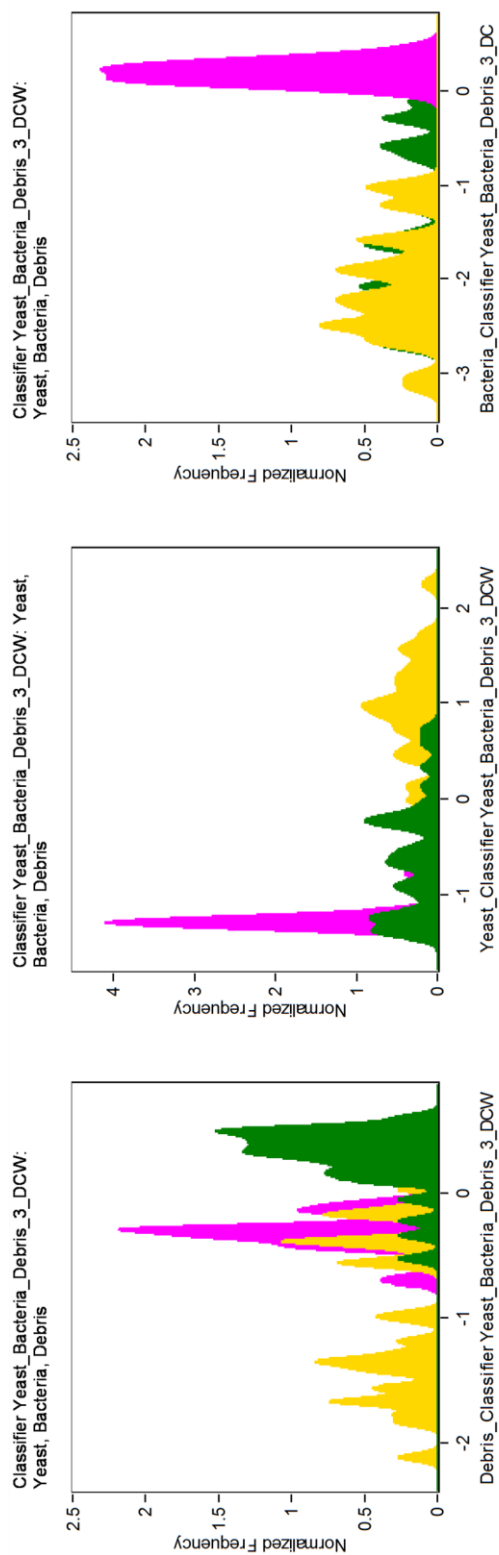


Figure 2

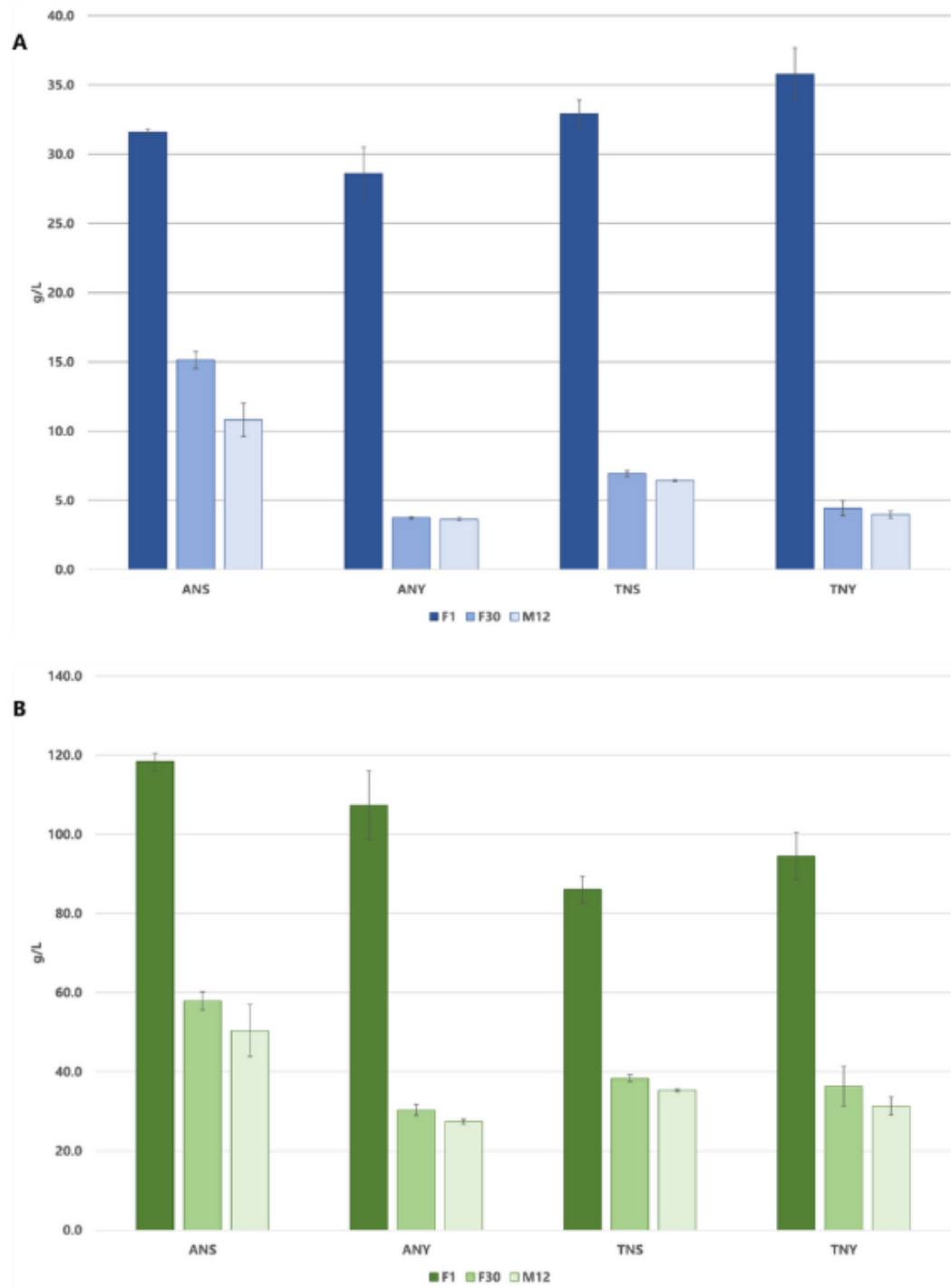


Figure 3

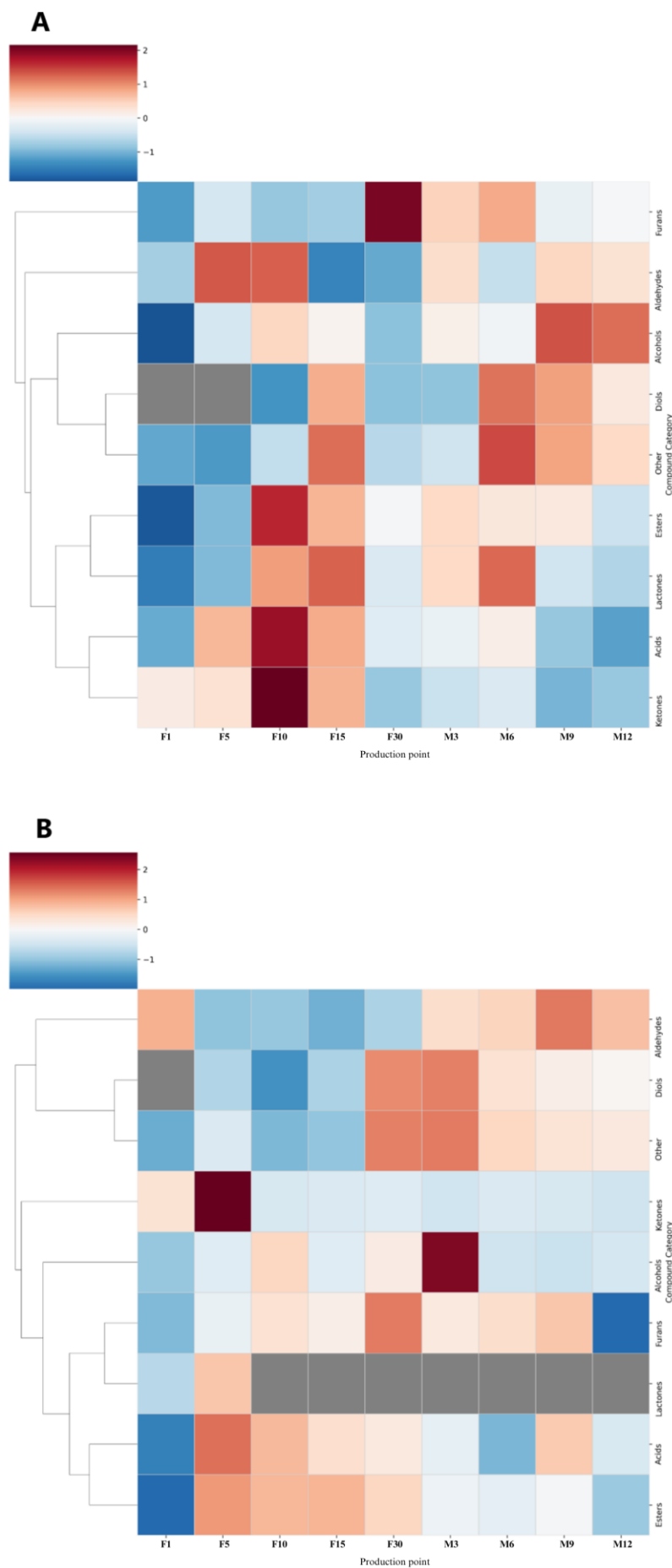


Figure 4

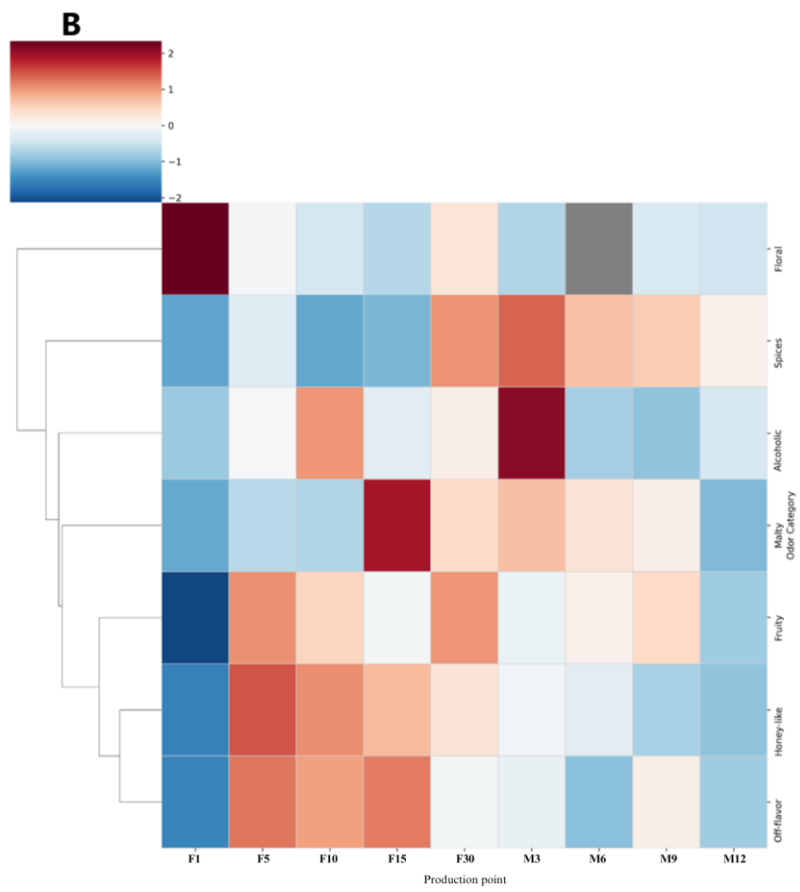
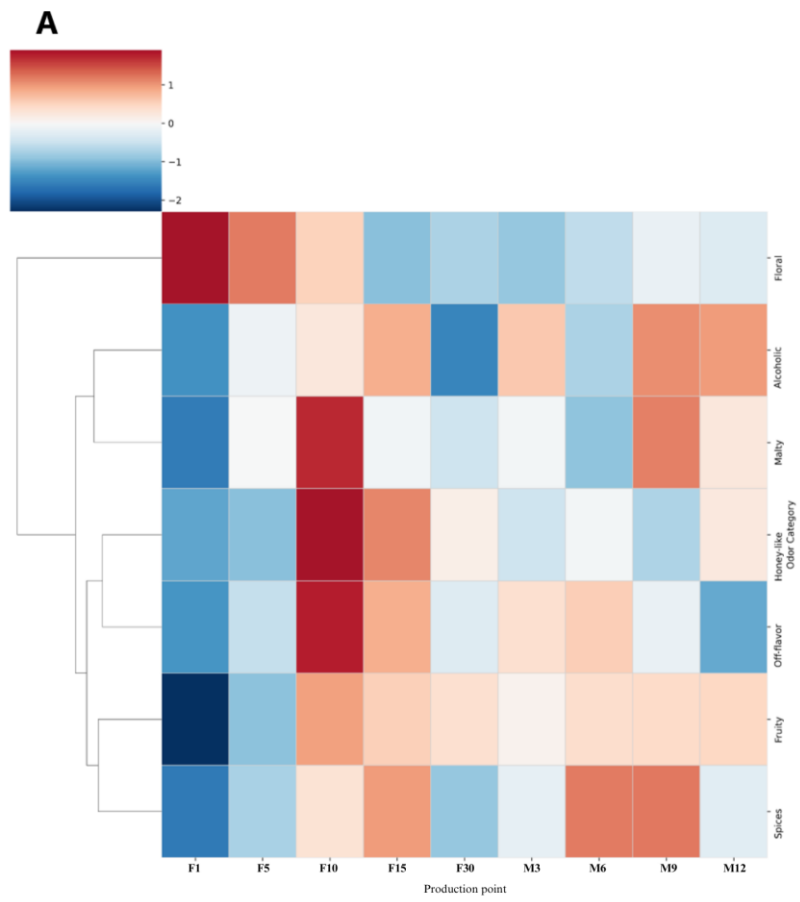


Figure 5



Figure 6

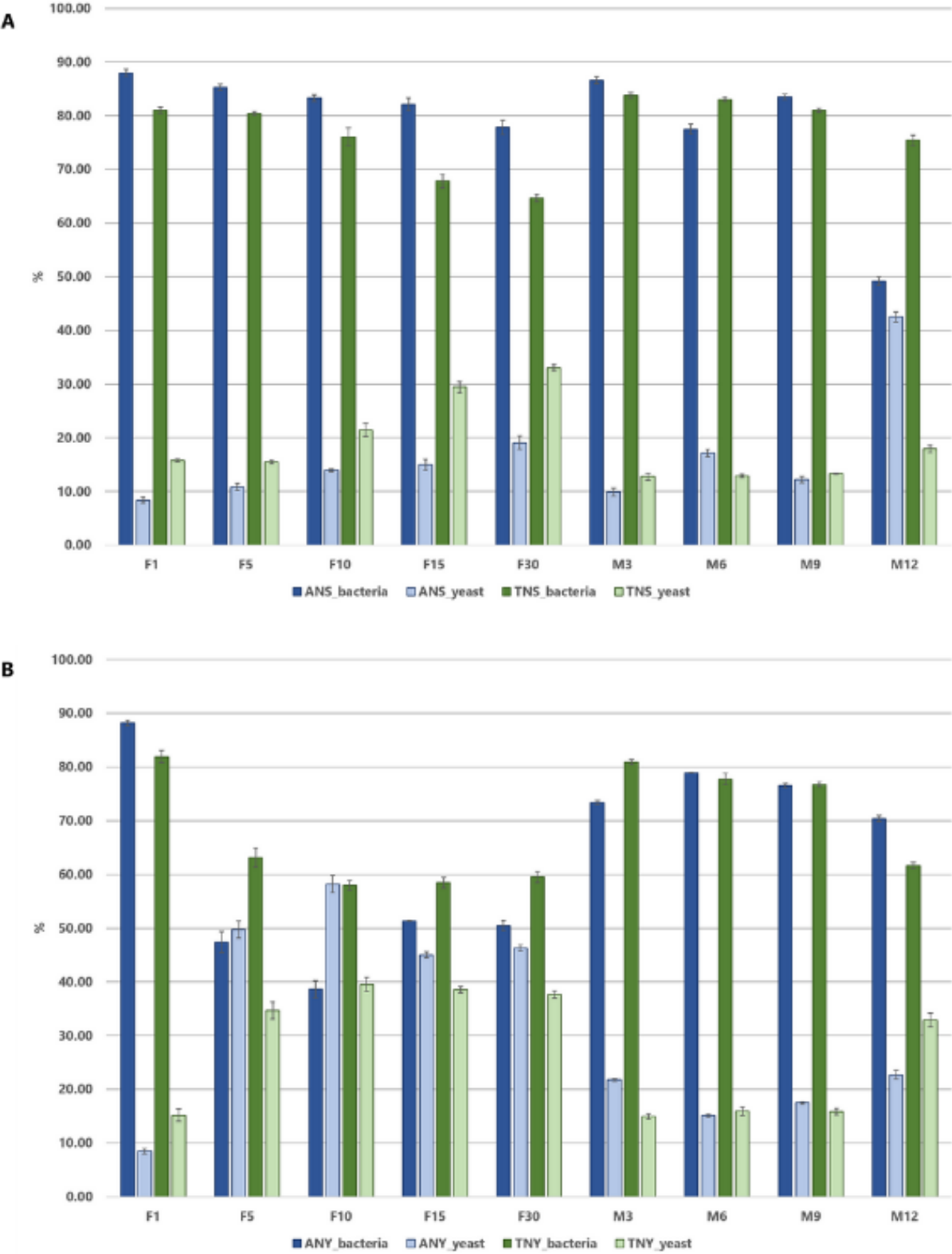


Figure 7

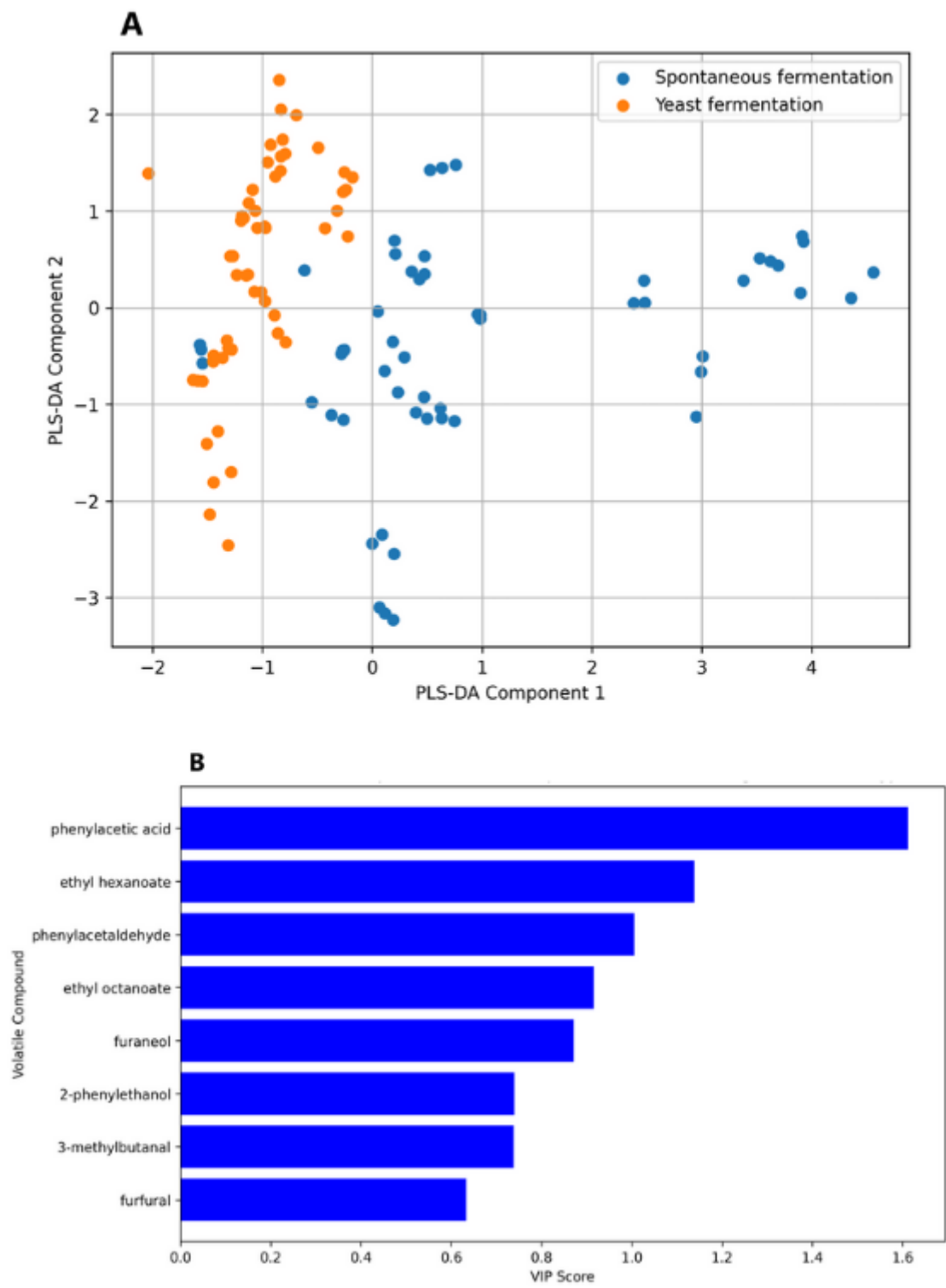
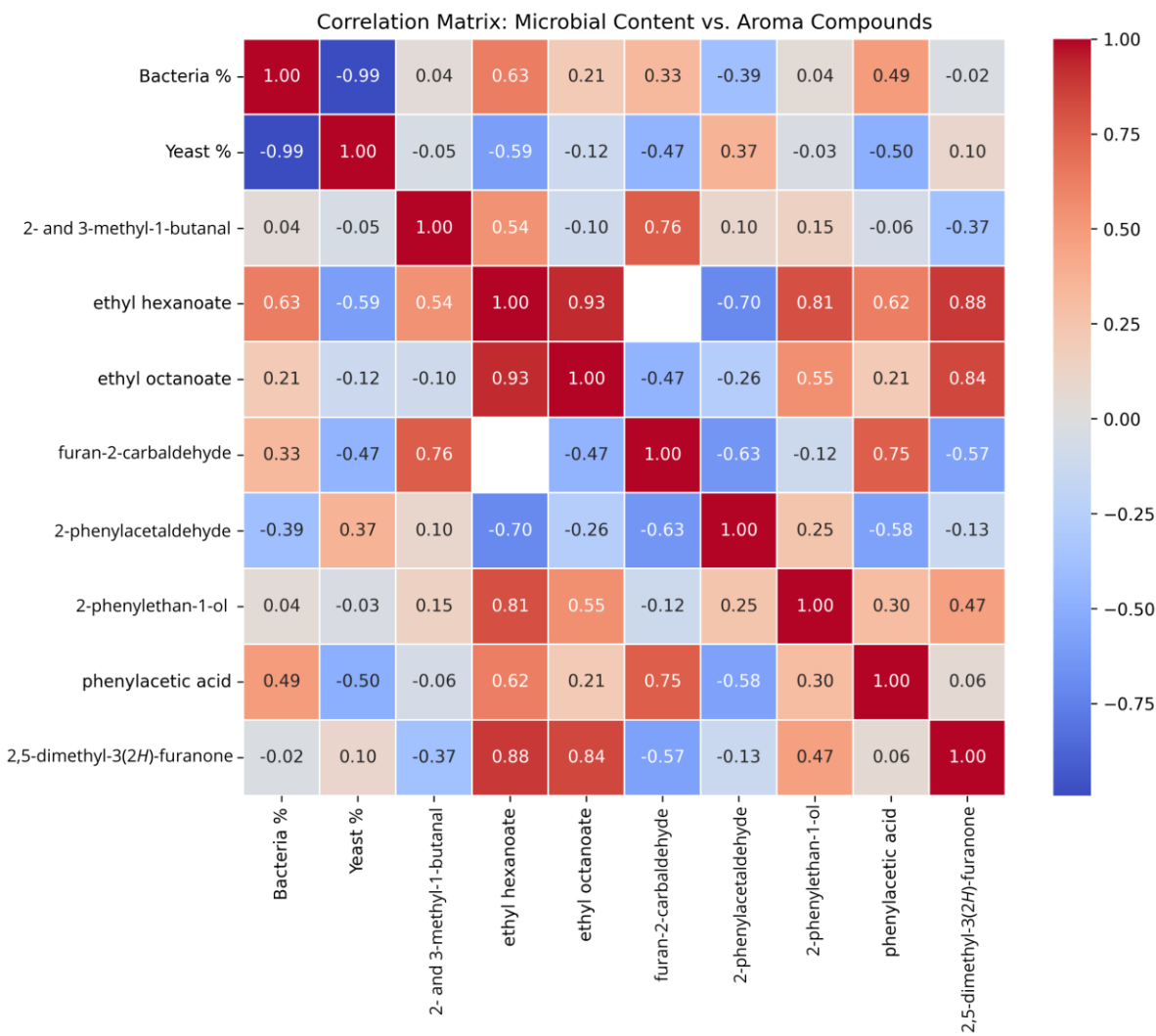


Figure 8



Fermentation Strategies in Mead Production: A Multitechnique Volatilomic Approach to Aroma Characterization

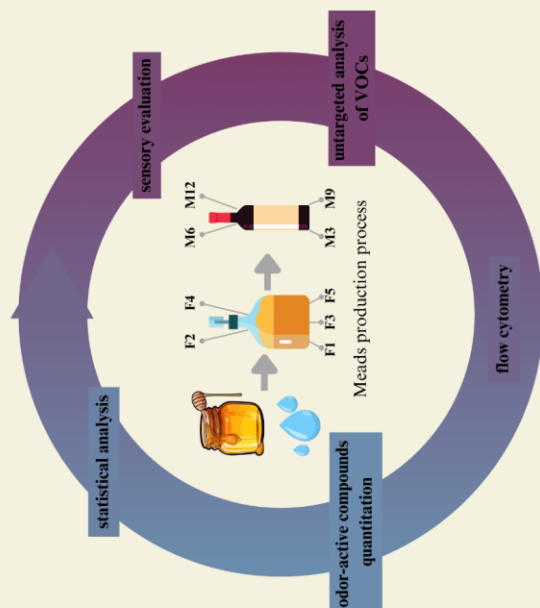
Background of the study



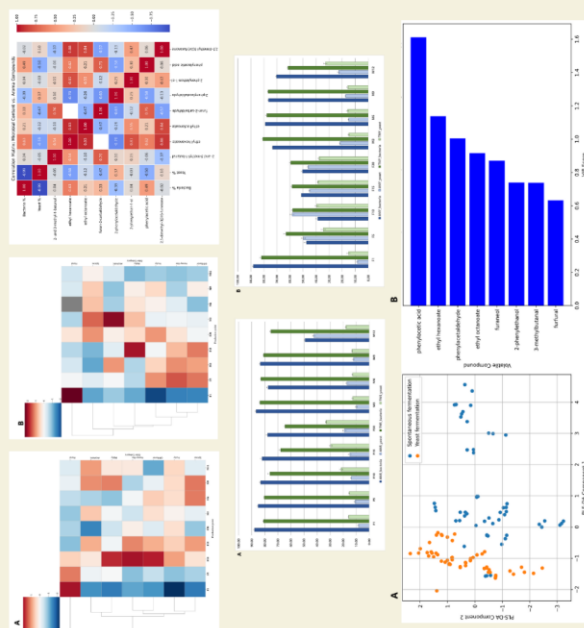
Differences in sensory evaluation

odor sensation intensity	spontaneous fermentation	yeast-inoculated fermentation
malty	←	→
honey	←	→
rum	←	→
yeasty	←	→
floral	←	→

Materials and methods



Results



Declaration of interests

☐The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

☒The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests:

Malgorzata Anna Majcher reports financial support was provided by National Science Centre Poland. If there are other authors, they declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.
--

Supplementary Material

Fermentation Strategies in Mead Production: A Multitechnique Volatilomic Approach to Aroma Characterization

Daria Cicha-Wojciechowicz^a, Anna Kaczmarek^a, Wojciech Juzwa^a, Natalia Drabińska^a,
Małgorzata Anna Majcher^a

*^aFaculty of Food Science and Nutrition, Poznań University of Life Sciences, Wojska Polskiego
31, 60-624 Poznań, Poland*

*Corresponding author: Małgorzata Anna Majcher, Faculty of Food Science and Nutrition,
Poznań University of Life Sciences, Wojska Polskiego 31, 60-624 Poznań, Poland, e-mail:
Malgorzata.majcher@up.poznan.pl*

Miscellaneous Chemicals and Materials. Dichloromethane, ethanol and sodium chloride were purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

GC-ToF-MS. A 7890B gas chromatograph (Agilent) was equipped with a CIS4 injector (Gerstel), and a GC capillary column SLB-5ms (30 m $\times$ 0.25 mm i.d., film thickness 0.25 μ m; Agilent). The carrier gas was helium at constant flow. The end of the column was connected to the MS interface (280 °C) of a Pegasus BT time-of-flight mass spectrometer (ToF-MS) (LECO, Mönchengladbach, Germany). Mass spectra were generated in the EI mode at 70 eV, in a range of 33–333 m/z , at a rate of 50 spectra/s. The oven temperature program was 40 °C (2 min), then 9 °C/min to 280 °C (4 min). LECO ChromaTOF software was used for data analysis.

GC-GC-MS (Pegasus 4D) System. A 6890 gas chromatograph (Agilent) was equipped with a GC sampler 80 autosampler (Agilent) and a GC capillary column SPB-5 (30 m $\times$ 0.25 mm i.d., film thickness 0.25 μ m; Agilent). The end of the column was connected to a second column, which was an SPB-50 (0.8 m $\times$ 0.25 mm i.d., film thickness 0.25 μ m; Agilent). The carrier gas was helium at 0.8 mL/min constant flow. At the beginning of the second column, a liquid nitrogen-cooled thermal modulator was used to collect the volatiles eluted from the first column in discrete portions (4 s) which were subsequently separated on the second column. The end of the second column was connected to the MS interface (250 °C) of a Pegasus 4D (LECO) time-of-flight mass spectrometer (ToF-MS) (LECO). Mass spectra were generated in the EI mode at 70 eV, in a range of 33–450 m/z , at a rate of 150 spectra/s. The oven temperature program was 40 °C (1 min), then 6 °C/min to 200 °C, then 25 °C/min to 250 °C (15 min) for the first oven. The second oven was heated with an offset of +5 °C to the first oven, and its temperature program was 70 °C (1 min), then 6 °C/min to 230 °C, then 25 °C to 250 °C (15 min). Data were collected using the LECO ChromaTOF v.4.44 software.

Table S1. Experimental Data of Quantitation of Primary Metabolites (Calibration Lines Equations, R²).

metabolite	calibration line equation*	R ²
glucose	y=0.5938x+0.3005	0.9935
fructose	y=1.4247x-0.8662	0.9805
glycerol	y=3.6392x-1.4583	0.9984
<i>mio</i> -inositol	y=2.4652x-0.0488	0.9999

*y=peak area standard / peak area analyte; x=concentration standard (µg/mL) / concentration analyte (µg/mL).

Table S2. Individual Parameters and Their Specific Weight Specifying the Discrimination Power Used for Creation of the ‘Super Parameter’.

Debris	
Feature	Weight (%)
H Homogeneity Mean_M01_BF_5	7.72
H Entropy Mean_M01_BF_1	7.71
Shape Ratio_Object(M09,Ch09,Tight)	-7.57
Aspect Ratio Intensity_Skeleton(Morphology(M02,Syto9),Syto9,Thin)_Syto9	-7.05
Mean Pixel_Threshold(M01,BF,30%)_BF	-6.91
H Energy Mean_M02_Syto9_1	-6.73
Aspect Ratio_Skeleton(Morphology(M02,Syto9),Syto9,Thin)	-6.71
Mean Pixel_Threshold(M02,Syto9,30%)_Syto9	-6.32
H Correlation Mean_M01_BF_5	6.29
Max Pixel_Skeleton(Morphology(M02,Syto9),Syto9,Thin)_Syto9	-6.21
Aspect Ratio Intensity_Skeleton(M02,Syto9,Thin)_Syto9	-6.18
Max Pixel_Skeleton(Object(M02,Syto9,Tight),Syto9,Thin)_Syto9	-6.18
H Energy Std_M02_Syto9_1	-6.15
Std Dev_Morphology(M02,Syto9)_Syto9	-6.14
Max Pixel_Skeleton(M02,Syto9,Thin)_Syto9	-6.13
Bacteria	
Feature	Weight (%)
H Entropy Mean_M09_Ch09_5	-18.98
H Entropy Mean_M01_BF_5	-17.64
H Entropy Mean_M09_Ch09_3	-16.71
H Entropy Mean_M01_BF_3	-16.14
H Homogeneity Mean_M06_SSC_5	-15.5
H Entropy Mean_M06_SSC_5	-15.04
Yeast	
Feature	Weight (%)
Mean Pixel_Threshold(M02,Syto9,30%)_Syto9	1.6
Max Pixel_Skeleton(Morphology(M02,Syto9),Syto9,Thin)_Syto9	1.57

Max Pixel_Skeleton(Object(M02,Syto9,Tight),Syto9,Thin)_Syto9	1.56
Mean Pixel_M02_Syto9	1.54
Std Dev_M02_Syto9	1.51
Max Pixel_Skeleton(M02,Syto9,Thin)_Syto9	1.49
Modulation_M02_Syto9	1.47
Std Dev_Morphology(M02,Syto9)_Syto9	1.47
Std Dev_Object(M02,Syto9,Tight)_Syto9	1.46
Max Pixel_MC_Syto9	1.41
Raw Max Pixel_MC_Syto9	1.41
Mean Pixel_Morphology(M02,Syto9)_Syto9	1.41
Mean Pixel_Skeleton(Morphology(M02,Syto9),Syto9,Thin)_Syto9	1.4
Mean Pixel_Object(M02,Syto9,Tight)_Syto9	1.39
Modulation_M06_SSC	1.35
Mean Pixel_Skeleton(Object(M02,Syto9,Tight),Syto9,Thin)_Syto9	1.34
Modulation_Morphology(M06,SSC)_SSC	1.29
Modulation_Object(M01,BF,Tight)_BF	1.26
Mean Pixel_Skeleton(M02,Syto9,Thin)_Syto9	1.25
Modulation_Object(M02,Syto9,Tight)_Syto9	1.23
Gradient Max_M06_SSC	1.23
Intensity_Skeleton(M02,Syto9,Thin)_Syto9	1.23
Modulation_M01_BF	1.22
Modulation_Morphology(M01,BF)_BF	1.22
Min Pixel_Skeleton(Morphology(M02,Syto9),Syto9,Thin)_Syto9	1.21
Gradient RMS_M06_SSC	1.21
Intensity_Skeleton(Morphology(M02,Syto9),Syto9,Thin)_Syto9	1.17
Lobe Count_Skeleton(M06,SSC,Thin)_SSC	1.17
Intensity_Skeleton(Object(M02,Syto9,Tight),Syto9,Thin)_Syto9	1.13
Modulation_Object(M06,SSC,Tight)_SSC	1.13
H Entropy Mean_M06_SSC_3	1.13
Lobe Count_Skeleton(Object(M06,SSC,Tight),SSC,Thick)_SSC	1.12
Thickness Max_Object(M02,Syto9,Tight)	1.12
Std Dev_Object(M01,BF,Tight)_BF	1.09
Mean Pixel_Threshold(M01,BF,30%)_BF	1.09
Raw Max Pixel_MC_BF	1.08
Width_M06	1.08
Bright Detail Intensity R3_MC_Syto9 + Gradient RMS_M02_Syto9	1.08
Max Pixel_MC_BF	1.08
Bright Detail Intensity R3_MC_Syto9	1.08
H Correlation Mean_M06_SSC_1	1.07
Lobe Count_Skeleton(Morphology(M06,SSC),SSC,Thin)_SSC	1.07
H Entropy Mean_M06_SSC_1	1.07
Min Pixel_Skeleton(Object(M02,Syto9,Tight),Syto9,Thin)_Syto9	1.07
H Correlation Mean_M01_BF_1	1.07
Lobe Count_Skeleton(Object(M06,SSC,Tight),SSC,Thin)_SSC	1.05
Diameter_M06	1.05
Minor Axis_M06	1.05
H Entropy Mean_M06_SSC_5	1.04
Max Pixel_Valley(Morphology(M01,BF),BF,3)_BF	1.04
Max Pixel_Valley(M01,BF,3)_BF	1.04
Compactness_Morphology(M06,SSC)_SSC	1.04
Lobe Count_Skeleton(M06,SSC,Thick)_SSC	1.04
Elongatedness_Object(M06,SSC,Tight)	1.03
Max Pixel_Valley(Object(M01,BF,Tight),BF,3)_BF	1.03
H Entropy Mean_M09_Ch09_3	1.02
Minor Axis_Object(M02,Syto9,Tight)	1.02
H Correlation Std_M01_BF_1	-1.02
Std Dev_Morphology(M01,BF)_BF	1.01
Symmetry 2_Skeleton(Object(M06,SSC,Tight),SSC,Thin)_SSC	1.01

Std Dev_M01_BF	1.01
Perimeter_M06	1
Modulation_M09_Ch09	1
H Homogeneity Std_M01_BF_1	-1
Width_Object(M02,Syto9,Tight)	1
Modulation_Morphology(M09,Ch09)_Ch09	1
H Correlation Std_M01_BF_3	-0.99
Symmetry 2_Skeleton(M06,SSC,Thin)_SSC	0.99
Std Dev_M09_Ch09	0.99
Modulation_Object(M09,Ch09,Tight)_Ch09	0.99
Std Dev_Morphology(M09,Ch09)_Ch09	0.99
Symmetry 2_Skeleton(Object(M06,SSC,Tight),SSC,Thick)_SSC	0.98
Thickness Max_Object(M09,Ch09,Tight)	0.98
H Homogeneity Std_M01_BF_3	-0.98
Std Dev_Object(M09,Ch09,Tight)_Ch09	0.97
Gradient RMS_M01_BF	-0.97
Max Pixel_Valley(Object(M02,Syto9,Tight),Syto9,3)_Syto9	0.97
Min Pixel_Skeleton(M02,Syto9,Thin)_Syto9	0.95
H Entropy Std_M06_SSC_7	0.94
Min Pixel_Valley(M09,Ch09,3)_Ch09	-0.92
Perimeter_Object(M06,SSC,Tight)	0.92
Raw Min Pixel_MC_Ch09	-0.92
Thickness Max_M06	0.92
H Entropy Mean_M09_Ch09_5	0.92
Min Pixel_Valley(Morphology(M09,Ch09),Ch09,3)_Ch09	-0.92
H Contrast Std_M09_Ch09_1	-0.91
Lobe Count_Object(M06,SSC,Tight)_SSC	0.91
Major Axis_Object(M06,SSC,Tight)	0.91
Lobe Count_Morphology(M06,SSC)_SSC	0.91

Table S3. Experimental Data of Quantitation With Internal Standard (Quantifier Ions, Calibration Lines)

odorant	isotopically substituted standard	quantifier ions (m/z)		calibration line equation*	R ²
		analyte	standard		
2- and 3-methyl-1-butanol	(² H ₈)-naphthalene	44	136	y=68.855x+0.3013	0.9895
ethyl hexanoate	(² H ₈)-naphthalene	99	136	y=11.994x+0.3098	0.9904
ethyl octanoate	(² H ₈)-naphthalene	127	136	y=29.154x+0.0472	0.9977
furan-2-carbaldehyde	(² H ₈)-naphthalene	96	136	y=26.23x+0.0029	0.9945
2-phenylacetaldehyde	(² H ₈)-naphthalene	91	136	y=278x+0.3964	0.9806
2-phenylethan-1-ol	(² H ₈)-naphthalene	122	136	y=2129.1x-0.0055	0.9978
2,5-dimethyl-3(2H)-furanone	(² H ₈)-naphthalene	43	136	y=57753x+23.18	0.9896
phenylacetic acid	(² H ₈)-naphthalene	91	136	y=17828x-2.7962	0.9918

(*)y=peak area standard / peak area analyte; x=concentration standard (μg/mL) / concentration analyte (μg/mL).

Table S4. pH and Brix Degrees of Meads During Production Process.

sample	pH			Brix (°)		
	F1**	F30	M12	F1	F30	M12
ANS*	3.97	3.77	3.69	33	25.5	24.0
ANY	3.94	3.67	3.74	33	18.5	18.5
TNS	4.00	3.92	3.72	33	19.0	19.0
TNY	4.02	3.91	3.73	33	16.5	16.5

*Sample type: ANS-acacia and spontaneous fermentation; ANY- acacia and yeast-inoculated fermentation; TNS- tilia and spontaneous fermentation; TNY- tilia and yeast-inoculated fermentation; ** Production point: F1- 1st day of fermentation; F30- 30th day of fermentation, M12- 12th month of maturation.

Table S5. Concentration of *Mio*-inositol and Glycerol in Mead Samples.

sample	<i>mio</i> -inosytl (g/L)*			glycerol (g/L)*		
	F1***	F30	M12	F1	F30	M12
ANS**	nd	0.0173 ± 0.00478	0.00367 ± 0.000125	nd	6.87 ± 0.386	7.94 ± 1.36
ANY	nd	nd	0.00900 ± 0.000712	nd	12.7 ± 0.303	11.5 ± 0.458
TNS	nd	0.323 ± 0.0222	0.270 ± 0.0159	nd	17.3 ± 0.231	15.7 ± 0.245
TNY	nd	0.361 ± 0.0669	0.283 ± 0.0319	nd	16.8 ± 2.75	13.8 ± 1.16

*All concentrations are presented as mean value ± standard deviation. **Sample type: ANS-acacia and spontaneous fermentation; ANY- acacia and yeast-inoculated fermentation; TNS-tilia and spontaneous fermentation; TNY- tilia and yeast-inoculated fermentation; ***Production point: F1- 1st day of fermentation; F30- 30th day of fermentation, M12- 12th month of maturation.

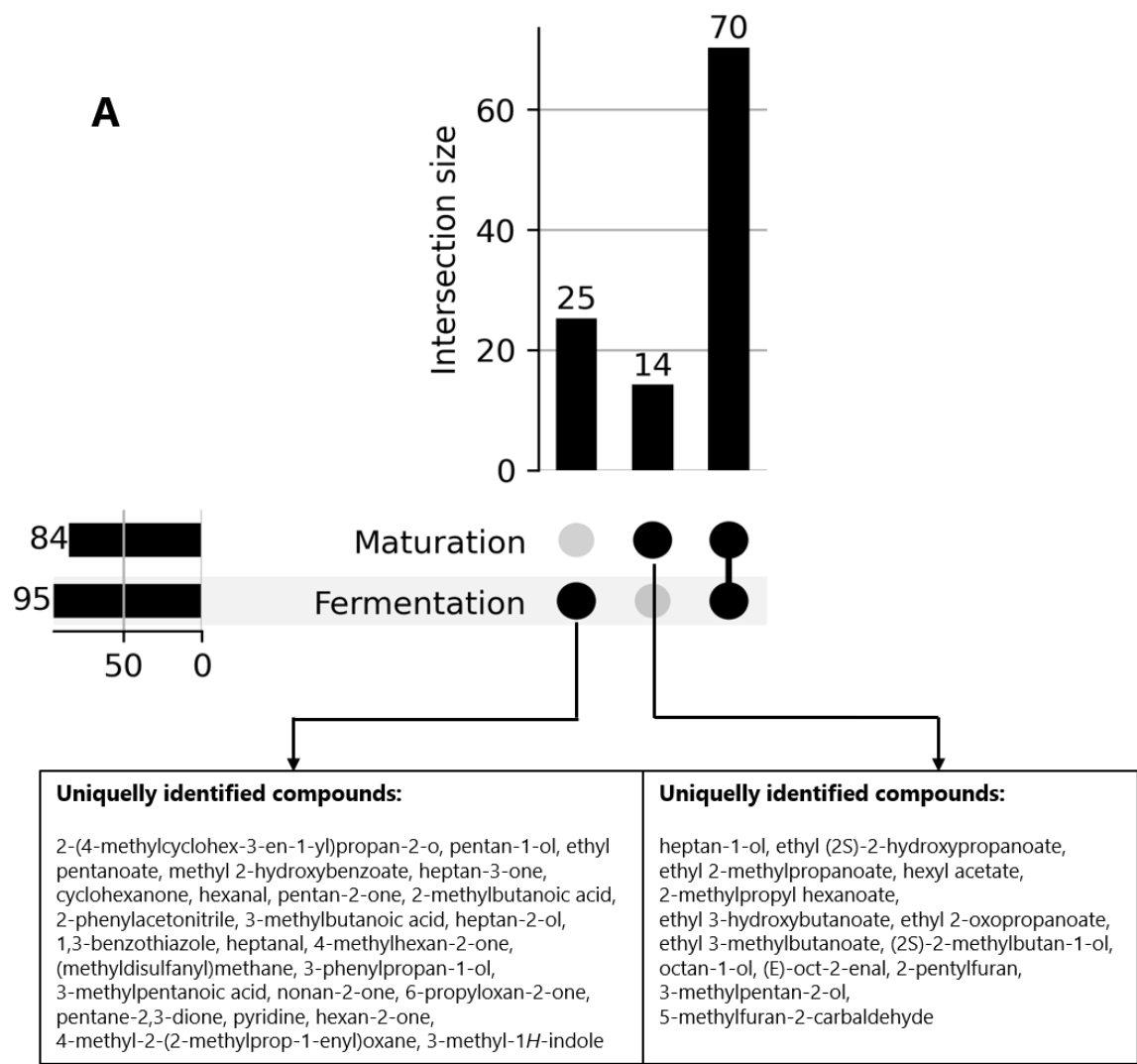
Table S6. List of the Potential Odorants Tentatively Identified in Mead Samples by Untargeted HS-SPME-GCxGC-MS Analysis.

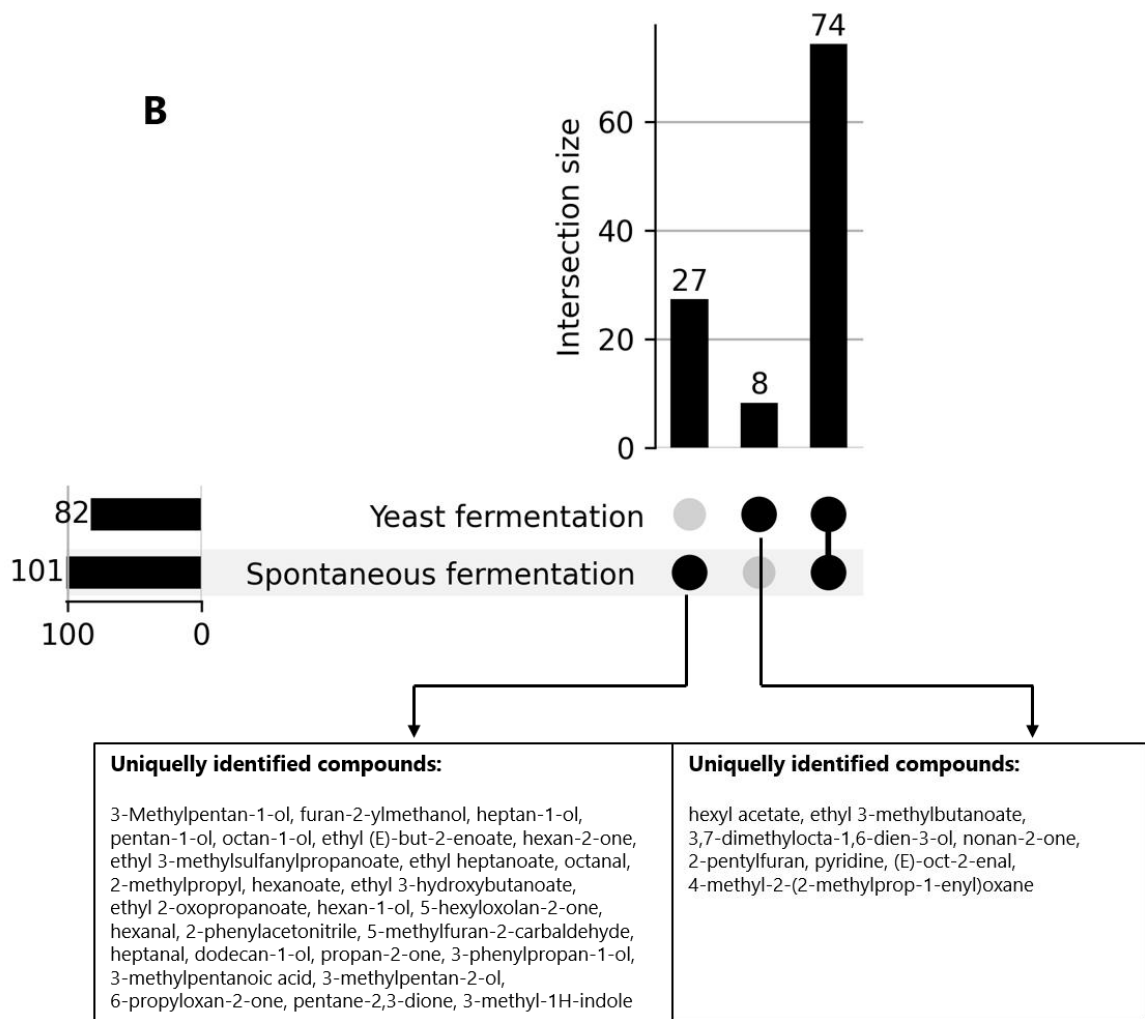
No.	Compound name	CAS number	odor
1	Acetic acid	64-19-7	vinegar-like
2	Hexanoic acid	142-62-1	sweaty
3	Octanoic Acid	124-07-2	carrot-like, musty
4	Decanoic acid	334-48-5	soapy, musty
5	Pentanoic acid	109-52-4	sweaty, fruity
6	Nonanoic acid	112-05-0	moldy, pungent
7	Butanoic acid	107-92-6	sweaty
8	Ethanol	64-17-5	ethanolic
9	2-Phenylethan-1-ol	60-12-8	floral, honey-like
10	Benzyl alcohol	100-51-6	bitter almond-like, fruity
11	2-Methylpropan-1-ol	78-83-1	malty
12	3-Methylbutan-1-ol	123-51-3	malty
13	1-Octen-3-ol	3391-86-4	mushroom-like
14	1-Butanol	71-36-3	malty, solvent-like
15	2-(4-methylcyclohex-3-en-1-yl)propan-2-ol	98-55-5	floral, citrus-like
16	3-Methylpentan-1-ol	589-35-5	fruity
17	furan-2-ylmethanol	98-00-0	cooked ham-like, sweaty
18	heptan-1-ol	111-70-6	fruity, soapy
19	pentan-1-ol	71-41-0	fruity, ethereal
20	octan-1-ol	111-87-5	soapy, citrus-like, green
21	Benzaldehyde	100-52-7	bitter almond-like, marzipan-like
22	2-phenylacetaldehyde	122-78-1	floral, honey-like
23	Acetaldehyde	75-07-0	fresh, green
24	ethyl decanoate	110-38-3	soapy, pear-like
25	ethyl butanoate	105-54-4	fruity
26	2-phenylethyl acetate	103-45-7	honey-like, floral
27	ethyl propanoate	105-37-3	fruity, glue-like
28	pentyl acetate	628-63-7	fruity
29	ethyl 2-phenylacetate	101-97-3	beeswax-like
30	2-methylpropyl acetate	110-19-0	fruity
31	ethyl hexanoate	123-66-0	fruity, pineapple-like
32	ethyl benzoate	93-89-0	starfruit-like
33	ethyl nonanoate	123-29-5	fruity
34	methyl benzoate	93-58-3	starfruit-like, sweet
35	methyl 2-aminobenzoate	134-20-3	sweet
36	ethyl octanoate	106-32-1	fruity, green
37	ethyl 2-hydroxypropanoate	97-64-3	fruity
38	methyl hexanoate	106-70-7	fruity, musty
39	ethyl 3-phenylpropanoate	2021-28-5	cinnamon-like, fruity
40	methyl decanoate	110-42-9	sweaty, soapy
41	ethyl (E)-but-2-enoate	623-70-1	fruity
42	ethyl (2S)-2-hydroxypropanoate	687-47-8	fruity
43	methyl octanoate	111-11-5	fruity, musty
44	ethyl 3-methylsulfanylpropanoate	13327-56-5	sulfuric, fruity
45	ethyl 2-methylpropanoate	97-62-1	fruity

46	hexyl acetate	142-92-7	fruity, pear-like
47	ethyl heptanoate	106-30-9	fruity
48	ethyl pentanoate	539-82-2	fruity
49	2-methylpropyl hexanoate	105-79-3	fruity
50	ethyl 3-hydroxybutanoate	5405-41-4	fruity
51	ethyl 2-oxopropanoate	617-35-6	fruity
52	ethyl 3-methylbutanoate	108-64-5	fruity, blueberry-like
53	1-phenylethanone	98-86-2	foxy, bitter almond-like, rubber-like
54	methoxymethane	115-10-6	ethereal
55	oxolan-2-one	96-48-0	sweet
56	butane-2,3-diol	513-85-9	butter-like, sweet
57	1-(furan-2-yl)ethanone	1192-62-7	smoky
58	2-ethylhexan-1-ol	104-76-7	ethereal, fruity
56	furan-2-carbaldehyde	98-01-1	marzipan-like, oats-like
60	ethyl acetate	141-78-6	solvent-like
61	1-methyl-4-prop-1-en-2-ylbenzene	1195-32-0	terpene-like
62	3-methylbutyl acetate	123-92-2	banana-like, fruity
63	butan-2-yl acetate	105-46-4	fruity
64	4-ethenyl-2-methoxyphenol	7786-61-0	smoky, clove-like
65	Octanal	124-13-0	citrus-like, green
66	3-hydroxybutan-2-one	513-86-0	butter-like, carrot-like
67	5-butyloxolan-2-one	104-50-7	coconut-like
68	propan-1-ol	71-23-8	pungent, fruity
69	(<i>E</i>)-1-(2,6,6-trimethylcyclohexa-1,3-dien-1-yl)but-2-en-1-one	23726-93-4	cooked apple-like
70	hexan-1-ol	111-27-3	grassy, marzipan-like
71	2-methyl-5-propan-2-ylphenol	499-75-2	phenolic, leather-like
72	1,1-diethoxyethane	105-57-7	fruity
73	5-hexyloxolan-2-one	706-14-9	peach-like, coconut-like
74	2-methylthiolan-3-one	13679-85-1	sulfuric, garlic-like
75	Toluene	108-88-3	chemical-like
76	Nonanal	124-19-6	citrus-like, soapy
77	(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-1,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-ol	124-76-5	earthy, moldy
78	methyl 2-hydroxybenzoate	119-36-8	fatty, tallowy, terpene-like
79	heptan-3-one	106-35-4	fruity, ethereal
80	cyclohexanone	108-94-1	bitter almond-like, pungent
81	4-methoxybenzaldehyde	123-11-5	woodruff-like, aniseed-like
82	Hexanal	66-25-1	green, grassy
83	pentan-2-one	107-87-9	fruity, banana-like
84	3,7-dimethylocta-1,6-dien-3-ol	78-70-6	citrus-like, floral
85	5-ethyloxolan-2-one	695-06-7	coconut-like, fruity
86	2-methylbutanoic acid	116-53-0	malty, fruity, sweaty
87	(2 <i>S</i>)-2-methylbutan-1-ol	1565-80-6	malty, solvent-like
88	2-phenylacetonitrile	140-29-4	mushroom-like
89	5-methylfuran-2-carbaldehyde	620-02-0	sweet, bitter almond-like
90	3-methylbutanoic acid	503-74-2	sweaty
91	heptan-2-ol	543-49-7	coconut-like, dill-like
92	1,3-benzothiazole	95-16-9	rubber-like, cabbage-like
93	Heptanal	111-71-7	citrus-like, fatty
94	4-methylhexan-2-one	105-42-0	ethereal, bitter almond-like
95	(methyldisulfanyl)methane	624-92-0	cabbage-like, sulfuric

96	dodecan-1-ol	112-53-8	soapy
97	propan-2-one	67-64-1	solvent-like, pungent
98	3-phenylpropan-1-ol	122-97-4	floral, sweet
99	3-methylpentanoic acid	105-43-1	cheesy, sweet
100	nonan-2-one	821-55-6	fruity, musty
101	2-pentylfuran	3777-69-3	vegetable-like
102	3-methylpentan-2-ol	565-60-6	ethereal
103	6-propyloxan-2-one	698-76-0	coconut-like
104	pentane-2,3-dione	600-14-6	butter-like
105	pyridine	110-86-1	unpleasant
106	4-methyl-2-(2-methylprop-1-enyl)oxane	16409-43-1	floral
107	(<i>E</i>)-oct-2-enal	2548-87-0	fatty, nutty
108	3-methyl-1 <i>H</i> -indole	83-34-1	fecal, mothball-like
109	hexan-2-one	591-78-6	fuel-like, fruity

Figure S7. Relationships Between Categorical Variables and Their Co-occurrences.





UpSet plots demonstrates number of potential odorants found in meads samples grouped by:

A) production step; B) fermentation type.

Table S8. Concentration of the Odor-active Compounds in Meads During the Production Process.

odorant	Odor-active compounds concentrations (mg/L)*								
	ANS**								
	F1***	F5	F10	F15	F30	M3	M6	M9	M12
2- and 3-methyl-1-butanal	0.000832	0.00107	0.00132	0.00212	0.00247	0.00233	0.00227	0.00189	0.00173
ethyl hexanoate	nd****	nd	0.00897	0.0123	0.0127	0.0116	0.00875	0.00746	0.00520
ethyl octanoate	nd	nd	0.0291	0.0568	0.0668	0.0606	0.0339	0.00854	0.00309
furan2-carbaldehyde	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2-phenylacetaldehyde	0.0266	0.0294	0.0383	0.0451	0.0470	0.0491	0.0518	0.0649	0.0744
2-phenylethan-1-ol	0.102	0.130	3.55	7.33	9.96	8.71	6.03	4.81	4.19
phenylacetic acid	nd	0.769	1.54	1.56	1.57	1.47	1.38	1.31	1.10
2,5-dimethyl-3(2H)-furanone	1.54	1.71	2.19	2.77	2.92	2.65	2.24	1.02	0.351
	ANY								
2- and 3-methyl-1-butanal	0.000801	0.000918	0.00100	0.00105	0.00112	0.00157	0.00193	0.00241	0.00246
ethyl hexanoate	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
ethyl octanoate	nd	0.0158	0.0239	0.0325	0.0302	0.0210	0.00728	0.00142	0.000852
furan2-carbaldehyde	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2-phenylacetaldehyde	0.0648	0.0605	0.0606	0.0654	0.0735	0.0778	0.0755	0.0719	0.0693
2-phenylethan-1-ol	nd	0.132	2.45	3.84	5.00	4.46	3.82	3.55	3.27
phenylacetic acid	nd	nd	0.357	0.374	0.397	0.417	0.496	0.774	0.902
2,5-dimethyl-3(2H)-furanone	1.51	1.863	2.12	2.34	2.40	2.15	1.23	0.564	0.352
	TNS								
2- and 3-methyl-1-butanal	0.0150	0.0152	0.0159	0.0142	0.0127	0.0178	0.0197	0.0221	0.0218
ethyl hexanoate	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
ethyl octanoate	nd	0.0164	0.0393	0.0528	0.0653	0.0569	0.0420	0.0237	0.0138
furan2-carbaldehyde	0.121	0.0834	0.0437	0.0405	0.0282	0.240	0.492	0.586	0.617
2-phenylacetaldehyde	0.0594	0.0596	0.0632	0.0692	0.0715	0.0686	0.0609	0.0593	0.0560
2-phenylethan-1-ol	0.0904	0.109	2.55	6.65	10.59	8.91	6.24	3.53	2.99
phenylacetic acid	nd	0.685	0.842	0.666	0.678	0.672	0.834	1.00	1.22
2,5-dimethyl-3(2H)-furanone	1.07	1.19	1.49	2.05	2.64	2.37	1.99	0.914	0.334
	TNY								
2- and 3-methyl-1-butanal	0.0177	0.0204	0.0181	0.0157	0.0151	0.0170	0.0190	0.0247	0.0298
ethyl hexanoate	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
ethyl octanoate	nd	0.0128	0.0222	0.0307	0.0306	0.0205	0.0125	0.00714	0.00445
furan2-carbaldehyde	0.132	0.0550	0.0256	0.0178	0.0140	0.247	0.522	0.559	0.568
2-phenylacetaldehyde	0.0583	0.0616	0.0641	0.0661	0.0676	0.0659	0.0624	0.0563	0.0514
2-phenylethan-1-ol	nd	0.133	3.78	9.62	12.88	11.58	7.40	5.12	4.29
phenylacetic acid	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2,5-dimethyl-3(2H)-furanone	0.888	1.11	1.48	1.88	2.16	1.73	1.20	0.687	0.390

*Concentration (mg/L); mean of triplicates; standard deviations are given in the Supplementary Material (Table S9). **Sample type: ANS-acacia and spontaneous fermentation; ANY- acacia and yeast-inoculated fermentation; TNS- tilia and spontaneous fermentation; TNY- tilia and yeast-inoculated fermentation. *** Production point: F1, F5, F10, F15, F30- 1st, 5th, 10th, 15th, 30th day of fermentation; M3, M6, M9, M12- 3rd, 6th, 9th, 12th month of maturation. ****nd-not detected

Table S9. Standard Deviations of Odor-active Compounds Quantitation in Meads During the Production Process.

odorant	ANS*								
	F1**	F5	F10	F15	F30	M3	M6	M9	M12
2- and 3-methyl-1-butanal	7.31E-05	4.77E-05	7.23E-06	4.57E-04	1.83E-04	1.84E-04	1.08E-04	1.23E-04	5.55E-05
ethyl hexanoate	-	-	1.51E-03	9.63E-04	2.80E-04	9.20E-04	9.44E-04	6.71E-04	4.41E-04
ethyl octanoate	-	-	4.24E-03	4.09E-03	5.85E-04	5.79E-04	1.15E-03	5.35E-04	1.15E-04
furan2-carbaldehyde	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-phenylacetaldehyde	9.89E-05	2.62E-04	3.79E-04	4.10E-04	5.35E-04	1.25E-04	1.03E-03	3.17E-04	8.88E-03
2-phenylethan-1-ol	9.20E-03	3.38E-03	1.72E-01	3.24E-01	4.64E-02	1.03E-01	4.69E-01	5.31E-02	3.38E-01
phenylacetic acid	-	9.84E-02	1.87E-01	1.88E-01	1.97E-01	1.23E-02	1.49E-02	4.05E-02	4.92E-02
2,5-dimethyl-3(2H)-furanone	3.77E-02	4.53E-02	1.55E-01	1.13E-01	1.11E-01	1.05E-01	5.57E-02	8.95E-02	4.29E-02
	ANY								
2- and 3-methyl-1-butanal	9.46E-05	2.88E-05	1.58E-05	5.46E-05	3.20E-05	8.37E-05	6.13E-05	1.87E-04	1.23E-04
ethyl hexanoate	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ethyl octanoate	-	9.32E-05	1.43E-03	1.33E-03	2.16E-03	4.17E-04	1.57E-04	5.49E-05	5.54E-05
furan2-carbaldehyde	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-phenylacetaldehyde	1.12E-02	5.93E-04	1.37E-03	7.31E-04	6.45E-03	1.90E-03	4.19E-04	4.7E-04	3.26E-03
2-phenylethan-1-ol	-	5.88E-03	6.38E-02	1.11E-01	3.68E-01	1.64E-01	4.80E-02	5.60E-02	3.15E-01
phenylacetic acid	-	-	2.39E-02	7.79E-03	2.23E-02	2.24E-02	7.05E-03	2.59E-02	4.42E-02
2,5-dimethyl-3(2H)-furanone	5.43E-02	4.82E-02	1.79E-01	1.64E-01	5.95E-02	4.20E-02	2.05E-02	1.17E-02	4.76E-02
	TNS								
2- and 3-methyl-1-butanal	0.000926	0.000256	0.00163	0.00125	0.000178	0.000845	0.000543	0.0000753	0.000860
ethyl hexanoate	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ethyl octanoate	-	0.00137	0.00531	0.00296	0.0000864	0.00318	0.00168	0.000219	0.000735
furan2-carbaldehyde	0.0139	0.00114	0.00232	0.00102	0.00288	0.0118	0.00339	0.01321	0.02545
2-phenylacetaldehyde	0.000516	0.000421	0.00137	0.000963	0.000750	0.001933	0.000821	0.000746	0.000275
2-phenylethan-1-ol	0.0127	0.00170	0.154	0.206	0.0354	0.0942	0.0984	0.250	0.00307
phenylacetic acid	-	0.0851	0.126	0.120	0.0752	0.00900	0.0181	0.0634	0.0384
2,5-dimethyl-3(2H)-furanone	0.0101	0.00684	0.0156	0.00539	0.113	0.0784	0.0751	0.0598	0.0265
	TNY								
2- and 3-methyl-1-butanal	0.000431	0.000829	0.000252	0.000662	0.000667	0.0000429	0.000318	0.00232	0.00178
ethyl hexanoate	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ethyl octanoate	-	0.0000565	0.00130	0.000874	0.0000284	0.000775	0.000483	0.0000938	0.0000745
furan2-carbaldehyde	0.00550	0.00130	0.00114	0.000444	0.000357	0.0190	0.0158	0.00228	0.0708
2-phenylacetaldehyde	0.000996	0.00105	0.000767	0.00120	0.00103	0.000496	0.000421	0.00293	0.00215
2-phenylethan-1-ol	-	0.0138	0.124	0.293	1.98	0.291	0.215	0.129	0.576
phenylacetic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,5-dimethyl-3(2H)-furanone	0.00420	0.0104	0.00411	0.0210	0.0132	0.0166	0.0195	0.00502	0.0115

*Sample type: ANS-acacia and spontaneous fermentation; ANY- acacia and yeast-inoculated fermentation; TNS- tilia and spontaneous fermentation; TNY- tilia and yeast-inoculated fermentation. ** Production point: F1, F5, F10, F15, F30- 1st, 5th, 10th, 15th, 30th day of fermentation; M3, M6, M9, M12- 3rd, 6th, 9th, 12th month of maturation.

11. Oświadczenia doktoranta oraz współautorów dotyczące ich wkładu w przygotowanie artykułów naukowych

Mgr inż. Daria Cicha Wojciechowicz
Katedra Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Cicha-Wojciechowicz, D.; Frank, S.; Steinhaus, M.; Majcher, M. A. (2024). Key Odorants Forming Aroma of Polish Mead: Influence of the Raw Material and Manufacturing Processes. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 72 (18), 10548–10557 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na przygotowaniu projektu badań, opracowaniu założeń i metod, przeprowadzeniu badań, w tym zbieraniu danych, analizie wyników, interpretacji wyników i sformułowaniu wniosków, opracowaniu grafik, opracowaniu manuskryptu.

Data 18.03.2025.....

Podpis

Daria Cicha - Wojciechowicz.....

Dr. Stephanie Frank
Leibniz Institute for Food Systems Biology
at the Technical University of Munich
85354 Freising, Germany

Declaration on co-authorship

I hereby declare that in the work Cicha-Wojciechowicz, D.; Frank, S.; Steinhaus, M.; Majcher, M. A. (2024). Key Odorants Forming Aroma of Polish Mead: Influence of the Raw Material and Manufacturing Processes. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 72 (18), 10548–10557 my individual contribution to its preparation consisted in elaboration of assumptions and methods, analysis of results, interpretation of results and formulation of conclusions, preparation of the manuscript.

Date 24.2.2025


.....
signature

PD Dr. Martin Steinhaus
Leibniz Institute for Food Systems Biology
at the Technical University of Munich
85354 Freising, Germany

Declaration on co-authorship

I hereby declare that in the work Cicha-Wojciechowicz, D.; Frank, S.; Steinhaus, M.; Majcher, M. A. (2024). Key Odorants Forming Aroma of Polish Mead: Influence of the Raw Material and Manufacturing Processes. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 72 (18), 10548–10557 my individual contribution to its preparation consisted in interpretation of results and formulation of conclusions, preparation of the manuscript.

Date 24.2.2025

.....
signature

Prof. Dr hab. Małgorzata Anna Majcher
Katedra Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Cicha-Wojciechowicz, D.; Frank, S.; Steinhaus, M.; Majcher, M. A. (2024). Key Odorants Forming Aroma of Polish Mead: Influence of the Raw Material and Manufacturing Processes. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 72 (18), 10548–10557 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na autorstwie koncepcji, przygotowaniu projektu badań, opracowaniu założeń i metod, analizie wyników, interpretacji wyników, opracowaniu manuskryptu, pozyskaniu finansowania.

Data 24.03.25

Podpis

MMajcher

Mgr inż. Daria Cicha Wojciechowicz
Katedra Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Cicha-Wojciechowicz, D., Drabińska, N., Majcher, M. A. (2024). Influence of Honey Varieties, Fermentation Techniques, and Production Process on Sensory Properties and Odor-Active Compounds in Meads. *Molecules*, 29(24), 5913 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na przygotowaniu projektu badań, opracowaniu założeń i metod, przeprowadzeniu badań, w tym zbieraniu danych, analizie wyników, interpretacji wyników i sformułowaniu wniosków, opracowaniu grafik, opracowaniu manuskryptu.

Data 18.03.2025

Podpis

Daria Cicha-Wojciechowicz

Dr Natalia Drabińska

Katedra Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Cicha-Wojciechowicz, D., Drabińska, N., Majcher, M. A. (2024). Influence of Honey Varieties, Fermentation Techniques, and Production Process on Sensory Properties and Odor-Active Compounds in Meads. *Molecules*, 29(24), 5913 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na wykonaniu obliczeń statystycznych, analizie wyników, interpretacji wyników i sformułowaniu wniosków.

Data 17.03.2025.....

Podpis

Natalia Drabińska

Prof. Dr hab. Małgorzata Anna Majcher
Katedra Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Cicha-Wojciechowicz, D., Drabińska, N., Majcher, M. A. (2024). Influence of Honey Varieties, Fermentation Techniques, and Production Process on Sensory Properties and Odor-Active Compounds in Meads. *Molecules*, 29(24), 5913 mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na autorstwie koncepcji, przygotowaniu projektu badań, opracowaniu założeń i metod, analizie wyników, interpretacji wyników, opracowaniu manuskryptu, pozyskaniu finansowania.

Data 24.03.25

Podpis



Mgr inż. Daria Cicha Wojciechowicz
Katedra Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Cicha-Wojciechowicz, D., Kaczmarek, A., Juzwa, W., Drabińska, N., Majcher, M. A. Fermentation Strategies in Mead Production: A Multitechnique Volatilomic Approach to Aroma Characterization. (publikacja dołączona jako manuskrypt wysłany do publikacji) mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na przygotowaniu projektu badań, opracowaniu założeń i metod, przeprowadzeniu badań, w tym zbieraniu danych, analizie wyników, interpretacji wyników i sformułowaniu wniosków, opracowaniu grafik, opracowaniu manuskryptu.

Data 18.03.2025

Podpis

Daria Cicha-Wojciechowicz

Dr inż. Anna Kaczmarek

Katedra Zarządzania Jakością i Bezpieczeństwem Żywności

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Cicha-Wojciechowicz, D., Kaczmarek, A., Juzwa, W., Drabińska, N., Majcher, M. A. Fermentation Strategies in Mead Production: A Multitechnique Volatilomic Approach to Aroma Characterization. (publikacja dołączona jako manuskrypt wysłany do publikacji) mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na przeprowadzeniu obliczeń statystycznych, analizie wyników, opracowaniu grafik, opracowaniu manuskryptu.

Data 18.03.2025

Podpis



prof. UPP, dr hab. inż. Wojciech Juzwa

Katedra Zarządzania Jakością i Bezpieczeństwem Żywności

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu

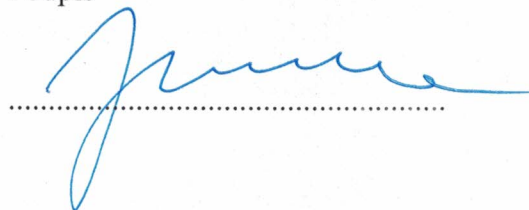
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Cicha-Wojciechowicz, D., Kaczmarek, A., Juzwa, W., Drabińska, N., Majcher, M. A. Fermentation Strategies in Mead Production: A Multitechnique Volatilomic Approach to Aroma Characterization. (publikacja dołączona jako manuskrypt wysłany do publikacji) mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu założeń i metod, przeprowadzeniu badań, w tym zbieraniu danych, analizie wyników, opracowaniu grafik, opracowaniu manuskryptu.

Data 20.03.2025 v.

Podpis



Dr Natalia Drabińska

Katedra Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Cicha-Wojciechowicz, D., Kaczmarek, A., Juzwa, W., Drabińska, N., Majcher, M. A. Fermentation Strategies in Mead Production: A Multitechnique Volatilomic Approach to Aroma Characterization. (publikacja dołączona jako manuskrypt wysłany do publikacji) mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na przeprowadzeniu badań, w tym zbieraniu danych i analizie wyników.

Data 14.03.2025

Podpis

Natalia Drabińska

Prof. Dr hab. Małgorzata Anna Majcher
Katedra Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Cicha-Wojciechowicz, D., Kaczmarek, A., Juzwa, W., Drabińska, N., Majcher, M. A. Fermentation Strategies in Mead Production: A Multitechnique Volatilomic Approach to Aroma Characterization. (publikacja dołączona jako manuskrypt wysłany do publikacji) mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na autorstwie koncepcji, przygotowaniu projektu badań, opracowaniu założeń i metod, analizie wyników, interpretacji wyników, opracowaniu manuskryptu, pozyskaniu finansowania.

Data 24.03.25.....

Podpis

MMajcher.....