



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΟΙΝΟΥ, ΑΜΠΕΛΟΥ ΚΑΙ ΠΟΤΩΝ**

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών στην  
Επιστήμη Οίνου και Ζύθου  
Κατεύθυνση: Ζύθος**

**Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία**

**Οι μετρήσεις του Αζώτου στην μύρα**

**Του**

**Πολυχρόνη Βογιατζή**

Παρουσιάστηκε για τη μερική εκπλήρωση των υποχρεώσεων για την απονομή του  
Μεταπτυχιακού Τίτλου Σπουδών στο Τμήμα Επιστημών Οίνου, Αμπέλου & Ποτών  
του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής

**Επιβλέπουσα: Καθηγήτρια Χατζηλαζάρου Αρχοντούλα, PhD**

ΑΘΗΝΑ, 2022



**UNIVERSITY OF WEST ATTICA  
SCHOOL OF FOOD SCIENCES  
DEPARTMENT OF WINE, VINE & BEVERAGE SCIENCES**

**Master of Science in  
Wine and Beer Science  
Option: Beer**

**Master Thesis  
Nitrogen measurements in beer**

**By  
Polychronis Vogiatzis**

Presented for the partial fulfillment of the obligations for the award of the  
Master's Degree in the Department of Wine, Vine and Beverage Sciences  
of the University of West Attica

**Supervisor:** Prof. Chatzilazarou Archontoula

Athens, 2022

## Διασαφήσεις

Οι υπογράφωντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία (master thesis) με τίτλο «Οι μετρήσεις του Αζώτου στην μύρα» που παρουσιάστηκε από τον ΠΟΛΥΧΡΟΝΗ ΒΟΓΙΑΤΖΗ και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

The signatories declare that we have examined the postgraduate diploma thesis titled “Nitrogen measurements in beer” presented by VOGIATZIS POLYCHRONIS and we affirm that it is accepted.

**Όνοματεπώνυμο & Υπογραφή 1ου Μέλους Επιτροπής  
(Name and Signature of 1<sup>st</sup> Commission Member):**  
ΑΡΧΟΝΤΟΥΛΑ ΧΑΤΖΗΛΑΖΑΡΟΥ

.....  
**Όνοματεπώνυμο & Υπογραφή 2<sup>ου</sup> Μέλους Επιτροπής  
(Name and Signature of 2<sup>nd</sup> Commission Member):**  
ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΤΑΤΑΡΙΔΗΣ

.....  
**Όνοματεπώνυμο & Υπογραφή 3<sup>ου</sup> Μέλους Επιτροπής  
(Name and Signature of 3<sup>rd</sup> Commission Member):**  
ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ ΕΥΑΓΓΕΛΟΥ

.....  
Με την υποβολή αυτής της διατριβής, δηλώνω ότι το σύνολο των εργασιών που περιέχονται σε αυτή είναι το δικό μου, πρωτότυπο έργο, ότι εγώ είμαι ο μοναδικός δημιουργός τους (εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά), ότι η αναπαραγωγή και η δημοσίευσή της από το Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής δεν θα παραβιάζει οποιαδήποτε δικαιώματα τρίτων και ότι δεν έχω υποβάλει στο παρελθόν το σύνολο ή μέρος αυτής για την απόκτηση οποιουδήποτε τίτλου.

By submitting this thesis, I declare that the entirety of the work contained therein is my own, original work, that I am the sole author thereof (save to the extent explicitly otherwise stated), that reproduction and publication thereof by University of West Attica will not infringe any third party rights and that I have not previously in its entirety or in part submitted it for obtaining any qualification.

**Όνοματεπώνυμο & Υπογραφή Υποψηφίου  
(Surname and first name of the candidate):**



.....  
Πολυχρόνης Βογιατζής (Polychronis Vogiatzis)

Πνευματική ιδιοκτησία © 2022 Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής  
Όλα τα δικαιώματα διατηρούνται

Copyright © 2022 University of West Attica  
All rights reserved

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διπλωματική εργασία έχει ως κεντρικό αντικείμενο πραγμάτευσης τις μεθόδους μέτρησης του αζώτου στην μύρα. Για την μελέτη του ερευνητικού αντικειμένου επιλέχθηκε η μέθοδος της βιβλιογραφικής ανασκόπησης. Μέσα από την ανασκόπηση της διαθέσιμης βιβλιογραφίας σχετικά με το αντικείμενο, αναλύθηκαν οι διαφορετικές πτυχές και παράμετροι του θέματος. Για να καταστεί δυνατή η σφαιρική πραγμάτευση του ζητήματος στην εργασία συμπεριλήφθηκαν αναλύσεις σχετικά με την διαδικασία παραγωγής της μύρας σε συνολικό επίπεδο, ενώ επίσης ένα μέρος της εργασίας αφιερώθηκε στον σημαντικό ρόλο που έχουν οι αζωτούχες ενώσεις στην ζύμωση και την παραγωγή του ζύθου. Στην εργασία μελετήθηκαν οκτώ διαφορετικές τεχνικές μέτρησης του αζώτου στην μύρα, ως προς τις τεχνικές τους απαιτήσεις, το πρωτόκολλο της μέτρησης, την διαδικασία και τα αποτελέσματα που παράγουν. Σε επίπεδο συμπερασμάτων οι εν λόγω μέθοδοι διαχωρίστηκαν ως προς την εργονομία, την ταχύτητα και την ευκολία που προσφέρουν στην ζυθοποιία. Τα κριτήρια αυτά διαδραματίζουν κεντρικό σημαντικό ρόλο για την παραγωγή και φαίνεται πως πολλές ζυθοποιίες προσανατολίζονται προς μεθόδους μέτρησης του αζώτου με τα προαναφερθέντα χαρακτηριστικά. Οι μέθοδοι αυτοί πραγματεύονται υλοποιούνται κυρίως μέσω έτοιμων αντιδραστηρίων τα οποία δεν προϋποθέτουν εξειδικευμένο προσωπικό για την υλοποίηση της μέτρησης. Τα έτοιμα αντιδραστήρια προτιμώνται κυρίως από μικρές και μεσαίες ζυθοποιίες.

**Λέξεις κλειδιά :** FAN, PAN, YAN, αμμωνιακό άζωτο, αφομοιώσιμο άζωτο, αμινοξέα, μύρα, ζυθοποιία, τεχνικές μέτρησης.

## ABSTRACT

This thesis focuses primarily on methods for measuring nitrogen in beer. For this study, the method of bibliographic review was selected. Through a review of the available literature on the topic, the various facets and parameters of the topic were examined. In order to provide a comprehensive treatment of the topic, the paper included a comprehensive analysis of the beer production process, with a section devoted to the fundamental nitrogen parameters involved in fermentation and beer production. In this thesis, eight distinct techniques for measuring nitrogen in beer are analyzed in terms of their technical requirements, measurement protocol, processes, and results. As a conclusion, these methods were distinguished based on the brewery's preference for ergonomics, speed, and convenience. These criteria play a central role in production, and it appears that many breweries prefer nitrogen measurement techniques with the aforementioned characteristics. The majority of these methods are implemented using ready to use reagents that do not require specialised personnel for measurement. Small and medium-sized breweries prefer measuring kits most often.

**Keywords:** FAN, PAN, YAN, ammonium nitrogen, assimilable nitrogen, beer, brewing, measuring techniques.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΟ CV

Πλήρες Ονοματεπώνυμο

Πολυχρόνης Βογιατζής

Μεταπτυχιακός Τίτλος Σπουδών  
«Επιστήμη Οίνου και Ζύθου», κατεύθυνση: Ζύθος

Τίτλος: Χημικός

Βιογραφικά Στοιχεία: 1987-1988 C.N.R (Εθνικό ίδρυμα Ερευνών Ferrara-Italy)

1988-1990 (Καύσιμα στην Π.Α.) ,1990-1991 Ιδιωτική Εκπαίδευση, 1991-Σήμερα σε  
Εταιρίες Διαγνωστικών (Κλινική Χημεία)

Προσωπικά Στοιχεία:

Όνοματεπώνυμο	<b>Πολυχρόνης (Χρόνης) Βογιατζής</b>
Διεύθυνση	3ης Ορεινής Ταξιαρχίας 26, 15772 Ζωγράφου
Τηλέφωνο	(+30) 210-7703 808 Κινητό: (+30) 6946-338264
E-mails	<a href="mailto:chronis_voya@yahoo.gr">chronis_voya@yahoo.gr</a> , <a href="mailto:c.vogiatzis@quattrolab.gr">c.vogiatzis@quattrolab.gr</a>
Ημερομηνία Γέννησης	25.05.1963
Φύλλο	Άρρεν
Οικογ. Κατάσταση	Παντρεμένος , δύο παιδιά
Ημερομηνίες	1982-1988
	Πτυχιούχος Χημείας, Scienze Fisiche e Naturali Facoltà di Chimica Οργανικής Βιοχημικής κατεύθυνσης στην Φωτοχημεία, 98/110 ΔΙΚΑΤΣΑ 8,3
Τίτλος	Università degli Studi di Ferrara (Italia-Italy)
Όνομασία Ιδρύματος	Activities and Societies: Photochemistry at Centre National of Research
Ημερομηνίες	1981 – 1982
Τίτλος	Superiore della lingua Italiana, Linguistics
Όνομασία Ιδρύματος	Università degli Studi di Perugia Corso di lingua (Ιταλική Γλώσσα)

Εκπλήρωσε τις απαιτήσεις για το Μεταπτυχιακό Τίτλο Σπουδών Επιστήμη Οίνου & Ζύθου με  
κατεύθυνση: Ζύθος στο Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, Τμήμα Επιστημών Οίνου, Αμπέλου  
& Ποτών, τον Σεπτέμβρη, 2022.

ΕΓΚΡΙΣΗ ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΟΣ: Χατζηλαζάρου Αρχοντούλα

## Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	iv
ABSTRACT .....	v
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΟ CV .....	vi
I. ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ .....	x
II. ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ .....	xi
III. ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ .....	xi
IV. ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ .....	xii
V. ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ, ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ, ΣΥΜΒΟΛΑ ΚΑΙ ΟΡΙΣΜΟΙ.....	xiii
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 <sup>ο</sup> : ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 <sup>ο</sup> : Η ΜΠΥΡΑ ΚΑΙ Η ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΗΣ .....	4
2.1 Η ΜΠΥΡΑ ΚΑΙ ΤΑ ΕΙΔΗ ΤΗΣ .....	4
2.1.1 Τα είδη της μύρας.....	8
2.2 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΜΠΥΡΑΣ: Η ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΟΥ ΖΥΘΟΥ .....	11
2.3 ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΜΑΓΙΑΣ ΣΤΙΣ ΖΥΜΩΣΕΙΣ ΖΥΘΟΠΟΙΗΣΗΣ .....	16
2.3.1 Μεταβολισμός σακχάρου .....	18
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 <sup>ο</sup> : ΤΟ ΑΖΩΤΟ ΣΤΗΝ ΖΥΘΟΠΟΙΑ .....	19
3.1 ΠΗΓΕΣ ΑΖΩΤΟΥ .....	20
3.2 ΑΖΩΤΟ ΖΥΘΟΓΛΕΥΚΟΥΣ.....	22
3.3 ΠΡΟΣΛΗΨΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΖΥΜΩΣΗ ΖΥΘΟΓΛΕΥΚΟΥΣ.....	23
3.4 ΠΡΟΣΛΗΨΗ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ .....	27
3.5 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΑΖΩΤΟΥ ΤΟΥ ΖΥΘΟΓΛΕΥΚΟΥΣ.....	28
3.6 ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΗ ΟΔΟΣ ERLICH .....	32
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 <sup>ο</sup> : ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΑΖΩΤΟΥ ΣΤΗΝ ΜΠΥΡΑ.....	33
4.1 Επίσημες μεθοδολογίες που σχετίζονται με τις μετρήσεις του Αζώτου σύμφωνα με την ANALYTICA EBC με την κωδικοποίηση τους .....	34
4.1.1 Φασματοσκοπία MIR και χημειομετρική αξιολόγηση.....	34

4.2 Επίσημες μεθοδολογίες που σχετίζονται με τις μετρήσεις του Αζώτου σύμφωνα με την AMERICAN SOCIETY OF BREWING CHEMISTS με την κωδικοποίηση τους.....	38
4.3 Επίσημες μεθοδολογίες που σχετίζονται με τις μετρήσεις του Αζώτου σύμφωνα με την MEBAK με την κωδικοποίηση τους.....	40
4.4 Μεθοδολογίες που σχετίζονται με τις μετρήσεις του Αζώτου από το Ερευνητικό Κέντρο Weihenstephan για την παρασκευή και την ποιότητα των τροφίμων Πολυτεχνείο του Μονάχου με την κωδικοποίηση τους και την τιμολόγηση τους.....	41
4.5. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΖΩΤΟΥΧΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΤΗΝ ΜΠΥΡΑ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ MIR.....	41
4.5.1 Φασματοσκοπία MIR και χημειομετρική αξιολόγηση.....	42
4.6 ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΛΕΥΘΕΡΟΥ ΑΜΙΝΟ ΑΖΩΤΟΥ (FAN) ΣΤΗΝ ΜΠΥΡΑ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΟ.....	45
4.6.1 Χημική αντίδραση.....	47
4.6.2 Προετοιμασία μέτρησης.....	48
4.6.3 Πρωτόκολλο μέτρησης με φασματόμετρο.....	48
4.6.4 Υπολογισμός του FAN.....	49
4.7 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΖΩΤΟΥ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΣΤΗΝ ΜΠΥΡΑ ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ ΚΑΥΣΗΣ DUMAS.....	49
4.7.1 Εισαγωγή.....	50
4.7.2 Συνοπτική παρουσίαση αναλυτικού συστήματος NDA 701 Dumas Nitrogen Analyzer.....	51
4.7.3 Προκαταρκτικές Λειτουργίες του NDA 701.....	55
4.7.4 Προετοιμασία των δειγμάτων.....	55
4.7.5 Διαδικασία Ανάλυσης.....	56
4.8 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΥΟΝΤΟΣ ΑΜΙΝΟ ΑΖΩΤΟΥ (PAN Ή FAN) ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΟΡΑ ΣΕ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΟ Ή ENZYMΙΚΟ ΑΝΑΛΥΤΗ.....	59
4.8.1 Αρχή μεθόδου.....	60



4.8.2 Διαδικασίες προετοιμασίας .....	60
4.8.3 Συστατικά και σύνθεση αντιδραστηρίων.....	61
4.8.4 Παρασκευή αντιδραστηρίων εργασίας.....	60
4.8.5 Διαδικασία .....	61
4.8.6 Βαθμονόμηση .....	62
4.8.7 Έλεγχος ποιότητας και μετρολογικά χαρακτηριστικά .....	62
4.8.8 Σημειώσεις διαδικασίας.....	63
4.9 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ FAN ΣΕ ΜΠΥΡΑ ΚΑΙ ΜΟΥΣΤΟ (WORT) ΔΙΑ ΜΕΣΟΥ ΤΟΥ CDR BEERLAB.....	65
4.9.1 Περιγραφή αναλυτικού συστήματος.....	65
4.10 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΜΜΩΝΙΑΣ ΜΕ ENZYΜΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟ ΣΕ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΟ Ή ΑΥΤΟΜΑΤΟ ΑΝΑΛΥΤΗ.....	64
4.10.1 Αρχή μεθόδου.....	67
4.10.2 Διαδικασίες προετοιμασίας .....	67
4.10.3 Αποθήκευση και παρασκευή αντιδραστηρίου .....	68
4.10.4 Συστατικά και σύνθεση αντιδραστηρίων.....	69
4.10.5 Παρασκευή αντιδραστηρίου εργασίας.....	69
4.10.6 Διαδικασία (Μη αυτόματη) .....	68
4.10.7 Βαθμονόμηση .....	69
4.10.8 Έλεγχος ποιότητας και μετρολογικά χαρακτηριστικά .....	70
4.10.9 Σημειώσεις διαδικασίας.....	71
4.10.10 Επιπλέον πληροφορίες .....	71
4.11 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΦΟΜΟΙΩΣΙΜΟΥ ΑΖΩΤΟΥ .....	73
4.12 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΜΕ ΑΥΤΟΜΑΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΣΕ ΑΥΤΟΜΑΤΟ ΑΝΑΛΥΤΗ .....	74
4.12.1 Αρχή της διαδικασίας .....	75
4.12.2 Προφυλάξεις.....	76
4.12.3 Συστατικά και σύνθεση αντιδραστηρίων.....	76

4.12.4 Τοποθέτηση αντιδραστηρίων στο αναλυτικό σύστημα .....	76
4.12.5 Δείγματα.....	75
4.12.6 Προετοιμασία δειγμάτων.....	76
4.12.7 Διαδικασία εξέτασης.....	76
4.12.8 Βαθμονόμηση.....	77
4.12.9 Έλεγχος ποιότητας.....	77
4.12.10 Υπολογισμός αποτελεσμάτων.....	77
4.12.11 Περιορισμοί εύρος και χαρακτηριστικά απόδοσης.....	78
4.12.12 Ακρίβεια / Σύγκριση μεθόδων.....	79
4.12.13 Άλλες παρατηρήσεις και διαχείριση αποβλήτων.....	80
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5<sup>ο</sup>: ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ</b> .....	<b>81</b>
5.1 Προσφορά ενδεικτικού αναλυτικού συστήματος .....	81
5.2 Προσφορά ενδεικτικών αναλυτικών συστημάτων .	83
5.3 Προσφορά ενδεικτικού συστήματος Smart Analysis ...	84
5.4 Προσφορά ενδεικτικής Εταιρίας διαμέσω παραχώρησης χρήσης	86
5.5 Ενδεικτικές Τιμές από το διαδίκτυο.....	86
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6<sup>ο</sup>: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b> .....	<b>82</b>
Βιβλιογραφία .....	88

## **I. ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ**

Εικόνα 1: Παγκόσμια κατανάλωση μύρας.....	4
Εικόνα 2: Γραμματόσημο που εκδόθηκε το 1983 για τον εορτασμό της ιστορίας του Reinheitsgebot και επίσης για τον εορτασμό της 450ης επετείου του .....	6
Εικόνα 3: Είδη μύρας .....	10
Εικόνα 4: Μικροπλάκες πυριτίου για φασματογράφο IR · δομοστοιχείο μικροπλάκας IR HTS XT.....	42
Εικόνα 5: Αναλυτής αζώτου Dumas NDA 701.....	51
Εικόνα 6: Dumas soft <sup>TM</sup> .....	52
Εικόνα 7: Τοποθέτηση δειγμάτων.....	56
Εικόνα 8: Προσδιορισμός αζώτου σε ζυθοποιίες.....	59

Εικόνα 9: Ενζυμικός αναλυτής Y15 (Αριστερά) και Ημιαυτόματος ενζυμικός αναλυτής της Εταιρίας Biosystems.....	59
Εικόνα 10: Βαθμονόμηση Primary Amino Nitrogen σε ενζυμικό αναλυτή σε Οινολογικό εργαστήριο της Νεμέας .....	62
Εικόνα 11: Παραμετροποίηση στον ενζυμικό αναλυτή Y15.....	64
Εικόνα 12: Αναλυτικό σύστημα CDR.....	65
Εικόνα 13: Απεικόνιση του CDR BeerLab.....	66
Εικόνα 14: Απεικόνιση του αντιδραστηρίου.....	67
Εικόνα 15: Γραμμική ευθυγράμμιση μεθόδου.....	67
Εικόνα 16: Βαθμονόμηση Αμμωνίας σε ενζυμικό αναλυτή Y15 BIOSYSTEMS σε Οινολογικό εργαστήριο της Νεμέας .....	70
Εικόνα 17: Παραμετροποίηση στον ενζυμικό αναλυτή Y15.....	73
Εικόνα 18: Υπολογιστικές εξετάσεις για τον υπολογισμό του YAN.....	73
Εικόνα 19: Τιμές CDR BEERLAB.....	84

## II. ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Κατανάλωση μύρας και μερίδιο παγκόσμιας αγοράς ανά χώρα .....	5
Πίνακας 2: Απορρόφηση των αμινοξέων από το ζυθογλεύκος.....	24
Πίνακας 3: Ταξινόμηση αμινοξέων με βάση την ουσιαστική τους φύση. (1987) .....	32
Πίνακας 4: Αποτελέσματα του φασματοσκοπικού προσδιορισμού IR των αζωτούχων ενώσεων σε 31 μύρες.....	
Πίνακας 5: Τι προσδιορίζει το αναλυτικό σύστημα ND 701.....	53
Πίνακας 6: DUMAS vs KJELDAHL.....	54
Πίνακας 7: Τυπικά αποτελέσματα Αζώτου % και Πρωτεΐνης % σε αφιλτράριστες ιταλικές μύρες.....	58
Πίνακας 8: Διαδικασία μέτρησης σε φασματοφωτόμετρο.....	62
Πίνακας 9: Μετρολογικά χαρακτηριστικά πρωτεΐνης αμινο αζώτου(PAN/FAN) ....	62
Πίνακας 10: Μετρολογικά χαρακτηριστικά FAN CDR BeerLAB.....	67
Πίνακας 11: Διαδικασία μέτρησης σε φασματοφωτόμετρο.....	70
Πίνακας 12: Μετρολογικά χαρακτηριστικά προσδιορισμού της αμμωνίας.....	70
Πίνακας 13: Επαναληψιμότητα μεθόδου της Ολικής Πρωτεΐνης.....	78
Πίνακας 14: Ανάλυση δειγμάτων μύρας (αποτελέσματα και θεωρητικές τιμές).....	79
Πίνακας 15: Είδη εξετάσεων.....	82
Πίνακας 16: Τιμές αναλυτικών συστημάτων.....	81
Πίνακας 17: Προσφορά Smart Analysis.....	83
Πίνακας 18: Τιμοκατάλογος .....	84

## III. ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Μικροβίωση βύνης και ζυθοποιίας Πηγή: Bokulich, Bamforth and Mills, ...	11
Σχήμα 2: Απλοποιημένο διάγραμμα παραγωγής μύρας.....	13
Σχήμα 3: Τα 8 στάδια της ζυθοποιίας .....	16
Σχήμα 4: Επισκόπηση των μεταβολικών δραστηριοτήτων του Saccharomyces που επηρεάζουν την ποιότητα της μύρας .....	19
Σχήμα 5: Μεταβολή αμινοξέων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του ζυθογλεύκου. ....	25

Σχήμα 6: Κεντρικές οδοί για την αξιοποίηση μιας ποικιλίας πηγών αζώτου. ....	27
Σχήμα 7: Μοτίβο σχηματισμού διακετυλίου και κατανομή σε σχέση με την ανάπτυξη ζύμης και τη βαρύτητα του ζυθογλεύκουσ	27
Σχήμα 8: Παραγωγή ανώτερων αλκοολών.....	30
Σχήμα 9: Οδός Ehrlich, σχέση μεταξύ ανώτερων αλκοολών και αμινοξέων.....	32
Σχήμα 10: Χημική αντίδραση νινυδρίνης.....	48
Σχήμα 11: Απεικόνιση της μεθόδου Dumas.....	54

#### **IV. ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ**

Διάγραμμα 1: Πρόβλεψη έναντι αληθινού/FAN [mg/l] / Διασταυρούμενη επικύρωση	44
Διάγραμμα 2: Μοντέλο καμπύλης βαθμονόμησης (A).....	77
Διάγραμμα 3: Μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης προσδιορισμού της ολικής πρωτεΐνης	80

## V. ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ, ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ, ΣΥΜΒΟΛΑ ΚΑΙ ΟΡΙΣΜΟΙ

AAT	Αλκοόλη ΑκέτυλοΤρανσφεράση
BBT	Bright Beer Tanks
CF	Combustion Furnace
DMS	Dimethyl sulfate
FAN	Free Amino Nitrogen
GAP	General Amino acid Permease
HMN	High Molecular Nitrogen
MIR	Middle Infra Red
nm	nanometer
NOPA	N-acetyl-L-cysteine + o-phthaldialdehyde
PAN	Primary Amino Nitrogen
pH	Puissance de Hydrogen
PLS	Partial Least Squares
RF	Reduction Furnace
SAP	Super-Adsorbent Powder
TCD	Thermal Conductivity Detector
TN	Total Nitrogen
UV	Ultra Violet
VDKs	Vicinal Diketones
WT1	Water Trap 1
WT2	Water Trap 2
YAN	Yeast Assimable Nitrogen

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup>: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παραγωγή αλκοολούχων ποτών είναι τόσο παλιά όσο και η ιστορία του ανθρώπου. Όσον αφορά το κρασί υπάρχουν αρχαιολογικές πηγές πάνω από 7,5 χιλιάδες χρόνια, με τα πρώιμα εικαζόμενα υπολείμματα κρασιού να χρονολογούνται από τις αρχές έως τα μέσα της πέμπτης χιλιετίας π.Χ. (McGovern et al., 1996). Σαφείς ενδείξεις σκόπιμης οινοποίησης εμφανίζονται για πρώτη φορά στις αναπαραστάσεις των πατητηριών που χρονολογούνται από τη βασιλεία του Udimu στην Αίγυπτο, περίπου 5000 χρόνια πριν. Η άμεση ζύμωση των φρούτων, όπως αυτή του σταφυλιού, λάμβανε χώρα για πολλές χιλιάδες χρόνια πριν ο άνθρωπος αναπτύξει την διαδικασία παρασκευής μύρας και, πιθανώς κατά σύμπτωση, το ψήσιμο ψωμιού (Hardwick, 1995). Η παλαιότερη ιστορική απόδειξη της επίσημης ζυθοποιίας χρονολογείται περίπου στο 6000 π.Χ. στην αρχαία Βαβυλωνία. Σε ένα κομμάτι κεραμικής που βρέθηκε εκεί, απεικονίζονται εργάτες οι οποίοι είτε ανακατεύουν είτε ξαφρίζουν μια δεξαμενή παρασκευής.

Στις μέρες μας, η παραγωγή αλκοολούχων ποτών ενέχει σημαντική συμβολή στις οικονομίες πολλών χωρών. Τα πιο σημαντικά ποτά σήμερα είναι η μύρα, το κρασί, τα αποστάγματα, ο μηλίτης, το σάκε και τα λικέρ (Lea και Piggott, 1995). Αυτή την στιγμή η χώρα με την υψηλότερη κατανάλωση μύρας είναι η Κίνα, που κατέχει επίσης και το υψηλότερο μερίδιο της παγκόσμιας αγοράς (20.30%) (Amoros, 2022). Για το 2020, ο τζίρος για την παγκόσμια αγορά μύρας ανέρχονταν στα 743.84 δις USD, ενώ σύμφωνα με ορισμένες προβλέψεις εκτιμάται πως το 2028 θα ανέλθει στα 989.48 δις *Beer Market Size, Share, Growth [2028]*", 2021). Η μύρα αποτελεί ένα ποτό το οποίο έχει αποκτήσει προοδευτικά μεγάλη απήχηση στο νεαρότερο κοινό.

Οι βασικές πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή μύρας είναι το νερό, το βυνοποιημένο κριθάρι, ο λυκίσκος και η μαγιά. Η διαδικασία παρασκευής περιλαμβάνει την εκχύλιση και τη διάσπαση των υδατανθράκων από το βυνοποιημένο κριθάρι για να παραχθεί ένα διάλυμα πλούσιο σε σάκχαρα που ονομάζεται γλεύκος (ζυθογλεύκος) «wort», το οποίο περιέχει επίσης απαραίτητα θρεπτικά συστατικά για την ανάπτυξη της μαγιάς και της ζύμωσης. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, ζυμώνονται τα σάκχαρα, απελευθερώνοντας ενέργεια και παράγοντας αιθανόλη και άλλα αρωματικά μεταβολικά υποπροϊόντα. Οι κύριες βιολογικές αλλαγές που συμβαίνουν στη διαδικασία παρασκευής καταλύονται από τα φυσικά ένζυμα από το κριθάρι (που παράγονται κατά τη διάρκεια της βυνοποίησης) και τη μαγιά. Η υπόλοιπη διαδικασία

παρασκευής περιλαμβάνει σε μεγάλο βαθμό ανταλλαγή θερμότητας, διαχωρισμό και διάγνωση, μικρές μεταβολές στη χημική σύνθεση σε σύγκριση με τις αντιδράσεις που καταλύονται από ένζυμα. Το κριθάρι κατά την διάρκεια της βυνοποίησης παράγει όλα τα ένζυμα που χρειάζονται για την αποικοδόμηση του αμύλου, της β-γλυκάνης, των λιπιδίων και των πρωτεϊνών, που είναι οι κύριες ενώσεις που ενδιαφέρουν τον ζυθοποιό. Παράλληλα με την προσθήκη του λυκίσκου επιτυγχάνεται η σταθερότητα και τα επιπλέον αρώματα και πικράδα της κάθε μύρας.

Οι αζωτούχες ενώσεις στο ζυθογλεύκος είναι θεμελιώδεις για τις διεργασίες ζυθοποιίας, την ποιότητα και τη σταθερότητα της μύρας. Επηρεάζουν τον ρυθμό ζύμωσης και τον σχηματισμό ενεργών γευστικών ενώσεων. Οι αζωτούχες ενώσεις συμμετέχουν στην σταθερότητα της μύρας, την δημιουργία και την σταθερότητα του αφρού. Η περιεκτικότητα σε ενώσεις αζώτου στην μύρα επηρεάζεται έντονα από τις πρώτες ύλες, τις τεχνολογίες ζυθοποιίας και τα στελέχη της ζύμης.

Στις μύρες που χρησιμοποιούνται πρόσθετα (adjunts) για τη βελτίωση της απόδοσης του εκχυλίσματος ή για λόγους διαφορετικότητας σε αρώματα η περιεκτικότητα του Αζώτου διαφέρει και είναι μικρότερη.

Με δεδομένο το πλαίσιο που αναφέρθηκε, το βασικό ερευνητικό αντικείμενο της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη των μεθοδολογιών μέτρησης του αζώτου στην μύρα. Για τον σκοπό αυτό επιστρατεύτηκε η μέθοδος της βιβλιογραφικής ανασκόπησης. Μια βιβλιογραφική ανασκόπηση έχει ως στόχο τον προσδιορισμό των περισσότερων εμπειρικών στοιχείων που τηρούν τα κριτήρια συμπερίληψης για να δώσουν απάντηση στα ερευνητικά ερωτήματα που παρουσιάζονται. Χρησιμοποιώντας την συστηματική μέθοδο κατά την αναζήτηση προηγούμενων επιστημονικών ερευνών μπορεί να ελαχιστοποιηθεί η προκατάληψη, παρέχοντας έτσι αξιόπιστα ευρήματα από τα οποία μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα (Moher et al., 2009).

Η συγκεκριμένη διπλωματική αποτελείται από έξι κεφάλαια εκ των οποίων το πρώτο και το τελευταίο αποτελούν την εισαγωγή και τα συμπεράσματα, αντίστοιχα. Το δεύτερο κεφάλαιο αποτελεί μια εισαγωγή στην διαδικασία παρασκευής της μύρας και στην εξέταση ορισμένων στιγμιότυπων αυτής της διαδικασίας, όπως η παραγωγή του ζύθου και οι διαδικασίες της ζύμωσης. Στο τρίτο κεφάλαιο αναφέρεται η συμβολή του αζώτου στην διαδικασία της ζύμωσης και αναλύονται η πρόσληψη και ο μεταβολισμός των αμινοξέων κατά την ζύμωση, η πρόσληψη των πεπτιδίων και η επίδραση του

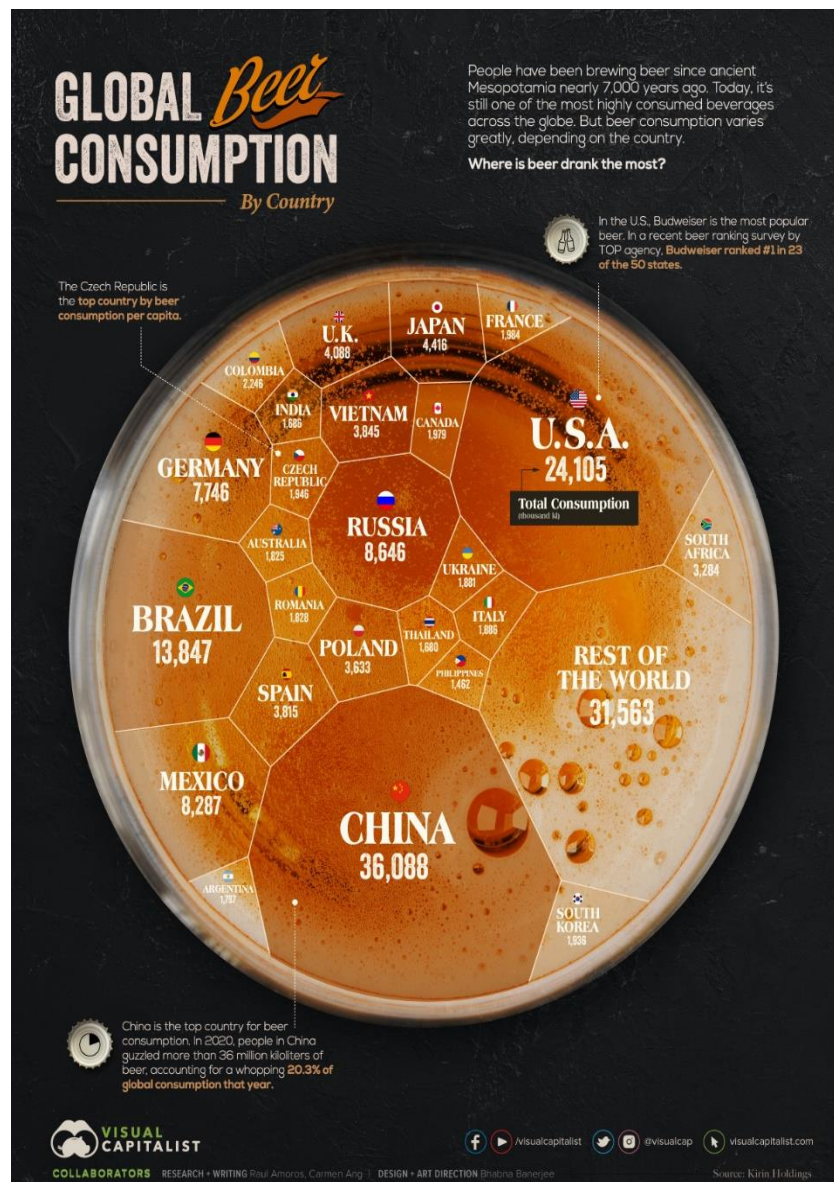
αζώτου του ζυθογλεύκου. Το τέταρτο κεφάλαιο αποτελεί την καρδιά της πραγμάτευσης και γίνεται παράθεση μιας πληθώρας μεθοδολογιών μέτρησης του αζώτου αλλά και άλλων συστατικών ουσιών της μύρας. Στο τέταρτο κεφάλαιο αναλύονται τεχνικές όπως η χρήση φασματοσκοπίας MIR για των προσδιορισμό των αζωτούχων ενώσεων, η μέτρηση του ελεύθερου αμινο αζώτου με φασματόμετρο, ο προσδιορισμός του αζώτου σύμφωνα με την μέθοδο Dumas κ.ά. Στο πέμπτο κεφάλαιο παρουσιάζονται προσφορές επί αναλυτικών συστημάτων. Στο τελευταίο κεφάλαιο διατυπώνονται ορισμένα συμπεράσματα σχετικά με τον ρόλο του αζώτου στην ζυθοποιία και σε σχέση με τις διάφορες τεχνικές μέτρησής του.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup>: Η ΜΠΥΡΑ ΚΑΙ Η ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΗΣ

### 2.1 Η ΜΠΥΡΑ ΚΑΙ ΤΑ ΕΙΔΗ ΤΗΣ

Η μύρα αποτελεί ένα από τα πιο δημοφιλή και με υψηλή κατανάλωση αλκοολούχο ποτό σε όλο τον κόσμο, και είναι επίσης ένα από τα παλαιότερα (Πίνακας 1). Η κατανάλωση μύρας και η ζυθοποιία αποτελούν μέρος των ανθρώπινων δραστηριοτήτων από την αυγή του πολιτισμού.



Εικόνα 1: Παγκόσμια κατανάλωση μύρας (Πηγή: Amoros, 2022)

Πίνακας 1: Κατανάλωση μύρας και μερίδιο παγκόσμιας αγοράς ανά χώρα (Πηγή: Amoros, 2022)

Κατάταξη του 2020	Χώρα	Συνολική κατανάλωση (thousand kl)	Μερίδιο Παγκόσμιας Αγοράς
1	China	36,088	20.30%
2	United States of America	24,105	13.60%
3	Brazil	13,847	7.80%
4	Russia	8,646	4.90%
5	Mexico	8,287	4.70%
6	Germany	7,746	4.40%
7	Japan	4,416	2.50%
8	United Kingdom	4,088	2.30%
9	Vietnam	3,845	2.20%
10	Spain	3,815	2.10%

Σύμφωνα με τον Campbell (2017) η πρώτη μύρα παρασκευάστηκε τυχαία και αυθόρμητα λόγω της ύπαρξης άγριων ζυμών παρουσία δημητριακών, νερού πριν εφευρεθεί το ψωμί.

Οι Σουμέριοι περίπου το 6.000 π.χ. παρασκεύασαν το πρώτο τύπο μύρας.

Πηγή: Βιβλίο Τεχνολογίες Βύνης & Ζύθου (2014)

Η σύγχρονη μύρα εμφανίστηκε κατά τον πρώιμο Μεσαίωνα, από Γερμανούς μοναχούς που χρησιμοποίησαν τον λυκίσκο σαν αρωματικό και πικρό παράγοντα. Η πορεία της μύρας επί Γερμανικού εδάφους και τα διαφορετικά νομικά πλαίσια που εναλλάσσονταν μέσα στην ιστορική διαδρομή παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Ειδικότερα, το *Reinheitsgebot*<sup>1</sup> ήταν μια σειρά κανονισμών που περιορίζουν τα συστατικά της μύρας στη Γερμανία και στις πολιτείες της πρώην Αγίας Ρωμαϊκής Αυτοκρατορίας. Η πιο γνωστή εκδοχή του νόμου εγκρίθηκε στη Βαυαρία το 1516 (από τον Γουλιέλμο Δ'), αλλά παρόμοιοι κανονισμοί προϋπήρχαν του βαυαρικού τάγματος

<sup>1</sup> Η απόδοση του όρου από τα Γερμανικά είναι «εντολή καθαρότητας».

και οι σύγχρονοι κανονισμοί διαφέρουν επίσης σημαντικά από τη βαυαρική έκδοση του 1516. Αν και σήμερα, το Reinheitsgebot αναφέρεται σε διάφορα κείμενα για την ιστορία της μύρας, ιστορικά εφαρμόστηκε μόνο στο δουκάτο της Βαυαρίας και από το 1906 στη Γερμανία συνολικά, και είχε μικρή ή καθόλου επίδραση σε άλλες χώρες ή περιοχές. Aroh et al., (2018)

Σύμφωνα με τον βαυαρικό νόμο του 1516 (Reinheitsgebot), τα μόνα συστατικά που μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στην παραγωγή μύρας ήταν: κριθάρι, λυκίσκος, ζύμη και νερό

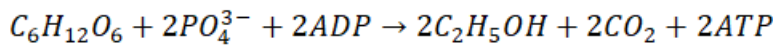


Εικόνα 2: Γραμματόσημο που εκδόθηκε το 1983 για τον εορτασμό της ιστορίας του Reinheitsgebot και επίσης για τον εορτασμό της 450ης επετείου του. (Πηγή: "Reinheitsgebot - Wikipedia", 2022)

Η παρασκευή μύρας διενεργούνταν τότε σε μικρή κλίμακα, αλλά με την άφιξη της Βιομηχανικής Επανάστασης, η παρασκευή της μεταφέρθηκε στη μαζική παραγωγή, επιτρέποντας την διανομή μύρας σε πολύ μεγαλύτερη κλίμακα (Sanchez, 2017). Η Διεθνής Ημέρα Μύρας γιορτάζεται την πρώτη Παρασκευή κάθε Αυγούστου σε περισσότερες από 200 πόλεις σε όλο τον κόσμο.

Η μύρα παράγεται με την ελεγχόμενη ζύμωση του ζυθογλεύκου που είναι πλούσιο σε σάκχαρα, αζωτούχες ενώσεις, κλπ ενώσεις που δημιουργούνται κατά την διάρκεια της βυνοποίησης του κριθαριού. Η ζύμωση είναι μία από τις σημαντικότερες χημικές αντιδράσεις κατά την οποία τα σάκχαρα μετατρέπονται σε αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα.

Εκφράζεται χημικά ως εξής:



Πίσω από αυτή την απλοποιημένη χημική αντίδραση βρίσκεται μια σειρά από πολύπλοκες βιοχημικές αντιδράσεις. Αυτές οι αντιδράσεις περιλαμβάνουν έναν αριθμό ενζύμων και λαμβάνουν χώρα αναερόβια μέσα στα κύτταρα της ζύμης ζυθοποιίας (Campbell, 2017). Αφού σχηματιστεί η αιθανόλη, η μύρα μεταφέρεται σε δοχεία ωρίμανσης και η γεύση εκλεπτύνεται φυσικά. (Campbell, 2017). Η παρασκευή μύρας περιλαμβάνει μικροβιακή δραστηριότητα σε κάθε στάδιο, από την παραγωγή πρώτων υλών και τη βυνοποίηση έως τη συσκευασία.

Η μύρα είναι ένα αλκοολούχο ποτό που παρασκευάζεται μέσω ζύμωσης δημητριακών, συνήθως βυνοποιημένο κριθάρι, καθώς και από καλαμπόκι και αρωματίζεται με λυκίσκο, ο οποίος της προσδίδει μια ελαφρώς πικρή γεύση και σταθερότητα. Η κριθαρένια μύρα λέγεται ότι έχει πολλά οφέλη για την υγεία εάν καταναλώνεται σε μέτριες ποσότητες.

Υπάρχουν διάφοροι τύποι στελεχών μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή μύρας, όπως γαλακτικά βακτήρια και μαγιά, αλλά το στέλεχος ζύμης που χρησιμοποιείται μαζικότερα είναι το *Saccharomyces cerevisiae*. Οι διαδικασίες παρασκευής της μύρας περιλαμβάνουν την βυνοποίηση ή βλάστηση, την άλεση, την πολτοποίηση ή εκχύλιση με νερό, την διήθηση, το βρασμό και την ζύμωση.

Η διαδικασία βυνοποίησης σταματά όταν επέλθει στην επιθυμητή ποιότητα βύνης, η πράσινη βύνη μετατρέπεται σε σταθερή και αποθηκεύσιμη ποσότητα, δίνεται το επιθυμητό χρώμα και γεύση, τα ένζυμα σταθεροποιούνται και οι ανεπιθύμητες γεύσεις απομακρύνονται. Οι στόχοι της πολτοποίησης είναι η διάλυση των συστατικών του κόκκου, η διάσπαση της δομής του κυτταρικού τοιχώματος των κόκκων, η εκχύλιση και η υδρόλυση αμύλου, πρωτεϊνών και πολυσακχαριτών χωρίς άμυλο και καθιερώνεται το προφίλ ζυμώσιμου σακχάρου. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, καθορίζεται το επίπεδο αλκοόλης, το γευστικό προφίλ της μύρας και το επίπεδο ενανθράκωσης. Στο τέλος της ζύμωσης μπορεί εύκολα να διαχωριστούν και να συλλεχθούν οι ζύμες. Οι χαμηλές θερμοκρασίες ωρίμανσης θα βελτιώσουν τη διαύγεια της μύρας. Χρησιμοποιώντας μια συστηματική διαδικασία για την επίλυση προβλημάτων ισορροπίας των υλικών, βρίσκονται τα ισοζύγια μάζας και στα έξι στάδια αυτής της παραγωγικής διαδικασίας (Ore et al., 2018) .

Η παρασκευή μύρας έχει ως αφετηρία την αρχαιότητα συνεχίζει να καταναλώνεται στις μέρες μας με σχετικά λίγες αλλαγές όσον αφορά την βασική συνταγή. Το βυνοποιημένο κριθάρι είναι το κύριο συστατικό, το οποίο, όταν αλέθεται και θερμαίνεται σε νερό για να εξαχθούν τα θρεπτικά συστατικά του, δίνει ένα θρεπτικό διάλυμα πλούσιο σε σάκχαρα και πρωτεΐνες που ονομάζεται ζυθογλεύκος (wort<sup>2</sup> (λέξη Γερμανικής προελεύσεως)). Το ζυθογλεύκος αποτελεί ένα ιδανικό μέσο στο οποίο οι ζυμομύκητες (η μαγιά) μπορούν να αναπτυχθούν και να ακολουθήσει η ζύμωση. Η προσθήκη του λυκίσκου γίνεται συνήθως στο στάδιο του βρασμού , έχει αντιβακτηριακές ιδιότητες που συντηρούν την ζυμωμένη μύρα, δίνοντας παράλληλα στην μύρα μια δροσιστική πικρή γεύση (Campbell, 2017).

Για πολλά χρόνια, η μόνη γνωστή μέθοδος ζύμωσης μύρας ήταν μια αργή διαδικασία ζύμωσης κατά παρτίδες που πραγματοποιούνταν σε ένα μόνο δοχείο ζύμωσης. Οι αργοί χρόνοι ζύμωσης προϋπέθεταν μεγάλο αριθμό δεξαμενών για να στεγαστούν όλες οι παρτίδες ζύμωσης (με αποτέλεσμα υψηλό κόστος αποθήκευσης και συνεπακόλουθο υψηλό κόστος διατήρησης των δοχείων αποθήκευσης στις απαιτούμενες θερμοκρασίες και τη δοκιμή της ποιότητας κάθε παρτίδας). Επιπλέον, δεν υπήρχε καμία εγγύηση ότι η μύρα θα είχε σταθερή γεύση.

### 2.1.1 Τα είδη της μύρας

Η γεύση και το άρωμα οποιασδήποτε μύρας καθορίζεται, σε μεγάλο βαθμό, εκτός από το νερό, τις βύνες και τις συνθήκες των σταδίων ζυθοποίησης, και από το στέλεχος μαγιάς που χρησιμοποιείται μαζί με τη σύνθεση του μούστου. Επιπλέον, οι ιδιότητες της ζύμης όπως η κροκίδωση, η ικανότητα ζύμωσης (συμπεριλαμβανομένης της πρόσληψης σακχάρων του μούστου, αμινοξέων, μικρών πεπτιδίων και ιόντων αμμωνίου), η ωσμωτική πίεση, η ανοχή σε αιθανόλη και οι απαιτήσεις σε οξυγόνο έχουν κρίσιμο αντίκτυπο στην απόδοση της ζύμωσης και στα μεταβολικά προϊόντα που παράγονται. Τα ιδιόκτητα στελέχη μαγιάς, που ανήκουν σε μεμονωμένες ζυθοποιίες, συνήθως φυλάσσονται και συντηρούνται με ζήλο (Stewart, 2016). Με τη γενετική χειραγώγηση των ζυμομυκήτων, έχουν εκτραφεί πολυάριθμα ποικιλιακά στελέχη, τα οποία μαζί με τροποποιήσεις στη διαδικασία παρασκευής έχουν οδηγήσει σε

---

<sup>2</sup> Η καλύτερη απόδοση της λέξης wort στα ελληνικά είναι γλεύκος.

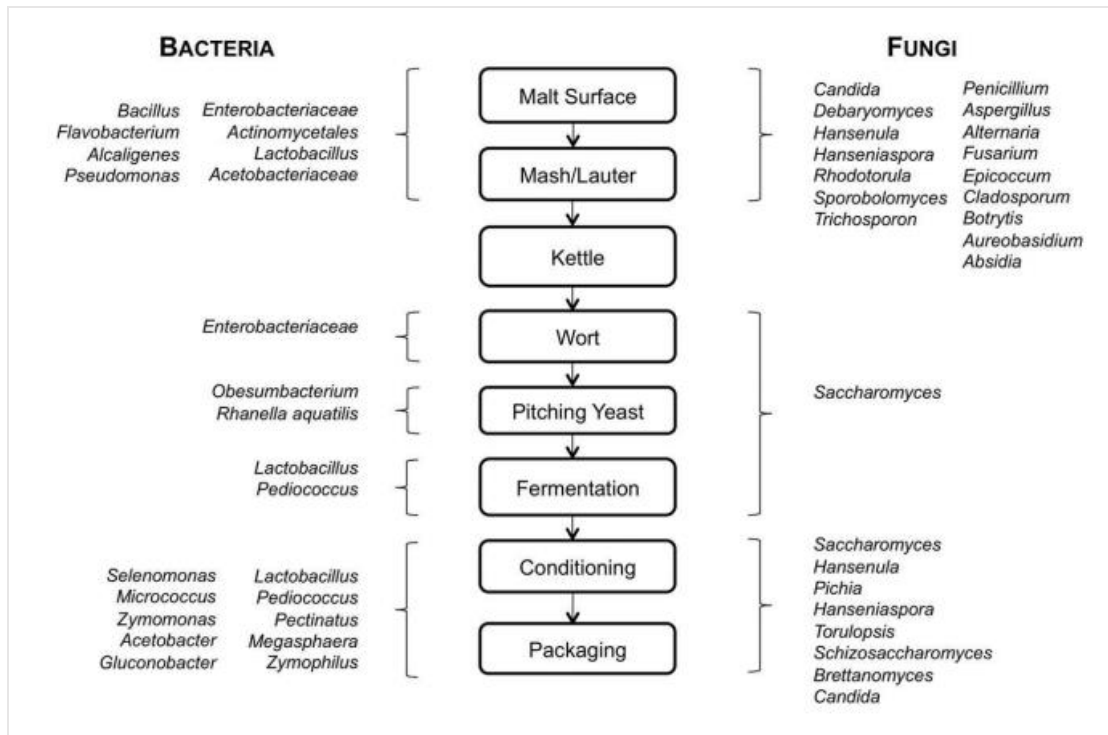
διαφορετικούς τύπους μύρας. Αυτές οι μύρες που εμφανίζονται πιο συχνά περιλαμβάνουν:

- Lager: Μύρες φτιαγμένες με μαγιά που επικάθονται σε μεγάλο βαθμό στον πάτο (*Saccharomyces pastorianus*, παλιότερα *carlsbergensis* *BYΘOZYMH*) του δοχείου που χρησιμοποιείται. Έτσι, όλη η μαγιά και άλλα υλικά κατακάθονται στον πυθμένα, με αποτέλεσμα να δημιουργηθεί μια καθαρή μύρα.
- Pilsner (υποκατηγορία της Lager): Μια άχρωμη μύρα lager που παρασκευάστηκε αρχικά στην πόλη Pilsen. Το νερό που χρησιμοποιείται για αυτό το στυλ μύρας Το νερό του Πίλσεν είναι πολύ μαλακό, απαλλαγμένο από τα περισσότερα μέταλλα και πολύ χαμηλό σε διττανθρακικά., με υψηλότερη περιεκτικότητα σε ασβέστιο και μαγνήσιο από το νερό που χρησιμοποιείται για τη lager. Το χρώμα της pilsner είναι επίσης πιο ανοιχτό από αυτό της μύρας lager.
- Ale: Μύρες που παρασκευάζονται με μαγιά που επιπλέει σε μεγάλο βαθμό (*Saccharomyces cerevisiae* *AΦPOZYMH*) στην κορυφή των δεξαμενών κατά τη διάρκεια της ζύμωσης : Τείνουν να έχουν υψηλότερη περιεκτικότητα σε αλκοόλ από τις lager.
- Porter: Μια πολύ «σκούρα - σκοτεινή» μύρα. Το πιο σκούρο χρώμα και η ιδιαίτερη γεύση προέρχονται από το ψήσιμο της βύνης πριν την παρασκευή του. Αυτό συνήθως οδηγεί σε πιο δυνατή γεύση .
- Stout: Μια πολύ «σκούρα-σκοτεινή», σχεδόν μαύρη μύρα. Το σκούρο χρώμα και η γεύση του καβουρδισμένου προέρχονται από το καβουρδισμένο κριθάρι και/ή τη ψημένη βύνη (Wong, 2003)





και μυκήτων τα οποία μπορεί να επιμολύνουν το προϊόν κατά τα στάδια της παραγωγής μπίρας.



Σχήμα 1: Μικροβίωση βύνης και ζυθοποιίας

(Πηγή: Bokulich, et al., 2012)

## 2.2 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΜΠΥΡΑΣ: Η ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΟΥ ΖΥΘΟΥ

Η ζυθοποιία είναι μια τεράστιας κλίμακας πολύπλοκη διαδικασία που μετατρέπει το νερό, τα δημητριακά και τον λυκίσκο για να παραχθεί αυτό που ονομάζουμε μπίρα, και αυτό επιτυγχάνεται κυρίως με τη βοήθεια μαγιάς.

Βασικά η μεγάλη ποικιλία στις μύρες οφείλεται στις διαφορετικές συνθήκες (θερμοκρασίας, είδος κόκκου κ.λπ.) που διαμορφώθηκαν στα στάδια παραγωγής (Sanchez, 2017). Το σώμα της μπίρας παρέχεται από το κριθάρι, πιο συγκεκριμένα από τη βύνη κριθαριού και γενικά για ένα λίτρο μπίρας χρησιμοποιούνται μερικές εκατοντάδες γραμμάρια. Η βύνη μπορεί να υποκατασταθεί εν μέρει από πρώτες ύλες πλούσιες σε άμυλο όπως το ρύζι, το καλαμπόκι ή το σιτάρι. Όταν ένας πολτός βύνης κριθαριού και νερού παρασκευής (που ονομάζεται «πολτός») θερμαίνεται σε



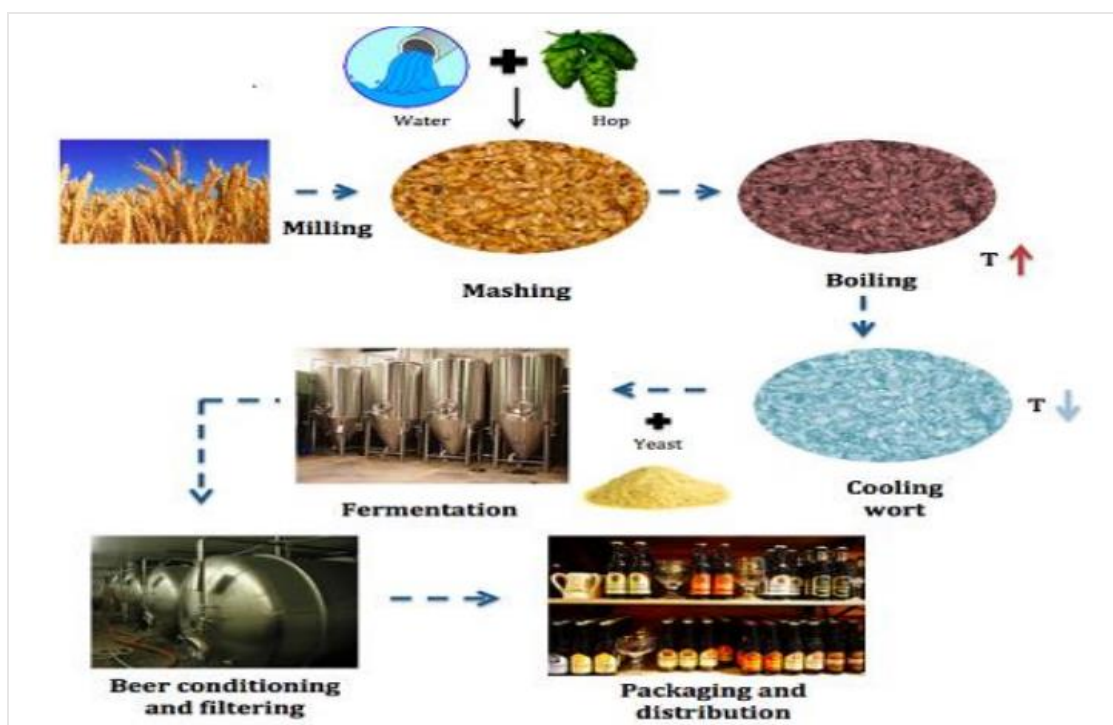
θερμοκρασία περίπου 60°C, τα ένζυμα της βύνης, κυρίως αμυλάσες αλλά και πρωτεάσες, αποδομούν το άμυλο και τις πρωτεΐνες, δημιουργώντας ένα μείγμα σακχάρων και πεπτιδίων ή αμινοξέων. Για το σκοπό αυτό, το κριθάρι πρέπει να υποβληθεί σε ελεγχόμενη βλάστηση, κατά την οποία αυτά τα ένζυμα σχηματίζονται στον κόκκο του κριθαριού πριν από την πολτοποίηση. Το κριθάρι αυτό είναι γνωστό ως βύνη κριθαριού (Keukeleire, 2000).

Η μετατροπή αμύλου σε σάκχαρα διακόπτεται με την θέρμανση. Ανάλογα με τις συνθήκες (χρόνος, θερμοκρασία), προκύπτουν βύνες ανοιχτόχρωμες, κεχριμπαρένιες ή σκούρες, με το χρώμα να οφείλεται στην καραμελοποίηση των σακχάρων. Είναι σημαντικό ότι το χρώμα της μύρας προέρχεται από το χρώμα της βύνης που χρησιμοποιείται. Επιπλέον, είναι προφανές ότι οι χρωματιστές βύνες παρουσίαζαν μια ξεχωριστή γεύση, η οποία συχνά είναι χαρακτηριστική ιδίως για τις μαύρες μύρες. Μετά τη διήθηση, το ζαχαρούχο διάλυμα στην ορολογία των ζυθοποιών που ονομάζεται «wort» μεταφέρεται στον βραστήρα ζυθοποιίας, όπου βράζετε για τουλάχιστον μία ώρα ενώ προστίθεται και ο λυκίσκος (*Humulus lupulus* L.). Η ποσότητα του λυκίσκου που απαιτείται είναι πολύ μικρή σε σχέση με τις ποσότητες βύνης που χρησιμοποιούνται στο ζυθοποιείο. Εκτός από το σχηματισμό αδιάλυτων συμπλοκών με πρωτεΐνες και πολυπεπίδια (που συμβάλλουν στη σταθερότητα της μύρας), ο λυκίσκος αποστειρώνει το διάλυμα του μούστου. Το πιο σημαντικό πλεονέκτημα του λυκίσκου είναι η πικρή γεύση που προσδίδεται στις ξανθές μύρες. Επιπλέον, ο λυκίσκος είναι απαραίτητος για τη σταθεροποίηση του αφρού της μύρας (Keukeleire, 2000).

Μετά την ψύξη και την απομάκρυνση του χρησιμοποιημένου λυκίσκου, το υγρό που είναι γνωστό ως «λυκίσκος wort» αντλείται στα δοχεία ζύμωσης και προστίθεται μαγιά υπό αερισμό για ανάπτυξη. Κατά τη διάρκεια της αναερόβιας φάσης τα κύτταρα ζύμης μετατρέπουν τα σάκχαρα σε αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα. Ανάλογα με τη θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και τη φύση της συλλογής ζύμης στο τέλος της περιόδου ζύμωσης, οι μύρες διακρίνονται ως παραγόμενες με «ζύμωση πυθμένα» ή «υψηλής ζύμωσης». Τα στελέχη ζύμης, κατάλληλα για μύρες που έχουν υποστεί ζύμωση πυθμένα (βυθοζύμες) (*Saccharomyces carlsbergensis*), είναι ενεργά κάτω από τους 5°C και καθιζάνουν στον πυθμένα του ζυμωτήρα μετά την παραγωγή αιθανόλης σε ποσότητα περίπου 5%. Αντίθετα, οι ζύμες που είναι χαρακτηριστικές για την παραγωγή μύρας υψηλής ζύμωσης (αφροζύμες) (*Saccharomyces cerevisiae*),

λειτουργούν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και ανθίστανται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις αιθανόλης έως και 12%. Όταν η δραστηριότητα σταματά, τα κύτταρα της ζύμης συγκεντρώνονται στην κορυφή ως πυκνός αφρός (Keukeleire, 2000)

Η τυπική ζύμωση διαρκεί περίπου μία εβδομάδα και σε αυτή την φάση δημιουργείται η αποκαλούμενη «πράσινη μύρα» ή «νεαρή μύρα» που δεν είναι πόσιμη, καθώς ένας αριθμός ενοχλητικών ενώσεων (κακή γεύση και οσμή) σχηματίζεται κατά τη ζύμωση. Κατά συνέπεια, οι μύρες χρειάζονται μια περίοδο ωρίμανσης αρκετών εβδομάδων στους 0°C περίπου, κατά την οποία τα ανεπιθύμητα συστατικά αποσυντίθενται αργά. Μόνο αφού το περιεχόμενο έχει μειωθεί κάτω από τις κρίσιμες τιμές μπορεί να συσκευαστεί η μύρα. Για παρατεταμένη διατήρηση, οι μύρες μπορούν επίσης να παστεριωθούν. Οι ειδικές μύρες απαιτούν συχνά μια αργή (μερικών μηνών) δεύτερη ζύμωση, συνήθως σε δρύινα βαρέλια, για να δημιουργήσουν όξινες γεύσεις, (Keukeleire, 2000). Ακολουθεί ένα απλοποιημένο σχήμα παραγωγής μύρας απεικονίζει την όλη διαδικασία και η εξήγηση κάθε σταδίου δίνεται παρακάτω.



Σχήμα 2: Απλοποιημένο διάγραμμα παραγωγής μύρας (Πηγή: Sánchez, 2017)

## **Πρώτο στάδιο: Βυνοποίηση και άλεση**

- Το κριθάρι έχει τροποποιηθεί σε βύνη από τον ζυθοποιό και αλέθεται αμέσως πριν από τη χρήση. Κάθε μύρα έχει τη δική της σύνθεση όσον αφορά το μείγμα διαφορετικών ποικιλιών βύνης.

## **Δεύτερο στάδιο: Ανάμιξη, εκχύλιση και διήθηση**

- Η δεξαμενή διαθέτει εξάρτημα ανάμειξης για να διασφαλίζει ότι το μείγμα νερού και βύνης αναδεύεται συνεχώς κατά τη διάρκεια της πολτοποίησης. Η βύνη αναμιγνύεται με ζεστό νερό για να επιτρέψει την ομοιογένεια στο άμυλο να μετατραπεί σε σάκχαρα δια μέσω των ενζύμων.
- Η θερμοκρασία του μείγματος είναι ζωτικής σημασίας, καθώς τα διάφορα σάκχαρα που παράγονται εξαρτώνται από τη θερμοκρασία για τη βέλτιστη δράση των ενζύμων: ορισμένα σάκχαρα είναι ζυμώσιμα, ενώ άλλα είναι μη ζυμώσιμα, δίνοντας αίσθηση του σώματος στην τελική μύρα.
- Υπάρχουν εξαρτήματα ατμού στον εξωτερικό μανδύα των δεξαμενών για τη θέρμανση του πολτού σταδιακά. Αυτή η διαδικασία πολτοποίησης διαρκεί περίπου δύο ώρες.
- Το γλυκό υγρό, που τώρα ονομάζεται βυνογλεύκος, μπορεί να περάσει μέσα από τις σήτες του ψεύτικου πυθμένα ενώ τα βυνοπολείματα μένουν πίσω. Στη συνέχεια, το βυνογλεύκος αντλείται στον βραστήρα. Αυτή η διαδικασία διαρκεί περίπου 2,5 ώρες.
- Στη συνέχεια συλλέγεται το χρησιμοποιημένο σιτάρι για ζωτροφές.

## **Τρίτο στάδιο: Βρασμός και διαύγαση**

- Μόλις μπει όλο το ζυθογλεύκος στον βραστήρα, το βυνογλεύκος βράζετε για 1-120 λεπτά (150 °C – 100 °C) για την απενεργοποίηση (καταστροφή) όλων των ενζύμων και την αποστείρωση του, την εξάτμιση άσχημων οσμών, την κροκίδωση των πρωτεϊνών. Το βράσιμο εξατμίζει επίσης λίγο νερό, συμπυκνώνοντας το ζυθογλεύκος και εντείνοντας κάπως το χρώμα.
- Ο λυκίσκος προστίθεται στο βραστήρα στην αρχή του βρασμού για την πικράδα και στο τέλος του βρασμού για το άρωμα και τη γεύση.

- Το ζυθογλεύκος στη συνέχεια (συνήθως) φυγοκεντρείται (whirlpool), καθώς υπάρχουν υπολείμματα λυκίσκου και πρωτεϊνών ∴. Πρώτα αφαιρείται το καθαρό ζυθογλεύκος και μετά τα υπολείμματα

### **Τέταρτο στάδιο: Ψύξη μέσω εναλλάκτη θερμότητας**

- Μόλις ολοκληρωθεί ο βρασμός, το ζυθογλεύκος μετά την μετάγγιση του ψύχεται στους περίπου 2-3 βαθμούς χαμηλότερα από τη θερμοκρασία ζύμωσης μέσω ενός εναλλάκτη θερμότητας στο δρόμο του προς τον ζυμωτήρα. Αυτή η διαδικασία διαρκεί περίπου 1 ώρα (όσο πιο γρήγορα τόσο καλύτερα).

### **Πέμπτο στάδιο: Ζύμωση και ωρίμανση**

- Μόλις μπει όλο το ζυθογλεύκος στη δεξαμενή, προστίθεται η μαγιά. Η μαγιά θα ζυμώσει το ζυθογλεύκος και θα το μετατρέψει σε μύρα.
- Η αρχική ζύμωση για να ολοκληρωθεί διαρκεί περίπου 3 - 4 ημέρες. Οι θερμοκρασίες ζύμωσης ποικίλλουν ανάλογα με τα είδη της μύρας, μια lager ζυμώνεται σε θερμοκρασία από ~8-12 °C, οι ale μύρες ζυμώνονται σε θερμοκρασία ~18-20.
- Στο τέλος της ζύμωσης, η τελική μύρα ψύχεται στους 10°C και στη συνέχεια στους 4°C και διατηρείται στη δεξαμενή για ωρίμανση, συνήθως περίπου δύο με τρεις εβδομάδες ώστε να μειωθούν τα επίπεδα μη επιθυμητών ουσιών όπως το διακετύλιο και η 2-3 πεντανεδιόνη. Παράλληλα επιτυγχάνεται και μια μικρή απολάσπωση.
- Η μαγιά συλλέγεται από το τμήμα κώνου στο κάτω μέρος του ζυμωτήρα, για να χρησιμοποιηθεί για τη ζύμωση άλλης παρτίδας μύρας.

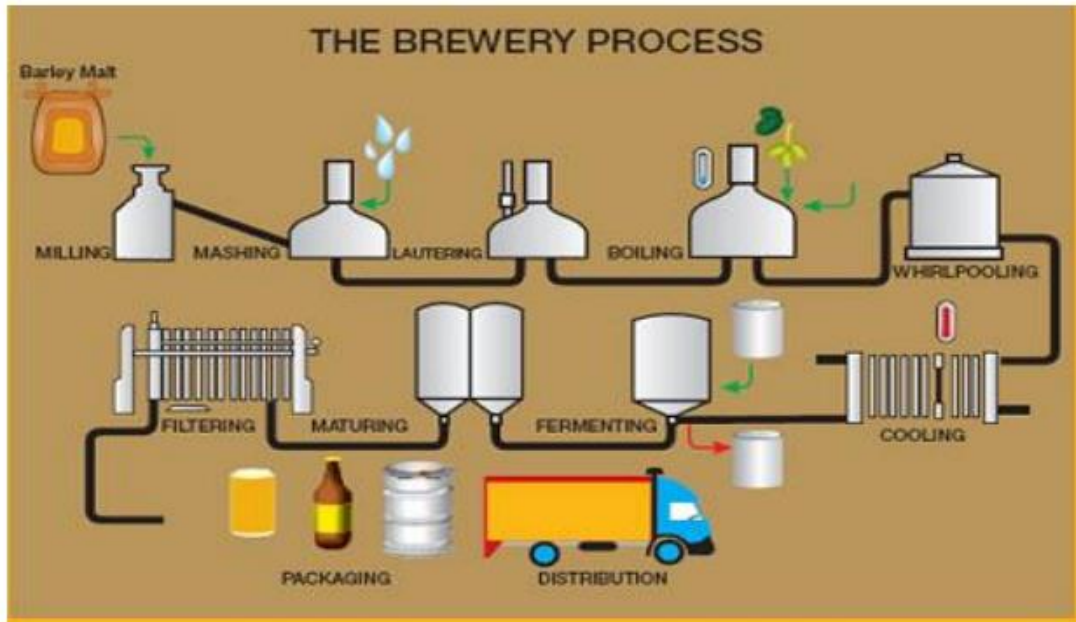
### **Έκτο στάδιο: Σταθεροποίηση και φιλτράρισμα**

- Για να συσκευαστεί, η μύρα μεταφέρεται στις δεξαμενές BBT<sup>3</sup>, όπου παραμένει μέχρι την εμφιάλωση για να σταθεροποιηθεί..

---

<sup>3</sup> Bright Beer Tanks

- Το φιλτράρισμα αφαιρεί την υπόλοιπη μαγιά, αφήνοντας τη μύρα πεντακάθαρη. Μερικές μύρες δεν φιλτράρονται καθόλου και εξακολουθούν να περιέχουν μαγιά.



Σχήμα 3: Τα 8 στάδια της ζυθοποιίας

Πηγή: (Kenekchukwu, Aroh, Eight degrees brewing, 2018)

### Έβδομο στάδιο: Συσκευασία

- Η μύρα συσκευάζεται είτε σε βαρέλια, είτε εμφιαλώνεται σε γυάλινα μπουκάλια των 330 ml των 500 ml ή σε κουτάκια και άλλους περιέκτες.
- Κάθε βαρέλι χωρά 30 λίτρα ή 50 λίτρα.
- Εάν εμφιαλωθεί, η μύρα πληρώνεται με αντίθετη πίεση (διπλή προεκκένωση) για μείωση της πρόσληψης οξυγόνου (οξειδωσης) και πωματίζεται σε αφρό για να διασφαλιστεί ότι δεν θα εισέλθει αέρας-οξυγόνο

## 2.3 ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΜΑΓΙΑΣ ΣΤΙΣ ΖΥΜΩΣΕΙΣ ΖΥΘΟΠΟΙΗΣΗΣ

Τα στελέχη μαγιάς μύρας είναι προαιρετικά αναερόβια, αυτό σημαίνει ότι μπορούν να αναπτυχθούν παρουσία ή απουσία οξυγόνου και αυτή η ικανότητα υποστηρίζει την ιδιότητά τους ως σημαντικό βιομηχανικό μικροοργανισμό (Stewart, 2016). Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, η μαγιά εκκρίνει μια σειρά από μόρια, εκτός από την αιθανόλη

και το CO<sub>2</sub>, που μπορούν να επηρεάσουν τη γεύση. Όλα τα στελέχη ζυθοποιίας παράγουν γλυκερίνη, γειτονικές δικετόνες (VDKs), αλκοόλες, εστέρες, λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας, οργανικά οξέα και διάφορες ουσίες που περιέχουν θείο. Τα επίπεδα των συστατικών που βρίσκονται στην μύρα εξαρτώνται εν μέρει από το στέλεχος της ζύμης, αλλά επίσης σημαντικές είναι οι ακριβείς συνθήκες ζύμωσης που υπάρχουν, της ποσότητας των ζυμών συμπεριλαμβανομένου του ρυθμού ανάπτυξης των ζυμών (Verbelen et al., 2009), της θερμοκρασίας, των επιπέδων προσθήκης οξυγόνου, την διάρκεια ζύμωσης και ωρίμανσης. Τα VDKs, το διακετύλιο και η πεντανεδιόνη προσθέτουν έναν βουτυρώδη ή μελί χαρακτήρα που είναι ανεπιθύμητος για τις περισσότερες μύρες (Bokulichn και Bamforth, 2013).

Μια σειρά εστέρων παράγεται από τη μαγιά ζυθοποιίας, με ίσως τον πιο συχνό να είναι ο οξικός ισοαμυλεστέρας. Τέτοιοι εστέρες παράγονται από τη δράση του ενζύμου αλκοόλης ακετυλοτρανσφεράσης (AAT) και του ακετυλο-συνένζυμου Α (acetyl-CoA) (Procopio, et al., 2011). Ένας σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την έκταση της παραγωγής λιπιδίων και κατ' επέκταση τον σχηματισμό εστέρων είναι η ποσότητα οξυγόνου και ακόρεστων λιπαρών οξέων στο γλεύκος. Η AAT είναι επίσης υπεύθυνη για την παραγωγή θειοεστέρων (Bokulichn και Bamforth, 2013). Οι εστέρες σχηματίζονται επίσης από τον συνδυασμό δραστικών οξέων και αλκοολών στην μύρα. Δεδομένου ότι η αλκοόλη που υπάρχει στη μακράν μεγαλύτερη ποσότητα είναι η αιθανόλη, οι περισσότεροι από τους εστέρες που παράγονται είναι αιθυλεστέρες. Δύο παραδείγματα είναι ο οξικός αιθυλεστέρας (διαλυτό, ελαφρώς γλυκιά γεύση που είναι πολύ κοντά στο χυμό αχλαδιού) και ο εξανοϊκός αιθυλεστέρας (άρωμα κόκκινων μήλων και γλυκάνισου). Η γευστική ισορροπία των παραγόμενων εστέρων εξαρτάται από το στέλεχος μαγιάς που χρησιμοποιείται. Για παράδειγμα, ορισμένα στελέχη μαγιάς *Brettanomyces* (άγρια μαγιά) παράγουν τεράστιες ποσότητες οξικού αιθυλεστέρα, προκαλώντας μια δυσοσμία τύπου κόλλας στην μύρα (Campbell, 2017).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η επιλογή στελεχών ζύμης με αυξημένη δράση β-γλυκοσιδάσης (β-G) για την ενίσχυση του αρώματος ιδιαίτερων κατηγοριών μύρας. Οι β-γλυκοσιδάσες στο *Saccharomyces* διασπούν μη πτητικές γλυκοσίδες (ένωση που σχηματίζεται από ένα απλό σάκχαρο και μια άλλη ένωση με αντικατάσταση μιας ομάδας υδροξυλίου στο μόριο του σακχάρου) που προέρχονται από λυκίσκο, φρούτα και άλλα φυτά που χρησιμοποιούνται στην ζυθοποιία, αποκόπτοντας ένα τμήμα σακχάρου από το άγλυκονιο (είναι η ένωση που απομένει μετά την αντικατάσταση της

ομάδας γλυκοζυλίου σε ένα γλυκοσίδιο από ένα άτομο υδρογόνου). Το ελεύθερο αγλυκόνιο μπορεί να εμφανίσει μια αρωματική δραστηριότητα σε αυτή την κατάσταση και αντιπροσωπεύει μια σε μεγάλο βαθμό αναξιοποίητη πηγή αρώματος στην μύρα (Daenen et al., 2008).

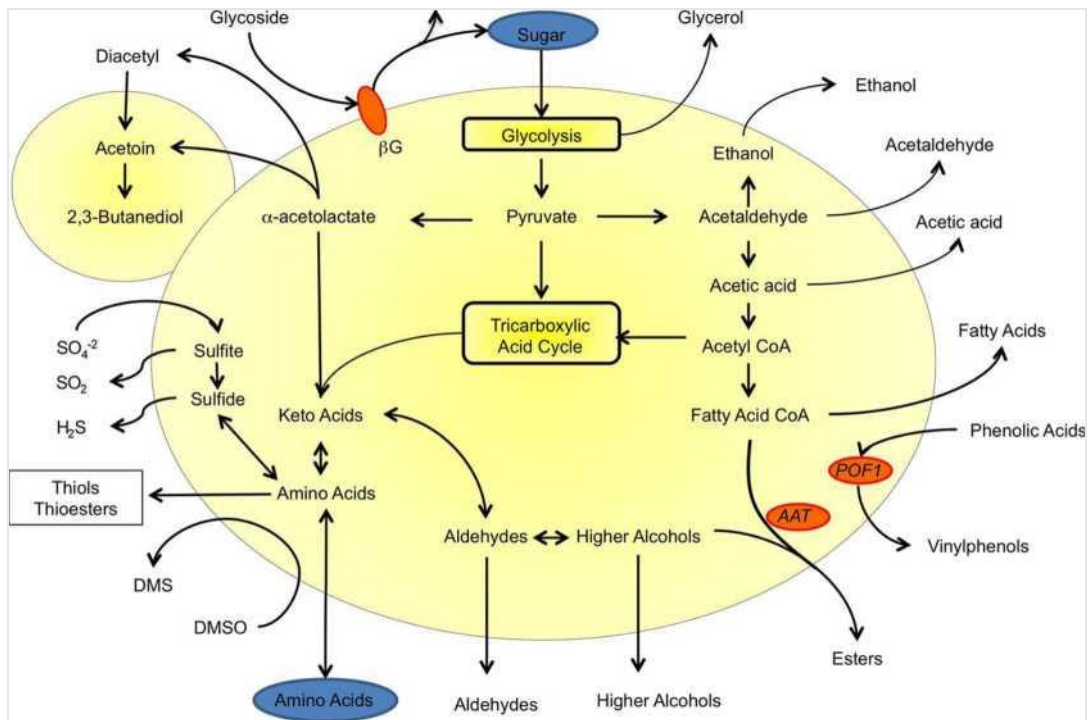
Η παραγωγή SO<sub>2</sub> από τη μαγιά είναι σημαντική για την άμεση συνεισφορά του στο άρωμα και επίσης λόγω του ρόλου του στην προστασία από την αλλοίωση της γεύσης. Το διμεθυλοσουλφίδιο (DMS) συχνά συμβάλλει σημαντικά στον χαρακτήρα των lager, το μεγαλύτερο μέρος του DMS προέρχεται από τη θερμική αποικοδόμηση ενός προδρόμου που προέρχεται από βύνη, ορισμένα στελέχη ζύμης είναι ικανά να μειώσουν το διμεθυλοσουλφοξείδιο που προέρχεται από τη βύνη (Bokulichn και Bamforth, 2013).

Η παραγωγή αλκοολών εκτός της αιθανόλης συνδέεται με την πρόσληψη αζώτου από τη ζύμη. Η μαγιά απαιτεί άζωτο (με τη μορφή αμινοξέων που εξάγονται από τη βύνη) για να παράγει πρωτεΐνη και άλλα αζωτούχα κυτταρικά συστατικά. Παραδείγματα ανώτερων αλκοολών που σχηματίζονται ως παραπροϊόντα του μεταβολισμού του αζώτου είναι η προπανόλη, η ισοβουτανόλη και η ισοαμυλική αλκοόλη. Οι ελλείψεις σε κρίσιμα αμινοξέα μπορούν να οδηγήσουν στην ανάπτυξη δυσάρεστων γεύσεων όπως το διακετύλιο (2,3-βουτανοδιόνη), μια βουτυρώδη γεύση που τείνει να παράγεται εάν τα επίπεδα βαλίνης είναι χαμηλά στο μούστο. Αυτή η γεύση μπορεί να αποφευχθεί επιτρέποντας στην μύρα επαρκή χρόνο ωρίμανσης μετά την ολοκλήρωση της ζύμωσης (Campbell, 2017).

### **2.3.1 Μεταβολισμός σακχάρου**

Υπάρχουν πέντε σάκχαρα που μπορεί να υπάρχουν στο γλεύκος, τα οποία χρησιμοποιούνται εύκολα από την τυπική μαγιά μύρας στη ζύμωση η γλυκόζη, η φρουκτόζη, η σακχαρόζη, η μαλτόζη και η μαλτοτριόζη. Αυτά τα σάκχαρα είναι η κύρια πηγή ενώσεων άνθρακα για όλα τα δομικά υλικά των κυττάρων ζύμης. Τα σάκχαρα προσλαμβάνονται πάντα από τη μαγιά με την ίδια σειρά. πρώτα γλυκόζη, φρουκτόζη και σακχαρόζη μετά μαλτόζη και τέλος μαλτοτριόζη. Η σακχαρόζη υδρολύεται από το ένζυμο ινβερτάση στο κυτταρικό τοίχωμα της ζύμης και διασπάται σε ένα μόριο γλυκόζης και ένα μόριο φρουκτόζης, τα οποία αμφότερα μπορούν να αφομοιωθούν στη γλυκολυτική οδό. Τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για τη μεταφορά

της μαλτόζης και της μαλτοτριόζης μέσω της κυτταρικής μεμβράνης της ζύμης (περμεάσες) «μπλοκάρονται» από την παρουσία των απλούστερων μονοσακχαριτών και έτσι η πρόσληψή τους καθυστερεί. Μόλις εισέλθουν στο κύτταρο ζυμομύκητα, τόσο η μαλτόζη όσο και η μαλτοτριόζη μετατρέπονται σε γλυκόζη από το ένζυμο «μαλτάση» (Campbell, 2017). Ακολουθεί μια απλοποιημένη σχηματική περίληψη των κύριων μεταβολικών οδών που συνδέονται με τη διαμόρφωση της γεύσης της μπίρας από το *Saccharomyces*.



Σχήμα 4: Επισκόπηση των μεταβολικών δραστηριοτήτων του *Saccharomyces* που επηρεάζουν την ποιότητα της μπίρας. (Πηγή: Bokulichn και Bamforth, 2013)

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup>: ΤΟ ΑΖΩΤΟ ΣΤΗΝ ΖΥΘΟΠΟΙΑ

Η παλαιότερη γραπτή αναφορά της ζυθοποιίας χρονολογείται την εποχή της Μεσοποταμίας (Hornsey, 2007). Ωστόσο, η κατανόησή της διαδικασίας είναι σχετικά πρόσφατη, ξεκινώντας από τις παρατηρήσεις με μικροσκόπιο του Leeuwenhoek τον 17ο αιώνα και το έργο των Lavoisier, Gay-Lussac, Schwann και άλλων κατά τον 18ο και 19ο αιώνα. Μόλις στα τέλη του 19ου αιώνα ο Pasteur απέδειξε ότι τα ποτά που έχουν υποστεί ζύμωση προκύπτουν από τη δράση της μετατροπής της γλυκόζης (και άλλων σακχάρων) σε αιθανόλη από ζωντανή μαγιά. Από τότε, οι γνώσεις γύρω από το



θέμα έχουν επεκταθεί εκθετικά, ιδιαίτερα με την ανάπτυξη των τεχνικών μοριακής βιολογίας (Stewart et al., 2013).

Στις παρακάτω ενότητες χρησιμοποιείται ένας αριθμός όρων για τον ορισμό των αζωτούχων συστατικών του ζυθογλεύκου. Το ελεύθερο αμινο άζωτο (FAN)<sup>4</sup> είναι ένα μέτρο των ενώσεων αζώτου που μπορούν να αφομοιωθούν ή να μεταβολιστούν από τη μαγιά κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Αυτές περιλαμβάνουν μεμονωμένα άλφα αμινοξέα ζυθογλεύκου (με εξαίρεση την προλίνη, η οποία δεν είναι α-αμινοξύ), αμμωνία και μικρά πεπτίδια. Άλλοι όροι για το FAN είναι Πρωτεΐον αμινο άζωτο (PAN)<sup>5</sup>, Ολικό χρησιμοποιήσιμο άζωτο ή χρησιμοποιήσιμο άζωτο. Το αφομοιώσιμο άζωτο ζύμης (YAN)<sup>6</sup> χρησιμοποιείται συνήθως στις μετρήσεις του γλεύκου κρασιού και είναι ένα μέτρο τόσο των ελεύθερων α-αμινοξέων όσο και της αμμωνίας.

### 3.1 ΠΗΓΕΣ ΑΖΩΤΟΥ

Η κυρίαρχη πρώτη ύλη για την παρασκευή μύρας και την απόσταξη είναι το βυνοποιημένο κριθάρι, με την προσθήκη σιταριού, καλαμποκιού, ρυζιού, βρώμης ή σόργου, που λειτουργούν ως συμπληρώματα. Η συνολική περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες των σπόρων δημητριακών, που είναι το κυρίαρχο μέρος που περιέχει άζωτο, ποικίλλει από περίπου 10 έως 15% του ξηρού βάρους του κόκκου (Mikola και Kolehmainen, 1972). Οι κόκκοι κριθαριού περιέχουν τέσσερις διακριτές κατηγορίες πρωτεϊνών:

- Αλβουμίνη
- Σφαιρίνη
- Προλαμίνη (ορδεΐνη)
- Γλουτελίνη

Οι πρωτεΐνες αποθήκευσης, η προλαμίνη και η γλουτελίνη, αντιπροσωπεύουν περίπου το 50% της συνολικής πρωτεΐνης σε ώριμους κόκκους δημητριακών. Με εξαίρεση τη βρώμη και το ρύζι, οι κύριες πρωτεΐνες αποθήκευσης ενδοσπερμίου όλων των κόκκων δημητριακών είναι οι προλαμίνες (Shewry και Halford, 2002). Οι προλαμίνες ποικίλλουν από 10 έως 100 kDa σε μοριακή μάζα και γενικά είναι σχετικά πλούσιες σε αμινοξέα προλίνη και αμιδικό άζωτο, που προέρχονται από γλουταμίνη (30-70% του

---

<sup>4</sup> Free Amino Nitrogen

<sup>5</sup> Primary Amino Nitrogen

<sup>6</sup> Yeast Assimilable Nitrogen

συνόλου), καθώς και από άλλα ειδικά αμινοξέα όπως ιστιδίνη, γλυκίνη, μεθειονίνη και φαινυλαλανίνη. Γενικά, οι προλαμίνες είναι ανεπαρκείς σε λυσίνη, θρεονίνη και τρυπτοφάνη (Folkes και Yemm, 1956). Οι προλαμίνες του καλαμποκιού, του σόργου και του κεχριού είναι πλούσιες σε μεθειονίνη, ενώ συγκεκριμένα οι προλαμίνες του καλαμποκιού είναι ιδιαίτερα χαμηλές σε τρυπτοφάνη.

Κατά τη διάρκεια της βυνοποίησης, η βλάστηση των κόκκων του κριθαριού ξεκινά με την πρόσληψη νερού (εμποτισμός). Η διαδικασία αυτή, προάγει την ανάπτυξη των ενζύμων που απαιτούνται για την τροποποίηση των αποθεμάτων αμύλου σε ζυμώσιμα σάκχαρα. Σε αυτό το στάδιο ενεργοποιούνται και τα πρωτεολυτικά ένζυμα. Η πρωτεόλυση είναι σημαντική κατά τη διάρκεια της βυνοποίησης επειδή η δεξαμενή διαλυτού αζώτου που απαιτείται για τη σύνθεση ενζύμων παράγεται όταν η πρωτεόλυση είναι η βέλτιστη (Agu, 2003). Η βέλτιστη πρωτεόλυση έχει ως αποτέλεσμα την αποδέσμευση ενζύμων της α-αμυλάσης, τα οποία απαιτούνται για την αποικοδόμηση του αμύλου.

Οι σπόροι κριθαριού που βλασταίνουν περιέχουν μια σειρά από πρωτεολυτικά ένζυμα, συμπεριλαμβανομένων τουλάχιστον 40 διαφορετικών ενδοπρωτεϊνών. Οι πιο υψηλές δραστηριότητες βρίσκονται στη στιβάδα αλευρόνης και στο ενδοσπέρμιο κατά τη βλάστηση (Burger και Schroeder, 1976). Το αμυλώδες ενδοσπέρμιο περιέχει περίπου τα δύο τρίτα του συνολικού αποθέματος πρωτεϊνών του κόκκου και το εσωτερικό του pH κατά τη βλάστηση είναι μεταξύ 5,0 και 5,2. Οι καρβοξυπεπτιδάσες είναι πολύ δραστικές σε αυτό το pH λόγω της υψηλής συγκέντρωσης τους στο ενδοσπέρμιο και κατέχουν κεντρικό ρόλο στην κινητοποίηση των εφεδρικών πρωτεϊνών κατά τη βλάστηση (Mikola και Kolehmainen, 1972). Οι υψηλές δραστηριότητες πεπτιδάσης εντός του τροποποιημένου σπόρου (scutellum) του κόκκου υποδηλώνουν ότι ορισμένα από τα προϊόντα υδρόλυσης απορροφώνται ως πεπτίδια και υδρολύονται περαιτέρω σε αμινοξέα σε αυτόν τον ιστό (Mikola και Kolehmainen, 1972). Ο Agu (2003) υποστηρίζει ότι η περιεκτικότητα σε άζωτο της βύνης κριθαριού συνδέεται τόσο με την παραγωγή ενζύμων κατά τη διάρκεια της βυνοποίησης όσο και με τους υδατάνθρακες/διαλυτό άζωτο που υπάρχει στο ζυθογλεύκος όταν το βυνοποιημένο κριθάρι πολτοποιείται. Υπολογίζεται ότι έως και το 70% του FAN του ζυθογλεύκους παράγεται κατά τη βυνοποίηση (Burger και Schroeder, 1976). Γενικά, τα κριθάρια με υψηλότερη περιεκτικότητα σε άζωτο παράγουν εκχυλίσματα που είναι πλούσια σε FAN (Agu, 2003). Αντίθετα, τα κριθάρια με χαμηλή περιεκτικότητα σε

αζώτο παράγουν εκχυλίσματα που είναι πλούσια σε υδατάνθρακες. Αν και τα επίπεδα αζώτου ποικίλλουν ανάλογα με την ποικιλία των κόκκων, οι συνολικοί τύποι αμινοξέων που υπάρχουν είναι παρόμοιοι.

Η χρήση του σόργου στην ζυθοποιία έχει ερευνηθεί εκτενώς τα τελευταία 30 χρόνια. Όπως περιγράφηκε παραπάνω, το FAN προέρχεται σε μεγάλο βαθμό από τη διάσπαση των πρωτεϊνών του ενδοσπερμίου κατά τη διάρκεια της βυνοποίησης (Folkes και Yemm, 1958). Ωστόσο, όταν το σόργο βυνοποιείται, μεγάλο μέρος του αζώτου στον πυρήνα μεταφέρεται στις ρίζες και τους βλαστούς. Ο Taylor (1983) έδειξε ότι, όπως και με το κριθάρι, οι προλαμίνες είναι η κύρια ομάδα πρωτεϊνών αποθήκευσης. Ωστόσο, η σύνθεση FAN των βυνοποιημένων κόκκων διαφέρει σημαντικά. Το βυνοποιημένο κριθάρι είναι πολύ πιο πλούσιο σε προλίνη, ενώ τα δύο πιο σημαντικά ελεύθερα αμινοξέα στη βύνη του σόργου είναι η ασπαραγίνη και η γλουταμίνη. Όσον αφορά τη διατροφή της ζύμης, η βύνη σόργου έχει υψηλότερο ποσοστό άμεσα αφομοιώσιμων αμινοξέων από τη βύνη κριθαριού και άλλα δημητριακά όπως το σιτάρι (Jones και Ingledew, 1994).

### **3.2 ΑΖΩΤΟ ΖΥΘΟΓΛΕΥΚΟΥΣ**

Μετά τη βυνοποίηση, το επόμενο στάδιο στη διαδικασία παρασκευής είναι η πολτοποίηση, μια διαδικασία κατά την οποία τα ένζυμα της βύνης (ή/και εξωγενή) διασπούν (υδρολύουν) τα άμυλα των δημητριακών σε ζυμώσιμα σάκχαρα. Όπως περιγράφηκε παραπάνω, η πλειονότητα του FAN του ζυθογλεύκου παράγεται κατά τη διάρκεια της βυνοποίησης, ωστόσο, οι ενδοπρωτεΐνες δεν καταστρέφονται και, ως εκ τούτου, παραμένουν ενεργές κατά την πολτοποίηση (Barrett και Kirsop, 1971; Osman et al., 2002).. Οι θερμοκρασίες πολτοποίησης για βέλτιστη πρωτεολυτική δραστηριότητα ενζύμου είναι μεταξύ 40 και 50 °C με βέλτιστο pH 3,8 (Jones και Ingledew, 1994). Κατά την πολτοποίηση μπορεί να εξαχθεί περίπου το 20 με 30% του συνολικού FAN του ζυθογλεύκου (Lekkas, et al. (2014).

Η χρήση πρόσθετων δημητριακών, όπως κριθάρι μη βυνοποιημένο (όχι βύνη), ρύζι ή σιτάρι, μπορεί επίσης να επηρεάσει την εκχύλιση του διαλυτού αζώτου κατά την πολτοποίηση. Χρησιμοποιώντας μείγματα μη βυνοποιημένου κριθαριού και βύνης, παρατηρείται μείωση του FAN του ζυθογλεύκου, χωρίς επιπτώσεις στην εκχύλιση υδατανθράκων (Enari et al., 1964).

### 3.3 ΠΡΟΣΛΗΨΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΖΥΜΩΣΗ ΖΥΘΟΓΛΕΥΚΟΥΣ

Όταν η μαγιά τοποθετείται στο ζυθογλεύκος, εισάγεται σε ένα εξαιρετικά περίπλοκο χημικό περιβάλλον (Stewart et al., 2013). Το ζυθογλεύκος αποτελείται κυρίως από ζυμώσιμα σάκχαρα, συμπεριλαμβανομένης της φρουκτόζης, της σακχαρόζης, της γλυκόζης, της μαλτόζης και της μαλτοτριόζης, και τα υπόλοιπα συστατικά είναι δεξτρίνες, αζωτούχα υλικά, βιταμίνες, ιόντα, μεταλλικά άλατα και ιχνοστοιχεία (Bamforth, 2008). Το ζυθογλεύκος λειτουργεί τόσο ως μέσο ανάπτυξης νέων κυττάρων ζύμης όσο και ως μέσο ζύμωσης για την παραγωγή αιθανόλης, διοξειδίου του άνθρακα και άλλων μεταβολικών προϊόντων, πολλά από τα οποία επηρεάζουν τη γεύση της προκύπτουσας μύρας (Ferreira και Guido, 2018). Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, οι ζύμες ζυθοποιίας απαιτείται να προσαρμοστούν γρήγορα σε αυτό το πλούσιο, συμπυκνωμένο περιβάλλον, χρησιμοποιώντας το διαθέσιμο άζωτο για τη σύνθεση κυτταρικών πρωτεϊνών και άλλων κυτταρικών ενώσεων.

Περίπου το 10% του ξηρού βάρους της μαγιάς είναι άζωτο. Στο ζυθογλεύκος, η κύρια πηγή αζώτου για τη σύνθεση πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων και άλλων αζωτούχων κυτταρικών συστατικών είναι η ποικιλία αμινοξέων, πεπτιδίων, πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων και των προϊόντων αποδόμησής τους που σχηματίζονται από την πρωτεόλυση πρωτεϊνών κριθαριού που περιγράφηκαν παραπάνω. Το ζυθογλεύκος περιέχει 19 από τα 20 βασικά αμινοξέα και εικάζεται ότι περιέχει ως και 400 διπεπτίδια και πάνω από 8000 τριπεπτίδια, που αποτελούν πιθανές πηγές αζώτου (Griffinand, Macwilliam et al., 1969).

Κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1960, η Margaret Jones και ο John Pierce, που εργάζονταν στα Ερευνητικά Εργαστήρια της μύρας Guinness, διεξήγαγαν μελέτες σχετικά με το μεταβολισμό του αζώτου κατά τη διάρκεια της ζύμωσης (Jones και Pierce, 1964; Pierce, 1987). Το έργο τους έχει τεκμηριωθεί από έναν αριθμό πιο πρόσφατων μελετών που δείχνουν ότι η απορρόφηση και η χρήση εξωγενών αζωτούχων ενώσεων ζυθογλεύκους και η σύνθεσή τους ενδοκυτταρικά ελέγχονται από τρεις κύριους παράγοντες: (Lekkas et al., 2007; Stewart et al., 2013)

1. Τη συνολική συγκέντρωση του αφομοιώσιμου αζώτου του ζυθογλεύκους.
2. Τη συγκέντρωση μεμονωμένων αζωτούχων ενώσεων και την αναλογία τους.

3. Την ανταγωνιστική αναστολή της πρόσληψης αυτών των συστατικών (κυρίως αμινοξέων).

Οι Jones και Pierce (1964) καθιέρωσαν μια μοναδική ταξινόμηση των αμινοξέων σύμφωνα με τους ρυθμούς κατανάλωσής τους κατά τη διάρκεια τυπικών ζυμώσεων ζυθοποιίας μπίρας (Πίνακας 2).

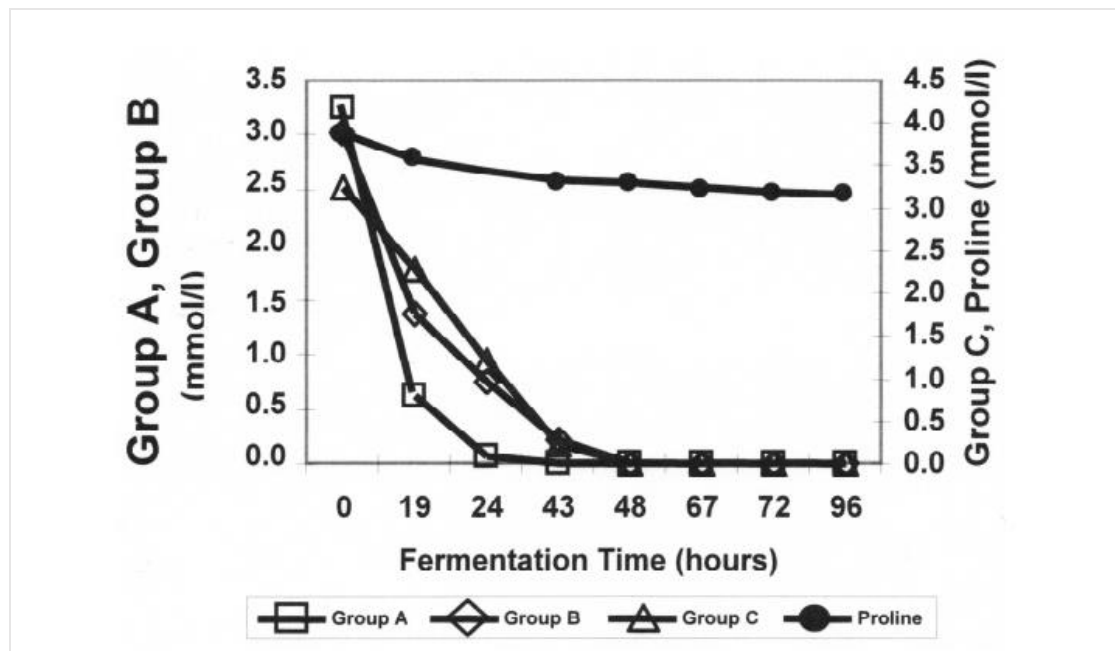
Πίνακας 2: Πρόσληψη αμινοξέων από γλεύκος. (Πηγή: Jones και Pierce, 1964)

Ομάδα Α	Ομάδα Β	Ομάδα Γ	Ομάδα Δ
<b>Γρήγορη απορρόφηση</b>	<b>Ενδιάμεση απορρόφηση</b>	<b>Αργή απορρόφηση</b>	<b>Ελάχιστη ή καθόλου απορρόφηση</b>
Γλουταμινικό			
Ασπαρτικό		Γλυκίνη	
Ασπαραγίνη	Βαλίνη	Φαινυλαλανίνη	
Γλουταμίνη	Μεθειονίνη	Τυροσίνη	
Σερίνη	Λευκίνη	Τρυπτοφάνη	Προλίνη
Θρεονίνη	Ισολευκίνη	Αλανίνη	
Λυσίνη	Ιστιδίνη	Αμμωνία	
Αργινίνη			

Οι Enari et al. (1964) πρότειναν κάποιες αλλαγές στις ομαδοποιήσεις που δίνονται στον Πίνακα 1 και οι Lekkas et al. (2014) συνιστούν να μετακινηθεί η πρόσληψη μεθειονίνης, λυσίνης και ισολευκίνης στην Ομάδα Α από την Ομάδα Β, αλλά το συνολικό μοτίβο πρόσληψης παραμένει αδιαμφισβήτητο (Σχήμα 5) .

Υπάρχουν τρεις τρόποι με τους οποίους η ζύμη μεταφέρει υλικά στο κύτταρο: διάχυση, διευκολυνόμενη διάχυση και ενεργή μεταφορά. Τόσο η διάχυση όσο και η διευκολυνόμενη διάχυση περιλαμβάνουν τη μετακίνηση μιας ουσίας κατά μήκος της πλασματικής μεμβράνης από υψηλή συγκέντρωση σε χαμηλότερη συγκέντρωση μέχρι να επιτευχθεί ισορροπία. Στην διευκολυνόμενη διάχυση, αυτή η κίνηση υποβοηθάτε από μια πρωτεΐνη, αλλά δεν απαιτεί ενέργεια. Στην ενεργό μεταφορά, η κίνηση κατά μήκος της πλασματικής μεμβράνης προκαλείται από πρωτεΐνες και γενικά απαιτεί ενέργεια. Χρησιμοποιώντας ενεργή μεταφορά, μια ουσία μπορεί να συσσωρευτεί έναντι μιας βαθμίδας συγκέντρωσης, συνήθως αυτή είναι η τυπική μέθοδος . Μια σειρά μηχανισμών μεταφοράς αμινοξέων έχει εντοπιστεί στο *Saccharomyces cerevisiae*, μια

γενική περμεάση αμινοξέων (GAP)<sup>7</sup> που βρίσκεται στην πλασματική μεμβράνη, καθώς και άλλες 19 περμεάσεις αμινοξέων που μεταφέρουν ειδική ή στενά συνδεδεμένη ομάδα αμινοξέων (Regenberg et al., 1999).



Σχήμα 5. Μεταβολή αμινοξέων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του ζυθογλεύκου. (Πηγή: Stewart et al., 2013)

Οι μηχανισμοί με τους οποίους οι ζυμομύκητες δρουν και ρυθμίζουν την πρόσληψη αμινοξέων και άλλων διαθέσιμων πηγών αζώτου είναι περίπλοκοι. Οι Magasanik και Kaiser (2002) συνόψισαν τον μεταβολισμό του αζώτου στο *S. cerevisiae* ως το αποτέλεσμα τριών διακριτών στοιχείων:

1. Των ενζύμων που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση και την αλληλομετατροπή των αζωτούχων ενώσεων.
2. Των περμεασών για την απορρόφηση του αζώτου.
3. Των παραγόντων μεταγραφής και των πρωτεϊνών διακίνησης μεμβράνης που ρυθμίζουν τη δραστηριότητα των ενζύμων και των περμεασών.

Για να αποτραπεί η πρόσληψη μη προκαθορισμένων πηγών αζώτου κατά την έναρξη της ζύμωσης, η μαγιά χρησιμοποιεί έναν μηχανισμό καταστολής ιόντων αζώτου. Η έκφραση των γονιδίων που ρυθμίζονται από το νιτρογονίδιο ενεργοποιείται από δύο μεταγραφικούς παράγοντες και η γλουταμίνη και το γλουταμικό χρησιμεύουν ως τα

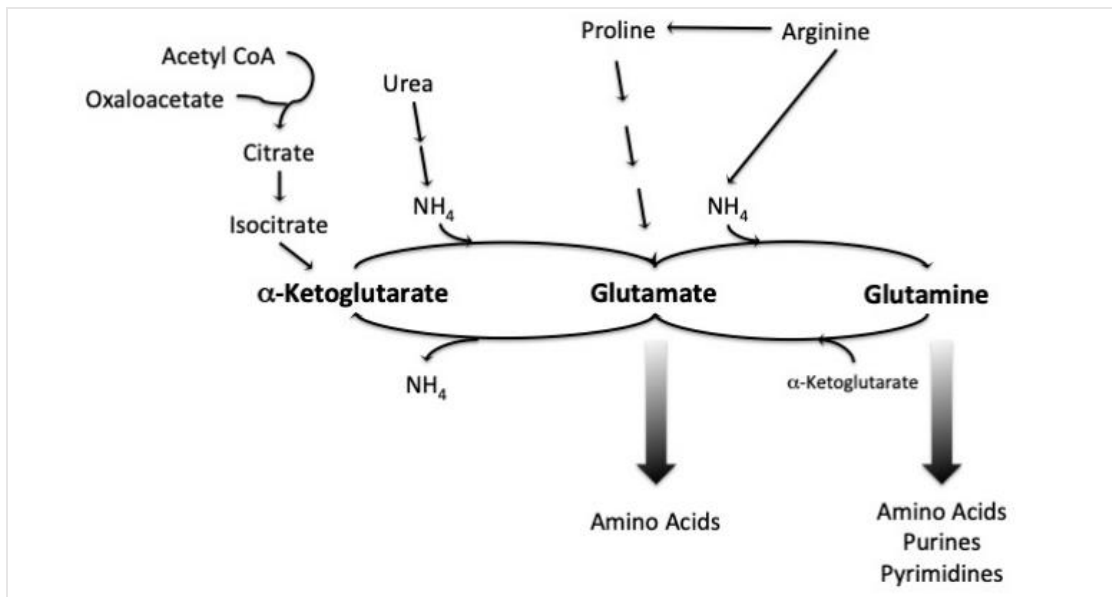
<sup>7</sup> General amino acid permease

ενδοκυτταρικά σήματα για την πρόληψη αυτής της ενεργοποίησης. Η παρουσία μιας προτιμώμενης πηγής αζώτου μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη δραστηριότητα άλλων περμεασών και, κατά συνέπεια, η επαγωγή των ειδικών οδών χρήσης του αζώτου θα μειωθεί (Stieger, 2007).

Το GAP αναστέλλεται από ιόντα αμμωνίου. Ως αποτέλεσμα, γίνεται ενεργό αργότερα στη ζύμωση όταν τα επίπεδα των ιόντων αμμωνίου μειώνονται. Η μεταφορά αμινοξέων αναστέλλεται έντονα από την αιθανόλη. Όταν μια σημαντική ποσότητα αιθανόλης παράγεται κατά τη ζύμωση, η μεμβράνη της μαγιάς γίνεται διαπερατή και επιτρέπει την εισροή πρωτονίων με διάχυση. Αυτά τα πλεονάζοντα πρωτόνια στο κύτταρο αφαιρούνται από μια αντλία πρωτονίων. Ωστόσο, για να αποφευχθεί η υπερφόρτωση της ικανότητας της αντλίας να εξάγει πρωτόνια, το κύτταρο μειώνει την πρόσληψη πρωτονίων και αμινοξέων.

Γενικά, η μαγιά προσλαμβάνει αμινοξέα σε σύντομο χρονικό διάστημα, κατά τη διάρκεια της ζύμωσης όταν η συγκέντρωση αιθανόλης είναι σχετικά χαμηλή. Επιπλέον, τα συσσωρεύει και τα αποθηκεύει σε κενοτόπια για μελλοντική χρήση όταν χρειάζονται για τη μεταβολική δραστηριότητα (Garrett, 2008). Αυτός ο μηχανισμός δίνει στη μαγιά ένα ανταγωνιστικό πλεονέκτημα, γιατί εξαντλεί τα θρεπτικά συστατικά από το μέσο, στερώντας τα από τους άλλους οργανισμούς.

Ο μεταβολισμός του αφομοιωμένου αμινοαζώτου εξαρτάται από τη φάση της ζύμωσης και από τη συνολική ποσότητα που παρέχεται στο ζυθογλεύκος. Η μαγιά μπορεί να συνθέσει τα περισσότερα από τα αμινοξέα που απαιτούνται για την κατασκευή κυτταρικών πρωτεϊνών χρησιμοποιώντας αμινοξέα ιόντων αμμωνίου και ζυθογλεύκους. Σε αυτή τη διαδικασία, ζωτικό ρόλο έχει το γλουταμικό, καθώς μπορεί να χρησιμεύσει ως δότης αμινομάδας για την παραγωγή διαφορετικών αμινοξέων. Η μαγιά μπορεί επίσης να αποικοδομήσει τα αμινοξέα για να αποκτήσει ιόντα αμμωνίου. Τα ιόντα αμμωνίου και το γλουταμικό χρησιμοποιούνται απευθείας στη βιοσύνθεση (Σχήμα 6) και γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιούνται ως πηγές αζώτου για την ανάπτυξη μαγιάς. Άλλες προτιμώμενες αζωτούχες ενώσεις είναι οι γλουταμίνη, αλανίνη, σερίνη, θρεονίνη, ασπαρτικό, ασπαραγίνη, αργινίνη και ουρία (Dharmadhikari, 2001) .



Σχήμα 6. Κεντρικές οδοί για την αξιοποίηση μιας ποικιλίας πηγών αζώτου. (Πηγή: Magasanik και Kaiser, 2002)

Η μη προτιμώμενη πηγή αζώτου που χρησιμοποιείται στις περισσότερες μελέτες για τη ρύθμιση του αζώτου είναι η προλίνη, η οποία αποδεικνύει την ταξινόμηση αυτού του αμινοξέος στην Ομάδα Δ (Πίνακας 2). Η πρόσληψη της προλίνης απαιτεί την παρουσία μιτοχονδριακής οξειδάσης. Άρα, σε αναερόβιες συνθήκες ζύμωσης ζυθογλεύκου, η μαγιά δεν μπορεί να χρησιμοποιήσει την προλίνη ως πηγή αζώτου. Ως αποτέλεσμα, η προλίνη είναι συνήθως ακόμα παρούσα στην μύρα σε ποσότητα 200-300 mg/L (Stewart, 2017).

Αν και η μαγιά μπορεί να χρησιμοποιήσει άμεσα μια σειρά αμινοξέων, συνήθως εμπλέκεται σε αντιδράσεις τρανσαμίνωσης και ένα σημαντικό ποσοστό των σκελετών αμινοξέων που βρίσκονται στη συνέχεια στις πρωτεΐνες της μαγιάς προέρχονται από σάκχαρα του ζυθογλεύκου. Για αυτόν τον λόγο, η συνολική περιεκτικότητα σε αμινοξέα του ζυθογλεύκου είναι σημαντική για τον προσδιορισμό της έκτασης της ανάπτυξης της μαγιάς, και όχι τόσο οι τύποι των αμινοξέων (Boulton, 1991).

### 3.4 ΠΡΟΣΛΗΨΗ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ

Το ισοζύγιο μάζας έχει καθορίσει ότι η απορρόφηση άλλων αζωτούχων συστατικών πρέπει να συνοδεύει την πρόσληψη αμινοξέων. Τα περισσότερα στελέχη μαγιάς καταναλώνουν πεπτίδια όχι μεγαλύτερα από τα τριπεπίδια. Η ανάλυση της πρόσληψης



των επισημασμένων με φθορισμό δι- και τρι-πεπτιδίων έδειξε ότι μοιράζονται το ίδιο σύστημα μεταφοράς στο *S. cerevisiae*. Δεν βρέθηκαν σημαντικές διαφορές στους ρυθμούς πρόσληψης πεπτιδίων από ένα στέλεχος άγριου τύπου και από έναν αριθμό μεταλλαγμένων με ανεπάρκεια περμεάσης αμινοξέων, αποδεικνύοντας ότι τα συστήματα μεταφοράς για τα πεπτίδια είναι ξεχωριστά από αυτά των αμινοξέων και δεν ανταγωνίζονται για την πρόσληψη από το κύτταρο. Μελέτες στελεχών μαγιάς lager και ale έδειξαν στη συνέχεια ότι μπορούν να χρησιμοποιούν ταυτόχρονα αμινοξέα και μικρά πεπτίδια ως πηγές αφομοιώσιμου αζώτου. Υποστηρίζεται ότι τα εξωκυτταρικά πρωτεολυτικά ένζυμα μαγιάς είναι υπεύθυνα για την αποικοδόμηση μεγαλύτερων πεπτιδίων ζυθογλεύκους σε μικρότερα μόρια, κατά τη διάρκεια της ζύμωσης για να παρέχουν στα κύτταρα μαγιάς περισσότερες διαθέσιμες αφομοιώσιμες πηγές αζώτου. Πιστεύεται ότι μόνο το 40% των συνολικών ολιγοπεπτιδίων που είναι διαθέσιμα στο ζυθογλεύκος χρησιμοποιούνται για τη μεταβολική δραστηριότητα του αζώτου και ότι το υπόλοιπο μπορεί να συμβάλει στην ανάπτυξη θολότητας (σύμπλοκα πολυπεπτιδίου- πολυφαινόλης) ή σταθερότητας του αφρού (Lekkas et al., 2009) .

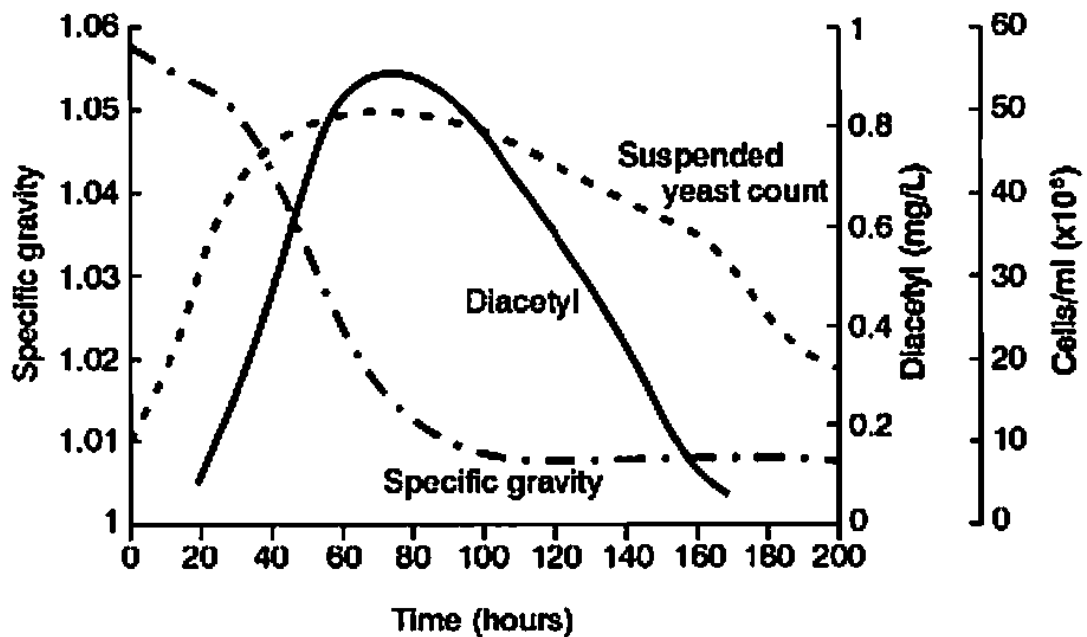
### **3.5 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΑΖΩΤΟΥ ΤΟΥ ΖΥΘΟΓΛΕΥΚΟΥΣ**

Το ελάχιστο FAN που απαιτείται για την επίτευξη ικανοποιητικής ανάπτυξης μαγιάς και απόδοσης ζύμωσης σε ζυθογλεύκος κανονικής βαρύτητας (10-12 ° P) έχει γίνει συχνά αντικείμενο συζήτησης. Ωστόσο, φαίνεται ότι το ελάχιστο απαιτούμενο είναι περίπου 130 mg FAN/L. Κάτω από 100 mg FAN/L, η ανάπτυξη μαγιάς εξαρτάται από το άζωτο και οι μη βέλτιστες συγκεντρώσεις διαθέσιμου αζώτου σχετίζονται με καθυστέρηση, ατελή ζύμωση . Στη στατική φάση της ανάπτυξης της μαγιάς, απαιτούνται μόνο χαμηλά επίπεδα αζώτου ως διεγερτικό ζύμωσης της μαγιάς, ενώ υψηλότερα επίπεδα απαιτούνται κατά τη φάση ανάπτυξης.

Τα βέλτιστα επίπεδα FAN διαφέρουν από ζύμωση σε ζύμωση και σχετίζονται επίσης με το στέλεχος της μαγιάς, τα επίπεδα σακχάρου του ζυθογλεύκους και τον τύπο του. Για τη ζύμωση κρασιού, η βέλτιστη συγκέντρωση αζώτου στο γλεύκος είναι 190 mg FAN/L, με παρόμοια επίπεδα (200-250 mg FAN/L) να θεωρούνται βέλτιστα για ζυμώσεις ζυθοποιίας τυπικής βαρύτητας. Υπάρχουν διαφορές μεταξύ των στελεχών ζύμης lager και ale σε σχέση με τα χαρακτηριστικά πρόσληψης αζώτου, που μπορούν να αφομοιωθούν με το ζυθογλεύκος. Ωστόσο, σε όλα τα στελέχη ζυθοποιίας, η

ποσότητα της περιεκτικότητας σε FAN ζυθογλεύκους που απαιτείται από τη μαγιά υπό κανονική ζύμωση ζυθοποιίας είναι ανάλογη με την ανάπτυξη της μαγιάς. Για ταχεία εξασθένιση του ζυθογλεύκους υψηλής βαρύτητας (16 °P), απαιτούνται αυξημένα επίπεδα FAN. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ταχύτερη αρχική ζύμωση. (Bely et al., 2003).

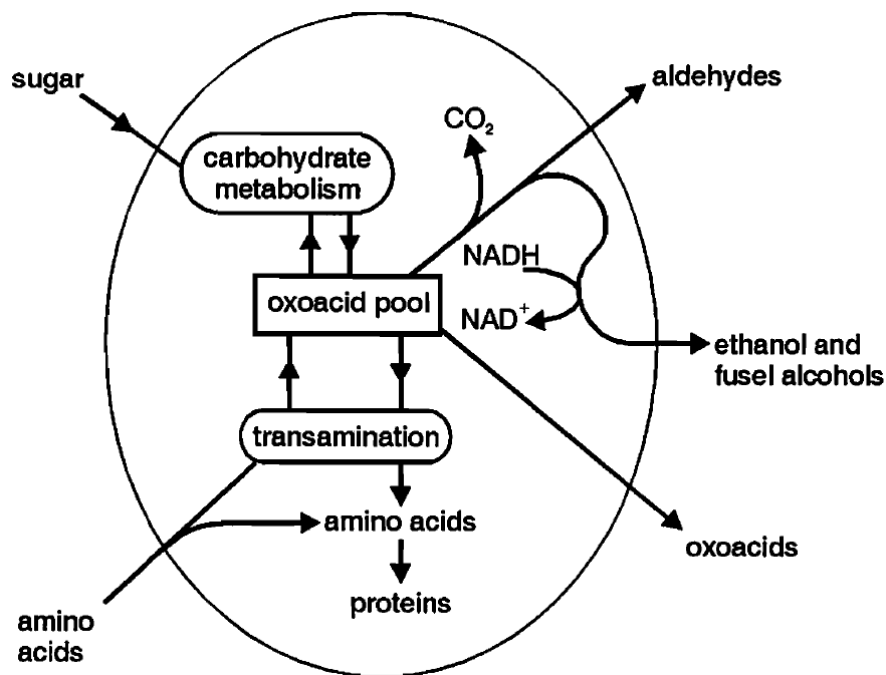
Τα αποτελέσματα της ζύμωσης υποδεικνύουν ότι το FAN της ζύμωσης συσχετίζεται με τουλάχιστον τρεις δείκτες απόδοσης ζύμωσης. Πρώτον, η υψηλή αρχική περιεκτικότητα σε FAN επιτρέπει μια πιο αποτελεσματική μείωση της βαρύτητας (°P) του ζυθογλεύκους. Δεύτερον, η μείωση του pH κατά τη ζύμωση είναι ανάλογη με την ποσότητα του FAN που χρησιμοποιείται. Τρίτον, η περιεκτικότητα σε FAN του ζυθογλεύκους είναι ένας χρήσιμος δείκτης για το σχηματισμό ολικών γειτονικών δικετονών, εστέρων και ανώτερων αλκοολών κατά τα τελευταία στάδια της ζύμωσης (Stewart et al., 2013).



Σχήμα 7. Μοτίβο σχηματισμού διακετυλίου και κατανομή σε σχέση με την ανάπτυξη ζύμης και τη βαρύτητα του ζυθογλεύκους. Πηγή: Βιβλίο An Introduction to BREWING SCIENCE & TECHNOLOGY Series III BREWER'S YEAST THE “IBD blue book on Yeast” σελ.52

Η επίδραση του FAN στον σχηματισμό γευστικών και αρωματικών ενώσεων κατά τη ζύμωση έχει μελετηθεί ευρέως, ιδιαίτερα κατά την παραγωγή κρασιού. Τόσο η αρχική

περιεκτικότητα σε FAN ζυθογλεύκους όσο και η ισορροπία αμινοξέων και ιόντων αμμωνίου στο μέσο επηρεάζουν το σχηματισμό εστέρων, αλδεϋδών, γειτονικών δικετονών, ανώτερων αλκοολών και οξέων, καθώς και ενώσεων θείου. Ακόμη και μικρές διαφορές στη σύνθεση του ζυθογλεύκους μπορούν να ασκήσουν σημαντικές επιπτώσεις στη γεύση της μύρας που προκύπτει. Η συγκέντρωση αζώτου έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει τουλάχιστον 23 ενώσεις στο κρασί. Τα λιπαρά οξέα διακλαδισμένης αλυσίδας και οι εστέρες τους συνδέονται με χαμηλές συγκεντρώσεις αζώτου, ενώ οι λιπαροί εστέρες μέσης αλυσίδας και το οξικό οξύ συνδέονται με υψηλές συγκεντρώσεις αζώτου. Στη ζυθοποιία, τα υπερβολικά επίπεδα FAN συνδέονται με την παραγωγή μη επιθυμητών γεύσεων όπως το διακετύλιο και οι ανώτερες αλκοόλες, της προπανόλης και της ισοβουτανόλης. Αντίθετα, κύτταρα που δεν έχουν FAN ή οξυγόνο παράγουν πολύ χαμηλά επίπεδα εστέρων (Carrau et al., 2010).



Σχήμα 8. Παραγωγή ανώτερων αλκοολών (προσαρμογή από Lewis and Young, Brewing, 1995).

Πηγή: Βιβλίο An Introduction to BREWING SCIENCE & TECHNOLOGY Series III BREWER'S YEAST THE "IBD blue book on Yeast" σελ.48

Η αναβολική οδός (μια βιοχημική διαδικασία που περιλαμβάνει τη σύνθεση οργανικών ενώσεων, συνήθως μια διαδικασία που χρησιμοποιεί ενέργεια) χρησιμοποιεί τις ίδιες

οδούς με αυτές που εμπλέκονται στην βιοσύνθεση αμινοξέων. Όπως και στην καταβολική οδό, το ενδιαμέσο του κετοξέος είναι η αποκαρβοξυλίωση και προκύπτει αλδεϋδη η οποία ανάγεται σε αλκοόλη. Η σχετική συνεισφορά των δύο οδών ποικίλλει ανάλογα με τις μεμονωμένες υψηλότερες αλκοόλες.

Δεδομένου ότι δεν υπάρχει αντίστοιχο αμινοξύ, η αναβολική οδός φαίνεται να είναι ο μόνος μηχανισμός σχηματισμού n-προπανόλης. Σε γενικές γραμμές, η καταβολική οδός φαίνεται να κυριαρχεί κατά την πρόιμη φάση ανάπτυξης όταν το αμινο άζωτο είναι άφθονο. Σε μεταγενέστερα στάδια όταν το γλεύκος παρουσιάζει έλλειψη αφομοιώσιμου αζώτου, η αναβολική οδός είναι πιθανώς η κύρια πηγή ανώτερων αλκοολών.

Η συνολική συγκέντρωση ανώτερων αλκοολών που παράγονται κατά τη ζύμωση σχετίζεται γραμμικά με τον βαθμό ανάπτυξης του ζυμομύκητα. Έτσι, συνθήκες που προάγουν την ανάπτυξη, όπως μια αυξημένη παροχή οξυγόνου, θα οδηγήσει σε αυξημένη παραγωγή ανώτερων αλκοολών. Ομοίως, η προσθήκη στο ζυθογλεύκος με επιπλέον αμινο άζωτο έχει επίσης ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ανώτερων αλκοολών.

Μια πιο προσεκτική εξέταση του σχηματισμού γεύσης αποκαλύπτει την επίδραση της σύνθεσης αμινοξέων του ζυθογλεύκους. Μια υποδιαίρεση των τάξεων που παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 2 μπορεί να γίνει με βάση την «ουσιαστική» φύση τους (Πίνακας 3).

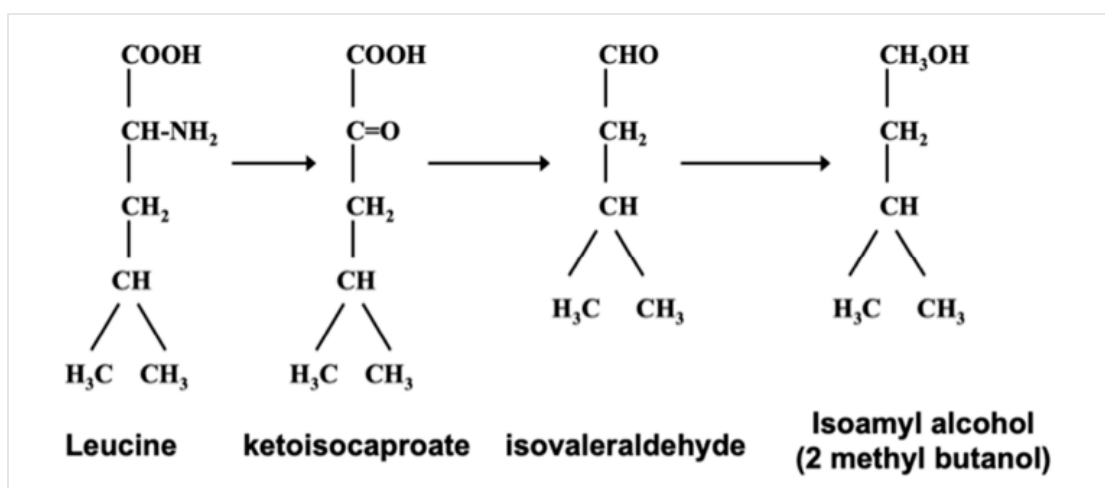
Η αρχική συγκέντρωση αμινοξέων Τάξης 1 θεωρείται σχετικά ασήμαντη, καθώς μπορεί να ενσωματωθούν απευθείας από το ζυθογλεύκος όταν είναι διαθέσιμο ή να συντεθούν από τον μεταβολισμό του σακχάρου και την τρανσαμίνωση σε μεταγενέστερη ζύμωση. Ωστόσο, οι ελλείψεις σε αμινοξέα Τάξης 2 και 3 έχουν σημαντικές επιπτώσεις στην ποιότητα της μύρας. Στα τελευταία στάδια της ζύμωσης, όταν εξαντληθεί η παροχή εξωγενών αμινοξέων, το τμήμα κετοξέος των αμινοξέων της Τάξεως 2 πρέπει να συντίθεται αποκλειστικά από σάκχαρα. Αυτή η διαδικασία σχηματισμού κετοξέος οδηγεί σε καρβονυλικά υποπροϊόντα, όπως το διακετύλιο, που προσδίδουν δυσάρεστες γεύσεις στην μύρα. Για τα αμινοξέα Κατηγορίας 3, η συνεισφορά της συνθετικής οδού σακχάρων είναι μικρή και η μαγιά εξαρτάται από επαρκή εξωγενή παροχή. Ως εκ τούτου, μια ανεπάρκεια σε αμινοξέα Τάξης 3 οδηγεί σε μεγάλες διαταραχές στο μεταβολισμό του αζώτου, με σημαντικές επιπτώσεις στη γεύση της μύρας (Pierce, 1987).

Πίνακας 3: Ταξινόμηση αμινοξέων με βάση την ουσιαστική τους φύση. From Pierce (1987)

Τάξη 1	Τάξη 2	Τάξη 3
Γλουταμινικό		
Ασπαρτικό	Βαλίνη	
Ασπαραγίνη	Ισολευκίνη	Λευκίνη
Σερίνη	Φαινυλαλανίνη	Ιστιδίνη
Θρεονίνη	Γλυκίνη	Λυσίνη
Μεθειονίνη	Τυροσίνη	Αργινίνη
Προλίνη		

### 3.6 ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΗ ΟΔΟΣ ERLICH

Έχει ήδη αναφερθεί ότι τα στελέχη μαγιάς της μύρας απορροφούν το φάσμα 19 αμινοξέων του ζυθογλεύκου μαζί με έναν αριθμό μικρών πεπτιδίων. Η ομάδα αμινοξέων αφαιρείται έτσι ώστε να μπορεί να ενσωματωθεί σε άλλα δομές. Αυτό που απομένει από τα αμινοξέα είναι α-κετοξέα που εισέρχονται σε μια μη αναστρέψιμη αντίδραση αποστράγγισης και τελικά θα σχηματίσουν ανώτερες αλκοόλες (Σχήμα 7) Αυτή είναι η μεταβολική οδός Erlich, η οποία οδήγησε σε μια διερεύνηση της σχέσης μεταξύ της ιοαμυλικής αλκοόλης με τη λευκίνη.



Σχήμα 9. Οδός Ehrlich, σχέση μεταξύ ανώτερων αλκοολών και αμινοξέων

Ο Erlich υποστήριξε επίσης ότι τα αμινοξέα υδρολύονται ενζυματικά για να σχηματίσουν την αντίστοιχη ανώτερη αλκοόλη, μαζί με την αμμωνία και το διοξείδιο του άνθρακα. Καθώς η αμμωνία δεν ανιχνεύθηκε στο μέσο αντίδρασης, έχει υποθεθεί

ότι ενσωματώθηκε απευθείας στις πρωτεΐνες. Στη συνέχεια, έχουν προταθεί ενδιάμεσα βήματα, που ολοκληρώνουν αυτό το μεταβολικό μονοπάτι. Επιπλέον, ανώτερες αλκοόλες σχηματίζονται επίσης κατά την ανάντη βιοσύνθεση των αμινοξέων (Hazelwood et al., 2008).

Ανώτερες Αλκοόλες είναι οι αλκοόλες με περισσότερα άτομα άνθρακα από την Αιθανόλη .( n-προπανόλη, ισοβουτανόλη, 2-μεθυλ-1-βουτανόλη και 3-μεθυλ-1-βουτανόλη κ.α. περίπου 40)

Οι αλκοόλες είναι πολύπλοκες αφού μπορούν να παραχθούν ως παραπροϊόντα του καταβολισμού αμινοξέων ή μέσω πυροσταφυλικού που προέρχεται από το μεταβολισμό των υδατανθράκων. Πηγή: Βιβλίο An Introduction to BREWING SCIENCE & TECHNOLOGY Series III BREWER'S YEAST THE "IBD blue book on Yeast" σελ.47.

Είναι προφανές ότι η σύνθεση αμινοαζώτου του ζυθογλεύκου έχει εκτεταμένες επιδράσεις στην απόδοση της ζύμωσης και στη γεύση της μύρας. Άλλες συνέπειες του υπερβολικού FAN στην μύρα περιλαμβάνουν προβλήματα στη θολότητα της μύρας και στη μικροβιολογική σταθερότητα. Στις περιπτώσεις, όπου η βύνη χρησιμοποιείται ως η κύρια πηγή ζυμώσιμου εκχυλίσματος, η ποσότητα και η σύνθεση των αμινοξέων είναι τέτοια που αυτά τα προβλήματα δεν υπάρχουν. Ωστόσο, πρέπει να δίνεται προσοχή όταν χρησιμοποιούνται πρόσθετα (adjuncts), τα περισσότερα από τα οποία είναι ανεπαρκή σε αμινο άζωτο.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup>: ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΑΖΩΤΟΥ ΣΤΗΝ ΜΠΥΡΑ**

Τι χρειάζεται για να ολοκληρωθεί η αλκοολική ζύμωση ;

Θεμελιώδη Συστατικά :

1. Πηγές Άνθρακα  
(σάκχαρα)
2. Πηγές Αζώτου (θρεπτικά  
συστατικά)

Δευτερεύοντα Συστατικά:

1. Ανόργανα άλατα
2. Βιταμίνες
3. Διαλυμένο Οξυγόνο
4. Άλλα διαλυμένα αέρια
5. Σωστό pH
6. Σωστή Θερμοκρασία

Πηγές Αζώτου :

Ανόργανο Άζωτο με την μορφή Αμμωνίου  $\text{NH}_4^+$

Οργανικό Άζωτο με δύο διαφορετικούς όρους :

Ελεύθερο Αμινο Άζωτο Free Amino Nitrogen (FAN) και σαν

Πρωτεύον Αμινο Άζωτο Primary Amino Nitrogen (PAN)

Οι δύο παραπάνω μορφές (FAN) και (PAN) είναι ακριβώς οι ίδιες.

#### **4.1 Επίσημες μεθοδολογίες που σχετίζονται με τις μετρήσεις του Αζώτου σύμφωνα με την ANALYTICA EBC με την κωδικοποίηση τους.**

##### **4.3.1 - Ολικό άζωτο βύνης: Μέθοδος Kjeldahl (IM)**

Προσδιορισμός της συνολικής περιεκτικότητας σε άζωτο της βύνης με διαδικασία Kjeldahl.

Είναι απαραίτητο να χρησιμοποιήσετε τη μέθοδο EBC 3.3.1

##### **4.3.2 - Ολικό άζωτο βύνης: Μέθοδος καύσης Dumas**

Προσδιορισμός της συνολικής περιεκτικότητας σε άζωτο της βύνης με μέθοδο καύσης με βάση την αρχή Dumas.

Είναι απαραίτητο να χρησιμοποιήσετε τη μέθοδο EBC 3.3.2

##### **4.9.1 - Διαλυτό άζωτο βύνης: Μέθοδος Kjeldahl**

Ο προσδιορισμός της συνολικής περιεκτικότητας σε άζωτο του  $\text{wom}$ , που παρασκευάστηκε κατά τη διάρκεια της ανάλυσης βύνης, με μια διαδικασία Kjeldahl.

Είναι απαραίτητο να χρησιμοποιήσετε τις μεθόδους EBC 3.3.1 και 4.5.1

##### **4.9.2 - Διαλυτό άζωτο βύνης: Φασματοφωτομετρική μέθοδος**

Ο προσδιορισμός του διαλυτού αζώτου σε γλεύκος πριν την προσθήκη του λυκίσκου με φασματοφωτομετρία.

Είναι απαραίτητο να χρησιμοποιήσετε τις μεθόδους EBC 1.2, 4.9.1, 4.2 και 4.5.1

#### **4.9.3 - Διαλυτό άζωτο βύνης: Μέθοδος καύσης Dumas**

Ο προσδιορισμός της συνολικής περιεκτικότητας σε άζωτο στο γλεύκος, που παρασκευάστηκε κατά τη διάρκεια της ανάλυσης βύνης, με τη μέθοδο καύσης Dumas. Περιγράφεις: υπολογίστε την περιεκτικότητα σε διαλυτό άζωτο ως ποσοστό ξηρής βύνης. Είναι απαραίτητο να χρησιμοποιήσετε τις μεθόδους EBC 4.2,

#### **4.5.1 ή 4.64.10 - Ελεύθερο αμινο άζωτο βύνης με φασματοφωτομετρία**

Προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε ελεύθερο αμινο άζωτο της βύνης με χρήση χρωματομετρίας με νινυδρίνη. Η μέθοδος δίνει μια εκτίμηση των αμινοξέων, της αμμωνίας και, επιπλέον, των τερματικών ομάδων αζώτου των πεπτιδίων και των πρωτεϊνών. Η προλίνη υπολογίζεται εν μέρει στο μήκος κύματος που χρησιμοποιείται. Η μέθοδος δεν είναι ειδική για το α-αμινο άζωτο δεδομένου ότι το γ-αμινο βουτυρικό οξύ, το οποίο υπάρχει στο βύνη, δίνει επίσης μια χρωματική αντίδραση με τη νινυδρίνη.

Είναι απαραίτητο να χρησιμοποιήσετε τις μεθόδους EBC 4.5.1 ή 4.6.1 και 8.10

#### **8.9.1 - Ολικό άζωτο σε γλεύκος: Μέθοδος Kjeldahl**

Προσδιορισμός της συνολικής περιεκτικότητας του γλεύκους σε άζωτο με διαδικασία Kjeldahl.

Είναι απαραίτητο να χρησιμοποιήσετε τη μέθοδο EBC 3.3.1

#### **8.9.2 - Ολικό άζωτο σε γλεύκος: Μέθοδος καύσης Dumas**

Προσδιορισμός της συνολικής περιεκτικότητας σε άζωτο στο γλεύκος, με τη μέθοδο της καύσης Dumas.

Είναι απαραίτητο να χρησιμοποιήσετε τη μέθοδο EBC 9.9.2

#### **8.10.1 Ελεύθερο άμινο άζωτο σε γλεύκος με φασματοφωτομετρία - Μη αυτόματη μέθοδος (IM)**

Προσδιορισμός της περιεκτικότητας του γλεύκους σε ελεύθερο αμινο άζωτο χρησιμοποιώντας χρωματομετρία με νινυδρίνη. Η μέθοδος δίνει μια εκτίμηση των αμινοξέων, της αμμωνίας και, επιπλέον, των τερματικών α-αμινο αζωτούχων ομάδων πεπτιδίων και πρωτεϊνών. Η προλίνη υπολογίζεται εν μέρει στο μήκος κύματος που



χρησιμοποιείται. Η μέθοδος δεν είναι ειδική για το α-αμινο άζωτο αφού το γ-βουτυρικό οξύ που υπάρχει στο γλεύκος δίνει μια χρωματική αντίδραση με τη νινυδρίνη.

#### **8.10.2 - Ελεύθερο αμινο άζωτο σε γλεύκος με ανάλυση τμηματικής ροής**

Προσδιορισμός της περιεκτικότητας του γλεύκους σε ελεύθερο αμινο άζωτο χρησιμοποιώντας χρωματομετρία με νινυδρίνη. Η μέθοδος δίνει μια εκτίμηση των αμινοξέων, της αμμωνίας και, επιπλέον, των τερματικών α-αμινο αζωτούχων ομάδων πεπτιδίων και πρωτεϊνών. Η προλίνη υπολογίζεται εν μέρει στο μήκος κύματος που χρησιμοποιείται. Η μέθοδος δεν είναι ειδική για το α-αμινο άζωτο αφού το γ-βουτυρικό οξύ που υπάρχει στο γλεύκος δίνει μια χρωματική αντίδραση με τη νινυδρίνη.

#### **8.10.3 Ελεύθερο αμινο άζωτο σε γλεύκος με αυτοματοποιημένη διακριτή ανάλυση (IM)**

Μέθοδος EBC 8.10.3 Ελεύθερο αμινο άζωτο σε γλεύκος με αυτοματοποιημένη διακριτή ανάλυση (IM) – 2021 επιτρέπει τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε ελεύθερο αμινο άζωτο στο γλεύκος χρησιμοποιώντας φωτομετρική μέτρηση του OPA (οΦθαλδιαλδεϋδη) και του NAC (N-ακετυλοκυστεΐνη). Η μέθοδος εκτελείται χειροκίνητα ή αυτόματα σε μήκος κύματος 340 nm σε θερμοκρασία 37 °C.

#### **9.9.1 - Ολικό άζωτο στην μύρα: Μέθοδος Kjeldahl**

Ο προσδιορισμός της συνολικής περιεκτικότητας σε άζωτο της μύρας με τη διαδικασία Kjeldahl.

Είναι απαραίτητο να χρησιμοποιήσετε τη μέθοδο EBC 3.3.1

#### **9.9.2 - Ολικό άζωτο στην μύρα: Μέθοδος καύσης Dumas**

Ο προσδιορισμός της συνολικής περιεκτικότητας σε άζωτο της μύρας, με τη μέθοδο της καύσης Dumas.

#### **9.10.1 - Ελεύθερο αμινο άζωτο σε μύρα με φασματοφωτομετρία (IM)**

Η διεθνής μέθοδος για τον προσδιορισμό του ελεύθερου αμινο αζώτου σε ανοιχτόχρωμες ή μαύρες μύρες. Η μέθοδος δίνει μια εκτίμηση των αμινοξέων, της αμμωνίας και, επιπλέον, των τερματικών α-αμινο αζωτούχων ομάδων πεπτιδίων και πρωτεϊνών. Η προλίνη υπολογίζεται εν μέρει στο μήκος κύματος που χρησιμοποιείται.

Είναι απαραίτητο να χρησιμοποιήσετε τη μέθοδο EBC 8.10

#### **9.10.2 - Ελεύθερο αμινο άζωτο σε μύρα με διακριτό αναλυτή (Μέθοδος NOPA)**

Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε ελεύθερο αμινο άζωτο στην μύρα χρησιμοποιώντας φωτομετρική μέτρηση OPA (ο-φθαλδιαλδεϋδη) και NAC (N-ακετυλοκυστεΐνη). Η μέθοδος εκτελείται χειροκίνητα ή αυτόματα σε μήκος κύματος 340 nm σε θερμοκρασία 37 °C. Στην αυτοματοποιημένη μέθοδο μετράται επίσης το δεύτερο μήκος κύματος των 700 ή 750 nm. Η μέθοδος υπολογίζει τα αμινοξέα μετρώντας τις τερματικές ομάδες α-αμινο αζώτου των πεπτιδίων και των πρωτεϊνών. **Η μέθοδος είναι ειδική για το α-αμινο άζωτο.** Δεν περιλαμβάνονται η προλίνη, η αμμωνία ή το αμμώνιο.

Πηγή: THE EUROPEAN REFERENCE ANALYTICAL METHODS  
<https://brewup.eu/ebcanalytica>

## **4.2 Επίσημες μεθοδολογίες που σχετίζονται με τις μετρήσεις του Αζώτου σύμφωνα με την AMERICAN SOCIETY OF BREWING CHEMISTS με την κωδικοποίηση τους.**

### **A. Μεθοδολογίες ζυθογλεύκους**

#### **Ζυθογλεύκος 10. Πρωτεΐνη**

Αυτή η μέθοδος προσδιορίζει την πρωτεΐνη (% κατά βάρος) με τη μέθοδο Kjeldahl και με καύση.

#### **Ζυθογλεύκος 12. Ελεύθερο αμινο άζωτο (Διεθνής μέθοδος)**

Αυτή η μέθοδος προσδιορίζει το ελεύθερο αμινο άζωτο (FAN) στο γλεύκος με τρεις μεθόδους: τη μέθοδο νινυδρίνης, την ανάλυση τμηματικής ροής και την αυτοματοποιημένη διακριτή ανάλυση. Η μέθοδος νινυδρίνης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της ποσότητας FAN στο γλεύκος ή στην μύρα για να παρέχει πληροφορίες σχετικά με την ποσότητα αμινοαζώτου που είναι διαθέσιμη στη ζύμη κατά τη διάρκεια της ζύμωσης ή την ποσότητα αμινοαζώτου που παραμένει στην μύρα μετά τη ζύμωση. Η μέθοδος μετρά τα αμινοξέα, την αμμωνία και, σε κάποιο

βαθμό, το γ-αμινο άζωτο της τελικής ομάδας σε πεπτίδια και πρωτεΐνες. **Η μέθοδος δεν είναι ειδική για το α-αμινο άζωτο καθώς το υ-αμινοβουτυρικό οξύ**, το οποίο υπάρχει τόσο στο μούστο όσο και στη μύρα. Η ανάλυση τμηματικής ροής είναι μια αυτοματοποιημένη διαδικασία που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό του FAN στο μούστο. Η συγκέντρωση FAN προσδιορίζεται με βάση την αντίδραση νινυδρίνης. Το δείγμα αραιώνεται και αναμιγνύεται με αντιδραστήριο νινυδρίνης, επωάζεται για καθορισμένο χρόνο και η απορρόφηση προσδιορίζεται στα 570 nm. Η συγκέντρωση του FAN στο δείγμα είναι ανάλογη με την απορρόφηση στα 570 nm. Η διαδικασία αυτοματοποιημένης διακριτής ανάλυσης για τον προσδιορισμό του FAN βασίζεται στην αντίδραση πρωτοταγών αμινών με ο-φθαλδιαλδεΐδη (OPA). Οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται στους 37°C και η ένταση της απορρόφησης μετράται στα 340 nm.

### **Ζυθογλεύκος 17. Πρωτεΐνη σε ζυθογλεύκος πριν την προσθήκη λυκίσκου με Φασματοφωτομετρία**

Η μέθοδος παρέχει ένα σχετικά απλό και γρήγορο μέσο μέτρησης της περιεκτικότητας σε διαλυτές πρωτεΐνες ζυθογλεύκους πριν την προσθήκη λυκίσκου με βάση τις διαφορετικές απορροφήσεις UV πρωτεΐνης στα 215 nm και 225 nm.

### **A. Μεθοδολογίες για την μύρα**

#### **Μύρα 11. Πρωτεΐνη**

Οι πρωτεΐνες της μύρας είναι εν μέρει υπεύθυνες για την καλή συγκράτηση του αφρού και τα επιθυμητά χαρακτηριστικά αίσθησης στο στόμα, αλλά είναι επίσης εν μέρει υπεύθυνες για την θολερότητα. Αυτή η μέθοδος προσδιορίζει την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη της μύρας (% κατά βάρος) με τη μέθοδο Kjeldahl, με κάυση και με φασματοφωτόμετρο.

#### **Μύρα 31. Ελεύθερο Αμινο Άζωτο (Διεθνής Μέθοδος)**

Η περιεκτικότητα σε ελεύθερο αμινο άζωτο (FAN) της τελικής μύρας αντανακλά πρωτίστως τη χρήση αμινο αζώτου χωρίς γλεύκος κατά τη ζύμωση. Η αξιολόγηση σε

διάφορα στάδια της ζύμωσης μπορεί επίσης να είναι χρήσιμη για την καταγραφή της προοδευτικής απώλειας. Αυτή η μέθοδος καθορίζει το FAN, mg/L, της τελικής μύρας.

#### **Μύρα 40. N-Νιτροζαμίνες**

Αυτή η μέθοδος προσδιορίζει τα επίπεδα N-νιτροζαμινών με απόσταξη (τα αποτελέσματα εκφράζονται σε mg/L) και με προσρόφηση σελίτη (τα αποτελέσματα εκφράζονται σε mg/kg).

Πηγή : ASBC Methods of Analysis

### **4.3 Επίσημες μεθοδολογίες που σχετίζονται με τις μετρήσεις του Αζώτου σύμφωνα με την ΜΕΒΑΚ με την κωδικοποίηση τους.**

#### 2.6 Ενώσεις Αζώτου 71

##### 2.6.1 Ολικό άζωτο 71

###### 2.6.1.1 Μέθοδος Kjeldahl (EBC) 71

###### 2.6.1.2 Μέθοδος καύσης σύμφωνα με τον Dumas (EBC) 74

##### 2.6.2 Πήσιμο άζωτο (πήξη θερμικής πρωτεΐνης) 76

##### 2.6.3 Κλασματοποίηση αζώτου 79

##### 2.6.4 Ενώσεις αζώτου χαμηλού μοριακού βάρους 84

###### 2.6.4.1 Ελεύθερο αμινο άζωτο (FAN) 84

###### 2.6.4.1.1 Μέθοδος νινυδρίνης (φωτομετρική, EBC) 84

###### 2.6.4.1.2 Προσδιορισμός αμινοξέων στο γλεύκος και την μύρα 87

###### 2.6.4.1.3 Αμίνες στο γλεύκος και στην μύρα 93

###### 2.6.4.2 Νιτροζαμίνες σε γλεύκος και μύρα 98

##### 2.6.5 Προλαμίνη σε μύρα (μέθοδος ELISA)

Πηγή : ΜΕΒΑΚ

#### **4.4 Μεθοδολογίες που σχετίζονται με τις μετρήσεις του Αζώτου από το Ερευνητικό Κέντρο Weihenstephan**

**για την παρασκευή και την ποιότητα των τροφίμων**

**Πολυτεχνείο του Μονάχου με την κωδικοποίηση τους και την τιμολόγηση τους .**

**23165 Ελεύθερο Αμινο Αζωτο (FAN), Μέθοδος Νινοδρίνης μεθοδολογία WBBM 2.6.4.1.1, Απαιτούμενη ποσότητα δείγματος : 50ml , Τιμή :79,00 €.**

**23175 Κλάσματα αζώτου Lundin, Απαιτούμενη ποσότητα δείγματος : 500ml, Τιμή : 98,00 €.**

**23180 Αζωτο με Θεικό Μαγνήσιο καθιζήσιμο, Μέθοδος: WBBM 2.6.3.1 , Απαιτούμενη ποσότητα δείγματος : 200ml, Τιμή : 58,00 €.**

**23181 Αζωτο χαμηλού μοριακού βάρους (P-Mo-καθιζήσιμο), Μέθοδος : WBBM 2.6.3.2, Απαιτούμενη ποσότητα δείγματος : 400ml, Τιμή : 58,00 €.**

**23190 Αζωτο κατακρημνιζόμενο με τανίνες , Μέθοδος :P-Sch III/B/14/b , Απαιτούμενη ποσότητα δείγματος : 400ml, Τιμή : 57,00 €.**

Πηγή: Price list 2017 Research Centre Weihenstephan for Brewing and Food Quality

#### **4.5. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΖΩΤΟΥΧΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΤΗΝ ΜΠΥΡΑ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ MIR**

Η ανάλυση των ενώσεων του αζώτου στην μπίρα δίνει σημαντικές πληροφορίες για τον ποιοτικό έλεγχο. Η φασματοσκοπία μεσαίας υπέρυθρης ακτινοβολίας (MIR)<sup>8</sup> με χρήση μικροπλακών σε συνδυασμό με μια μέθοδο χημειομετρικής αξιολόγησης επιτρέπει έναν εύκολο ποσοτικό προσδιορισμό του συνολικού διαλυμένου αζώτου, των ελεύθερων αμινο ενώσεων και των ενώσεων αζώτου υψηλού μοριακού βάρους. Η υψηλή απόδοση της μέτρησης και η έλλειψη πρόσθετων χημικών είναι περαιτέρω πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου.

---

<sup>8</sup> Mid-infrared spectroscopy

Οι ενώσεις του αζώτου, ιδιαίτερα οι πρωτεΐνες, τα πεπτίδια και τα ελεύθερα αμινοξέα παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία παρασκευής. Τα αμινοξέα και τα άλατα αμμωνίου, για παράδειγμα, είναι απαραίτητα για τη διαδικασία ζύμωσης καθώς αποτελούν την κύρια πηγή αζώτου για τη μαγιά. Η ικανότητα φιλτραρίσματος της μύρας εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη συγκέντρωση πρωτεΐνης υψηλού μοριακού βάρους. Οι ενώσεις αζώτου μεσαίου και ιδιαίτερα υψηλού μοριακού βάρους επηρεάζουν άμεσα τη σταθερότητα του αφρού, τη γεύση της μύρας και την κολλοειδή σταθερότητα (ποιότητα αποθήκευσης). Καθώς οι διάφορες ενώσεις αζώτου έχουν διαφορετικές επιδράσεις σε αυτά τα χαρακτηριστικά του προϊόντος, είναι απαραίτητο όχι μόνο να ποσοτικοποιηθεί η συνολική ποσότητα αζώτου, αλλά και οι συγκεντρώσεις των επιμέρους ομάδων ουσιών. Οι μέθοδοι προσδιορισμού των αζωτούχων ενώσεων στα αρχικά, ενδιάμεσα και τελικά προϊόντα της διαδικασίας ζυθοποιίας ορίζονται από τις αντίστοιχες ενώσεις ζυθοποιίας. Όλες αυτές οι μέθοδοι είναι εντατικές, χρονοβόρες και απαιτούν χημικές ουσίες που είναι εν μέρει επιβλαβείς ή τοξικές. Επιπλέον, αυτές οι μέθοδοι δεν επιτρέπουν μια ανάλυση που μπορεί να γίνει κατά τη διαδικασία παρασκευής.

#### **4.5.1 Φασματοσκοπία MIR και χημειομετρική αξιολόγηση**

Στη φασματοσκοπία MIR μπορούν να προσδιοριστούν τόσο η ποιοτική σύνθεση ενός δείγματος όσο και η συγκέντρωση μεμονωμένων συστατικών. Οι κλασικές μέθοδοι αξιολόγησης μετρούν τα φάσματα MIR με βάση τον νόμο Lambert-Beer χρησιμοποιώντας το ύψος ή την περιοχή μιας ζώνης που είναι για ένα συγκεκριμένο στοιχείο. Για την ανάλυση των φασμάτων IR που προκύπτουν από πολύπλοκα μείγματα πολλών ουσιών, αυτή η μέθοδος συχνά δεν μπορεί να εφαρμοστεί λόγω παρεμβολών. Επομένως πρέπει να εφαρμοστούν μέθοδοι χημειομετρικής αξιολόγησης όπως η μέθοδος της μερικής παλινδρόμησης ελαχίστων τετραγώνων (PLS)<sup>9</sup>.

Για τη βαθμονόμηση, οι τιμές συγκέντρωσης των αντιπροσωπευτικών δειγμάτων βαθμονόμησης πρέπει να προσδιορίζονται όσο το δυνατόν ακριβέστερα, χρησιμοποιώντας μια ανεξάρτητη μέθοδο αναφοράς. Στη συνέχεια, ο αλγόριθμος κάνει χρήση της μεθόδου των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS) και υπολογίζει ένα

---

<sup>9</sup> Partial Least Squares

μαθηματικό μοντέλο για τη σχέση μεταξύ των φασμάτων βαθμονόμησης και των τιμών αναφοράς. Μετά τη ρύθμιση, τη βελτιστοποίηση και την επικύρωση του μοντέλου, οι συγκεντρώσεις άγνωστων δειγμάτων μπορούν να προσδιοριστούν γρήγορα και εύκολα με βάση τα φάσματα τους. Η ακρίβεια των αποτελεσμάτων, εξαρτάται από την ακρίβεια της μεθόδου αναφοράς.

Πολλές ουσίες έχουν υψηλή απορροφητικότητα στην περιοχή μεσαίας υπέρυθρης ακτινοβολίας, έτσι ώστε, σύμφωνα με το νόμο Lambert-Beer, απαιτείται μόνο μια μικρή διαδρομή του δείγματος. Καθώς οι λωρίδες -OH του νερού επικαλύπτονται ευρέως με τις ζώνες άλλων συστατικών του δείγματος, η ανάλυση MIR των υδατικών δειγμάτων είναι δυνατή μόνο σε εξαιρετικά λεπτές κυψελίδες (< 10 mm.) ή μετά την αφαίρεση του νερού. Στη μικροπλάκα (Εικ.4) αυτό μπορεί να επιτευχθεί ξεραινώντας μερικά μικρολίτρα του δειγματικού υγρού σε μια θέση δείγματος. Το αποτέλεσμα είναι ένα λεπτό φιλμ των διαλυμένων συστατικών που μπορεί πλέον να μετρηθεί σε διαπερατότητα χρησιμοποιώντας τη φασματοσκοπία MIR. Ένα άλλο πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου μέτρησης είναι η υψηλή απόδοση δείγματος με τυπικά από 96 μέχρι και 384 μεμονωμένες μετρήσεις ανά μικροπλάκα.



Εικόνα 4: Μικροπλάκες πυριτίου για φασματογράφο IR · δομοστοιχείο μικροπλάκας IR HTS XT. (Πηγή: Boese και Eberl, 2013)

Στην εφαρμοσμένη έρευνα φασματοσκοπίας MIR και χημειομετρικής αξιολόγησης των (Boese και Eberl, 2013) το σετ δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκε περιλάμβανε 31

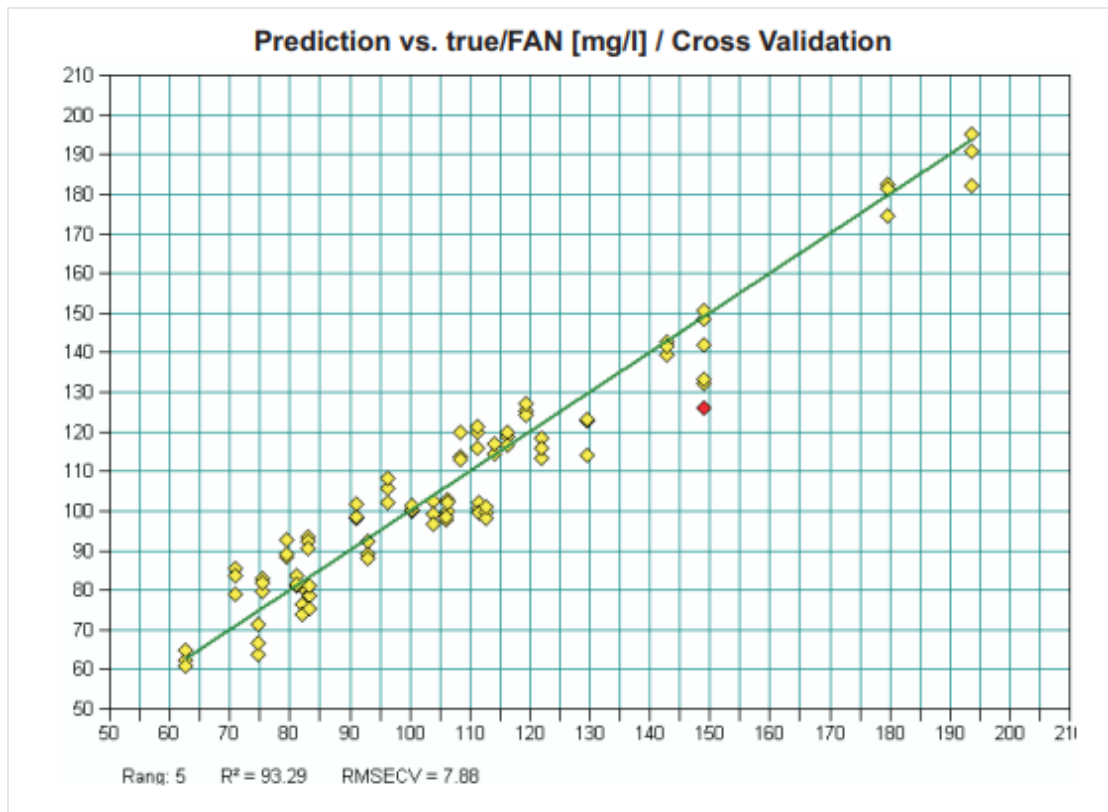
διαφορετικές μπύρες. Εκτός από 27 μπύρες Pilsener, το σετ δειγμάτων περιελάμβανε επίσης μια μπύρα χωρίς αλκοόλ και τρεις μαύρες μπίρες για δοκιμαστικούς σκοπούς.

Σύμφωνα με το MEBAK (Mittleuropäische Brautechnische Analyse-Kommission), όλα τα δείγματα αναλύθηκαν για FAN χρησιμοποιώντας τη φωτομετρική μέθοδο με νινυδρίνη για το ολικό άζωτο (TN) όσο και για το άζωτο υψηλού μοριακού βάρους (HMN) (άζωτο που κατακρημνίζεται μετά από επεξεργασία με θειικό μαγνήσιο) χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Kjeldahl. Οι προσδιορισμοί των μετρήσεων επαναλήφθηκαν δύο φορές και κατά τη διάρκεια της δοκιμής νινυδρίνης, επαναλήφθηκαν τρεις φορές. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης ήταν στην περιοχή από 63 μέχρι 194 mg/l για το FAN, 461 - 1434 mg/l για το TN και 83 - 185 mg/l για το HMN. Για να ελεγχθεί η αναπαραγωγιμότητα της μέτρησης αναφοράς, ένα δείγμα μπύρας αναλύθηκε πέντε φορές αποκαλύπτοντας μια σχετική τυπική απόκλιση 2,5 % για το FAN, 3,0 % για το TN και 1,0 % για το HMN.

Οι μετρήσεις MIR πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του αναγνώστη μικροτιτλοδοτήσεων HTS-XT της Bruker Optic συνδεδεμένο με φασματόμετρο TENSOR 27 FT-IR. Από κάθε δείγμα, 10 μl μεταφέρθηκαν με πιπέττα σε τρεις θέσεις δειγμάτων σε μικροτιτλοδότηση πυριτίου και επώαστηκαν για να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου (περίπου 15-20 λεπτά). Τα δεδομένα μέτρησης αξιολογήθηκαν χημειομετρικά χρησιμοποιώντας έναν αλγόριθμο PLS του λογισμικού OPUS/QUANT.

Λόγω του μικρού αριθμού δειγμάτων της έρευνας των Boese και Eberl, (2013) επιλέχθηκε η διασταυρούμενη επικύρωση για την επαλήθευση της βαθμονόμησης PLS. Στην διασταυρούμενη επικύρωση, ένα εκ των δειγμάτων αποκλείεται από το σύνολο δειγμάτων πριν ξεκινήσει η βαθμονόμηση. Τα υπόλοιπα δείγματα χρησιμοποιούνται για τη βαθμονόμηση του συστήματος. Στη συνέχεια, το εξαιρούμενο δείγμα (που θεωρείται ως άγνωστο δείγμα) χρησιμοποιείται για τον έλεγχο του χημειομετρικού μοντέλου. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται για όλα τα δείγματα. Στο Διάγραμμα 1, απεικονίζονται τα αποτελέσματα της διασταυρούμενης επικύρωσης για τα FAN σε γραφική παράσταση με τις αντίστοιχες τιμές αναφοράς. Ο Πίνακας 4 περιλαμβάνει τις αντίστοιχες στατιστικές παραμέτρους και για τις τρεις μετρούμενες συνιστώσες. Το μέσο σφάλμα πρόβλεψης είναι μεταξύ 5 - 7 %, αναφορικά με τη μέση τιμή των δεδομένων αναφοράς.





Διάγραμμα 1: Πρόβλεψη έναντι αληθινού/FAN [mg/l] / Διασταυρούμενη επικύρωση

Χρησιμοποιώντας τη φασματοσκοπία MIR και τις μεθόδους χημειομετρικής αξιολόγησης, η συγκέντρωση των διαφορετικών ενώσεων αζώτου στην μύρα μπορεί να προσδιοριστεί με ταχύτητα και ακρίβεια. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα αυτής της αναλυτικής μεθόδου είναι το γεγονός ότι η συγκέντρωση πολλών συστατικών όπως το ολικό άζωτο, το ελεύθερο αμινο άζωτο και το άζωτο υψηλού μοριακού βάρους μπορεί να προσδιοριστεί ταυτόχρονα με μία μόνο μέτρηση και χωρίς να απαιτούνται πρόσθετα χημικά αντιδραστήρια. Μπορεί να επιτευχθεί περαιτέρω βελτίωση αυτής της μεθόδου, συμπεριλαμβάνοντας περισσότερα δείγματα στο σετ βαθμονόμησης και διασφαλίζοντας καθορισμένες συνθήκες στεγνώματος.

Πίνακας 4: Αποτελέσματα του φασματοσκοπικού προσδιορισμού IR των αζωτούχων ενώσεων σε 31 μύρες.

Αναλυτική παράμετρος Αζώτου	Συγκέντρωση (mg/l)	R <sup>2</sup>	RMSECV (mg/l)
Ελεύθερο αμινο άζωτο	63-194	0,93	7,9
Άζωτο υψηλού μοριακού βάρους	83-285	0,91	11,4
Ολικό άζωτο	623-1434	0,94	44,0

Πηγή: Application

Note

AN

B408

[https://takimya.com/storage/pdf/AN\\_B408\\_Determination\\_Nitrogen\\_in\\_%20beer\\_EN.pdf](https://takimya.com/storage/pdf/AN_B408_Determination_Nitrogen_in_%20beer_EN.pdf)

#### 4.6 ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΛΕΥΘΕΡΟΥ ΑΜΙΝΟ ΑΖΩΤΟΥ (FAN) ΣΤΗΝ ΜΠΥΡΑ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΟ

Το ελεύθερο αμινο άζωτο (FAN) ορίζεται ως το άθροισμα των μεμονωμένων αμινοξέων, ιόντων αμμωνίου και μικρών πεπτιδίων (δι- και τριπεπίδια) στο μούστο. Το FAN είναι μία σημαντική παράμετρος των θρεπτικών συστατικών, οι οποίες αποτελούν το άζωτο που μπορεί να αφομοιώσει η μαγιά κατά τη ζύμωση της ζυθοποιίας. Το FAN είναι προϊόν αποικοδόμησης πρωτεΐνης σε πρώτες ύλες όπως βυνοποιημένο κριθάρι, σιτάρι, κριθάρι και σόργο. Ακόμη και αν η εξασθένηση των σακχάρων του μούστου συνεχιστεί κανονικά, η παραγωγή της ίδιας ποιότητας μύρας δεν είναι πάντα εγγυημένη, γεγονός που υποδηλώνει ότι η αφαίρεση του σακχάρου του μούστου από μόνη της δεν είναι καλός δείκτης απόδοσης της ζύμης. Ορισμένοι επιστήμονες ζυθοποιίας θεωρούν το FAN ως καλύτερο δείκτη για την πρόβλεψη της υγιούς ανάπτυξης ζύμης, της βιωσιμότητας, της ζωτικότητας, της αποτελεσματικότητας της ζύμωσης και ως εκ τούτου της ποιότητας και της σταθερότητας της μύρας. Τα σωστά επίπεδα FAN θα καθοριστούν χρησιμοποιώντας κατάλληλες βύνες και τη σωστή διαδικασία πολτοποίησης. Το επίπεδο του FAN καθορίζεται κυρίως από τον βαθμό στον οποίο τα πρωτεολυτικά ένζυμα είναι σε θέση να δράσουν. Το ίδιο το FAN παράγεται από το ένζυμο καρβοξυπεπτιδάση, ένα πολύ ανθεκτικό στη θερμότητα ένζυμο που υπάρχει σε άφθονες ποσότητες στις περισσότερες βύνες και συνεπώς

σπάνια είναι σε έλλειψη. Τα υποστρώματά του είναι τα πεπτίδια που παράγονται από τις πρωτεΐνες που καταλύουν την υδρόλυση των πρωτεϊνών αποθήκευσης εντός του κόκκου. Αυτά τα ένζυμα δρουν κυρίως κατά τη διάρκεια της βυνοποίησης, και επομένως είναι η έκταση της τροποποίησης πρωτεΐνης στη βύνη που καθορίζει πρωτίστως την ποσότητα FAN που θα αναπτυχθεί κατά την πολτοποίηση. Το άζωτο του μούστου χρησιμοποιείται από τη ζύμη για να επιτύχει τις μεταβολικές της δραστηριότητες, ιδιαίτερα τη σύνθεση νέων αμινοξέων και, ως εκ τούτου, πρωτεϊνών. Η πλειονότητα του FAN καταναλώνεται εντός των αρχικών 24-36 ωρών της ζύμωσης, μετά την οποία η ανάπτυξη της ζύμης γενικά σταματά. Ωστόσο, έχουν εντοπιστεί διαφορές στην πρόσληψη FAN μεταξύ των στελεχών ζύμης lager και ale. Η συγκέντρωση του FAN του μούστου που απαιτείται από τη μαγιά υπό κανονικές συνθήκες ζυθοποιίας είναι ευθέως ανάλογη με την ανάπτυξη της ζύμης και επηρεάζει την ωρίμανση της μύρας. Υπάρχει επίσης συσχέτιση μεταξύ των αρχικών επιπέδων FAN και της ποσότητας της παραγόμενης αιθανόλης. Βλέπε αιθανόλη. Το FAN χρησιμοποιείται επίσης από τα κύτταρα της ζύμης για την παραγωγή μιας σειράς μεταβολικών προϊόντων που επηρεάζουν τη γεύση και τη σταθερότητα της μύρας, συμπεριλαμβανομένων των υψηλότερων αλκοολών. Τα μούρα που παράγονται από ορισμένα πρόσθετα, όπως το σόργο, τείνουν να έχουν χαμηλό FAN και αυτή η ανεπάρκεια έχει αποδειχθεί ότι προκαλεί προβλήματα ζύμωσης.

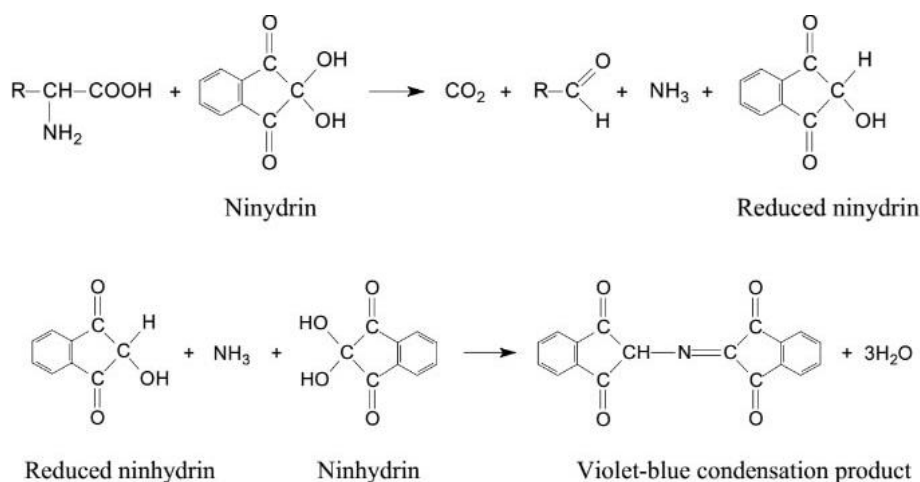
Πηγή: Graham G. Stewart <https://beerandbrewing.com/dictionary/o1j9KOtQ4v/> (The Oxford Companion to Beer definition of free amino nitrogen (FAN))

Οι τιμές (ποσότητα) του FAN υποδεικνύουν τη βιοδιαθεσιμότητα του αζώτου στην μύρα. Ως διαγνωστικό τεστ, οι χαμηλές ποσότητες FAN υποδεικνύουν αργή ή ατελή ζύμωση, ενώ οι υψηλές μετρήσεις FAN μπορεί να υποδεικνύουν προβλήματα θολότητας και/ή σχηματισμό διακετυλίου.

Πηγή: SHORT PROTOCOL No. 09 I June 2015, Jessica Geisler<sup>1</sup>, Natascha Weiß<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Eppendorf North America; <sup>2</sup>Eppendorf AG Free Amino Nitrogen (FAN) Measurement in Beer using an Eppendorf BioSpectrometer®

#### 4.6.1 Χημική αντίδραση:



Σχήμα 10 Χημική αντίδραση νινυδρίνης

Πηγή : Biocheminfo ninhydrin.

#### 4.6.2 Προετοιμασία της μέτρησης:

##### Αντιδραστήριο χρώματος Νινυδρίνης:

- Διάλυση 10g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5g νινυδρίνης και 0,3g φρουκτόζης σε συνολικά 100 mL απεσταγμένου νερού. Το pH πρέπει να είναι μεταξύ 6,6-6,8. Το μείγμα φυλάσσεται στο ψυγείο σε αδιαφανές δοχείο για 2 εβδομάδες.

##### Διάλυμα αραιώσης:

- Διάλυση 2g ιωδιούχου καλίου σε 600 mL απεσταγμένου νερού και στη συνέχεια προσθήκη 400 mL αιθανόλης 96 %.
- Παρασκευή διαλύματος γλυκίνης για τυπικό απόθεμα : Διάλυση 107,2 mg γλυκίνης σε συνολικό όγκο 100 mL απιονισμένου νερού το διάλυμα αυτό φυλάσσεται αυτό στους 0 °C.

##### Πρότυπο διάλυμα γλυκίνης:

- Αραίωση 1 mL του τυπικού αποθέματος γλυκίνης σε 99 mL απεσταγμένου νερού. Αυτό το πρότυπο διάλυμα πρέπει να περιέχει 2 mg/L αμινο άζωτο.

### 4.6.3 Πρωτόκολλο μέτρησης με φωτόμετρο

Ακολουθούν τα στάδια του πρωτοκόλλου της μέτρησης FAN στην μύρα με φασματόμετρο: Αραίωση 1 mL μύρας σε 49 mL (ή 1 mL γλεύκους σε 99 mL) απεσταγμένου νερού. Χρήση 50 mL απεσταγμένου νερού για την μέτρηση του τυφλού

1. Πραγματοποίηση ανάλυσης του δείγματος, του προτύπου διαλύματος και του τυφλού τρεις φορές.
2. Μεταφορά με σιφόνιο 2 mL του αραιωμένου δείγματος, του πρότυπου διαλύματος και του H<sub>2</sub>O, το καθένα σε χωριστούς δοκιμαστικούς σωλήνες.
3. Προσθήκη 1 mL Έγχρωμου Αντιδραστηρίου Νινυδρίνης και ανάδευση.
4. Χαλαρό κλείσιμο κάθε δοκιμαστικού σωλήνα για να υπάρχει μείωση της εξάτμισης. Επωάστε τα διαλύματα για 16 λεπτά στους 100 °C για 16 λεπτά.
5. Ψύξη των διαλυμάτων για 20 λεπτά στους 20 °C.
6. Προσθήκη 5 mL Διαλύματος Αραίωσης και μέτρηση εντός 30 λεπτών της απορρόφησης σε κυψελίδα 10 mm στα 570 nm στο απεσταγμένο νερό.
7. Στο φωτόμετρο, στην περιοχή MAIN GROUPS επιλογή ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ. Στην περιοχή ΥΠΟΟΜΑΔΕΣ επιλογή SINGLE λ. Στην περιοχή ΜΕΘΟΔΟΙ επιλογή SINGLE λ.
8. Επιλογή του πλήκτρου EDIT για αλλαγή των παραμέτρων:
  - a. Κυβέττα: 10 mm
  - b. Μήκος κύματος: 570 nm
9. Αποθήκευση των παραμέτρων πατώντας το προγραμματιζόμενο πλήκτρο SAVE.
10. Επιλογή του προγραμματιζόμενου πλήκτρου NEXT.
11. Πραγματοποιήστε την διαδικασία τυφλού (Blank) με την χρήση απεσταγμένου νερού.
12. Δείγματα ανάλυσης μεταφοράς (μύρα, πρότυπο γλυκίνης, H<sub>2</sub>O) στην κυβέττα τοποθέτηση της κυβέττας στον ίδιο προσανατολισμό με την κενή φιάλη και μέτρηση πατώντας το στρογγυλό πλήκτρο SAMPLE.

#### 4.6.4 Υπολογισμός του FAN

$$\text{Ελεύθερο αμινο άζωτο [mg/L]} = \frac{A_S - A_B - A_C}{A_G - A_B} \times 2 \times F$$

$A_S$  = μέση απορρόφηση του δείγματος

$A_G$  = μέση απορρόφηση του προτύπου διαλύματος γλυκίνης

$A_B$  = μέση απορρόφηση της τιμής (H<sub>2</sub>O) ?τυφλό

$A_C$  = μέση απορρόφηση της διόρθωσης για το ζυθογλεύκος και την μύρα

$F$  = συντελεστής αραίωσης του δείγματος

2 = συγκέντρωση του προτύπου διαλύματος γλυκίνης σε mg/L

Πηγή : SHORT PROTOCOL No. 09 I June 2015, Jessica Geisler<sup>1</sup>, Natascha Weiß<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Eppendorf North America; <sup>2</sup>Eppendorf AG Free Amino Nitrogen (FAN) Measurement in Beer using an Eppendorf BioSpectrometer®

### 4.7 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΖΩΤΟΥ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΣΤΗΝ ΜΠΥΡΑ ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ ΚΑΥΣΗΣ DUMAS

#### 4.7.1 Εισαγωγή

Η μύρα είναι το προϊόν της αλκοολικής ζύμωσης από μαγιά εκχυλισμάτων βύνης κριθαριού.

Η παραγωγή αλκοολών εκτός της αιθανόλης συνδέεται με την πρόσληψη αζώτου από τη ζύμη.

Η μαγιά χρειάζεται άζωτο για να παράγει πρωτεΐνες και άλλα αζωτούχα κυτταρικά συστατικά.

Για το λόγο αυτό, η παρακολούθηση της περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη κατά τη διαδικασία παρασκευής είναι σημαντική για να διασφαλιστεί η επιβίωση, η ανάπτυξη και η παραγωγικότητα της μαγιάς που χρησιμοποιείται για τη μετατροπή των σακχάρων σε αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα.

Επιπλέον, η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη είναι ένα σημαντικό κριτήριο για την αξιολόγηση της ποιότητας της μύρας: οι υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες κριθαριού παίζουν σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό, τη σταθερότητα και την υφή των αφρού κεφαλής.

Πηγή : APPLICATION NOTE F&F-D-001-2012/A3 VELP SCIENTIFICA

#### 4.7.2 Συνοπτική παρουσίαση αναλυτικού συστήματος NDA 701 Dumas Nitrogen Analyzer



**ermes enabled**

Εικόνα 5: Αναλυτής Αζώτου Dumas NDA 701

Πηγή : [www.velp.com](http://www.velp.com)

Η τέλεια λύση για να μεγιστοποιήσετε την παραγωγικότητά σας

Οι πλήρως αυτόματοι αναλυτές της σειράς NDA πραγματοποιούν ανάλυση σε 3-5 λεπτά. Η γρήγορη εκκίνηση και η λειτουργία <<stand-by>> εξασφαλίζουν γρήγορη ρύθμιση λειτουργίας με δυνατότητα δοκιμής διαρροής ανά ζώνη.

Ο LoGas™ TCD (Ανιχνευτής θερμικής αγωγιμότητας) που σχεδιάστηκε από τη VELP εγγυάται απαράμιλλη ακρίβεια με το ασυναγώνιστο LOD των 0.001 mgN και χαμηλή τυπική απόκλιση.

Οι αναλυτές της σειράς NDA είναι εξοπλισμένοι με τελευταίας χαρακτηριστικά ασφαλείας που διακόπτουν την ανάλυση σε περίπτωση παρατυπιών. Η άμεση ειδοποίηση και η απομακρυσμένη διακοπή μέσω της πλατφόρμας VELP Ermes Cloud διασφαλίζει ασφαλείς λειτουργίες χωρίς επίβλεψη.

Η πλήρως αυτόματη και αξιόπιστη μέθοδος καύσης της σειράς NDA μαζί με την παγίδα νερού DriStep™ εγγυώνται μέτριο κόστος. Η αυτόματη δειγματοληψία δίσκων 30 θέσεων με δυνατότητα επέκτασης με επιπλέον 3 δίσκους εξασφαλίζει μέγιστη παραγωγικότητα και χρόνο λειτουργίας.

Η σειρά NDA λειτουργεί με στερεά, υγρά και ζυμώσιμα δείγματα έως και 1 γραμμαρίου. Ομαλή επιλογή φέροντος αερίου μεταξύ ηλίου και αργού χωρίς αλλαγές υλικού και χωρίς εφέ μνήμης.

Οι στοιχειώδεις αναλυτές της σειράς NDA είναι εύχρηστοι και δεν απαιτούν εξειδικευμένο χειριστή. Το φιλικό προς το χρήστη λογισμικό DUMASoft™ και η σύνδεση VELP Ermes θα προσφέρουν μια νέα εμπειρία στον χειριστή και έξυπνες ροές εργασίας.



Εικόνα 6: DUMASoft™



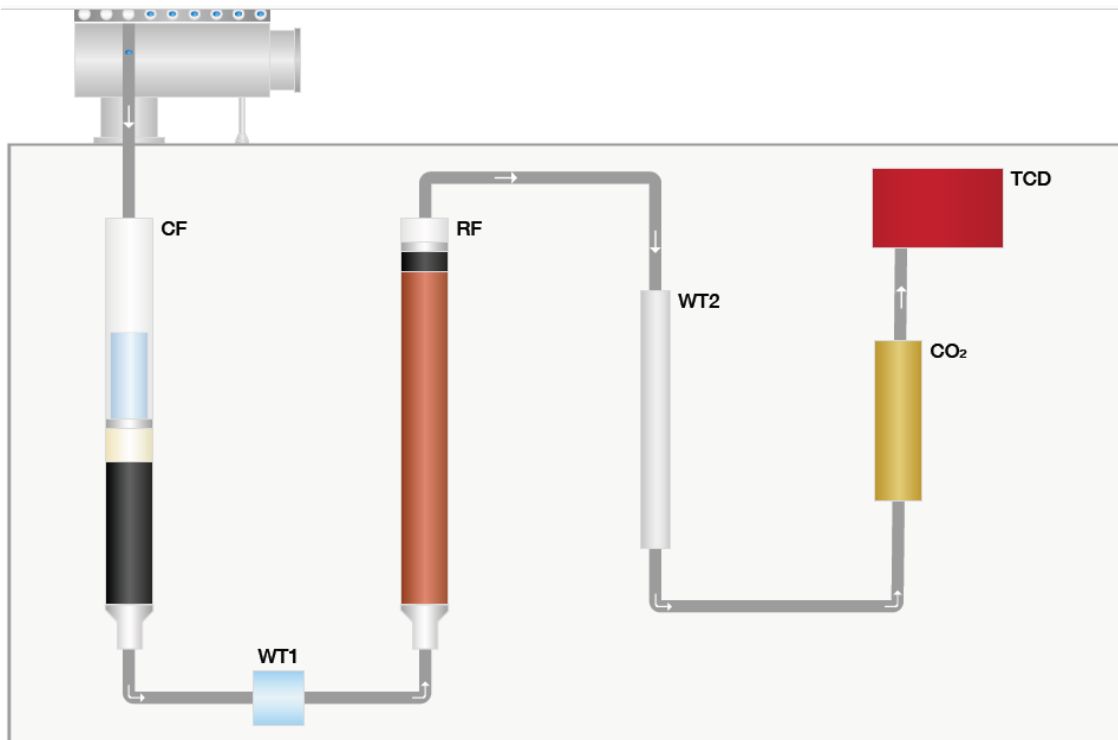
Πίνακας 5: Τι προσδιορίζει το αναλυτικό σύστημα ND 701

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΖΩΤΟΥ
ΔΗΜΗΤΡΙΑΚΑ	ΕΜΒΟΛΙΑ
ΕΛΑΙΟΣΠΟΡΟΙ	ΠΛΑΣΤΙΚΑ
ΖΩΟΤΡΟΦΕΣ	ΕΛΑΣΤΟΜΕΡΗ
ΓΑΛΑ	ΕΔΑΦΟΣ
ΓΑΛΑΚΤΟΜΙΚΑ ΠΡΟΙΟΝΤΑ	ΛΙΠΑΣΜΑΤΑ
ΖΥΘΟΓΛΕΥΚΟΣ	ΚΥΤΤΑΡΙΝΗ
ΜΠΥΡΑ	
ΣΙΤΗΡΑ	
ΚΡΙΘΑΡΙ	
ΒΥΝΗ	
ΚΡΕΑΣ	
ΠΡΟΙΟΝΤΑ ΚΡΕΑΤΟΣ	
ΑΛΕΥΡΙΑ	

Πίνακας 6: DUMAS VS KJELDAHL

<b>DUMAS</b>	<b>KJELDAHL</b>
<p><b>ΥΨΗΛΗ ΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟΤΗΤΑ</b></p> <p>Συνεχής παραγωγικότητα</p>	<p><b>ΛΙΓΟΤΕΡΗ ΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟΤΗΤΑ</b></p> <p>Αδυναμία συνεχούς λειτουργίας</p>
<p><b>ΕΞΟΙΚΟΝΟΜΗΣΗ ΧΡΟΝΟΥ</b></p> <p>Απαιτούνται λίγα λεπτά</p>	<p><b>ΧΡΟΝΟΒΟΡΟΣ</b></p> <p>Η ανάλυση διαρκεί ώρες</p>
<p><b>ΧΑΜΗΛΟ ΚΟΣΤΟΣ ΙΔΙΟΚΤΗΣΙΑΣ</b></p> <p>Μέτριο λειτουργικό κόστος</p>	<p><b>ΠΡΟΣΙΤΟ ΚΟΣΤΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΥ</b></p>
<p><b>ΔΕΝ ΑΠΑΙΤΕΙ ΕΠΙΣΤΑΣΙΑ</b></p> <p>Πλήρως αυτοματοποιημένη διαδικασία</p>	<p><b>ΑΠΑΙΤΕΙ ΕΠΙΣΤΑΣΙΑ</b></p> <p>Όχι εντελώς αυτοματοποιημένη διαδικασία</p>
<p><b>ΞΗΡΗ ΧΗΜΕΙΑ</b></p> <p>Χωρίς επικίνδυνα χημικά</p>	<p><b>ΥΓΡΗ ΧΗΜΕΙΑ</b></p> <p>Χρησιμοποιεί χημικά</p>
<p><b>ΦΙΛΙΚΑ ΠΡΟΣ ΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ</b></p> <p>Λιγότερα υπολείμματα και δεν παράγονται απόβλητα</p>	<p><b>ΑΚΡΙΒΑ ΠΑΡΑΓΟΥΜΕΝΑ ΑΠΟΒΛΗΤΑ</b></p> <p>Τα υπολείμματα πρέπει να απορρίπτονται</p>
<p><b>ΕΠΙΣΗΜΑ ΑΝΑΓΝΩΡΙΜΕΝΗ ΜΕΘΟΔΟΣ</b></p> <p>Κερδίζοντας σε διεθνή χρήση με προηγμένα όργανα</p>	<p><b>ΠΑΓΚΟΣΜΙΑ ΕΠΙΣΗΜΗ ΜΕΘΟΔΟΣ</b></p> <p>Παραδοσιακή τεχνική, απλός εξοπλισμός</p>

Η μέθοδος Dumas ξεκινά με έναν κλίβανο καύσης (CF)<sup>10</sup> για την καύση του δείγματος, λαμβάνοντας στοιχειακές ενώσεις. Το νερό αφαιρείται από μια πρώτη φυσική παγίδα (WT1), που τοποθετείται μετά την καύση και μια δεύτερη χημική (WT2). Μεταξύ των δύο, οι στοιχειώδεις ουσίες περνούν μέσω ενός κλιβάνου αναγωγής (RF)<sup>11</sup>. Οι αυτοαναγεννητικοί προσροφητές CO<sub>2</sub> αφήνουν να περάσει μόνο το στοιχειακό άζωτο που ανιχνεύεται από τον ανιχνευτή θερμικής αγωγιμότητας (TCD)<sup>12</sup> χωρίς απαίτηση για αέριο αναφοράς. Το NDA 701 ελέγχεται μέσω υπολογιστή μέσω λογισμικού.



- **CF** (Combustion Reactor) Allows complete combustion at 1030 °C in order to convert all of the sample into its elemental substances.
- **WT1** (Physical Water Trap) The maintenance-free DriStep™ cooler permits 99% of water to be removed.
- **RF** (Reduction Reactor) Enables the elimination of unwanted compounds and oxygen, transforming NO<sub>x</sub> into N<sub>2</sub>.
- **WT2** (Chemical Water Trap) Eliminates the residual water.
- **CO<sub>2</sub>** (CO<sub>2</sub> Regenerating Adsorbers) Used to get rid of all the CO<sub>2</sub>. Auto-regenerating, maintenance-free system.
- **TCD** (Innovative TCD) LoGas™ determines nitrogen content without the need for a reference gas. Maintenance-free.

Σχήμα 11 : Απεικόνιση της μεθόδου Dumas

<sup>10</sup> Combustion Furnace

<sup>11</sup> Reduction Furnace

<sup>12</sup> Thermal Conductivity Detector

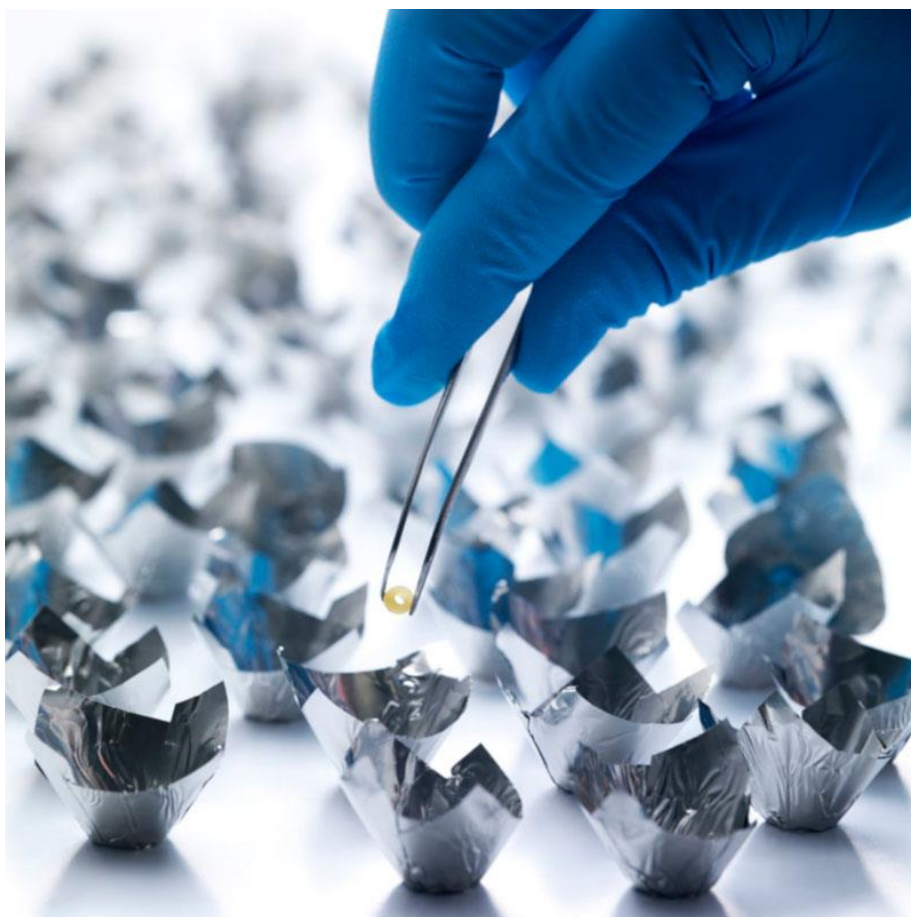
### 4.7.3 Προκαταρκτικές Λειτουργίες του NDA 701

Πριν από οποιαδήποτε μέτρηση με την μέθοδο Dumas μέσω του NDA 701 θα πρέπει να έχουν οριστεί οι ακόλουθες παράμετροι:

- Θερμοκρασία Αντιδραστήρα καύσης: 1030 °C
- Θερμοκρασία Αντιδραστήρα αναγωγής: 650 °C
- Ρυθμός ροής MFC1 He : 190 ml/min
- Ταχύτητα ροής MFC2 He : 220 ml/min

### 4.7.4 Προετοιμασία των δειγμάτων

- Περιδίνηση υπό ανάδευση μιας ποσότητας μύρας για να απομακρυνθεί το CO<sub>2</sub>.
- Προσθήκη στο αλουμινόχαρτο 70-100 mg Super-Absorbent Powder<sup>13</sup>



---

<sup>13</sup> Υπερ-απορροφητική σκόνη

Εικόνα 7: (ΤΟΠΟΘΕΤΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ) Με το NDA 701 μπορείτε να τοποθετήσετε ταυτόχρονα διαφορετικές μήτρες στερεών, ημιστερεών και υγρών δειγμάτων.

- Γέμισμα του αλουμινόχαρτου με περίπου 200 mg μύρας (~ 200  $\mu$ l) με ακρίβεια 0,1 mg, που λαμβάνεται υπό ανάδευση.
- Κλείσιμο του αλουμινόχαρτο, δημιουργία κάψουλας.
- Τοποθέτηση της κάψουλας στον αυτόματο δειγματολήπτη.

#### **4.7.5 Διαδικασία Ανάλυσης**

Συμπλήρωση των ακόλουθων πεδίων στη βάση δεδομένων: Όνομα δείγματος, Βάρος, Μέθοδος, Τύπος δείγματος, Αριθμός βαθμονόμησης Η μέθοδος BEER στο NDA 701 δείχνει τις ακόλουθες παραμέτρους:

- Πρωτεϊνικός παράγοντας : 6,25
- O<sub>2</sub> ρυθμός ροής : 300 ml/min
- O<sub>2</sub> Παράγοντας: 0,5 ml/mg

Πατώντας το πλήκτρο START ξεκινάει η ανάλυση και ο χρόνος ανάλυσης για μια παρτίδα είναι περίπου τρία λεπτά.

Πίνακας 7: Αποτελέσματα Αζώτου % και Πρωτεΐνης σε αφιλτράριστες ιταλικές μπύρες  
 Πηγή : APPLICATION NOTE F&F-D-001-2012/A3 Copyright © 2017 VELP Scientifica. Protein Determination in Beer according to the Dumas combustion method  
 Reference: AOAC 997.09 Nitrogen in Beer, Wort, and Brewing Grains Protein (Total)  
 Tested with VELP Scientifica NDA 701 Dumas Nitrogen Analyzer (Code F30800070)

Ποσότητα δείγματος (mg)	Άζωτο %	Πρωτεΐνη %
202.10	0,083	0,521
190,20	0,084	0,523
200,00	0,082	0,513
197.10	0,083	0,519
193.00	0,084	0,527
193,70	0,083	0,518
200,70	0,084	0,522
190,60	0,084	0,525
194.30	0,084	0,525
199,80	0,084	0,527
191,80	0,083	0,519
189,60	0,084	0,524
Μέσος όρος ± T.A%	0,084 ± 0,001	0,522 ± 0,004
RSD% *	0,807	0,819
<b>Τιμή επισήμανσης πρωτεϊνών: 0,5%</b>		
<b>Πρωτεϊνικός Παράγοντας: 6,25</b>		
<b>* RSD% = (Τυπική απόκλιση * 100) / Μέσος όρος</b>		

Η μέθοδος καύσης, βασιζόμενη στην αρχή του Dumas, για τον προσδιορισμό του ολικού αζώτου στο κριθάρι και τη βύνη, έχει συμπεριληφθεί ως επίσημη εναλλακτική στη μέθοδο Kjeldahl. Τα αποτελέσματα έχουν ληφθεί με την ακόλουθη καμπύλη βαθμονόμησης: σε μια περιοχή από 0 - 1,8 mg N με 5 μετρήσεις (από 30 έως 120 mg) πρότυπου διαλύματος Γλυκίνης 1% σε απεσταγμένο νερό (συγκέντρωση αζώτου: 0,1866%).

Τα οφέλη της μεθόδου καύσης Dumas είναι:

- Υψηλή παραγωγικότητα
- Εξοικονόμηση χρόνου (απαιτούνται λίγα λεπτά)
- Μέτριο λειτουργικό κόστος
- Πλήρης αυτοματοποίηση (χωρίς επίβλεψη)
- Παράλειψη σκληρών και τοξικών χημικών ουσιών
- Φίλικό προς το περιβάλλον, χαμηλή ποσότητα υπολειμμάτων και απορριμμάτων

Αρκετοί οργανισμοί που ασχολούνται με την τυποποίηση και τη σύσταση χημικών μεθόδων έχουν εγκρίνει μεθόδους καύσης για τον προσδιορισμό του αζώτου. Από εκείνες που σχετίζονται με τη ζυθοποιία, η Αμερικανική Εταιρεία Ζυθοποιών Χημικών (ASBC) έχει εγκρίνει μεθόδους καύσης για τον προσδιορισμό του αζώτου στα δημητριακά ζυθοποιίας καθώς και στο μούστο και τη μύρα. Χάρη στην ανάπτυξη εξελιγμένων οργάνων, η αρχή Dumas αποτελεί μια πρακτική εναλλακτική λύση για τον προσδιορισμό του αζώτου στα δείγματα μύρας.



#### **VELP SCIENTIFICA SOLUTIONS - TWO OPTIONS FOR YOUR SPECIFIC NEEDS**

CHOOSE BETWEEN VELP SCIENTIFICA KJELDAHL AND DUMAS METHOD

Εικόνα 8: ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΖΩΤΟΥ σε ΖΥΘΟΠΟΙΕΙΕΣ

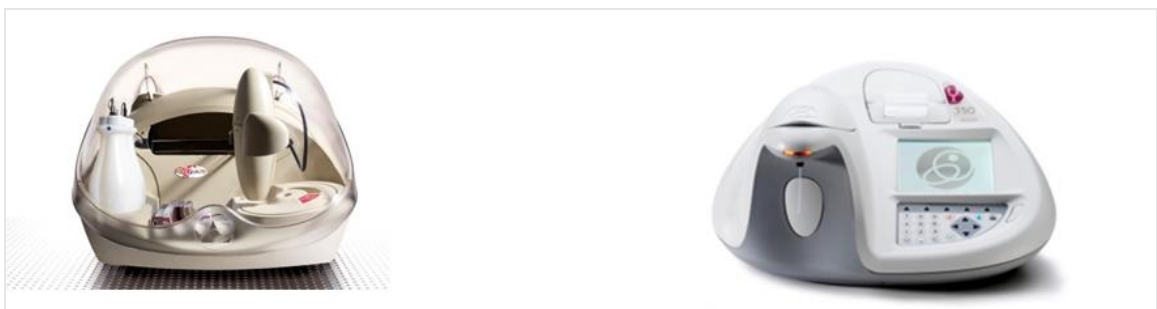
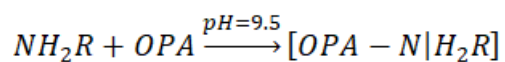
## 4.8 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΟΓΕΝΙΚΟΥ ΑΜΙΝΟ ΑΖΩΤΟΥ ΜΕ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟ ΣΕ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΟ Ή ΕΝΖΥΜΙΚΟ ΑΝΑΛΥΤΗ

### 4.8.1 Αρχή μεθόδου

Η διαδικασία προσδιορισμού PAN (Πρωτεύν Αμινο Άζωτο-Primary Amino Nitrogen) (PANOPA) μια πιο ακριβής εναλλακτική λύση στην τιτλοδότηση με φορμόλη που μετράει επίσης προλίνη, ένα άφθονο αμινοξύ που βρίσκεται στο ζυθογλεύκος που δεν συμβάλλει στο YAN σε αναερόβιες ζυμώσεις.

Το αντιδραστήριο είναι για τη μέτρηση του πρωτογενούς αμινοαζώτου σε διάφορους τύπους δειγμάτων. Οι αμινο ομάδες αζώτου των ελεύθερων αμινοξέων στο δείγμα αντιδρούν με N-ακετυλο-L-κυστεΐνη και ο-φθαλδιαλδεΐδη για σχηματισμό παραγώγων ισοϊνδόλης. Η ποσότητα του παραγώγου ισοϊνδόλης που σχηματίζεται σε αυτή την αντίδραση είναι στοιχειομετρική με την ποσότητα του ελεύθερου αμινοαζώτου. Το παράγωγο ισοϊνδόλης που υπολογίζεται με την αύξηση της απορρόφησης στα 340 nm.

Η παρακάτω μαθηματική σχέση περιγράφει την χημική διαδικασία που συντελείται εντός του αντιδραστηρίου:



Εικόνα 9: Αυτόματος αναλυτής Y15 (Αριστερά) και Ημιαυτόματος αναλυτής της Εταιρίας Biosystems



#### 4.8.2 Διαδικασίες προετοιμασίας

- Φιλτράρισμα ή φυγοκέντρωση των θολών διαλυμάτων.
- Απαέρωση των δειγμάτων που περιέχουν διοξείδιο του άνθρακα σε λουτρό υπερήχων ή ανάδευση του δείγματος σε ένα ποτήρι ζέσεως για περίπου 1 λεπτό.
- Αποχρωματισμός των έντονα χρωματισμένων δειγμάτων με πολυβινυλοπολυπυρρολιδόνη (PVPP) (π.χ. 1 g PVPP/100 mL δείγματος), ανακάτεμα για 1 λεπτό και διήθηση ή φυγοκέντρωση για να εξαλειφθεί η PVPP.
- Ανάλογη αραιώση με δείγματα απεσταγμένου νερού με συγκέντρωση πάνω από το καθορισμένο όριο γραμμικότητας. Πολλαπλασιασμός της ληφθείσας συγκέντρωσης με τον παράγοντα αραιώσης.

Δείγμα μύρας : Απαερώστε, φιλτράρετε, καθαρίστε και/ή αραιώστε τη μύρα εάν είναι απαραίτητο. Η μέθοδος μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί με άλλους τύπους δειγμάτων.

#### 4.8.3 Συστατικά και σύνθεση αντιδραστηρίων

- Αντιδραστήριο A1: Ρυθμιστικό διάλυμα με συντηρητικά , pH= 9,9
- Αντιδραστήριο A2: N-acetylcysteine, με συντηρητικά , pH= 6,2
- Αντιδραστήριο B: o-phaldialdehyde με συντηρητικά , pH= 9,4
- Αντιδραστήριο S: Πρότυπο διάλυμα PAN 150 mg/L

#### 4.8.4 Παρασκευή αντιδραστηρίων εργασίας

- Αντιδραστήριο A (ST2) μεθοδολογία για την μύρα: Προσθήκη 0,3 mL του Αντιδραστηρίου A2 στη φιάλη Αντιδραστηρίου A1. Απαλό ανακάτεμα. Οι όγκοι μπορούν να παρασκευαστούν στην αναλογία: 3 mL Αντιδραστηρίου A1 + 0,03 mL Αντιδραστηρίου A2. Σταθερή θερμοκρασία για 3 μήνες στους 2-8°C.

#### 4.8.5 Διαδικασία

1. Η διαδικασία είναι μη αυτόματη πρέπει να γίνει μεταφορά με πιπέττα σε κυβέττα των παρακάτω ποσοτήτων για τυφλό, για πρότυπη καμπύλη (standard), για δείγμα προς εξέταση :

	Reagent ΤΥΦΛΟ	Blank (RB)	Standard / Sample
Standard / Sample (ST1/ST2)	-		17 μL
Distilled water (ST1/ST2)	17 μL		-
Reagent A	800 μL		800 μL

2. Ανάμειξη και επώαση για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, διαβάστε την απορρόφηση (A1) στα 340 nm.
3. Προσθέστε το Αντιδραστήριο B με πιπέττα στην κυβέττα

Reagent B	200 μL	200 μL
-----------	--------	--------

4. Ανάμειξη και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Μέτρηση της απορρόφησης (A2) του τυφλού αντιδραστήριου, του πρότυπου και του δείγματος στα 340 nm.
6. Το χρώμα πρέπει να είναι σταθερό 30 λεπτά .
7. Υπολογισμός της συγκέντρωσης στο δείγμα (C) χρησιμοποιώντας τον ακόλουθο τύπο:

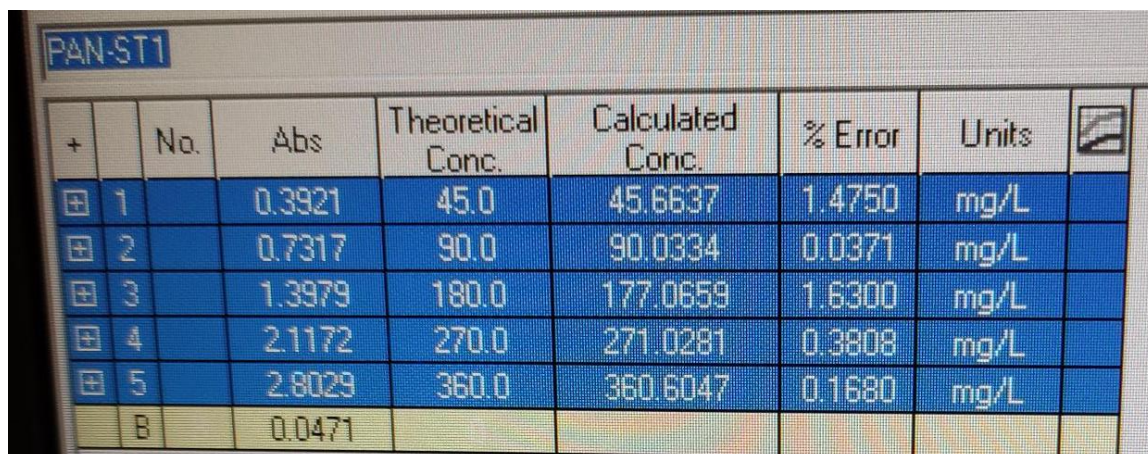
Πίνακας 8: Διαδικασία μέτρησης σε φασματοφωτόμετρο (ημιαυτόματος ενζυμικός αναλυτής)

$$\frac{(A2 - 0.80 \times A1)_{Sample} - (A2 - 0.80 \times A1)_{RB}}{(A2 - 0.80 \times A1)_{Sample} - (A2 - 0.80 \times A1)_{RB}} \times C_{Standard} \left[ \frac{mg}{L} \right] = C_{Sample} \left[ \frac{mg}{l} \right]$$

Πηγή: Primary Amino Nitrogen – Biosystems COD 12807 100ML

#### 4.8.6 Βαθμονόμηση

Θα πρέπει να γίνεται ένα τυφλό αντιδραστηρίου κάθε μέρα και μια βαθμονόμηση μετά την αλλαγή της παρτίδας αντιδραστηρίου ή όπως απαιτούνται από τις διαδικασίες ποιοτικού ελέγχου.



+	No.	Abs	Theoretical Conc.	Calculated Conc.	% Error	Units	
+	1	0.3921	45.0	45.6637	1.4750	mg/L	
+	2	0.7317	90.0	90.0334	0.0371	mg/L	
+	3	1.3979	180.0	177.0659	1.6300	mg/L	
+	4	2.1172	270.0	271.0281	0.3808	mg/L	
+	5	2.8029	360.0	360.6047	0.1680	mg/L	
	B	0.0471					

Εικόνα 10: Βαθμονόμηση Primary Amino Nitrogen σε ενζυμικό αναλυτή σε Οινολογικό εργαστήριο της Νεμέας

#### 4.8.7 Έλεγχος ποιότητας και μετρολογικά χαρακτηριστικά

Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να καθιερώσει το δικό του σύστημα εσωτερικού ποιοτικού ελέγχου και διαδικασίες για διορθωτικές ενέργειες εάν οι έλεγχοι δεν επανέλθουν εντός των αποδεκτών ανοχών.

Τα μετρολογικά χαρακτηριστικά που περιγράφονται παρακάτω έχουν ληφθεί χρησιμοποιώντας έναν αναλυτή Y15.

Πίνακας 9: Μετρολογικά χαρακτηριστικά PAN

Mean concentration (ST1)	Repeatability (CV)	Within-laboratory (CV)
68 mg/L	0.8%	2.1%
135 mg/L	0.4%	1.5%
Mean concentration (ST2)	Repeatability (CV)	Within-laboratory (CV)
105 mg/L	0.9%	1.2%
134 mg/L	0.5%	0.9%

Πηγή: Primary Amino Nitrogen – Biosystems COD 12807 100ML

#### 4.8.8 Σημειώσεις διαδικασίας

1. Η διαδικασία και οι παράμετροι δοκιμής ενδέχεται να διαφέρουν ανάλογα με τον τύπο του δείγματος (Τύπος δείγματος: ST).
2. Οι προτεινόμενοι όγκοι είναι η χρήση ημι-μικροκυβέττας. Άλλοι όγκοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν εάν η αναλογία μεταξύ των αντιδραστηρίων και του δείγματος διατηρείται.

##### BioSystems Y15

Reagent 1: Use Reagent A.

Reagent 2: Use Reagent B.

GENERAL	Test name Analysis mode Sample type Units Reaction type Decimals	<b>PRIMARY AMINO NITROGEN</b> differential bireagent ST1 / ST2 mg/L increasing 0
PROCEDURE	Reading Sample Reagent 1 Reagent 2 Washing Predilution factor Main Reference Reading 1 Reading 2 Reagent 2	monochromatic 5 240 60 1.2 - 340 - 72 s 480 s 96 s
CALIBRATION	Calibration type Calibration curve	specific -
OPTIONS	Blank Absorbance limit Kinetic blank limit Linearity limit	0.300 - 400/200

Εικόνα 11: Παραμετροποίηση στον ενζυμικό αναλυτή Y15

Πηγή: Primary Amino Nitrogen – Biosystems COD 12807 100ML

## 4.9 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ FAN ΣΕ ΜΠΥΡΑ ΚΑΙ ΜΟΥΣΤΟ (WORT) ΔΙΑ ΜΕΣΟΥ ΤΟΥ CDR BEERLAB

### 4.9.1 Περιγραφή αναλυτικού συστήματος

Ο αναλυτής SLB222 είναι κατασκευασμένος για την ανάλυση σε διάφορα είδη τροφίμων με χρήση CDR ειδικά κιτ δοκιμών μαζί με ειδικές οδηγίες εφαρμογής δοκιμής για χρήση σε γραμμές παραγωγής ή ειδικά εργαστήρια.

Όλες οι αναλυτικές δοκιμές που παρέχονται από τον αναλυτή SLB222 είναι καλά βαθμονομημένες αφού είναι έγκυρες με διεθνή πρότυπα.



Εικόνα 12: Αναλυτικό σύστημα CDR

Πηγή : CDR User Guide - 3rd edition

Ο αναλυτής SLB222 είναι ένα αυτόνομο, συμπαγές όργανο που σχεδιάστηκε και κατασκευάστηκε σύμφωνα με τα τελευταία νέα τεχνολογία. Το κύριο μέρος του είναι το φασματοφωτόμετρο με 4 κανάλια και 2 δέσμες το καθένα διαφορετικού μήκους κύματος που συνοδεύεται από ένα μπλοκ επώασης 16 κυττάρων. Με ελεγχόμενη θερμοκρασία στους  $37,0^{\circ}\text{C} \pm 1$  ( $98,6^{\circ}\text{F}$ ), για προθέρμανση των κυβετών. Ο αναλυτής βαθμονομείται και ελέγχεται αυτόματα μετά την ενεργοποίηση του παράλληλα θα γίνουν όλοι οι στοιχειώδεις έλεγχοι λειτουργίας.

Ο αναλυτής είναι εξοπλισμένος με έγχρωμη οθόνη αφής LCD. Όλες οι επεμβάσεις πραγματοποιούνται χρησιμοποιώντας ένα δάχτυλο ή ένα ειδικό στυλό οθόνης αφής που πρόκειται να τοποθετηθεί σε ένα σύμβολο ή ένα μήνυμα. Όλες οι εξετάσεις είναι προ-βαθμονομημένες.

Το CDR BeerLab είναι ένα εύκολο, γρήγορο και αξιόπιστο σύστημα μετρήσεων που χρησιμοποιείται απευθείας στο ζυθοποιείο χωρίς να χρειάζεται εξειδίκευση στη χημική ανάλυση.

Το CDR BeerLab εκτελεί τις παρακάτω εξετάσεις στην μύρα , το ζυθογλεύκος και το νερό :

Bitterness (IBU), Fermentable Sugars, Alcohol by Volume (ABV), Acetic acid, Yeast Vitality, Vicinal Diketons (VDKs), Total sulfur dioxide, Free Amino Nitrogen (FAN) by OPA, Colour, Starch, pH, Lactic Acid (D + L), Polyphenols in beer, Carbohydrates in Beer, Zinc, Calcium in Beer and Water, Alkalinity of water, Bicarbonate in Water

Zinc in Water, Sulfate in Water, Magnesium in Water, Potassium in Water, Chloride in Water.

Ο έλεγχος του FAN με την χρήση της OPA είναι μια εξέταση που επιτρέπει τη σωστή διαχείριση της αλκοολικής ζύμωσης.



Εικόνα 13: Απεικόνιση του CDR BeerLab

Πηγή : <https://www.cdrfoodlab.com/foods-beverages-analysis/>

### 1.6 CDR Reagent kit

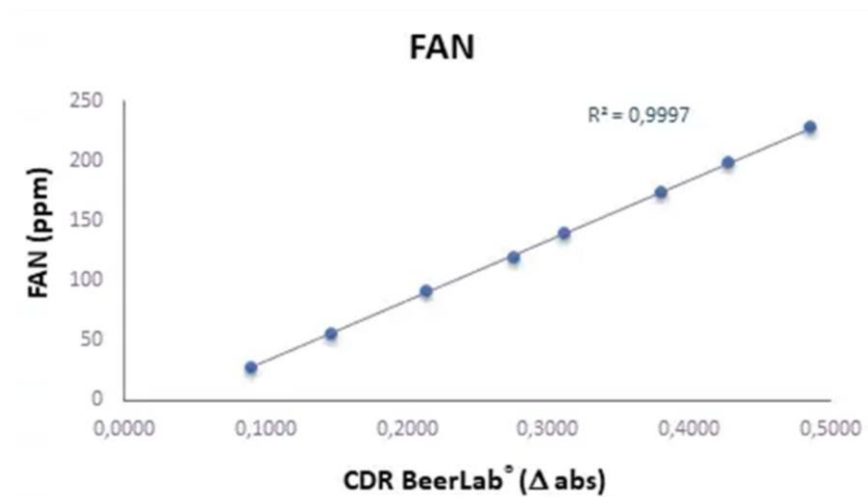
A test kit contains a number of 10 or 20 of test cuvettes inside



Important information on plate:  
 Instrument name  
 Test name: e.g. YAN ORGANIC NITROGEN  
 REF: 300xxx (order code)  
 LOT: reagent lot number  
 EXP: expiration date  
 Store at: storing temperature  
 Link for download METHOD; MSDS etc.  
 Symbols should be observed!  
 Pre-filled cuvettes in a welded aluminium bag.

Εικόνα 14: Απεικόνιση του αντιδραστηρίου

Πηγή : User Guide - 3rd edition



Εικόνα 15: Γραμμική ευθυγράμμιση μεθόδου

Πηγή: <https://www.cdrfoodlab.com/foods-beverages-analysis/analysis-fan-beer/>

Πίνακας 10: Μετρολογικά χαρακτηριστικά FAN CDR Beer LAB

Μέθοδος	Όρια μέτρησης	Επαναληψιμότητα
FAN by OPA	30 – 300 ppm	2 ppm

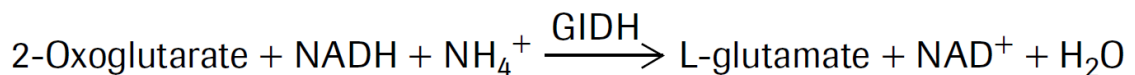
Πηγή: <https://www.cdrfoodlab.com/foods-beverages-analysis/analysis-fan-beer/>



## 4.10 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΜΜΩΝΙΑΣ ΜΕ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟ ΣΕ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΟ Ή ΑΥΤΟΜΑΤΟ ΑΝΑΛΥΤΗ

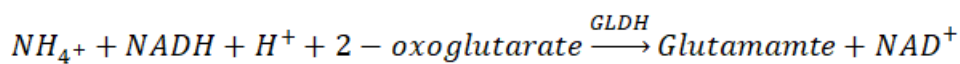
### 4.10.1 Αρχή της μεθόδου

Παρουσία γλουταμικής αφυδρογονάσης (GIDH) και μειωμένης νικοτιναμίδης δινουκλεοτίδιο αδενίνης (NADH), η αμμωνία αντιδρά με το 2-οξογλουταρικό σε L-γλουταμινικό, όπου το NADH οξειδώνεται.



Η ποσότητα του NADH που οξειδώνεται στην παραπάνω αντίδραση είναι στοιχειομετρική προς την ποσότητα αμμωνίας. Το NADH προσδιορίζεται μέσω της απορρόφησης φωτός του στα 334, 340 ή 365 nm.

Το αντιδραστήριο της Αμμωνίας μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για τη μέτρηση της αμμωνίας σε διάφορους τύπους δειγμάτων. Η αμμωνία στο δείγμα καταναλώνει, μέσω της αντίδρασης που περιγράφεται παρακάτω, NADH που μπορεί να μετρηθεί με φασματοφωτομετρία:



Πηγή: Ammonia – Biosystems COD 12809 100ML

### 4.10.2 Διαδικασίες προετοιμασίας

- Φιλτράρισμα ή φυγοκέντρηση των θολών διαλυμάτων.
- Απαερώση των δειγμάτων που περιέχουν διοξείδιο του άνθρακα σε λουτρό υπερήχων ή ανάδευση του δείγματος σε ένα ποτήρι ζέσεως για περίπου 1 λεπτό.
- Αποχρωματισμός των έντονα χρωματισμένων δειγμάτων με πολυβινυλοπολυπυρρολιδόνη (PVPP) (π.χ. 1 g PVPP/100 mL δείγματος), ανακάτεμα για 1 λεπτό και διήθηση ή φυγοκέντρηση για να εξαλειφθεί η PVPP.
- Διαύγαση με αντιδραστήριο Carrez (Biosystems ref. 12837) προσθέτοντας 5 mL Carrez-I και 5 mL Carrez-II στα υγρά εκχυλίσματα δείγματος σε ογκομετρική φιάλη 100 mL. Ρύθμιση του pH 7,5-8,5 με υδροξείδιο του νατρίου. Ανάμειξη μετά από κάθε διάλυμα και συμπλήρωση της ογκομετρικής φιάλης μέχρι τη χαραγή και κατόπιν διήθηση.



- Αποπρωτεΐνοποίηση των δειγμάτων που περιέχουν πρωτεΐνη με αντιδραστήριο Carrez.

#### **Ενδεικτικά παραδείγματα:**

Χυμοί φρούτων και παρόμοια ποτά: Φιλτράρετε, διαυγάστε, αποχρωματίστε ή/και αραιώστε το χυμό εάν χρειάζεται. Κόκκινο και λευκό κρασί: Φιλτράρετε, διαυγάστε, αποχρωματίστε ή/και αραιώστε το κρασί, εάν χρειάζεται. Συνιστάται η χρήση του Wine Control (Κόκκινο) (Biosystems ref. 12822) και του Wine Control (White) (Biosystems ref. 12821) για την επαλήθευση της απόδοσης της διαδικασίας μέτρησης.

#### **4.10.3 Αποθήκευση και παρασκευή αντιδραστηρίων**

Φυλάσσεται στους 2-8°C. Τα αντιδραστήρια είναι σταθερά μόλις ανοιχτούν μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα, εάν είναι αποθηκευμένα καλά κλεισμένα και λαμβάνεται μέριμνα για την αποφυγή μόλυνσης κατά τη χρήση τους. Τα αντιδραστήρια και το πρότυπο παρέχονται έτοιμα προς χρήση.

#### **4.10.4 Συστατικά και σύνθεση αντιδραστηρίων**

- Αντιδραστήριο A: Sodium tetraborate 5mmol/L, NADH 0,5 mmol/L με συντηρητικά , pH= 9,5
- Αντιδραστήριο B: Hepes 400 mmol/L, 2-oxoglutarate 22 mmol/L, glutamate dehydrogenase > 140 U/ml, ethyleneglicol 0,2 L/L, με συντηρητικά , pH= 8,0
- Αντιδραστήριο S: Πρότυπο διάλυμα Αμμωνίας 150 mg/L

#### **4.10.5 Παρασκευή αντιδραστηρίων εργασίας**

Έτοιμα προς χρήση.

#### **4.10.6 Διαδικασία (Μη αυτόματη)**

1. Τα αντιδραστήρια και το φωτόμετρο πρέπει να «έρθουν» στους 37°C.
2. Η διαδικασία είναι μη αυτόματη πρέπει να γίνει μεταφορά με πιπέττα σε κυβέττα των παρακάτω ποσοτήτων για τυφλό, για πρότυπη καμπύλη (standard), για δείγμα προς εξέταση:

	Reagent ΤΥΦΛΟ	Blank (RB)	Standard / Sample
Standard / Sample (ST1/ST2)	-		20 µL
Distilled water (ST1/ST2)	20 µL		-
Reagent A	800 µL		800 µL

3. Ανάμιξη και επώαση για 1 λεπτό στους 37°C, διαβάστε την απορρόφηση (A1) στα 340 nm.
4. Μεταφορά με πιπέτα στην κυβέττα αντιδραστηρίου B

Reagent B	200 µL	200 µL
-----------	--------	--------

5. Ανάμιξη και επώαση για 10 λεπτά στους 37°C. Μέτρηση της απορρόφησης (A2) του τυφλού αντιδραστηρίου, το πρότυπο και το δείγμα στα 340 nm
6. Υπολογισμός της συγκέντρωσης στο δείγμα (C) χρησιμοποιώντας τον ακόλουθο τύπο:

Πίνακας 11: Διαδικασία μέτρησης σε φασματοφωτόμετρο (ημιαυτόματος ενζυμικός αναλυτής)

$$\frac{(0.80 \times A1 - A2)_{Sample} - (0.80 \times A1 - A2)_{RB}}{(0.80 \times A1 - A2)_{Sample} - (0.80 \times A1 - A2)_{RB}} \times C_{Standard} \left[ \frac{mg}{L} \right] = C_{Sample} \left[ \frac{mg}{l} \right]$$

Πηγή: Ammonia – Biosystems COD 12809 100ML

#### 4.10.7 Βαθμονόμηση

Θα πρέπει να γίνεται ένα τυφλό αντιδραστηρίου κάθε μέρα και μια βαθμονόμηση μετά την αλλαγή της παρτίδας αντιδραστηρίου ή όπως απαιτούνται από τις διαδικασίες ποιοτικού ελέγχου.

Y15 - [Curve]

Configuration Programming Work Session Current State Histori

AMMONIA-ST1

No.	Abs	Theoretical Conc.	Calculated Conc.	% Error	Units
1	0.1813	23.0	22.5698	1.8704	mg/L
2	0.3281	45.0	45.7005	1.5566	mg/L
3	0.5937	90.0	87.5580	2.7134	mg/L
4	0.8782	135.0	132.3894	1.9338	mg/L
5	1.1997	180.0	183.0588	1.6994	mg/L
B	0.0491				

Εικόνα 16: Βαθμονόμηση Αμμωνίας σε ενζυμικό αναλυτή Y15 Biosystems σε Οινολογικό εργαστήριο της Νεμέας (Αφροδίτη Ν. Κυριάκου)

#### 4.10.8 Έλεγχος ποιότητας και μετρολογικά χαρακτηριστικά

Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να καθιερώνει το δικό του σύστημα εσωτερικού ποιοτικού ελέγχου και διαδικασίες για διορθωτικές ενέργειες εάν οι έλεγχοι δεν επανέλθουν εντός των αποδεκτών ανοχών.

Τα μετρολογικά χαρακτηριστικά που περιγράφονται παρακάτω έχουν ληφθεί χρησιμοποιώντας έναν αναλυτή Y15. Το όριο ανίχνευσης είναι 3 mg/L και το όριο γραμμικότητας 200 mg/L.

Πίνακας 12: Μετρολογικά χαρακτηριστικά προσδιορισμού της αμμωνίας

Mean concertation (ST1)	Repeatability (CV)	Within-laboratory (CV)
50 mg/L	1.3%	4.6%
150 mg/L	1.2%	1.6%

Πηγή: Ammonia – Biosystems COD 12809 100ML

#### **4.10.9 Σημειώσεις διαδικασίας**

1. Οι προτεινόμενοι όγκοι είναι η χρήση ημι-μικροκυβέττας. Άλλοι όγκοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν εάν η αναλογία μεταξύ των αντιδραστηρίων και του δείγματος διατηρείται.

#### **4.10.10 Επιπλέον πληροφορίες**

- Πρόσθετος εξοπλισμός: Αναλυτής, φασματοφωτόμετρο ή φωτόμετρο με θερμοστατούμενη κυψελίδα στους 37°C και ικανό να μετρήσει στα 340 nm.
- Εφαρμογή σε αυτόματο ενζυμικό αναλυτή Y15:

**BioSystems Y15**

Reagent 1 (Vol. R1): Use Reagent A.

Reagent 2 (Vol. R2): Use Reagent B.

GENERAL	Test name Analysis mode Sample type Units Reaction type Decimals	<b>AMMONIA</b> differential bireagent - mg/L decreasing 0
PROCEDURE	Reading Sample Reagent 1 Reagent 2 Washing Predilution factor Main Reference Reading 1 Reading 2 Reagent 2	monochromatic 6 240 60 1.2 - 340 - 72 s 600 s 96 s
CALIBRATION	Calibration type Calibration curve	specific -
OPTIONS	Blank Absorbance limit Kinetic blank limit Linearity limit	1.200 - 200

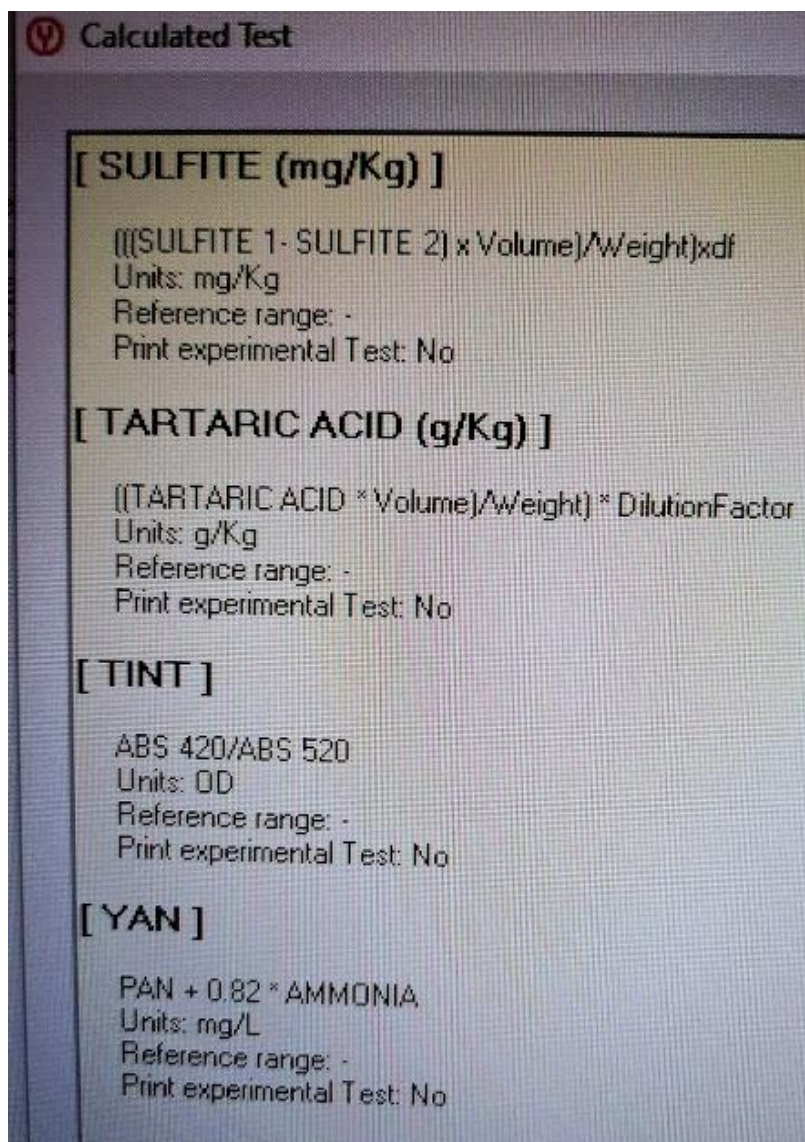
Εικόνα 17: Παραμετροποίηση στον ενζυμικό αναλυτή Y15.

Πηγή: Ammonia – Biosystems COD 12809 100ML



#### 4.11 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΦΟΜΟΙΩΣΙΜΟΥ ΑΖΩΤΟΥ

Οι περισσότεροι ενζυμικοί αναλυτές διαθέτουν τις λεγόμενες υπολογιστικές εξετάσεις .  
Βλέπε παράδειγμα από τον Y15 της Εταιρίας Biosystems :



Εικόνα 18: Υπολογιστικές εξετάσεις

Διαφορετικά ο υπολογισμός του YAN γίνεται με τον μαθηματικό τύπο :

$$\text{YAN} = \text{Primary Amino Nitrogen} + 0,83 \times \text{NH}_3$$

## 4.12 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΜΕ ΑΥΤΟΜΑΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΣΕ ΑΥΤΟΜΑΤΟ ΑΝΑΛΥΤΗ

### 4.12.1 Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος της διουρίας

Η μέθοδος διουρίας είναι μια χρωματομετρική τεχνική ειδική για πρωτεΐνες και πεπτίδια. Τα άλατα χαλκού σε αλκαλικό διάλυμα σχηματίζουν ένα μωβ σύμπλοκο με ουσίες που περιέχουν δύο ή περισσότερους πεπτιδικούς δεσμούς. Η απορρόφηση που παράγεται είναι ανάλογη με τον αριθμό των πεπτιδικών δεσμών που αντιδρούν και επομένως με τον αριθμό των πρωτεϊνικών μορίων που υπάρχουν στο σύστημα αντίδρασης. Έτσι, η αντίδραση διουρίας με πρωτεΐνες είναι κατάλληλη για τον προσδιορισμό της ολικής πρωτεΐνης με φασματοφωτομετρία (στα 540–560 nm). Η μέθοδος χρησιμοποιείται εκτενώς, ιδιαίτερα σε αυτοματοποιημένους αναλυτές. Η χρήση αλβουμίνης ορού βοείου ή ανθρώπου για την τυποποίηση της μεθόδου διουρίας είναι καλά τεκμηριωμένη. Η λευκωματίνη υψηλής καθαρότητας περιέχει μόνο αμινοξέα. Η περιεκτικότητά του σε άζωτο είναι ένα σταθερό κλάσμα της μοριακής του μάζας και ο αριθμός των πεπτιδικών δεσμών ανά μόριο είναι γνωστός. Δεδομένου ότι ο πεπτιδικός δεσμός είναι η μονάδα που αντιδρά στη διουρία σε όλες τις πρωτεΐνες και ο αριθμός των πεπτιδικών δεσμών καθορίζει την απορρόφηση του έγχρωμου προϊόντος, η αλβουμίνη είναι ένα λογικό πρότυπο πεπτιδικού δεσμού για όλες τις πρωτεΐνες του μείγματος.

Πηγή : Βιβλίο A. Bianchi-Bosisio, in Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition), 2005

#### **Ολική Πρωτεΐνη + Cu<sup>++</sup> → Έγχρωμο Σύμπλοκο**

Για τον προσδιορισμό της ολικής πρωτεΐνης σε ομοιογενή υγρά δείγματα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένα αντιδραστήριο φωτομετρικού προσδιορισμού Ολικής Πρωτεΐνης Thermo Scientific™, Arena™ ή Αναλυτής Gallery™. Η μέθοδος που ακολουθείται είναι η χρωματομετρική μέτρηση με ιόντα χαλκού και εκτελείται στους 37 °C, χρησιμοποιώντας φίλτρο 540 nm και σαν δεύτερο φίλτρο διόρθωσης μήκους κύματος 700 nm. (διχρωματική μεθοδολογία).

Πηγή :D10415\_03\_Insert\_Total\_Protein\_BiuretTemplateQ D08896\_01 2015 Thermo Fisher Scientific Inc.

#### **4.12.2 Προφυλάξεις**

Το αντιδραστήριο είναι επικίνδυνο και θα πρέπει να εφαρμόζονται οι συνήθεις προφυλάξεις που απαιτούνται για το χειρισμό όλων των αντιδραστηρίων στα εργαστήρια, επίσης το προϊόν πρέπει να απορριφθεί ως εργαστηριακή χημική ουσία σύμφωνα με τους τοπικούς κανονισμούς.

Πηγή :D10415\_03\_Insert\_Total\_Protein\_BiuretTemplateQ D08896\_01 2015 Thermo Fisher Scientific Inc.

#### **4.12.3 Συστατικά και σύνθεση αντιδραστηρίων**

Αντιδραστήριο έτοιμο προς χρήση.

Συγκεντρώσεις

NaOH 1,0 mol/L

CuSO<sub>4</sub> 9,0 mmol/L

KI 9,0 mmol/L

Na<sub>2</sub>-EDTA 28 mmol/L

Πηγή :D10415\_03\_Insert\_Total\_Protein\_BiuretTemplateQ D08896\_01 2015 Thermo Fisher Scientific Inc.

#### **4.12.4 Τοποθέτηση αντιδραστηρίου στο αναλυτικό σύστημα**

Θα πρέπει να γίνει προκαταρκτικός έλεγχος ότι δεν υπάρχουν φυσαλίδες στην επιφάνεια του αντιδραστηρίου όταν εισάγονται φιαλίδια στον αναλυτή.

#### **4.12.5 Δείγματα**

Στα αντιδραστήρια καλύπτεται ένα ευρύ φάσμα δειγμάτων όπως τρόφιμα, ποτά και άλλα δείγματα υλικού. Όλες οι λεπτομέρειες σχετικά με τη μέθοδο βρίσκονται στη χωριστή σημείωση της εφαρμογής.

Πηγή :D10415\_03\_Insert\_Total\_Protein\_BiuretTemplateQ D08896\_01 2015 Thermo Fisher Scientific Inc.



#### 4.12.6 Προετοιμασία των δειγμάτων

Τα δείγματα μπίρας μπορούν να χρησιμοποιηθούν απευθείας. Εάν το δείγμα περιέχει ουσίες που παρεμβαίνουν στη μέτρηση, ο χειρισμός είναι διαφορετικός και πρέπει να ακολουθηθεί μια εκ των ακόλουθων διαδικασιών προετοιμασίας:

- Χρήση άμεσα διαυγών, άχρωμων και πρακτικά υγρών δειγμάτων
- Φιλτράρισμα ή φυγοκέντρηση των θολών διαλυμάτων
- Απαέρωση δειγμάτων που περιέχουν διοξείδιο του άνθρακα
- Θρυμματισμός ή ομογενοποίηση στερεών ή ημιστερεών δειγμάτων
- Ρύθμιση των όξινων δειγμάτων σε pH 8 προσθέτοντας νατρίουχο ή καλιούχο διάλυμα υδροξειδίου και επώαση για περίπου 15 λεπτά.

Πηγή :D10415\_03\_Insert\_Total\_Protein\_BiuretTemplateQ D08896\_01 2015  
Thermo Fisher Scientific Inc.

#### 4.12.7 Διαδικασία εξέτασης

- Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται:
  - Απεσταγμένο νερό (άσηπτο και απαλλαγμένο από βαρέα μέταλλα)
  - Βασικός εξοπλισμός εργαστηρίου.
  - Όλο τα υλικά που απαιτούνται για την πρότυπη βαθμονόμηση και τα δείγματα QC.

#### 4.12.8 Βαθμονόμηση

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί πρότυπο διάλυμα βαθμονόμησης με βάση το νερό. Για παράδειγμα, ένα διάλυμα Αλβουμίνης (από βόειο ορό, 1000772605, A7906-10G, Sigma-Aldrich, >99 %) σε 10 g/l. Το διάλυμα αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο για την αυτοματοποιημένη βαθμονόμηση. Εάν οι μήτρες του δείγματος διαφέρουν σημαντικά από τη λευκωματίνη, η βαθμονόμηση μπορεί να πραγματοποιηθεί, π.χ. με γλουτεΐνη σίτου. Αυτή η αλλαγή πρέπει να επικυρωθεί από τον χρήστη.

Πηγή :D10415\_03\_Insert\_Total\_Protein\_BiuretTemplateQ D08896\_01 2015 Thermo  
Fisher Scientific Inc.

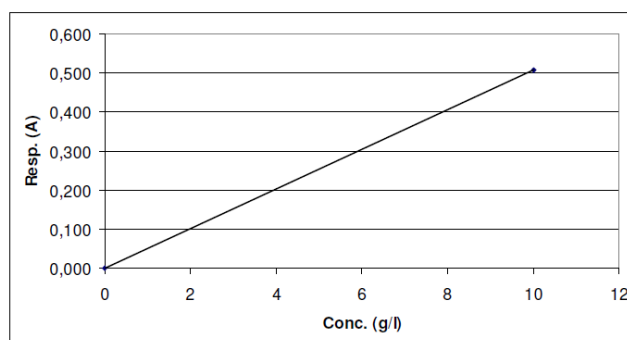
#### 4.12.9 Έλεγχος ποιότητας

Χρήση δειγμάτων ποιοτικού ελέγχου τουλάχιστον μία φορά την ημέρα και μετά από κάθε μία βαθμονόμηση και κάθε φορά που χρησιμοποιείται μια νέα φιάλη αντιδραστηρίου. Συνιστάται η χρήση δύο επιπέδων ελέγχου. Τα διαστήματα ελέγχου και τα όρια πρέπει να προσαρμόζονται στις επιμέρους εργαστηριακές απαιτήσεις. Τα αποτελέσματα των δειγμάτων ποιοτικού ελέγχου θα πρέπει να εμπίπτουν στα προκαθορισμένα όρια από το εργαστήριο. Το δείγμα ποιοτικού ελέγχου πρέπει να παρασκευάζεται από άλλο υλικό εκτός από το πρότυπο αποθέματος βαθμονόμησης. Συνιστάται να οριστεί η τιμή για το Δείγμα QC επίσης με μέθοδο αναφοράς και να προετοιμαστεί από την ίδια μήτρα ως δείγμα. Τα δείγματα QC κατασκευασμένα από μήτρες παρόμοιες για τα δείγματα δίνει πολύ χαμηλά ή υψηλά αποτελέσματα, αυτό το φαινόμενο θα πρέπει να ελέγχεται χρησιμοποιώντας παρόμοιες μήτρες και για τα πρότυπα βαθμονόμησης.

Πηγή :D10415\_03\_Insert\_Total\_Protein\_BiuretTemplateQ D08896\_01 2015 Thermo Fisher Scientific Inc.

#### 4.12.10 Υπολογισμός αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα υπολογίζονται αυτόματα από τον αναλυτή χρησιμοποιώντας καμπύλη βαθμονόμησης (A).



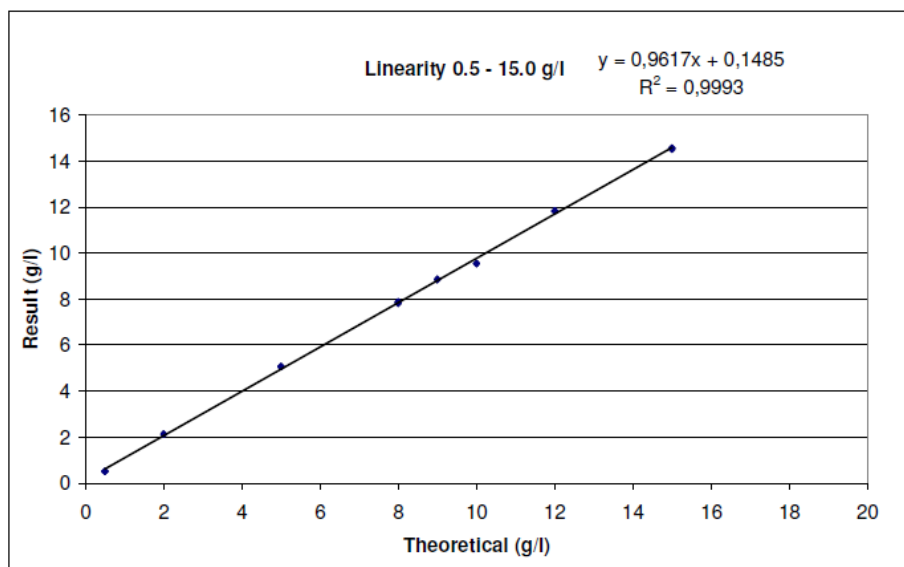
Calibrator	Response (A)	Calc. conc. (g/l)
Water	0.001	0
Albumin std	0.509	10

Διάγραμμα 2: Μοντέλο καμπύλης βαθμονόμησης (A) ποιας μεθόδου Ολικής Πρωτεΐνης

Πηγή :D10415\_03\_Insert\_Total\_Protein\_BiuretTemplateQ D08896\_01 2015 Thermo Fisher Scientific Inc.

#### 4.12.11 Περιορισμοί, εύρος και χαρακτηριστικά απόδοσης

Δεν υπάρχουν γνωστές παρεμβολές ή περιορισμοί στην μέθοδο. Το τεστ αναπτύχθηκε για τον προσδιορισμό των συνολικών συγκεντρώσεων πρωτεΐνης εντός εύρους μέτρησης από 0,5 έως 15 g/l. Τα αποτελέσματα που λαμβάνονται σε μεμονωμένα εργαστήρια μπορεί να διαφέρουν από τα δεδομένα απόδοσης. Έγινε δοκιμή γραμμικότητας με τυποποιημένα διαλύματα με βάση το νερό.



Διάγραμμα 3: Μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης προσδιορισμού της Πρωτεΐνης

Πηγή :D10415\_03\_Insert\_Total\_Protein\_BiuretTemplateQ D08896\_01 2015 Thermo Fisher Scientific Inc.

Το όριο προσδιορισμού για αυτή τη μέθοδο είναι 0,5 g/l.

Πίνακας 13: Επαναληψιμότητα μεθόδου της Ολικής Πρωτεΐνης

Precision Gallery Analyzer						
	Mean 3.5 g/l Dark Beer		Mean 4.5 g/l Lager Beer		Mean 8.1 g/l Lager Beer	
	SD	CV %	SD	CV %	SD	CV %
Within run	0.032	0.9	0.035	0.8	0.062	0.8
Between run	0.076	2.1	0.110	2.4	0.158	1.9
Total	0.083	2.3	0.115	2.6	0.170	2.1

Πηγή :D10415\_03\_Insert\_Total\_Protein\_BiuretTemplateQ D08896\_01 2015 Thermo Fisher Scientific Inc.

#### **4.12.12 Ακρίβεια / Σύγκριση μεθόδων**

Η ακρίβεια της μεθόδου δοκιμάστηκε με φυσικά δείγματα. Αναλύθηκαν πέντε επίπεδα δείγματος μύρας.

Πίνακας 14: Ανάλυση δειγμάτων μύρας (αποτελέσματα και θεωρητικές τιμές) της Ολικής Πρωτεΐνης

<b>Sample</b>	<b>Result (g/l)</b>	<b>Theoretical value (g/l)</b>	<b>Recovery rate (%)</b>
Beer level 1	3.9	4.0	98
Beer level 2	5.4	5.4	99
Beer level 3	7.3	7.3	100
Beer level 4	8.2	8.3	99
Beer level 5	9.8	9.9	99

Πηγή :D10415\_03\_Insert\_Total\_Protein\_BiuretTemplateQ D08896\_01 2015 Thermo Fisher Scientific Inc.

#### **4.12.13 Άλλες παρατηρήσεις και διαχείριση αποβλήτων**

Πρέπει να σημειωθεί ότι η απόδοση της εφαρμογής έχει επαληθευτεί με καθαρές χημικές ουσίες διαλυμένες σε απιονισμένο νερό και με φυσικά δείγματα. Τα αποτελέσματα που λαμβάνονται σε μεμονωμένα εργαστήρια μπορεί να διαφέρουν από τα δεδομένα απόδοσης λόγω π.χ. της μήτρας δείγματος, των συγκεντρώσεων ή του περιβάλλοντος ανάλυσης. Κάθε εργαστήριο είναι υπεύθυνο για την επαλήθευση της μεθόδου και για την απόδειξη της απόδοσης της ανάλυσης.

Για την διαχείριση των αποβλήτων θα πρέπει να ακολουθηθούν οι τοπικές νομικές απαιτήσεις. Συνιστάται το άδειασμα το αναλυτή, του κάδου των κυψελών (κυβέτες), του κάδου των απορριμμάτων και των λυμάτων καθημερινά. Η κένωση πρέπει να γίνεται αμέσως μετά την ανάλυση όταν χρησιμοποιείται επικίνδυνο αντιδραστήρια/διαλύματα.

Πηγή :D10415\_03\_Insert\_Total\_Protein\_BiuretTemplateQ D08896\_01 2015 Thermo Fisher Scientific Inc.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5<sup>ο</sup>: Τιμές αναλυτικών συστημάτων και αντιδραστηρίων

### 5.1 Προσφορά αναλυτικού συστήματος ενδεικτικά

#### ΑΥΤΟΜΑΤΟΣ ΕΝΖΥΜΙΚΟΣ ΑΝΑΛΥΤΗΣ

Τιμή προσφοράς: 10.900 €

Αυτόματος ανοικτός Ενζυμικός αναλυτής Random Access, σύγχρονης τεχνολογίας, παραγωγικής δυνατότητας 150 φωτομετρικών εξετάσεων την ώρα. Ο αναλυτής διαθέτει χώρο για 10-20 αντιδραστήρια και 24-48 δείγματα σε σωληνάρια ή / και σε καψάκια. Διαθέτει σύστημα αυτόματης ανίχνευσης στάθμης και σύστημα ανάδευσης. Ο αναλυτής είναι ανοικτού τύπου και διαθέτει πρόγραμμα λειτουργίας σε περιβάλλον Windows, φιλικό προς τον χρήστη με ενσωματωμένα προγράμματα ποιοτικού ελέγχου.

Ο αναλυτής συνοδεύεται από ηλεκτρονικό υπολογιστή (PC, οθόνη, πληκτρολόγιο και ποντίκι).

Από τους οικονομικότερους αναλυτές της αγοράς με ελάχιστο όγκο φωτομέτρησης 180 μλ.

Το λογισμικό που έχει σχεδιαστεί ειδικά για αυτόν τον τύπο ανάλυσης και η ενσωμάτωση 420, 520 και 620 φίλτρων, τον καθιστούν έναν μοναδικό αναλυτή για οινολογικές αναλύσεις με μέγιστη αξιοπιστία.

Οι αναλυτές διαθέτουν ειδικό λογισμικό που μας παρέχει την δυνατότητα πλήρους ιχνηλασιμότητας.

Ιστορικό βαθμονομήσεων, στοιχεία μέτρησης με φωτομετρικές γραφικές παραστάσεις, αρχείο αποτελεσμάτων, αρχείο αντιδραστηρίων καθώς και πλήρες πρόγραμμα ποιοτικού ελέγχου.

Πίνακας 15: Είδη εξετάσεων

Ref.	Description	Components	STD included	Shelf Life once ...	Units	N° Assays	Τιμή κττ	Τιμή/Τεστ
12800	D-Glucose/D-Fructose	2 x 60 ml	4 g/L	-	g/L	400	175	0,44 €
12801	D-Lactic Acid	2 x 50 ml	0,125 g/L	-	g/L	333	195	0,59 €
12802	L-Lactic Acid	2 x 50 ml	0,5 g/L	-	g/L	333	175	0,53 €
12803	L-Malic Acid	2 x 50 ml	2 g/L	2 x 4 months	g/L	333	125	0,38 €
12806	Total Sulfite	4 x 50 ml	150 mg/L	-	mg/L	667	94	0,14 €
12807	PAN (Primary Amoni Nitrogen)	2 x 50 ml	150 mg/L	2 x 12 months	mg/L	333	160	0,48 €
12808	Tartaric Acid	2 x 50 ml	(5 STD no linear)	-	g/L	333	80	0,24 €
12809	Ammonia	2 x 50 ml	150 mg/L	-	mg/L	333	115	0,35 €
12810	Acetic Acid	4 x 25 ml	0,5 g/L	4 x 1 month	g/L	333	195	0,59 €
12811	Gluconic Acid	2 x 50 ml	0,5 g/L	-	g/L	333	299	0,90 €
12812	Glycerol	2 x 40 ml	0,75 g/L	-	g/L	333	58	0,17 €
12813	Free Sulfite	4 x 100 ml	30 mg/L + 75 mg/L	-	mg/L	500	105	0,21 €
12814	Copper	2 x 50 ml	3 mg/L	-	mg/L	333	115	0,35 €
12815	Polyphenols	2 x 40 ml	2000 mg/L	-	mg/L	200	58	0,29 €
12816	Color	2 x 40 ml	-	-	OD	111	35	0,32 €
12817	Iron	2 x 50 ml	10 mg/L	-	mg/L	333	58	0,17 €
12819	Sucrose/Glucose/Fructose	1 x 60 ml	1 g/L / 5,05 g/L	1 x 3 months	g/L	200	95	0,48 €
12820	Acetaldehyde	1 x 50 ml	75 mg/L	1 x 3 weeks	mg/L	167	149	0,89 €
12823	Potassium	2 x 40 ml	150 mg/L + 300 mg/L	-	mg/L	333	178	0,53 €
12824	Calcium	2 x 40 ml	100 mg/L	-	mg/L	200	35	0,18 €
12825	Citric Acid	2 x 25 ml	250 mg/L	2 x 1 month	mg/L	167	70	0,42 €
12826	Pyruvic Acid	2 x 50 ml	200 mg/L	2 x 4 months	mg/L	333	90	0,27 €
12828	Ascorbic Acid	1 x 90 ml	Lot dependent	-	mg/L	173	175	1,01 €
12829	Histamine	2 x 50 ml	(5 STD no linear)	-	mg/L	500	387	0,77 €
12830	Glutamic Acid	2 x 50 ml	200 mg/L	-	mg/L	333	185	0,56 €
12831	Anthocyanins	2 x 50 ml	Factor	-	mg/L	500	47	0,09 €
12832	Carbon Dioxide	1 x 50 ml	1000 mg/L	-	mg/L	167	95	0,57 €
12846	Total Acidity	2 x 50 ml	(5 STD no linear)	-	g/L	500	82	0,16 €
12876	pH	2 x 50 ml	(5 STD no linear)	-	-	333	68	0,20 €
12878	Magnesium	2 x 50 ml	20 mg/L	2 x 15 days	mg/L	333	68	0,20 €
<b>Calibrators, Controls and Consumables</b>								
12841	Ions MultiCal	5 x 10 ml	-				104	
12818	MultiCal	5 x 10 ml	-				104	
12821	White Wine Control	10 x 5 ml	10 x 1 month				46	
12822	Red Wine Control	10 x 5 ml	10 x 1 month				46	
AC11485	Rotors 10 x 120					1200	42	0,04 €
AC10770	Pediatric sample wells (1000 u)					1000	34	
BO11524	Concentrated liquid system (1000 mL)						30	
BO13416	Concentrated washing solution (100 mL)						30	

## 5.2 Προσφορά αναλυτικών συστημάτων ενδεικτικά

Πίνακας 16: Τιμές αναλυτικών συστημάτων

A/A	Τύπος αναλυτικού συστήματος	Τιμή	Περιγραφή
1	Y 350 SEMI-AUTOMATIC ANALYZER	2.600 €	Ημιαυτόματος αναλυτής
2	Y15 ANALYZER	10.900 €	έως 150 εξετάσεις ανά ώρα
3	Y15 C ANALYZER	11.200 €	έως 150 εξετάσεις ανά ώρα
4	SPICA	11.000 €	έως 180 εξετάσεις ανά ώρα
5	Y25 ANALYZER	14.000 €	έως 250 εξετάσεις ανά ώρα
6	Y200 ANALYZER	19.000 €	250 εξετάσεις ανά ώρα
7	Y400 ANALYZER	24.000 €	400 εξετάσεις ανά ώρα
8	BS-230	9.000 €	έως 200 εξετάσεις ανά ώρα
9	BS-240	10.000 €	έως 200 εξετάσεις ανά ώρα
10	BS-240 PRO	11.500 €	220 εξετάσεις ανά ώρα
11	BS-430	19.000 €	430 εξετάσεις ανά ώρα
12	BS-600M	32.000 €	600 εξετάσεις ανά ώρα
13	BS-800	40.000 €	800 εξετάσεις ανά ώρα

## 5.3 Προσφορά συστήματος Smart Analysis ενδεικτικά

Πίνακας 17: Προσφορά Smart Analysis

<b>SMART ANALYSIS MODELS</b>				
PFIKIT-0002	SMART ANALYSIS (WINE/BEER) with 280 nm 8 parameters	1 ud	3.120,00 €	
PFIKIT-0002	SMART ANALYSIS (WINE/BEER) with 280 nm 14 parameters	1 ud	3.770,00 €	
PFITAB-0117	TABLET	1 ud	230,00 €	
<b>COMPLEMENTARY INSTRUMENTS</b>				
PFILAB-0123	CENTRIFUGE (Beer and pH, T. acidity)	1 ud	195,00 €	
PFITER-0122	THERMOBLOCK	1 ud	868,00 €	
PFILAB-0001	SONICATOR/DEGASSER (Beer)	1 ud	105,00 €	
<b>ENOLOGY SYSTEM</b>				<b>1st</b>
DP-11109	D-GLUCOSE / D-FRUCTOSE	20 tests	99,00 €	4,95 €
DP-11114	ACETIC ACID	20 tests	99,00 €	4,95 €
DP-11112	L-LACTIC ACID	20 tests	99,00 €	4,95 €
DP-11113	L-MALIC ACID	20 tests	99,00 €	4,95 €
DP-11110	FREE SULFITE	20 tests	90,00 €	4,50 €
DP-11111	TOTAL SULFITE	20 tests	90,00 €	4,50 €
DP-11108	TARTARIC ACID	20 tests	90,00 €	4,50 €
DP-11120	TOTAL ACIDITY	20 tests	90,00 €	4,50 €

DP-11122	pH	20 tests	90,00 €	4,50 €
DP-11121	ANTHOCYANINS	20 tests	90,00 €	4,50 €
DP-11123	PRIMARY AMINO NITROGEN	20 tests	90,00 €	4,50 €
DP-11124	AMMONIA	20 tests	99,00 €	4,95 €
ET- 00001	ALCOHOL	20 tests	120,00 €	6,00 €
<b>BEER ANALYZER</b>				
REBGFS-0020	TOTAL SUGARS (GLU-FRU-SAC)	20 tests	110,00 €	5,50 €
REBIBBU-0020	BITTERNES - IBU	20 tests	90,00 €	4,50 €
REBAAN-0020	ALPHA AMINO NITROGEN	20 tests	99,00 €	4,95 €
REBSO2TOT-0020	TOTAL SO <sub>2</sub>	20 tests	90,00 €	4,50 €
REBPH-0020	pH	20 tests	90,00 €	4,50 €
REBLAT-0020	L-Lactic	20 tests	99,00 €	4,95 €
REBETH-0020	ETHANOL	20 tests	120,00 €	6,00 €
REBACE-0020	ACETIC ACID	20 tests	120,00 €	6,00 €
REBBIC-0020	BICARBONATE-WATER	20 tests	100,00 €	5,00 €
REBCHL-0020	CHLORIDE-WATER	20 tests	100,00 €	5,00 €
REBCAL-0020	CALCIUM-WATER	20 tests	100,00 €	5,00 €
REBPOT-0020	POTASSIUM-WATER	20 tests	100,00 €	5,00 €
REBSUL-0020	SULPHATES-WATER	20 tests	100,00 €	5,00 €
<b>DISPOSABLES</b>				
REFERENCE	DESCRIPTION	PRESENTATION	PVP	€/assay
CONCON-0044 (100)	SET OF 100 CUVETTES OF 10 MM (white)	1 ud	37,50 €	0,38 €
CONCON-0049 (10)	SET OF 10 CUVETTES OF 1 MM (red-beer)	1 ud	37,50 €	3,75 €
CONCON-0002	100 EPPENDORF FOR CENTRIFUGE	1 ud	7,50 €	0,08 €
CONCON-0048	PIPETTE 250 µl	1 ud	23,40 €	
CONDIL-0001	DILUTION KIT (ALCOHOL) X 100 ANALYSIS	1 ud	52,50 €	0,53 €
CONDIL-0127	REFILL DILUTION KIT	1 ud	36,00 €	0,36 €
CONFIL-0128	FILTERING KIT	1 ud	45,00 €	0,45 €

#### 5.4 Προσφορά της Εταιρίας διαμέσω παραχώρησης χρήσης.

Η Εταιρία χορηγεί τα συστήματα με συμβόλαιο παραχώρησης είτε με τη μορφή ενοικίου ή διαμέσω συμφωνημένων καταναλώσεων αντιδραστηρίων.



## 5.5 Τιμές από το διαδίκτυο ενδεικτικά

Thank you for your inquiry into the CDR Beer Lab, we can certainly help you. We just started carrying the Beer Lab, so no customers as of yet (plenty of bites though). We are adding a new test, SO<sub>2</sub>, which should be available soon.

The CDR Beer Lab Touch is \$7,500 FOB CA, including a mini centrifuge, micro-pipettors with tips, and enough reagents for 10 tests each of the 14 available tests.

The CDR Beer Lab Junior is \$5,000 FOB CA, including a micro-pipetter with tips (the mini centrifuge is only for IBU and is not included with the Junior model), and enough reagents for 10 tests each of the 14 available tests, but will not test IBU or run water analysis.

Reagent pricing for future orders is as follows (10-pack of reagents):

IBU	\$79.62
Total lactic D+L	\$79.62
Fermentable Sugars	\$54.85
Dilution Kit for Sugars	\$7.96
Starch	\$54.85
ABV	\$79.62
pH	\$42.46
FAN	\$79.62
Color	\$42.46
Calcium	\$42.46
Magnesium	\$42.46
Bicarbonate	\$42.46
Potassium	\$42.46
Sulfate	\$42.46

Bear in mind, 10 of each reagent comes with the Beer Lab, and in the future you can order only the reagents you need.

I look forward to discussing the possibilities with you.

Cheers.

### Εικόνα 19: Τιμές

Πηγή: <https://discussions.probrewer.com/forum/probrewer-message-board/brewing-process-and-theory/quality-control-available-for-mentorship/37182-cdr-beerlab>

### Πίνακας 18: Τιμοκατάλογος

Περιγραφή	Τιμή σε Δολάρια Αμερικής	Τιμή/παράμετρο
CDR Beer Lab Touch	7.500	-
CDR Beer Lab Junior	5.000	-
IBU	79,62	7,96
Total Lactic D+L	79,62	7,96
Fermentable Sugars	54,85	5,48
Dilution Kit for Sugars	7,96	-
Starch	54,85	5,48

ABV	79,62	7,96
pH	42,86	4,29
FAN	79,62	7,96
Color	42,46	4,25
Calcium	42,46	4,25
Magnesium	42,46	4,25
Bicarbonate	42,46	4,25
Potassium	42,46	4,25
Sulfate	42,46	4,25

Πηγή: <https://discussions.probrewer.com/forum/probrewer-message-board/brewing-process-and-theory/quality-control-available-for-sponsorship/37182-cdr-beerlab>

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6<sup>ο</sup>: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στη παρούσα εργασία μελετήθηκε η συμβολή του αζώτου στην παρασκευή της μύρας καθώς και οι μέθοδοι δια των οποίων μπορεί να μετρηθεί το άζωτο στην μύρα. Το άζωτο, η ποσότητά του αλλά και η συμβολή του στην ζύμωση επηρεάζει σημαντικά την γεύση, το χρώμα και την ποιότητα του τελικού προϊόντος. Ως εκ τούτου οι μετρήσεις του αζώτου είτε σαν FAN, PAN, YAN, Ολικών Πρωτεϊνών ή και άλλων πιθανών μετρήσεων είναι πολύ σημαντικές τόσο για την μύρα όσο και για το κρασί. Παρόλη την σημαντικότητα των μετρήσεων, ενώ στον χώρο της παρασκευής του κρασιού γίνονται συστηματικά σχεδόν σε επίπεδο ρουτίνας, στην μύρα λόγω του ότι το προϊόν είναι χαμηλότερου αλκοολικού τίτλου οι ζυμώσεις σταματούν δύσκολα.

Η σημαντικότητα των μετρήσεων όπως σημειώθηκε είναι αρκετά υψηλή εξαιτίας μιας πληθώρας λόγων και επιπλέον όταν χρησιμοποιούνται πρόσθετα (adjuncts) τα οποία δεν έχουν ή έχουν λίγο άζωτο. Μέσα από τις μετρήσεις καθίσταται δυνατή η επιλογή

των σωστών ζυμών, ώστε να επιτευχθούν τα επιθυμητά αποτελέσματα σε γεύση, σταθερότητα αφρού, στην θολερότητα και στην αποφυγή μη επιθυμητών αρωμάτων και γεύσεων. Επίσης, οι μετρήσεις επενεργούν θετικά και ως προς την διαδικασία παραγωγής, μέσω των μετρήσεων δίνεται η δυνατότητα ελέγχου στην διαδικασία ζύμωσης και μπορούν να αποφευχθούν πιθανές διακοπές στην ζύμωση. Οι μετρήσεις παρέχουν την δυνατότητα στους ζυθοποιούς, της επισταμένης παρακολούθησης της διαδικασίας ζύμωσης και να καταγράφουν με αριθμητική ακρίβεια όλη την διαδικασία. Μέσω αυτού τα εμπορικά σήματα καταγραφής των θρεπτικών ουσιών μπορούν να λάβουν χώρα οι απαραίτητες τροποποιήσεις και προσθαφαιρέσεις υλικών προς επίτευξη των επιθυμητών αποτελεσμάτων. Τέλος, οι μετρήσεις συμβάλουν στην δημιουργία νέων συνταγών.

Μέσα από την βιβλιογραφική διερεύνηση της συμβολής του αζώτου στην ζύμωση και στην συνολική διαδικασία παρασκευής, αναδείχθηκε η σημασία της συγκέντρωσης του FAN, καθώς η ανάπτυξη της μαγιάς εξαρτάται από το άζωτο. Σε περιπτώσεις που οι τιμές του FAN είναι μικρότερες από 100 mg/L, δηλαδή δεν υφίστανται η βέλτιστες συγκεντρώσεις διαθέσιμου αζώτου, συναντάται καθυστέρηση της ζύμωσης, ατελή ζύμωση και έκλυση πιθανόν ανεπιθύμητων ουσιών. Υπάρχει επίσης, ευθεία εξάρτηση του υψηλόβαθμου ζυθογλεύκου (16 °P) και της μείωσης του pH κατά την ζύμωση από τα επίπεδα και την διαθέσιμη ποσότητα του FAN που χρησιμοποιείται.

Στην παρούσα διπλωματική παρουσιάστηκαν μια σειρά μεθόδων ανάλυσης του αζώτου στην μύρα, κάθε μέθοδος ενείχε διακριτά χαρακτηριστικά όσον αφορά της ενεργειακές απαιτήσεις, το εξοπλιστικό κόστος και την χημική διαδικασία που ακολουθείται. Υπό την σκέπη μιας επέκτασης και διάδοσης των μετρήσεων αζώτου κατά την παρασκευή μύρας, τα οφέλη των οποίων σημειώθηκαν παραπάνω, θα μπορούσαμε να διακρίνουμε τις μεθόδους ως προς την ευκολία υλοποίησης και το αν απαιτείται πρόσθετος εργαστηριακός εξοπλισμός ή ένα απλό «κιτ». Επί παραδείγματι, η μέθοδος προσδιορισμού των αζωτούχων ενώσεων στην μύρα με χρήση φασματοσκοπίας MIR, απαιτεί ειδικό και ακριβό εξοπλισμό. Το ίδιο ισχύει και για την μέτρηση του FAN στην μύρα με φασματόμετρο, όπου αν και γίνεται χρήση αντιδραστηρίων χαμηλού κόστους προϋποθέτει παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων με διαδοχικές αραιώσεις, οι οποίες θέλουν χρόνο και συνεχή παρακολούθηση. Μια ακόμα «παραδοσιακή» μέθοδος που εμπίπτει σε αυτή την κατηγορία είναι ο προσδιορισμός του αζώτου και της πρωτεΐνης στην μύρα μέσω καύσης DUMAS, όπου απαιτείται

ακριβός εξοπλισμός, ενέχει υψηλό ενεργειακό κόστος, αν και μετά την απόκτηση του αρχικού εξοπλισμού είναι οικονομική, οικολογική και γρήγορη.

Στον αντίποδα οι υπόλοιπες μεθοδολογίες που μελετήθηκαν στην παρούσα διπλωματική γίνονται με την χρήση εμπορικών «κιτ», τα οποία εξασφαλίζουν εργονομία, ταχύτητα και ευκολία χρήσης. Τέτοιες μέθοδοι είναι, ο προσδιορισμός του FAN ή της αμμωνίας με ενζυμική μέθοδο σε φασματόμετρο ή ενζυμικό αναλυτή, ο προσδιορισμός του αφομοιώσιμου αζώτου με υπολογιστική αυτόματη μέθοδο ενζυμικού αναλυτή η δια μέσω υπολογισμού των χειριστών, ο προσδιορισμός της ολικής πρωτεΐνης με αυτόματη μέθοδο σε ολικό αναλυτή και ο προσδιορισμός του FAN σε μύρα και «wort» με το CDR Beerlab. Όλες οι μέθοδοι που παρατέθηκαν παραπάνω προσφέρουν μια σειρά διευκολύνσεων προς τους ζυθοποιούς που θέλουν να προσδιορίσουν το άζωτο στην μύρα που παρασκευάζουν. Αρχικά τα αντιδραστήρια σε όλες τις μεθόδους παρέχονται και περιλαμβάνουν έτοιμα πρότυπα διαλύματα. Εκτός αυτού, διαθέτουν στοιχεία επαναληψιμότητας, ελέγχου ποιότητας και πρόκειται περί ιγνηλάσιμων μεθόδων. Αυτό, σημαίνει πως σε αυτές τις μεθοδολογίες γνωρίζουμε πότε συντελέστηκε η μέτρηση, από ποιον, υπό ποιο τρόπο έγινε η βαθμονόμηση, δίνουν ανατροφοδότηση ως προς τον έλεγχο ποιότητας και της κακής λειτουργίας του αναλυτικού συστήματος, όπως για παράδειγμα σε περιπτώσεις που πιθανώς να έχει λήξει το «κιτ». Τέλος, καμία εξ αυτών των μεθόδων δεν απαιτούν εξειδικευμένο προσωπικό.

Έχοντας καλύψει το ζήτημα των μεθοδολογιών μέτρησης του αζώτου από τεχνικής απόψεως και των διευκολύνσεων που δίνουν τα εμπορικά «κιτ», μπορούμε να κλείσουμε διατυπώνοντας ορισμένα σχόλια σχετικά με την ζυθοποιία και της μεθόδους μέτρησης του αζώτου σε Ελλάδα και εξωτερικό. Διαθέτουμε αρκετές μαρτυρίες από τον Ευρωπαϊκό χώρο για ορισμένες από τις μεθόδους που αναλύθηκαν στην εργασία που υποδεικνύουν την εργονομία και την ευκολία που προσφέρουν στου ζυθοποιούς. Σύμφωνα με το Εκπαιδευτικό Κέντρο Ζυθοποιίας της Βαρκελώνης, η Smart Analysis είναι ιδανική για μικρές και μεσαίες ζυθοποιίες και βοηθά στον έλεγχο ποιότητας και στην επισκόπηση της διαδικασίας παρασκευής. Η Brekeriet Brewery που εδρεύει στην Σουηδία, ακολουθεί και αυτή την μέθοδο Smart Analysis και αναφέρεται στις δυνατότητες ανάλυσης που προσφέρει η μέθοδος, που έχει ως απόρροια την βελτιστοποίηση της διαδικασίας. Το BeerLab που χρησιμοποιείται από την Bad Co και

την Cloudwater, χαίρει εξίσου σχολίων που εξάρουν την ακρίβεια και την ταχύτητα του αναλυτή και την σιγουριά που προσδίδει ο αναλυτής στην διαδικασία παρασκευής.

Τέλος, στην χώρα μας λόγω της σχετικά μικρής παραγωγής των ζυθοποιιών δεν γίνονται οι «απαραίτητες» μετρήσεις, ενώ παράλληλα οι διάφοροι αντιπρόσωποι αναλυτικών συστημάτων κοστολογούν πολύ υψηλά τον τεχνικό εξοπλισμό. Μια πιθανή απάντηση σε αυτό το πρόβλημα, που αφορά κυρίως την μικρής κλίμακας ζυθοποιία θα ήταν να χρησιμοποιήσουν τις επιδοτήσεις της Περιφέρειας (όπως κάνουν τα οινοποιεία και να έχουν επιδότηση 50% στον εξοπλισμό). Μία άλλη πρόταση θα ήταν να απευθυνθούν στις Εταιρίες εξοπλισμού και να αναζητήσουν λύσεις μακροχρόνιας μίσθωσης ή ενοικίασης του εξοπλισμού.

## **Βιβλιογραφία**

### Άρθρο Περιοδικού

Agu, R.C., (2003). Some relationships between malted barleys of different nitrogen levels and the wort properties. *Journal of the Institute of Brewing*, 109(2), pp.106–109.

Amoros, R. (2022). *Visualizing Which Countries Drink the Most Beer*. Visual Capitalist. Retrieved 4 September 2022, from <https://www.visualcapitalist.com/which-countries-drink-the-most-beer/>.

Aroh, Kenechukwu. Uchechukwu ,(2018) Review: Beer Production , January 2019SSRN Electronic Journal, DOI:10.2139/ssrn.3458983

Bamforth, C.W., (2008). Wort composition and Beer Quality. *Brewing Yeast Fermentation Performance*, pp.75–85.

Barrett, J. & Kirsop, B.H., (1971). The relative contributions to wort nitrogen of nitrogenous substances solubilized during malting and mashing. *Journal of the Institute of Brewing*, 77(1), pp.39–42.

- Bely, M., Rinaldi, A. & Dubourdieu, D., (2003). Influence of assimilable nitrogen on volatile acidity production by *saccharomyces cerevisiae* during high sugar fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96(6), pp.507–512.
- Bokulich, N. A., Bamforth, C. W., and Mills, D. A., (2012). A review of molecular methods for microbial community profiling of beer and wine. *Journal of American Society Brewing Chemists*, 70:150–162.
- Bokulich, N. A., and Bamforth, C. W., (2013). The Microbiology of Malting and Brewing. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2 (77):157–172.
- Boulton, C.A., (1991). Developments in brewery fermentation. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 9(1), pp.127–182.
- Burger, W.C. & Schroeder, R.L., (1976). Factors contributing to wort nitrogen. I. Contributions of malting and mashing, and effect of Malting Time. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 34(2), pp.133–137.
- C.Lekkas, A.E. Hill, & G.G. Stewart (2014). Extraction of fan from Malting Barley during malting and mashing. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*.
- Campbell, S. L., (2017). The continuous brewing of beer. VI-Food-A-Beer:1-8
- Carrau, F. et al., (2010). Effect of *saccharomyces cerevisiae* inoculum size on wine fermentation aroma compounds and its relation with assimilable nitrogen content. *International Journal of Food Microbiology*, 143(1-2), pp.81–85.
- Chlup, P. H., Bernard, D., and Stewart, G. G., (2008). Disc stack centrifuge operating parameters and their impact on yeast physiology. *Journal of Institute of Brewing*, 114:45– 61.
- Daenen, L., Saison, D., Sterckx, F., Delvaux, F. R., Verachtert, H., and Derdelinckx, G., (2008). Screening and evaluation of the glucoside hydrolase activity in *Saccharomyces* and *Brettanomyces* brewing yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, 104:478 – 488.
- Dharmadhikari, M. (2001). Nitrogen metabolism during fermentation. *Vineyard Vintage View*, 17, 5–7.

Kenekchukwu Aroh ,Eight degrees brewing, (2018). Brewing Process. Available at <https://www.eightdegrees.ie/brewingprocess-2/>. Accessed on 05/09/2022.

Enari, T.-M., Mikola, J. & Linko, M., (1964). Restriction of proteolysis in mashing by using a mixture of barley and malt. *Journal of the Institute of Brewing*, 70(5), pp.405–410.

Ferreira, I. & Guido, L., (2018). Impact of wort amino acids on beer flavour: A Review. *Fermentation*, 4(2), p.23.

Ferreira, I., Pinho, O., Vieira, E., and Tavarela, J. G., (2010). Brewer's *Saccharomyces* yeast biomass: characteristics and potential applications. *Trends in Food Science and Technology*, 21:77– 84.

Folkes, B.F. & Yemm, E.W., (1956). The amino acid content of the proteins of barley grains. *Biochemical Journal*, 62(1), pp.4–11.

Folkes, B.F. & Yemm, E.W., (1958). The respiration of barley plants. X. Respiration and the metabolism of amino-acids and proteins in germinating grain. *New Phytologist*, 57(1), pp.106–131.

Garrett, J.M., (2008). Amino acid transport through the *saccharomyces cerevisiae* gap1 permease is controlled by the Ras/Camp Pathway. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40(3), pp.496–502.

Hazelwood, L.A. et al., (2008). The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: A century of research on *saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(8), pp.2259–2266.

Hornsey, I.S., (2007). *A history of beer and brewing*, Cambridge: Royal Society of Chemistry.

Justin , (2018). Controlling Beer Fermentation and Fermentability. Available at <https://www.winning-homebrew.com/beer-fermentation.html>. Accessed on 05/09/2022.

Jones, A.M. & Ingledew, W.M., (1994). Fuel alcohol production: Appraisal of nitrogenous yeast foods for very high gravity wheat mash fermentation. *Process Biochemistry*, 29(6), pp.483–488.

- Jones, M. & Pierce, J.S., (1964). Absorption of amino acids from wort by yeasts. *Journal of the Institute of Brewing*, 70(4), pp.307–315.
- Keukeleire, D., (2000). Fundamentals of beer and hop chemistry. *QUÍMICA NOVA*, 23(1):108-112.
- Lekkas, C. et al., (2007). Elucidation of the role of nitrogenous wort components in yeast fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, 113(1), pp.3–8.
- Lekkas, C. et al., (2009). The role of small wort peptides in brewing fermentations. *Journal of the Institute of Brewing*, 115(2), pp.134–139.
- Magasanik, B. & Kaiser, C.A., (2002). Nitrogen regulation in *saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 290(1-2), pp.1–18.
- Mikola, J. & Kolehmainen, L., (1972). Localization and activity of various peptidases in germinating Barley. *Planta*, 104(2), pp.167–177.
- O' Kelly, D. (2014). *What Does the Beer You Drink Say About Your Personality?*. HubPages. Retrieved 4 September 2022, from <https://discover.hubpages.com/food/10-Things-Only-Narcoleptics-Can-Understand>.
- Ore, G., Mironov, M., and Shootov, A., (2018). Design and production of maize beer. *MOJ Food Processing and Technology*, 6(1) :78–87.
- Osman, A.M. et al., (2002). Characterisation and assessment of the role of Barley Malt endoproteases during malting and Mashing<sup>1</sup>. *Journal of the Institute of Brewing*, 108(1), pp.62–67.
- Pierce, J.S., (1987). Horace Brown Memorial lecture the role of nitrogen in brewing. *Journal of the Institute of Brewing*, 93(5), pp.378–381.
- Procopio, S., Qian, F., and Becker, T., (2011). Function and regulation of yeast genes involved in higher alcohol and ester metabolism during beverage fermentation. *European Food Research and Technology*, 233:721–729.
- Regenberg, B. et al., (1999). Substrate specificity and gene expression of the amino-acid permeases in *saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, 36(6), pp.317–328.



S.R.Griffinand I.C.MacWilliam (1969). VARIATION OF CELL WALL CONTENTIN FLOCCULENT AND NON-FLOCCULENT YEASTS TRAINS The Institute of Brewing & Distilling , Vol. 75, pp.355-358

Sánchez, H. C., (2017). The mathematics of brewing. Available at <http://chalkdustmagazine.com/blog/themathematics-of-brewing/>. Accessed on 08/09/2022.

Shewry, P.R. & Halford, N.G., (2002). Cereal seed storage proteins: Structures, properties and role in grain utilization. *Journal of Experimental Botany*, 53(370), pp.947–958.

Stewart, G. G., (2016). *Saccharomyces species in the Production of Beer*. *Beverages*, (2) 34: 1-18.

Stewart, G., (2017). The production of secondary metabolites with flavour potential during brewing and distilling wort fermentations. *Fermentation*, 3(4), p.63.

Stewart, G.G., Hill, A. & Lekkas, C., (2013). Wort fan – its characteristics and importance during fermentation. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 71(4), pp.179–185.

Stewart, G.G., Hill, A.E. & Russell, I., (2013). 125th Anniversary review: Developments in brewing and distilling yeast strains. *Journal of the Institute of Brewing*, 119(4), pp.202–220.

Stieger, B., (2007). Amino acid permeases. *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, pp.1–2.

McGovern, P., Glusker, D., Exner, L., Voigt, M. (1996). Neolithic resinated wine. *Nature* 381:480–81.

Taylor, J.R., (1983). Effect of malting on the protein and free amino nitrogen composition of Sorghum. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 34(8), pp.885–892.

Lea, A., Piggott, J., (1995). *Fermented beverage production*. Glasgow, UK: Blackie Academic and Professional.

Verbelen, P. J., Dekoninck, T. M., Saerens, S.M., Van Mulders, S. E., Thevelein, J. M., and Delvaux, F. R., (2009). Impact of pitching rate on yeast fermentation performance and beer flavour. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82:155– 167.

Wong, (2003). Role of Yeast in Production of Alcoholic Beverage. *Botany*135, 1: 30-45.

### Βιβλία

An Introduction to BREWING SCIENCE & TECHNOLOGY Series III BREWER'S YEAST THE “IBD blue book on Yeast” σελ.47, 48, 52

Bianchi-Bosisio, in *Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition)*, 2005

Hardwick, W., (1995). History and antecedents of brewing. In: Hardwick WA, editor. *Handbook of brewing*. New York: Marcel Dekker. p. 37 – 51.

Stewart, (2016). *Brewing and Distilling Yeasts* (pp.109-146)

Τεχνολογίες Βύνης & Ζύθου , Η. Νερατζής, Π. Ταταρίδης, Δ. Κεχαγιά (2014)

### Bulletin

Ammonia – Biosystems COD 12809 100ML

Application Note AN B408  
[https://takimya.com/storage/pdf/AN\\_B408\\_Determination\\_Nitrogen\\_in\\_%20beer\\_EN.pdf](https://takimya.com/storage/pdf/AN_B408_Determination_Nitrogen_in_%20beer_EN.pdf)

D10415\_03\_Insert\_Total\_Protein\_BiuretTemplateQ D08896\_01 2015 Thermo Fisher Scientific Inc.

Primary Amino Nitrogen – Biosystems COD 12807 100ML

### Δευτερογενής Πηγή

APPLICATION NOTE F&F-D-001-2012/A3 VELP SCIENTIFICA

ASBC Methods of Analysis / <https://www.asbcnet.org/methods/pages/default.aspx>

*Beer Market Size, Share, Growth | Global Industry Trends [2028].*

CDR User Guide - 3rd edition/ <https://www.gusmerenterprises.com/wp-content/uploads/2022/04/CDR-User-Guide.pdf>

EBC <https://brewup.eu/ebcanalytica>

Fortunebusinessinsights.com. (2021). Retrieved 5 September 2022, from <https://www.fortunebusinessinsights.com/beer-market-102489>.

Graham G. Stewart <https://beerandbrewing.com/dictionary/o1j9KOtQ4v/> (The Oxford Companion to Beer definition of free amino nitrogen (FAN))

Price list 2017 Research Centre Weihenstephan for Brewing and Food Quality / [https://www.blq-weihenstephan.de/fileadmin/pdf/Pricelist\\_2017\\_N\\_Stand\\_20072020.pdf](https://www.blq-weihenstephan.de/fileadmin/pdf/Pricelist_2017_N_Stand_20072020.pdf)

*Reinheitsgebot - Wikipedia.* En.wikipedia.org. (2022). Retrieved 4 September 2022, from <https://en.wikipedia.org/wiki/Reinheitsgebot>.

Sánchez (2017) <https://chalkdustmagazine.com/blog/the-mathematics-of-brewing/>

SHORT PROTOCOL No. 09 I June 2015, Jessica Geisler<sup>1</sup>, Natascha Weiß<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>Eppendorf North America; <sup>2</sup>Eppendorf AG Free Amino Nitrogen (FAN) Measurement in Beer using an Eppendorf BioSpectrometer®

TFE ,(2015) <https://tfetimes.com/how-to-be-a-beer-expert/>

THE EUROPEAN REFERENCE ANALYTICAL METHODS FOR BREWERIES