

Αλημπαμπούδη Δήμητρα
ΑΜ:151002
Κοττάκης Χριστόφορος
ΑΜ:14209



ALMOST BEER

HANDCRAFTED IN ATHENS 2020
FULLY AGED AND QUALITY CONTROLLED

ABV:0,5% 500ML

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

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Παραγωγή μύρας χωρίς αλκοόλ.

Δήμητρα Αλημπαμπούδη

ΑΜ: 151002

Χριστόφορος Κοττάκης

ΑΜ:14209

Επιβλέπων:

Δέσποινα Κεχαγιά

Διασαφήσεις εξεταστικής επιτροπής

Οι υπογράφωντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη διπλωματική εργασία με τίτλο «Παραγωγή μπύρας χωρίς αλκοόλ» και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

Ψηφιακή Υπογραφή Επιβλέποντα Καθηγητή (1^ο Μέλους Επιτροπής)	
Ψηφιακή Υπογραφή Καθηγητή (2^ο Μέλους Επιτροπής)	
Ψηφιακή Υπογραφή Καθηγητή (3^ο Μέλους Επιτροπής)	

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Οι κάτωθι υπογεγραμμένοι **ΑΛΗΜΠΑΜΠΟΥΔΗ ΔΗΜΗΤΡΑ** του **ΔΗΜΗΤΡΙΟΥ** με αριθμό μητρώου **151002**, **ΧΡΙΣΤΟΦΟΡΟΣ ΚΟΤΤΑΚΗΣ** του **Κωνσταντίνου**, με αριθμό μητρώου **15205** φοιτητές του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστημών Οίνου, Αμπέλου και Ποτών, δηλώνουμε ο καθένας υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Ονοματεπώνυμο & Υπογραφή Συγγραφέα Πτυχιακής Εργασίας

Αλημπαμπούδη Δήμητρα.....

Κοττάκης Χριστόφορος.....

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα εργασία αποτελεί μια μελέτη των φυσικών και βιοχημικών συνθηκών που μπορούν να επιδράσουν στον μεταβολικό μονοπάτι που ακολουθούν οι ζύμες του ζύθου ώστε να περιοριστεί η παραγωγή της αιθανόλης και να παραχθεί μια μπίρα χωρίς ή με ελάχιστο αλκοόλ. Ένα τέτοιο προϊόν εκφράζεται στον σύγχρονο πολιτισμό ως ανάγκη από πλευράς των καταναλωτών που επιδιώκουν έναν υγιεινό τρόπο ζωής όπου το αλκοόλ θα συμμετάσχει στο ελάχιστο χωρίς να στερούνται τις γευστικές απολαύσεις της μπίρας. Αλλά και από πλευράς της βιομηχανίας ζύθου η μπίρα χωρίς αλκοόλ προβάλλει ως μια καινοτομία που έρχεται να απαντήσει στις σύγχρονες ανάγκες. Ξεκινώντας από απλές διαδικασίες όπως είναι ο βρασμός της μπίρας ώστε να απομακρυνθεί η αιθανόλη οι τεχνολογικές διαδικασίες εξελίχθηκαν με τα χρόνια. Μηχανικές διατάξεις που συνδυάζουν σύνθετες μεταβολές των φυσικών συνθηκών όπως πίεσης και θερμοκρασίας παρήγαγαν μπίρα χωρίς αλκοόλη αρκετά ποιοτική. Συγχρόνως όμως εξελίχθηκαν και βιοχημικές παρεμβάσεις στην ίδια την ανάπτυξη των ζυμών, των ζωντανών αυτών οργανισμών που ευθύνονται για της ζυθοποίηση. Από την πιο απλή επιλογή και απομόνωση εκείνων των στελεχών που παράγουν λιγότερη αλκοόλη έως τον γενετικό μετασχηματισμό των ζυμών που συμμετέχουν στην ζύμωση του ζυθογλεύκου, οι προσπάθειες της επιστήμης της βιοτεχνολογίας συνέβαλαν και συμβάλλουν σημαντικά στο ίδιο σκοπό δηλ. στη παραγωγή μπίρας χωρίς αλκοόλ.

Η παρούσα εργασία επιχειρεί να συμβάλει με τη σειρά της, στην μελέτη και την ερευνά των συγχρόνων και περίπλοκων αλληλεπιδράσεων κατά τον μεταβολισμό των ζυμών, μελετώντας και επιβεβαιώνοντας πειραματικά πώς η αυξημένη θερμοκρασία κατά την διαδικασία πολτοποίησης, η μείωση του pH και η χρήση επιλεγμένων ζυμών μπορούν να αποτελέσουν ικανές συνθήκες για την παραγωγή μπίρας με μειωμένη έως ελάχιστη αλκοόλη. Τόσο η υψηλή θερμοκρασία πολτοποίησης όσο και η χρήση ειδικών ζυμών αποδεχθήκαν αποτελεσματικές μέθοδοι για την μείωση της παραγόμενης αλκοόλης, ενώ βοηθητικό ρολό έπαιξε το αρχικά χαμηλό πλατό του ζυθογλεύκου. Η διαδικασία απεδείχθη αρκετά περιπλοκή και ευαίσθητη σε εξωγενείς παράγοντες πράγμα που οδήγησε στην μη επίτευξη του στόχου για λιγότερη από 0,5% αλκοόλη

ABSTRACT

Keywords: Beer with non-alcohol

The present thesis is a study of the physical and biochemical conditions that can affect the metabolic pathway that beer yeasts follow, to reduce ethanol production in order to create a AFBs or NABs beer. This kind of beer is expressed in modern culture as on the part of consumers seeking a healthy lifestyle where the alcohol will be involved to the minimum. From the side of the beer industry promotes non-alcoholic Beer as an innovation that comes to meet modern needs. For start, a simple procedure is the boiling of beer to remove the ethanol, that technological procedure is evolved over the years. Also, mechanical devices set through natural conditions like pressure and temperature produce beer without alcohol with great quality. At the same time, biochemical interventions are involved in the same development of yeasts . The efforts of biotechnology and science are being contributed significantly for the same purpose like in the production of non-alcoholic beer.

This paper is contributed to research and study complex interactions in the metabolism of yeasts. The experiments confirmed that the increased temperature during the process mashing, lowering the PH and using selected yeasts can be suitable conditions for the production of beer with reduced to minimum alcohol.

Αφιέρωση

Στο χρυσό νέκταρ

Ευχαριστίες

Θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε όλους όσους μας βοήθησαν στην εκπόνηση της πτυχιακής μας εργασίας.

Πρώτον, ευχαριστούμε πολύ την κυρία Δέσποινα Κεχαγιά επιβλέπουσα καθηγήτρια της πτυχιακής μας εργασίας, η οποία μας βοήθησε στον συντονισμό της έρευνας. Επίσης, ευχαριστούμε όλους τους καθηγητές του τμήματος Επιστημών Οίνου, Αμπέλου και ποτών που συνέβαλαν και μας παρείχαν πληροφορίες, τον κύριο Ταταρίδη Παναγιώτη επίκουρος καθηγητής, μηχανικής διεργασιών οίνου ζύθου και ποτών, ο οποίος μας παρείχε πρόσβαση σε σημαντικά άρθρα και πληροφορίες που χρησιμοποιήσαμε. Την κύρια Ξηρογιάννη Αικατερίνη για τον δανεισμό εργαστηριακού υλικού για την υλοποίηση πειραματικού μέρους, αλλά και το πανεπιστημιακό ίδρυμα Δυτικής Αττικής για την άδεια χρήσης εργαστηρίων και εργαστηριακών υλικών. Ακόμα θέλουμε να ευχαριστήσουμε την ομάδα οινοποίησης που μας χορήγησε τους ζυμομύκητες για την εξέλιξη των πειραμάτων μας.

Ευχαριστούμε θερμά την ζυθοποιία Αναστασίου για την χορηγία υλικών αλλά και την παροχή χώρου για την διεκπεραίωση του πειραματικού μέρους που λόγω Lockdown δεν είχαμε πρόσβαση στα εργαστήρια του Πανεπιστημίου.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στο οινολογικό εργαστήριο Αναγνωστόπουλος Γεώργιος για την πρόσβαση σε μηχανήματα υψηλής τεχνολογίας και την βοήθεια στις αναλύσεις μας.

Τέλος , ευχαριστούμε τις οικογένειες, τους φίλους και τους συμφοιτητές μας για όλη την οικονομική, ψυχολογική και συναισθηματική στήριξη κατά την διάρκεια των σπουδών μου.

Πίνακας περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	i
ABSTRACT	2
Αφιέρωση	3
Ευχαριστίες	4
1. Εισαγωγή και Σκοπός της Εργασίας Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.....	7
1.1. Γενικά για την μύρα χωρίς αλκοόλ.....	7
1.2. Κίνητρο και Σκοπός της εργασίας.....	7
2. Μύρα χωρίς αλκοόλ αναδρομή στην ιστορία	8
2.1. Στις απαρχές τις ιστορίας της μύρας.....	8
2.2. Με αφορμή την ποτοαπαγόρευση γέννηση της μύρας χωρίς αλκοόλ.....	9
3. Παραγωγή και κατανάλωση μη αλκοολούχας μύρας	11
3.1. Στοιχεία παραγωγής.....	11
3.2. Νομοθεσία.....	12
3.2.1. Νομοθεσία στις Μύρες χωρίς αλκοόλ στην Ελλάδα.....	12
3.2.2. Νομοθεσία στις Μύρες χωρίς αλκοόλ στις υπόλοιπες χώρες.....	12.
3.3. Μύρα εις υγείαν.....	14
4. Εφαρμοσμένη τεχνολογία της μύρας χωρίς αλκοόλ στην βιομηχανία σήμερα	16
4.1. Φυσικές.....	18
4.1.1. Θερμικές [Διόρθωση- Εξάτμιση].....	19
4.1.2. Διεργασίες μεμβράνης [Διάλυση-Αντίστροφη ώσμωση].....	22
4.2. Βιολογικές.....	25
4.2.1. Παραδοσιακό οινοποιείο [Διακοπή ή σταμάτημα της αλκοολικής ζύμωσης- Αλλαγή διαδικασίας πολτοποίησης- ειδικές ζύμες].....	25
4.2.2. Ειδικός εξοπλισμός- Συνεχής Ζύμωση.....	31
5. Επιστημονικές έρευνες στην παραγωγή AFBs	34
5.1. Ανάπτυξη μεθόδων για τον προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών στις μύρες χωρίς αλκοόλ.....	34
5.2. Έλεγχος της συγκέντρωσης των αλδεϋδών που προσδίδουν δυσάρεστη γεύση στις AFBs.....	36

5.3. Γενετική τροποποίηση της ζύμης ζυθοποίησης με στόχο την μείωση της παραγωγής αλκοόλης.....	37
5.4. Έλεγχος της διαμόρφωσης της γεύσης στην AFB μέσω της παρακολούθησης της φυσιολογίας των ζυμομυκήτων κατά την ζυθοποίηση με ακινητοποιημένες ζύμες..	38
5.5. Προβιοτική μύρα μια καινοτόμος πρόταση.....	40
6. Τα στάδια παραγωγής μύρας με εστίαση στη πολτοποίηση και τη χρήση ειδικών ζυμών για παραγωγή μύρας χωρίς αλκοόλη.....	41
6.1. Τα στάδια παραγωγής μύρας	41
6.2. Πολτοποίηση και τροποποίηση προγράμματος πολτοποίησης για περιορισμό παραγωγής της αλκοόλης.....	43
6.3. Χρήση ειδικών ζυμών για την μείωση της αλκοόλης κατά την ζύμωση.....	49
7. Υλικά και μέθοδοι.....	52
7.1. Πειραματική ζυθοποίηση Α΄ - Υψηλή θερμοκρασίας σε αραιωμένο γλεύκος.....	53
7.2. Πειραματική ζυθοποίηση Β΄ - Υψηλή θερμοκρασία σε πυκνό γλεύκος.....	58
7.3. Πειραματική ζυθοποίηση Γ΄ - Μεταβολή του pH προς όξινο.....	64
8. Συγκριτική ανάλυση αποτελεσμάτων.....	68
8.1. Αποτελέσματα και συζήτηση.....	68
8.2. Συμπεράσματα.....	69
9. Βιβλιογραφία.....	70

1. Εισαγωγή

1.1.Γενικά για την μύρα χωρίς αλκοόλ

Όταν ο άνθρωπος ανακάλυψε την μύρα και συγκεκριμένα όταν πριν 5000 χρόνια οι Σουμέριοι καταπιάστηκαν με την παραγωγή της το κύριο ενδιαφέρον στο προϊόν αυτό ήταν το αλκοόλ. Πέρασαν τα χρόνια και μόλις την τελευταία 100ετία ιστορικά γεγονότα πίεσαν την τεχνολογία να αφαιρέσει από την μύρα το αλκοόλ. Η τεχνολογία ανταποκρίθηκε σ' αυτό το κάλεσμα και σ' όλη τη διάρκεια αυτού του αιώνα κάνει δραματικές προσπάθειες να αφαιρέσει αποκλειστικά το αλκοόλ χωρίς να θίξει καμιά άλλη από τις απολαυστικές ιδιότητές της. Αρχικά η αφαίρεση γινόταν με θέρμανση πράγμα που απομάκρυνε εστέρες και ανώτερες αλκοόλες υπεύθυνες για ένα μεγάλο φάσμα γευστικών ιδιοτήτων. Η πρόιμη μη αλκοολούχα μύρα είχε αυξημένη συγκέντρωση αλδεϋδών που μαζί με την έλλειψη αρωμάτων οδηγούσε σε μια “worty” οργανοληπτική εντύπωση[12], Έτσι οι ανάγκες οδήγησαν την τεχνολογία και την βιοτεχνολογία, να αναζητήσει νέους τρόπους όπως χρήση ειδικών στελεχών ζυμών που παράγουν λίγη αλκοόλη χωρίς να στερούν την μύρα από τα υπόλοιπα μεταβολικά προϊόντα τους, χρήση μεμβρανών για αφαίρεση μόνο της αλκοόλης, τεχνικές εξάτμισης μόνο της αλκοόλης και των ανεπιθύμητων ουσιών, τεχνικές ανάκτησης των αρωματικών ουσιών. Στη σημερινή εποχή ανεξάρτητα από οικονομικές και πολιτικές σκοπιμότητες που μπορεί να πιέζουν για αυστηρά νομικά πλαίσια σ' ένα αυστηρά ανταγωνιστικό περιβάλλον, ο άνθρωπος μπορεί να κρίνει την συμβολή του αλκοόλ στην ανάπτυξη του πολιτισμού και να θέσει το μέτρο εκείνο που οριοθετεί την κατανάλωσή του χωρίς κίνδυνο για τη ζωή την υγεία του την ολοκληρωμένη ανάπτυξη της προσωπικότητάς του χωρίς εξαρτήσεις. Έτσι η μύρα χωρίς αλκοόλ αποτελεί μια πρόκληση όχι μόνο για καινοτόμες δράσεις στο πλαίσιο της εισόδου στην αγορά αλλά και σαν μια σύγχρονη απαίτηση για προϊόντα που περικλείουν με ασφάλεια όλη την πολιτιστική κληρονομιά.

1.2.Κίνητρο και Σκοπός της εργασίας

Κίνητρο για αυτή την εργασία απετέλεσε η αναζήτηση καινοτόμων τομέων της παραγωγής μύρας. Στην αναζήτηση καινούργιων προϊόντων που μπορούν να ανοίξουν τόσο την αγορά όσο και τα ενδιαφέροντα των καταναλωτών, βρέθηκε ότι η μύρα χωρίς αλκοόλ αποτελεί πράγματι ένα νέο προϊόν με πολύ μικρή βιβλιογραφία και ελάχιστη πειραματική έρευνα από τα Ελληνικά Πανεπιστήμια. Έτσι αυτή η πτυχιακή δημιουργήθηκε με σκοπό την έρευνα και ανάπτυξη μεθόδων για την παραγωγή μύρας χωρίς αλκοόλ. Με αφορμή, έρευνες και δημοσιεύσεις σχεδόν κατά αποκλειστικότητα ξένης βιβλιογραφίας, η παρούσα εργασία εξειδικεύεται στην επίδραση της μεθόδου πολτοποίησης και στην χρήση ειδικών ζυμομυκήτων για την παραγωγή μη αλκοολούχου ζύθου ή ζύθου με χαμηλό αλκοολικό βαθμό.

2. Μπύρα χωρίς αλκοόλ αναδρομή στην ιστορία

2.1.Στις απαρχές της ιστορίας

Αν η ιστορία των μυκήτων, των προγόνων του *Saccharomyces cerevisiae* τοποθετείται 700 εκατομμύρια χρόνια πριν και η ιστορία της μπίρας 5.000 χρόνια πριν, η ιστορία της μπίρας χωρίς αλκοόλ έχει μόνο 100 χρόνια ζωής. Βέβαια ο άνθρωπος και πιο συγκεκριμένα ο Antony Leeuwenhoek μόλις το 1680 κατάφερε να δει ότι πίσω από τη ζύμωση κρύβονταν οι μύκητες κάποια μικροσκοπικά "ζωάρια". Χρειάστηκαν 150 χρόνια για να μελετηθούν ξανά αυτά τα ζωντανά από τους επιστήμονες, οι οποίοι χωρίστηκαν αρχικά σε δυο στρατόπεδα. Οι μιν θεωρούσαν ότι τα «ζωάρια», ως ζωντανοί οργανισμοί, κινούνται και με τις κινήσεις τους διασπών τα σάκχαρα μέσα στα οποία τυχαίνει να βρεθούν, μια θεώρηση που ονομάστηκε μηχανιστική. Οι αντίπαλοι θεωρούσαν ότι τα «ζωάρια» κοινώς οι ζύμες, χρησιμοποιούν τα σάκχαρα ως υπόστρωμα μεταβολισμού για ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό. Η διαμάχη κατέληξε στη επικράτηση της δεύτερης θεώρησης. Έτσι το 1864 μετά από εντελεχείς μελέτες ο Παστέρ, διέψευσε πλήρως τη μηχανιστική θεωρία των ζυμών και απέδειξε ότι οι ζύμες και οι διαδικασίες μεταβολισμού τους, αποτελούν την αιτία της ζύμωσης.[12]

Αυτή η καθυστέρηση καθόλου δεν εμπόδισε τους Σουμέριους να ανακαλύψουν την ζύμωση, γύρω στη 3^η χιλιετία π.Χ. αρχικά κατά τύχη. Πιθανόν ένα κομμάτι ξεχασμένο ψωμί που βράχηκε, εξελίχθηκε με το χρόνο σε ένα αλκοολούχο ποτό, ικανό να προσφέρει εκτός από την θρεπτική του αξία κυρίως την γευστική απόλαυση του οινοπνεύματος. Οι Σουμέριοι επαναλαμβάνοντας σκόπιμα την ζύμωση που ανακάλυψαν τυχαία κατέληξαν στην ελεγχόμενη παραγωγή μπίρας. Τόσο ελεγχόμενη που στο Βρετανικό Μουσείο του Λονδίνου σε 2 λίθινες πλάκες της 3^{ης} πχ χιλιετίας αποτυπώνονται οι συνταγές άλεσης προϊστορικού τύπου δημητριακού για την παραγωγή μπίρας. Μετά οι Βαβυλώνιοι παίρνοντας τη σκυτάλη της εξέλιξης τους πολιτισμού, Μαζί και τη σκυτάλη της παραγωγής της μπίρας. Κατάφεραν να παράγουν 20 διαφορετικά είδη μπίρας 8 από αυτά παράγονταν από το φυτό «έμερ», 8 από κριθάρι και 4 από μίγμα σπόρων. Τόσο είχαν εξελίξει την παραγωγή αλλά και την εμπορική διακίνηση της μπίρας προς τους Αιγύπτιους που ένας από τους γνωστούς νόμους του βασιλιά Χαμουραμπί αφορούσε την ίδια την μπίρα.

Παραλαμβάνοντας οι Αιγύπτιοι την τεχνογνωσία της μπίρας την προχωράνε ακόμη μερικά βήματα. Σ' αυτούς βρίσκουμε για πρώτη φορά την προσθήκη χουρμάδων ή και προζύμι ψωμιού, παραδόσεις που ακολουθούνται ακόμη και σήμερα, από χωρικούς στις όχθες του Νείλου. Με τη σειρά του ο βασιλιάς Ραμσής, καθιερώνει την μπίρα από κριθάρι ενώ ένα από τα ιερογλυφικά συμβολίζει τον ζυθοποιό.[20]

Ζύθος ονομάστηκε η μπίρα από τον Αριστοτέλη ως αποτέλεσμα βρασμού ή ζέσης δηλαδή της διαδικασίας της ζύμωσης. Πράγμα που δείχνει ότι με τη σειρά τους οι Έλληνες πήραν τις γνώσεις από τους Αιγύπτιους και την παρέδωσαν στους Ρωμαίους. Είναι φανερό ότι ποτέ δεν πήρε η μπίρα εκείνα τα χρόνια τη θέση του οίνου τόσο στον ελληνικό όσο και στο Ρωμαϊκό

πολιτισμό και μάλιστα θεωρώντας το κρασί ως το ποτό των θεών κατέτασσαν την μύρα ως το ποτό των βαρβάρων.

Η υποβάθμιση της μύρας ανατράπηκε κατά τον Μεσαίωνα όταν την παραγωγή της ανέλαβαν τα μοναστήρια. Αφού ως υγρό η μύρα δεν απαγορευόταν κατά τις νηστείες, η παραγωγή της εντάθηκε και η μοναστηριακή ζυθοποιία εξελίχθηκε σε αξιοσέβαστο εμπόριο. Συγχρόνως η τεχνολογία παραγωγής της ακόμη και η επιστημονική έρευνα γύρω από τις βιοχημικές διεργασίες που την συνοδεύουν, απογειώθηκαν μέσα στα μοναστηριακά κελιά. Η προσθήκη πικρών και αρωματικών βοτάνων, ριζών, λουλουδιών και φρούτων άνοιξε καινούργιους δρόμους με πρωταγωνιστή τον Λυκίσκο που καθιερώθηκε για πρώτη φορά στα μοναστήρια Brabant στο σημερινό Βέλγιο. Βέβαια η πρώτη ιστορική αναφορά χρήσης Λυκίσκου δείχνει στην Αίγυπτο την πρώτη χρήση Λυκίσκου μεταξύ του 10^{ου} και 7^{ου} αιώνα προ χριστού. Αλλά η χρήση του κατά τη μοναστηριακή ζυθοποίηση, ανέδειξε την μύρα με την χαρακτηριστικό ευχάριστο άρωμα και την πικράδα, βελτιώνοντας την συντήρησή της. Και επειδή η μύρα δεν έπαψε να είναι ποτέ το αγαπημένο και δημοφιλές ποτό των Γερμανικών φυλών ο Δούκας της Βαυαρίας WILHELM IV στα 1526 θεσπίζει τον «Γερμανικό Νόμο για την ποιότητα της μύρας» ώστε να διαφυλάξει την ποιότητα και τη σταθερότητα της. Ο νόμος αυτό είναι ο παλιότερος νόμος που έχει θεσπιστεί και βρίσκεται ακόμη σε ισχύ. Καθορίζει ότι η ζυθοποιία χρησιμοποιεί μόνο κριθάρι, λυκίσκο και καθαρό νερό. Η χρήση ζυμών δεν αναφέρεται στον νόμο, γιατί στα 1500 δεν ήταν γνωστές οι ζύμες και η ζύμωση γινόταν αυθόρμητα με τις άγριες ζύμες του περιβάλλοντος. Βέβαια κατά την σύγχρονή του εφαρμογή και αφού ο νόμος αντιτίθεται ουσιαστικά στον ελεύθερο ανταγωνισμό, έχει τροποποιηθεί και αναφέρει ότι αν υπάρχουν και άλλα συστατικά αυτά πρέπει να αναγράφονται.

Και όταν η επιστήμη άρχισε να σκορπά τα σκοτάδια του Μεσαίωνα, φώτισε και όλες τις σκοτεινές πλευρές της ζύμωσης. Απέδειξε ότι πρόκειται για μια αυθόρμητη διαδικασία που ενεργοποιείται από τη μικροχλωρίδα της επιφάνειας του σταφυλιού και μετατρέπει το μούστο σε κρασί. Το ίδιο ακριβώς γένος μικροοργανισμών, στη ζυθοποίηση, ο *Saccharomyces cerevisiae*, πραγματοποιεί την αντίδραση της αλκοολικής ζύμωση χρησιμοποιώντας τα σάκχαρα του διαλυτοποιημένου αμύλου των δημητριακών για να αναπτυχθεί και να πολλαπλασιαστεί. Η ιστορική αναδρομή συναντά λοιπόν πάλι στον Louis Pasteur που ανακάλυψε τον *Saccharomyces cerevisiae* και τον μηχανισμό του μεταβολισμού του, αλλά και τον Christian Hansen που αμέσως μετά κατάφερε να τον απομονώσει και στη συνέχεια να τον καλλιεργήσει σε συνθετικό υπόστρωμα (1890) καθιερώνοντας τις καθαρές καλλιέργειες στη παραγωγή μύρας στα 1905.

Και ύστερα ήρθε η βιομηχανική επανάσταση. Η χρήση ατμού σε κάθε είδους μηχανές ώθησε και τη ζυθοποιία στην εκβιομηχάνιση. Καθόλου τυχαίο λοιπόν που το πρώτο τρένο που διέσχισε την Γερμανία μετέφερε συμβολικά δύο μπουκάλια μύρας. Κατόπιν η εφεύρεση της ψυκτικής μηχανής ανεξαρτοποίησε την παραγωγή ζύθου από τους χρονικούς περιορισμούς, ενώ η ανακάλυψη των αραιόμετρων και των θερμόμετρων επέτρεψαν πλέον τον πλήρη έλεγχο της ζύμωσης, την απόλυτη γνώση των αποτελεσμάτων της.

2.2.Με αφορμή την ποτοαπαγόρευση η γέννηση της μύρας χωρίς αλκοόλ

Μύρα χωρίς αλκοόλ δεν συναντάμε καθόλου στα 5000 χιλιάδες χρόνια παρά μόνο στα 1919 και μάλιστα στην Αμερική[2]. Και όσο τυχαία ήταν η πρώτη ανακάλυψη της αλκοολικής

ζύμωσης δεν μπορούμε να πούμε το ίδιο για την ανακάλυψη της μύρας χωρίς αλκοόλ ή αλλιώς «σχεδόν» μύρα.



Εικ.2: 1we want beer συγκέντρωση διαμαρτυρίας ενάντια στη ποτοαπαγόρευση

Η ποτοαπαγόρευση στην Αμερική ήταν ένα σύνθετο κοινωνικοπολιτικό φαινόμενο που οι απαρχές του βρίσκονται στις αρχές του 19^{ου} αιώνα. Τότε σε αρκετές πολιτείες στις ΗΠΑ άρχισαν να ψηφίζουν νόμους που περιόριζαν ή απαγόρευαν τη διάθεση αλκοολούχων ποτών με πρωτοβουλία κυρίως θρησκευτικών προτεσταντικών οργανώσεων. Δύο από τις οργανώσεις που ιδρύθηκαν, η «Ένωση κατά των Σαλούν» και η «Ένωση Γυναικών για τη Χριστιανική Εγκράτεια», μετατράπηκαν γρήγορα σε ισχυρές ομάδες πίεσης και σχημάτισαν το Κόμμα της Απαγόρευσης. Όταν στα 1884 ο Σεντ Τζον που είχε ήδη καταφέρει ως κυβερνήτης του Κάνσας να θέσει το αλκοόλ εκτός νόμου, έβαλε υποψηφιότητα για πρόεδρος των ΗΠΑ έλαβε 150.369 ψήφους και έριξε το σπόρο της ποτοαπαγόρευσης. Στις αρχές του 20^{ου} αιώνα σε συνθήκες του παγκοσμίου πολέμου και φτώχιας πολλοί Αμερικανοί θεωρούσαν αμαρτία τα δημητριακά να πηγαίνουν σε αλκοόλ αντί για τροφή, τα αντιγερμανικά αντανάκλαστικά των Αμερικανών εντάθηκαν ενάντια στους ζυθοποιούς που ήταν κυρίως γερμανικής καταγωγής και επιπλέον οι εκπρόσωποι του επιχειρηματικού κόσμου όπως Ford και Rockefeller ενίσχυσαν οικονομικά το Κόμμα της Απαγόρευσης. Όλα αυτά οδήγησαν στο νόμο της καθολικής απαγόρευσης Volstead το 1920.[24]

Σαν αποτέλεσμα της ποτοαπαγόρευσης όσοι παραγωγοί δεν μετέφεραν τις δραστηριότητές τους στο εξωτερικό πείστηκαν για κάτι διαφορετικό. Και στο σημείο αυτό γεννιέται η μύρα χωρίς αλκοόλ. Τα ζυθοποιεία που ήταν ταυτόχρονα και βυνοποιεία όπως τα Anheuser-Busch, Pabst, Miller και Schlitz, κατάφεραν να επιβιώσουν πουλώντας εκχυλίσματα και σιρόπια βύνης σε φούρνους και στα λεγόμενα “malt-and-hop stores” τα οποία παρήγαγαν την “near beer”. Μία μορφή lager που αρχικά παράγονταν σε υψηλούς αλκοολικούς βαθμούς και μετά αραιώνονταν μέχρι τους 0.5% με την επισήμανση “cereal beverage”. Ανεξάρτητα βέβαια από το γεγονός πως για τις ανάγκες των καταναλωτών κυκλοφορούσαν παράνομα και οι

ενέσεις που εισήγαγαν την εκλιπούσα αλκοόλη και δημιουργούσαν τις λεγόμενες “spiked beer” ή “needle beer”, ένα καινούργιο προϊόν είχε πλέον γεννηθεί και αναζητούσε οπαδούς.[10]

3. Παραγωγή και κατανάλωση σε παγκόσμιο επίπεδο

3.1.Στοιχεία παραγωγής

Τα βασικά κίνητρα που κατευθύνουν από τα τέλη της δεκαετίας του 20^{ου} αιώνα μέχρι σήμερα τις επιχειρήσεις παραγωγής μύρας χωρίς αλκοόλ ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες:

- Καινοτόμα προϊόντα εκεί που η αγορά είναι ιδιαίτερα ανταγωνιστική
- Εναλλακτικά προϊόντα σε καταναλωτές που αγαπούν την μύρα αλλά οι ασχολίες τους απαγορεύουν τη χρήση αλκοόλ όπως αθλητές ή χειριστές μηχανών και γενικά τείνουν προς ένα υγιεινό τρόπο ζωής.
- Διείσδυση σε αγορές που η θρησκεία ή η κουλτούρα απαγορεύει το αλκοόλ

Αν και κάτω από τις αρχικές προσδοκίες των επενδυτών, στην Ευρώπη παρατηρείται μια σταδιακή αύξηση της κατανάλωσης με πρωταγωνιστή την Ισπανία όπου το 10% της κατανάλωσης της μύρας αφορά την μύρα με περιορισμένο αλκοόλ. Στην Γερμανία το ποσοστό αυξήθηκε από 5,4% το 2012 σε 7,3% το 2018, στην Ολλανδία αυξήθηκε από 1,5% το 2012 σε 5,2% το 2018. Γενικά στην Ευρώπη λόγω της έντασης των ελέγχων κυρίως κατά τη διάρκεια της οδήγησης αλλά και από την ίδια την ευαισθητοποίηση των καταναλωτών για μια μετριοπαθή κατανάλωση αλκοόλ, η μύρα χωρίς αλκοόλ βρίσκει όλο και περισσότερους οπαδούς. Σε παγκόσμιο επίπεδο υπήρξε αύξηση του όγκου κατανάλωσης κατά 20% μεταξύ του 2011 και του 2016 ενώ προβλέπεται να αυξηθεί ακόμη 24% το 2021. Και φυσικά η Μέση Ανατολή και η Αφρική μαζί με τη Δυτική Ευρώπη αποτελούν σε όγκο την μεγαλύτερη αγορά στην οποία απευθύνονται σήμερα οι παραγωγοί μύρας με περιορισμένη ή χωρίς καθόλου αλκοόλη.[7]

Κι επειδή σε παγκόσμιο επίπεδο το αλκοόλ είναι ο τρίτος επιβλαβής παράγοντας για την υγεία οι προσδοκίες για την ανάπτυξη της αγοράς της μύρας με περιορισμένη ή καθόλου αλκοόλη είναι μεγάλες, αρκεί βέβαια η παραγωγή του προϊόντος να ανταποκρίνεται και στις προσδοκίες του καταναλωτή που περιμένει να γεύεται ένα προϊόν πολύ κοντά σε αυτό που έχει μάθει ως μύρα.

Άρα η πρόκληση για την νέα αυτή αγορά απαιτεί την συσσώρευση της μέχρι τώρα εμπειρίας, την βαθύτερη και πολυπλοκότερη έρευνα, ώστε ιδιότητες όπως το χρώμα, ο αφρός, η γεύση, το άρωμα, η αίσθηση στο στόμα και η επίγευση να συσχετιστούν με την διαδικασία και να ελεγχθούν ώστε το αποτέλεσμα να είναι ποιοτικό προϊόν με γεύση πολύ κοντά στη μύρα και ελάχιστη ή καθόλου αλκοόλη.

3.2. Νομοθεσία

3.2.1. Νομοθεσία στις Μπύρες χωρίς αλκοόλ στην Ελλάδα

Με το νόμο Φ.Ε.Κ. 90/Α/1989 Ν. 1839/1989

«Ο ζύθος που διατίθεται από τους ζυθοποιούς για την εσωτερική κατανάλωση ή εξαγωγή, πρέπει να έχει αρχική πυκνότητα ζυθογλεύκους τουλάχιστον 7 plato και βαθμό ζύμωσης τουλάχιστον 40% και η αλκοόλη που περιέχεται σε αυτόν να προέρχεται αποκλειστικά από την αλκοολική ζύμωση των πρώτων υλών που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του.»

- Μπύρα με χαμηλή περιεκτικότητα σε αλκοόλη: πρέπει να έχει αρχική πυκνότητα ζυθογλεύκους τουλάχιστον 2plato και αλκοόλη μέχρι 1,5% κ.ο.
- Μπύρα χωρίς αλκοόλη: πρέπει να έχει αρχική πυκνότητα ζυθογλεύκους τουλάχιστον 2 plato και αλκοόλη μέχρι 0,7% κ.ο.

Κατ' εξαίρεση, σε περίπτωση αποστολής μπύρας σε άλλο κράτος μέλος ή εξαγωγής σε τρίτη χώρα, τα όρια που αναφέρονται στην αρχική πυκνότητα ζυθογλεύκους, το βαθμό ζύμωσης και τον αλκοολικό τίτλο είναι δυνατό να τροποποιούνται με απόφαση του Υπουργού Οικονομικών, ώστε η μπύρα να είναι σύμφωνη με τη χώρα προορισμού.

Αξίζει να σημειωθούν τα νομοθετικά όρια σε άλλες χώρες σύμφωνα με το Άρθρο

«Definition of low and non- alcoholic beer- Brewup last update 2017»

3.2.2. Νομοθεσία στις Μπύρες χωρίς αλκοόλ στις υπόλοιπες χώρες

Οι παρακάτω Πίνακες 3:1, 3:2 αναφέρουν τα νομοθετικά όρια σε Άλλες χώρες.

Πίνακας 3 : 1 Νομοθεσίες σε Ευρωπαϊκές χώρες [4]

Country	Original term	English translation	Description	Legal reference
France	bière sans alcool	alcohol-free beer	≤ 1.2% ABV following a dealcoholisation process or the start of a fermentation process	Décret n° 92-307 du 31 mars 1992 stipulates that "bière sans alcool" is the (legal) name of a beer fulfilling these criteria
	alkoholfreies Bier	alcohol-free	≤ 0.5% ABV	Common Law
Germany	Leicht-/Light-Bier	light	30% reduction of alcohol and/or 30% reduction of energy	Regulation (EC)1924/2006
Greece	Ειδικός Ζύθος που δεν έχει αλκοόλη ή έχει χαμηλή περιεκτικότητα σε αλκοόλη	non-alcohol or alcohol-free beer and low alcohol beer	Non-alcohol or Alcohol-free beer: original gravity should be minimum 2 and with an alcohol content maximum 0.7 % by volume (abv) Low alcohol beer: original gravity should be minimum 2 and with an alcohol content maximum 1.5 % by volume(abv) Non-alcohol beer according to the Excise tax regulation is with alcohol content less than 0.5 % by volume (abv)	Regulation 2963/1922 paragraph 3(b), article 3 – According also to Food & Beverage Code Art. 86 L.2960/2001 Customs & Excise Code
Hungary	alkoholmentes sör	non-alcoholic beer	"... a beverage named "non-alcoholic beer", made of malt beer but with an alcoholic content of 0.5 or less percentage by volume"	Excise legislation, Decree No. 13/2004 (II.25.) of the Ministry of Finance
Ireland				NO REGULATION – According to the Revenue Commissioner's Office the tax definition of beer, made from malt, exceeding 0.5% vol ABV and includes any beverage exceeding 0.5% vol containing a mixture of Beer with a non-alcoholic beverage. No legal definition of low alcohol beer.
Italy	birra analolica	alcohol-free	≤ 1.2% ABV	Law 16 August 1962 n. 1354

Πίνακας 3 : 2 Νομοθεσίες σε Άλλες Χώρες

Country	Original term	English translation	Description	Legal reference
Turkey	alcohol free beer	≤0.5% ABV	alcohol free beer	Alcohol Law and Agreement with Ombudsman regarding advertising : i.e. Self-Regulation
	low alcohol	0.5% - 2.8% AB	low alcohol	
	high alcohol content	>6.5% ABV	high alcohol content	
United Kingdom	alcohol-free		<p>Shall not be applied to any alcoholic drink from which the alcohol has been extracted unless</p> <p>a) the drink has an alcoholic strength by volume of not more than 0.05% and</p> <p>b) the drink is marked or labelled with an indication of its maximum alcoholic strength (in one of the forms specified) in regulation 30(1) immediately preceded by the words \"not more than\" or, in an appropriate case, with an indication that it contains no alcohol.</p>	Statutory Instrument 1996 n° 1499 (sunset clause until December 2018 – definitions shall be re-assessed by that date)
	dealcoholised		<p>Shall not be applied to any drink, unless:</p> <p>a) the drink, being an alcoholic drink from which the alcohol has been extracted, has an alcoholic strength by volume of not more than 0.5 per cent, and</p> <p>b) the drink is marked or labelled with an indication of its maximum alcoholic strength (in one of the forms specified) in regulation</p>	
Country	Original term	English translation	Description	Legal reference
United Kingdom			30(1) immediately preceded by the words \"not more than\" or, in an appropriate case, with an indication that it contains no alcohol.	
	"low alcohol" or any other word or description which implies that the drink being described is low in alcohol		<p>Shall not be applied to any alcoholic drink unless:</p> <p>a) the drink has an alcoholic strength by volume of not more than 1.2% and</p> <p>b) the drink is marked or labelled with an indication of its maximum alcoholic strength (in one of the forms specified) in regulation 30(1) immediately preceded by the words \"not more than\" or, in an</p>	
	non-alcoholic (only applies to communion wines)		Shall not be used in conjunction with a name commonly associated with an alcoholic drink, except in the composite name "non-alcoholic wine" when that composite name is used in accordance with regulation 43.	

Όπως αναφέρετε και στο άρθρο οι πληροφορίες προέρχονται από επαγγελματίες ζυθοποιούς και όχι από νομοθέτες. Οπότε μπορεί να μην είναι επαρκώς ενημερωμένο για το 2021.

3.3.Μπύρα εις υγείαν

Τα οφέλη της μπύρας μπορούν να διαχωριστούν σε 2 βασικά σκέλη σε αυτά που υπάρχουν στην κατανάλωση τις οποιαδήποτε μπύρας που εμπεριείχε αλκοόλη και στα πιο συγκεκριμένα οφέλη που έχει η μπύρα χωρίς αλκοόλ.

Από την μείωση του κίνδυνου καρδιολογικών προβλημάτων μέχρι και την ελάττωση πιθανοτήτων ανάπτυξη διάφορων μορφών καρκίνου η μπύρα έχει ωφελήσει των άνθρωπο από τα αρχαία χρόνια μέχρι και σήμερα .Αφού αποτελούσε βασικό προϊόν της διατροφικής συνήθειας και μέσω αυτού μεγάλη πηγή πρόσληψης θρεπτικών συστατικών

Τα οφέλη της μπύρας που εμπεριέχει αλκοόλη αφορούν:

- Την υγεία της καρδιάς:** Η αλκοόλη και τα αντιοξειδωτικά της μπύρας συνδέουν την κατανάλωση της με μέτρο με πολλαπλά οφέλη για την υγεία της καρδιάς, παρόμοια με εκείνα του κρασιού. Παρατηρείται βελτίωση των επιπέδων των λιπιδίων στο αίμα, μείωση δεικτών φλεγμονής, μείωση αντίστασης στην ινσουλίνη.

- **Την υγεία των οστών :** Το αλκοόλ, το πυρίτιο και τα αντιοξειδωτικά της μπύρας φαίνεται να συνδέουν την κατανάλωση της πάντα με μέτρο, με τη διατήρηση της οστικής μάζας, πολύ περισσότερο στις γυναίκες γύρω και μετά την εμμηνόπαυση.

- Καλύτερες γνωστικές λειτουργίες :**Τα άτομα που καταναλώνουν αλκοόλ με μέτρο φαίνεται να εμφανίζουν καλύτερη νοητική λειτουργία συγκριτικά με αυτά που δεν καταναλώνουν αλκοόλ ή καταναλώνουν πολύ μεγαλύτερες ποσότητες! Η επίδραση του στη λειτουργία των αγγείων και στη διάθεση φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο.

- Η μπύρα προλαμβάνει το Alzheimer & το Πάρκινσον:** Η κατανάλωση μπύρας με μέτρο φαίνεται να έχει προστατευτική δράση στην εμφάνιση της νόσου του Alzheimer κυρίως λόγω της περιεκτικότητας της σε πυρίτιο.

- Οι καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες:** Η τακτική μέτρια κατανάλωση αλκοόλ σχετίζεται αρνητικά με τη εμφάνιση καρδιαγγειακών αλλά και με σημαντική μείωση της θνησιμότητας τόσο της γενικής όσο και ειδικά της θνησιμότητας από καρδιαγγειακά. Η διαπίστωση αυτή εξετάστηκε για πρώτη φορά στο κρασί και για πολλά χρόνια έγινε λόγος για το γνωστό πλέον Γαλλικό παράδοξο. Επιδημιολογικές μελέτες που έγιναν την τελευταία δεκαετία δείχνουν ότι και η μπύρα έχει ευεργετικές ιδιότητες. Συνεπώς το αλκοόλ έχει καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες πιθανότατα εξαιτίας της

ικανότητάς του να αυξάνει τα επίπεδα της «καλής» χοληστερόλης HDL, η οποία έχει τη ικανότητα να απομακρύνει τη χοληστερόλη από τους ιστούς και να προστατεύει από τον σχηματισμό της αθηρωματικής πλάκας αλλά και της βελτίωσης της ευαισθησίας στην ινσουλίνη.

•**Προστασία από καρκινογένεση και οστεοπόρωση:** Μελέτες που έγιναν σε πειραματόζωα έδειξαν ότι η μύρα μπορεί να προστατεύσει από καρκινογένεση και οστεοπόρωση. Τελευταία φαίνεται ότι και η μύρα έχει αρχίσει να κατακτά το επιστημονικό ενδιαφέρον το οποίο στρέφεται και προς τον σχεδιασμό μελέτης που θα εξετάσει τις ευεργετικές ιδιότητες της μύρας χωρίς αλκοόλ (μελέτες στις οποίες χρησιμοποιήθηκε κρασί χωρίς αλκοόλη έδειξαν ότι το κρασί έχει ευεργετικές ιδιότητες ανεξάρτητες της αλκοόλης). Επιπλέον, ο λυκίσκος που συμβάλει στην δημιουργία της πικρής γεύσης και στο άρωμα της μύρας της μύρας προσδίδει ουσίες αποκαλούμενες isohumulones οι οποίες φαίνεται ότι μπορούν να βελτιώσουν την παχυσαρκία, τον διαβήτη τύπο 2, τον μεταβολισμό των λιπιδίων και να καταστείλουν την αρτηριοσκλήρυνση.

•Έρευνες απέδειξαν ότι οι άνδρες που πίνουν μύρα μπορεί να μειώσουν τις πιθανότητες να αναπτύξουν καρκίνο του προστάτη. Πειράματα έδειξαν ότι η ουσία **xanthohumol**, ένα μείγμα που παράγεται από τον λυκίσκο της μύρας, «μπλοκάρει» τη χημική αντίδραση που μπορεί να οδηγήσει σε εμφάνιση καρκίνου. Άλλωστε η ασθένεια αυτή αντιμετωπίζεται με φάρμακα που δρουν με παρόμοιο τρόπο στον οργανισμό. Το xanthohumol είναι αντιοξειδωτικό, γνωστό για τις αντικαρκινικές του ιδιότητες.

•Η μύρα μέσω του μεγάλου ποσοστού σε νερό όπου εμπεριέχει και των φυτικών ινών που βρίσκεται σε αυτήν βοηθάει στον καθαρισμό των νεφρών και μειώνει δραματικά την πιθανότητά σχηματισμού πέτρας στα νεφρά

Τα οφέλη της μύρας που δεν εμπεριέχει αλκοόλη

Η μύρα χωρίς αλκοόλ έχει άμεσα και έμμεσα οφέλη στην υγεία μας. Τα άμεσα οφέλη αφορούν όσα προέρχονται από την κατανάλωση της μύρας αυτής καθαυτής όπου κατά το πλείστον είναι παρεμφερή με τα πλεονεκτήματα που έχει και η μύρα που εμπεριέχει αλκοόλη και αναφέρθηκαν προηγούμενα. Επειδή όμως η αλκοόλη για να έχει οφέλη στον οργανισμό πρέπει να περιορίζεται σε λίγα γραμμάρια την ημέρα και η υπέρβαση αυτών των ορίων προκαλεί χρόνιες ζημιές στον ανθρώπινο οργανισμό η μύρα χωρίς αλκοόλη επιτρέπει την μεγαλύτερη κατανάλωσή της κρατώντας μόνο τα οφέλη της

- Όλοι ξέρουμε ότι οδήγηση και αλκοόλ δεν πάνε μαζί. Η μύρα μπορεί πολύ εύκολα να σε ξεγελάσει λόγω του μικρού ποσοστού αλκοόλης που εμπεριέχει

σε σύγκριση με τα αλλά αλκοολούχα ποτά αλλά δυστυχώς η αλήθεια είναι ότι μόλις ½ λίτρο μύρας επηρεάζει αρκετά τα αντανακλαστικά μας ώστε να μειωθεί δραματικά ο χρόνος αντίδρασης μας σε μια κρίσιμη κατάσταση. Απολαμβάνοντας την μύρα χωρίς αλκοόλ μπορεί και ο οδηγός να συμμετέχει στις κοινωνικές εκδηλώσεις.

- Η μύρα εμπεριέχει αρκετά συστατικά όπου βοηθούν ένα άνθρωπο να λάβει μεγάλο ποσοστό θρεπτικών ουσιών και αρκετό νερό για την ανάπλαση του μυϊκού συστήματος μετά από την άθληση ιδιαίτερα οι αστέριωτες και αφιλτράριστες. Αντίθετα αν περιέχουν αλκοόλ οι μύρες είναι απαγορευτικές για τους αθλητές στερώντας τους όχι μόνο την απόλαυση αλλά και την θρεπτική τους αξία
- Η κατανάλωση της μύρας χωρίς αλκοόλ μπορεί να αντικαταστήσει τα αναψυκτικά που περιέχουν μεγάλες ποσότητες ζάχαρης προσφέροντας μια λύση που συνδυάζει την απόλαυση με τον υγιεινό τρόπο ζωής
- Στις εγκύους και γενικά σε όλες τις περιπτώσεις που η κατανάλωση αλκοόλ είναι απαγορευτική η μύρα χωρίς αλκοόλ αντικαθιστά την αναζήτηση ενός ποτού που μόνο θετικά έχει να δώσει στον οργανισμό[20] [16]

4. Εφαρμοσμένη τεχνολογία της μύρας χωρίς αλκοόλ στην βιομηχανία σήμερα και μέθοδοι παραγωγής

Οι μέθοδοι με τις οποίες μπορεί σήμερα να παραχθεί μύρα που να ανήκει στη κατηγορία **AFBs** (alcohol free beers $\leq 0.5\%$) ή και **LABs** (low-alcohol beers $\leq 1.2\%$ αλκοόλ) χωρίζονται βασικά σε δύο μεγάλες κατηγορίες. Η πρώτη αφορά τις μύρες οι οποίες, αφού έχουν κανονικά ζυμωθεί και περιέχουν ένα φυσιολογικό για μύρα ποσοστό αλκοόλ, το αλκοόλ αφαιρείται. Η κατηγορία αυτού του τύπου των διεργασιών ονομάζονται φυσικές αφού η απομάκρυνση της αλκοόλης πραγματοποιείται με τη χρησιμοποίηση ενός φυσικού φαινομένου. Η δεύτερη κατηγορία αφορά τις μύρες που παράγονται έτσι ώστε να περιορίζεται ή να διακόπτεται η παραγωγή αλκοόλης κατά τη διαδικασία τη ζύμωσης. Αυτού του τύπου οι διεργασίες επιτυγχάνονται μέσω του ελέγχου του μεταβολισμού των ζυμών και για αυτό ονομάζονται βιολογικές. Κάθε μία από αυτές τις κατηγορίες υποδιαιρείται σε περισσότερες υποκατηγορίες, με βάση τη χρησιμοποιούμενη φυσική ή βιοχημική ιδιότητα

στην οποία παρεμβαίνει η τεχνολογία ή πάλι με βάση την ίδια την τεχνολογική εξειδίκευση και εφαρμογή που χρησιμοποιείται.[3]

Γενικά οι θερμικές μέθοδοι που είναι και οι πρώτες που χρησιμοποιήθηκαν, είναι οι πλέον δαπανηρές, αφού απαιτούν κατανάλωση ενέργειας αλλά και ειδικό εξοπλισμό. Στις μέρες μας το γευστικό αποτέλεσμα είναι πλέον καλό και είναι σε θέση να αφαιρέσουν ολοκληρωτικά την αλκοόλη. Από την άλλη μεριά οι βιολογικές μέθοδοι δεν απαιτούν ιδιαίτερο τεχνολογικό εξοπλισμό και μπορούν να πραγματοποιηθούν σε παραδοσιακά οινοποιεία δηλαδή με τον υπάρχοντα εξοπλισμό. Παρόλα αυτά η έρευνα και η εξειδίκευση όταν αφορά την επιλογή και παραγωγή ή αγορά ειδικών ζυμών αυξάνει τα έξοδα. Επιπλέον η αφαίρεση της αλκοόλης δεν είναι ολοκληρωτική ενώ το γευστικό αποτέλεσμα ακόμη αποτελεί αντικείμενο επιστημονικών ερευνών, ώστε να πλησιάζει τις κανονικές μύρες. Στην ίδια κατηγορία των βιολογικών διεργασιών ανήκουν και οι συνεχείς ζυμώσεις με ακινητοποιημένες ζύμες που απαιτούν ειδικές επενδύσεις για εξοπλισμό σε βιοαντιδραστήρες που ξεφεύγει από τον παραδοσιακό εξοπλισμό ενός οινοποιείου. Βέβαια καμιά από τις παραπάνω κατηγορίες δεν είναι απόλυτη αφού η ανάγκη για ένα βέλτιστο αποτέλεσμα απαιτεί να αξιοποιηθεί η επιστημονική πλέον γνώση από όλες τις διαδικασίες και να συνδυαστούν τα πλεονεκτήματα από κάθε ιδιαίτερη διαδικασία.



Εικ.4: 1 Διάγραμμα μεθόδων παραγωγής μύρας χωρίς αλκοόλ

Ο βασικός χάρτης της κατηγοριοποίησης των μεθόδων παραγωγής μύρας χωρίς αλκοόλ παρουσιάζεται στην εικόνα 4:1, ενώ στη συνέχεια αναλύονται τα βασικά χαρακτηριστικά κάθε κατηγορίας και υποκατηγορίας.

4.1.Φυσικές Διεργασίες

Οι φυσικές διεργασίες που εφαρμόζονται σήμερα στη βιομηχανία διαιρούνται στις θερμικές και τις διαδικασίες χρήσης μεμβρανών. Με τη σειρά τους οι θερμικές διαιρούνται σε διαδικασίες διόρθωσης και εξάτμισης ενώ των μεμβρανών στις κατηγορίες της διάλυσης και της αντίστροφης ώσμωσης. Αναλυτικά η μεθοδολογία και η τεχνολογία που χρησιμοποιείται είναι η παρακάτω.

4.1.1. Θερμικές

Αρχικά η μύρα χωρίς αλκοόλη παραγόταν με βρασμό την ήδη υπάρχουσα μύρα. Με αυτό τον τρόπο όμως μαζί με την αλκοόλη απομακρύνονταν από την μύρα η καταστρέφονταν και όλες οι ενώσεις που συνεισφέραν στο άρωμα και τη γευστική εντύπωση της μύρας. Γνωρίζοντας στη συνέχεια ότι η υψηλή θερμοκρασία ήταν η αιτία της καταστροφής των χρήσιμων ουσιών και αφού ο βρασμός της αλκοόλης μπορεί να επιτευχθεί όπως και κάθε βρασμός σε χαμηλότερη θερμοκρασία αν η πίεση του αέρα γίνει μικρότερη, αναπτύχθηκαν συσκευές βρασμού σε κενό ή σε χαμηλή πίεση. Σήμερα οι πιέσεις που επιτυγχάνονται είναι της τάξεως των 4-20 kPa, στις οποίες η αλκοόλη βράζει στους 30-60°C. Η σημερινή βιομηχανία χρησιμοποιεί κυρίως μονάδες απόσταξης κενού ή διόρθωσης, και εξατμιστήρες κενού φυγοκεντρικούς ή πτώσεως υδρατμών. (εικόνα 4:2)

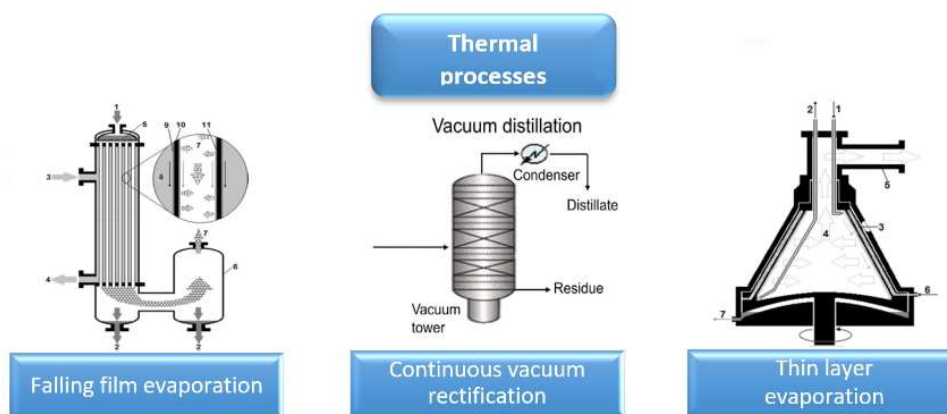


Figure 1. Graphical representation of thermal processes used to obtain non-alcoholic beer (NAB) and low-alcohol beer (LAB), adaptation from [42,67].

Εικ.4: 2 Βασικές θερμικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή [7]

Μονάδα διόρθωσης στο κενό

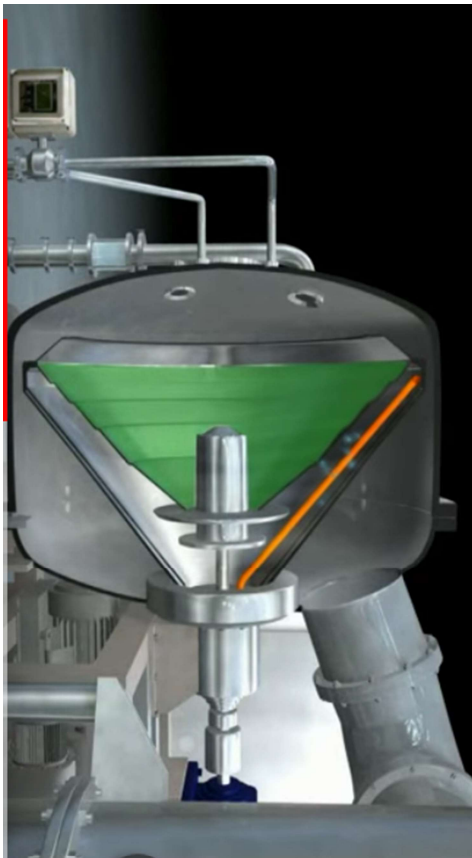
Τα βασικά βήματα της διεργασίας είναι η **προθέρμανση** της αλκοολούχας μύρας, η **απαέρωση** με ταυτόχρονη απελευθέρωση των πτητικών ενώσεων, η **απομάκρυνση της αλκοόλης** και η ανάκτηση των συστατικών του αρώματος με ανακατεύθυνση τους στη μη αλκοολούχα μύρα με **ψεκάσμό του CO₂**. Στοιχεία του τεχνολογικού εξοπλισμού

αποτελούν ένας **πλακοειδής εναλλάκτης θερμότητας**, ο **απαερωτήρας κενού**, η **στήλη διόρθωσης** στην οποία το υγρό ρέει προς τα κάτω στους 42-46°C ενώ ατμοί που παράγονται από την μύρα χωρίς αλκοόλ οδηγούνται στον **εξατμιστήρα** για τον τελικό διαχωρισμό της αλκοόλης από την μύρα.

Οι ατμοί που περιέχουν την αλκοόλη μπορούν είτε να συμπυκνωθούν σε συγκέντρωση 75% και να διατεθούν απ' ευθείας για πώληση ως οινόπνευμα είτε χωρίς συμπύκνωση με συγκέντρωση 8-9% να διατεθούν ως υποπροϊόν για ξίδι.

Εξατμιστές λεπτής μεμβράνης

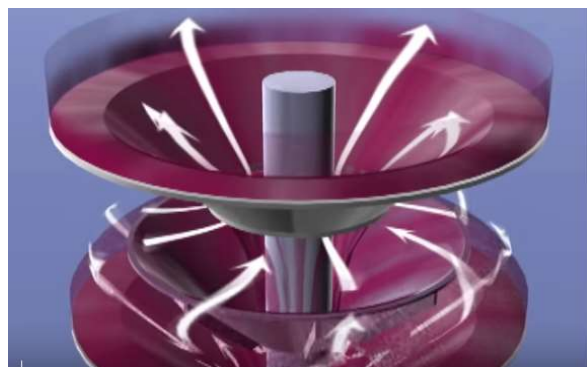
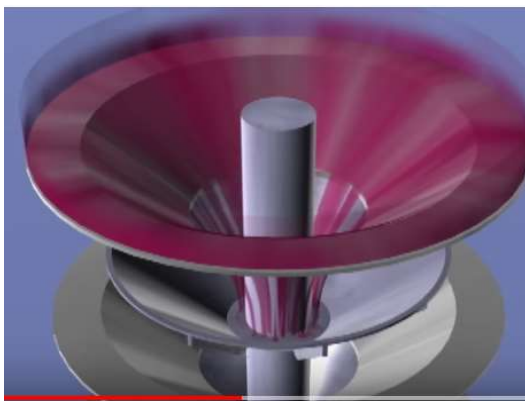
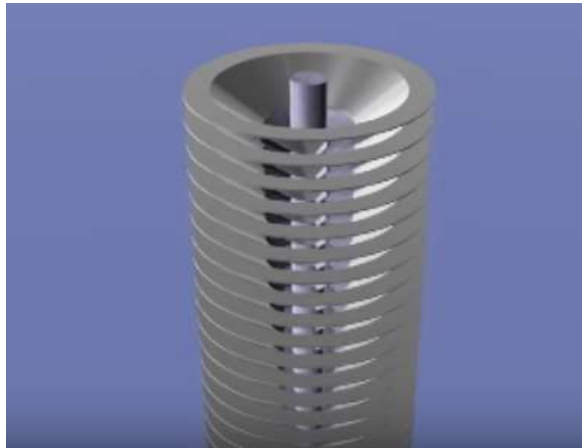
Πρόκειται για συσκευές που λειτουργούν υπό κενό αλλά επιπλέον επιτυγχάνουν να μορφοποιούν τη εισερχόμενη μύρα σε λεπτή μεμβράνη ώστε η εξάτμιση της αλκοόλης να πραγματοποιείται σε ελάχιστο χρόνο και να αποφεύγεται η οποιαδήποτε περαιτέρω έκθεση του προϊόντος σε αλλοιώσεις της ποιότητάς του. Μία εφαρμογή αποτελεί το σύστημα **Centritherm**(εικόνα 4:3). Στο σύστημα αυτό η μύρα εισέρχεται στον περιστρεφόμενο **κωνικό εξατμιστήρα** μέσω **σωλήνα τροφοδοσίας και ακροφύσιο έγχυσης** που την διανέμει στο πυθμένα. Ο **περιστρεφόμενος κώνος** με τις φυγοκεντρικές δυνάμεις που αναπτύσσει εκτοξεύει το υγρό εφαπτομενικά στην εσωτερική του επιφάνεια δημιουργώντας την λεπτή μεμβράνη. Ακολουθεί η θέρμανση της λεπτής μεμβράνης σε εύρος θερμοκρασιών **35-60°C** από την κωνική επιφάνεια η οποία θερμαίνεται για λιγότερο από ένα δευτερόλεπτο, με τη βοήθεια **ατμών**. Η συλλογή της συμπυκνωμένης μύρας χωρίς αλκοόλη γίνεται στο εξωτερικό άκρο του κώνου και βγαίνει από τον εξατμιστή. Ταυτόχρονα οι ατμοί με την αλκοόλη εισέρχονται σ' ένα **σωλήνα εξάτμισης** στο κέντρο του κώνου και οδηγούνται σ' ένα **συμπυκνωτή** για την παραλαβή της αλκοόλης σε υγρή μορφή. Το σύστημα Centritherm συνήθως περιλαμβάνει 12 κώνους και μπορεί να επεξεργαστεί έως **100hl/h**. Έχει εύκολη λειτουργία, μηδαμινή θερμική επίδραση στο προϊόν και μοναδικό μειονέκτημα την πιθανή διείδυση οξυγόνου στις ενώσεις των επί



Εικ.4: 3 Σύστημα Centritherm [22]

μέρους τμημάτων του.

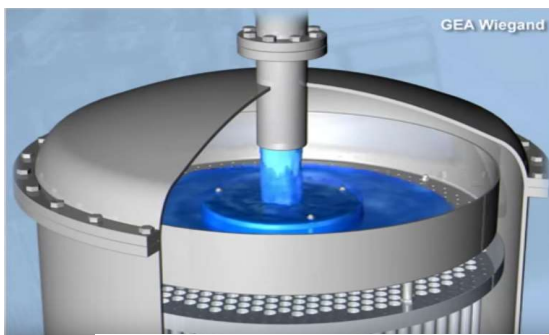
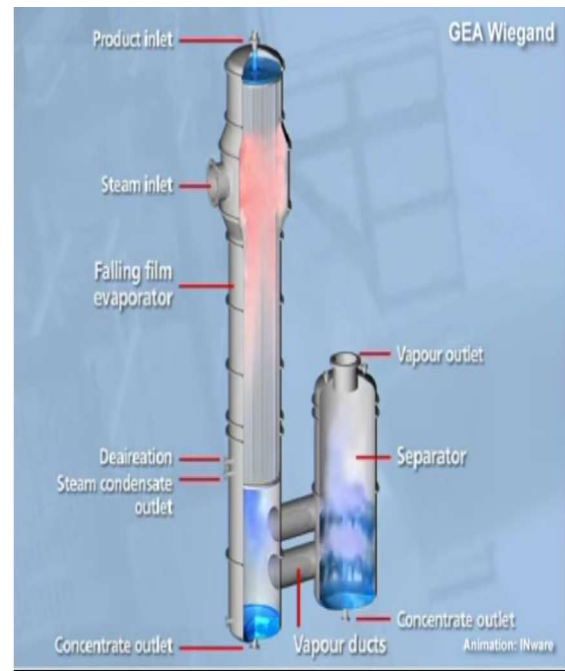
Άλλη διάταξη που παράγει λεπτή μεμβράνη αποτελεί η **περιστρεφόμενη στήλη κώνου**(SCC). Αποτελεί μια διάταξη αντίστροφης ροής υγρού αερίου και χρησιμοποιεί απλό μηχανισμό για μία γρήγορη και αποτελεσματική εξάτμιση της αλκοόλης. Αποτελείται από δύο σειρές αντεστραμμένων κώνων. Στη μία σειρά οι κώνοι είναι σταθερά προσαρτημένοι στο εσωτερικό τοίχωμα της στήλης και στην



Εικ.4: 4 Μέρη της περιστρεφόμενης στήλης- κώνου [26]

άλλη οι κώνοι περιστρέφονται μέσω ενός κοινού περιστρεφόμενου άξονα . οι δύο σειρές εναλλάσσονται παράλληλα. Η αρχική μύρα εισέρχεται στον πρώτο σταθερό κώνο, ρέει προς τον πυθμένα και συλλέγεται στον πρώτο περιστρεφόμενο που με τις φυγοκεντρικές δυνάμεις που αναπτύσσει μορφοποιεί την μύρα σε λεπτή μεμβράνη, η οποία ανέρχεται την επιφάνεια και φτάνοντας στη κορυφή του περιστρεφόμενου κώνου πέφτει στο επόμενο σταθερό κώνο. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται σε ολόκληρη τη σειρά των εναλλασσόμενων κώνων με αποτέλεσμα, την καθοδική πορεία της μύρας υπό μορφή λεπτών μεμβρανών. Το μέσο διαχωρισμού είναι θερμοί ατμοί νερού που διοχετεύονται στη βάση της στήλης και ανερχόμενοι προς τα πάνω συλλέγουν την αλκοόλη από τις λεπτές μεμβράνες την κατερχόμενης μύρας, μαζί βέβαια με άλλες πτητικές ενώσεις της. Τα πτερύγια των περιστρεφόμενων κώνων ειδικά διαμορφωμένα προκαλούν σημαντική ώθηση των ατμών προς τα πάνω , η χαμηλή πίεση επιτρέπει την εξάτμιση στους 40 με 55⁰C και έτσι η μύρα μπορεί μέσα σε χρόνο 20s να αποβάλλει την αλκοόλη μειώνοντας την περιεκτικότητά της από 5% σε 0.01-0.03% κ.ο. Για την ανάκτηση της γεύσης μέσω της επαναρροής των χρησιμων πτητικών εστέρων και ανώτερων αλκοολών έχουν μελετηθεί διάφορες διαδικασίες. Η τεχνολογία SCC δεν εμφανίζει αφρισμό με το υπολειπόμενο CO₂ ούτε συγκρατεί O₂ κατά τη διαδικασία εξάτμισης

Άλλος ένας εξατμιστής που δεν είναι όμως περιστρεφόμενος είναι ο **εξατμιστής μεμβράνης πέλματος**, που αποτελεί και τον πιο οικονομικό εξοπλισμό που αφορά τις θερμικές διαδικασίες. Η αρχική μύρα προθερμαίνεται στους 30-60°C και σε πίεση 3.5-20kPa και αυτή η διαδικασία είναι η πλέον δαπανηρή. Εισέρχεται από την κορυφή της **στήλης εξάτμισης** που περιλαμβάνει μία συσκευή διανομής ώστε καθώς το υγρό πέφτει με τη βαρύτητα **στη διάταξη των κατακόρυφων σωλήνων** δημιουργούνται στα εσωτερικά τους τοιχώματα λεπτές κυλινδρικές μεμβράνες. Λόγω του πλήθους των σωλήνων η συνολική επιφάνεια της λεπτής μεμβράνης είναι ασύγκριτα μεγαλύτερη από τις επιφάνειες των κώνων των προηγούμενων διατάξεων. Ο **ατμός διεργασίας** που εισέρχεται στη κορυφή της στήλης θερμαίνει τις επιφάνειες των σωλήνων και κατ' επέκταση την κατερχόμενη μύρα. Η αλκοόλη της μύρας εξατμίζεται μέσα στους σωλήνες και ρέει προς τα κάτω λόγω της υποπίεσης που δημιουργεί μία **αντλία κενού** συνδεδεμένη στη βάση της συσκευής η οποία ωθεί προς τα κάτω τόσο την μύρα χωρίς αλκοόλη όσο και τους ατμούς τους πλούσιους σε αλκοόλη. Ένας



Εικ.4: 5 Εξατμιστής μεμβράνης πέλματος [25]

διαχωριστής στην έξοδο του εξατμιστή διαχωρίζει την συμπυκνωμένη χωρίς πτητικά και αλκοόλη μύρα από τους ατμούς τους πλούσιους σε αλκοόλη ενώ ο **συμπυκνωτής** αναλαμβάνει την παραλαβή της αλκοόλης σε υγρή μορφή. τα πλεονεκτήματα της συσκευής είναι το χαμηλό κόστος επένδυσης αλλά στα μειονεκτήματα συγκαταλέγονται η μεγάλη απώλεια πτητικών εστέρων και ανώτερων αλκοολών που στερεί το προϊόν από την πλήρη γευστική τους απόλαυση ακόμη και μετά τον επαναπροσανατολισμό των χρήσιμων πτητικών στη συμπυκνωμένη μύρα.

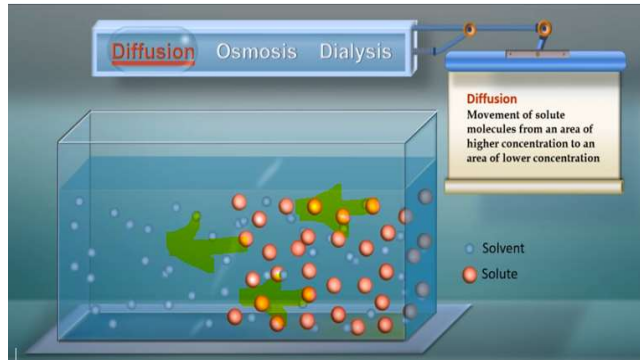
4.1.2. Διεργασίες μεμβράνης

Δύο φαινόμενα εμπλέκονται σε οποιαδήποτε διαδικασία εμπεριέχει **ημιπερατή μεμβράνη** δηλ. μεμβράνη με πόρους που επιτρέπει τη διέλευση μόνο των μορίων που χωρούν να περάσουν. Το ένα είναι ο διαχωρισμός των υλικών ενός μίγματος από την συνολική μάζα ανάλογα με το μέγεθος των μορίων του σε σύγκριση με το αντίστοιχο των πόρων της

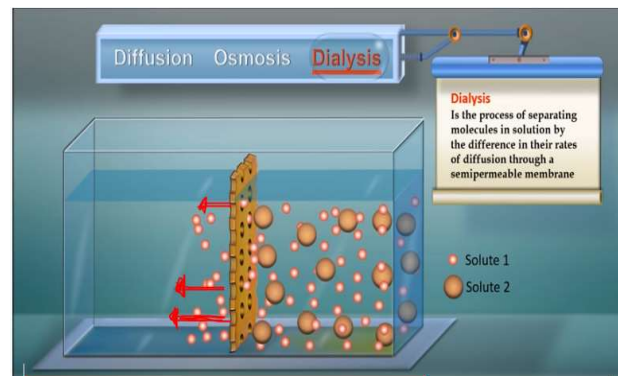
μεμβράνης. Το άλλο είναι η **διάχυση**, ένα φυσικό φαινόμενο μετακίνησης μάζας από περιοχές συγκέντρωσης προς περιοχές μικρότερη ή και μηδενικής. Η διάχυση συμβαίνει φυσικά και χωρίς την παρουσία μεμβράνης και τείνει να εξισορροπήσει τις διαφορές συγκέντρωσης ενός συστατικού προς όλες τις κατευθύνσεις. Όταν όμως τις δύο περιοχές διαφορετικής συγκέντρωσης

οριοθετεί μια ημιπερατή μεμβράνη εξελίσσεται το φαινόμενο της **διάλυσης** όπου τα μόρια επιχειρούν να διαχυθούν προς την αραιότερη περιοχή αλλά περνούν μόνο όσα χωρούν. Για τους σκοπούς της αραιώσης την μύτρας ως προς την αλκοόλη μια τέτοια διαδικασία πρέπει να περιλαμβάνει μεμβράνες που να επιτρέπουν μόνο στην αλκοόλη να περάσει, αν είναι δυνατόν. Τέλος **ώσμωση** είναι μια ακόμη πιο σύνθετη διαδικασία όπου αν δεν χωράνε τα μόρια της διαλυμένης ουσίας να περάσουν από τις οπές για να διαχυθούν, περνούν τα μόρια του διαλύτη πχ του νερού για να αραιώσουν το διάλυμα.

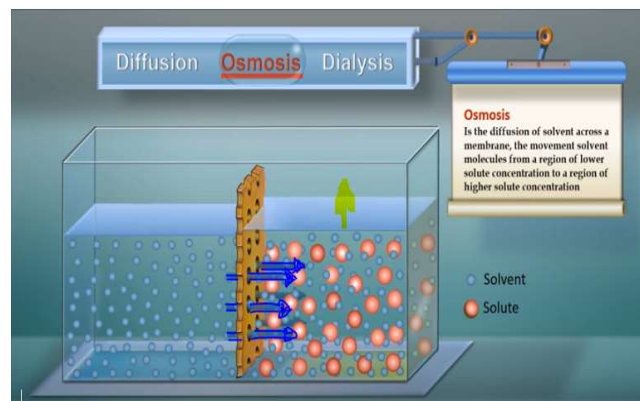
Κάτι τέτοιο δεν έχει ενδιαφέρον για την απομάκρυνση της αλκοόλης αφού δεν μπορεί να προχωρήσει σε διαχωρισμό υλικών όμως υπάρχει η αντίστροφη ώσμωση που παρουσιάζει ενδιαφέρον κατά την εξέλιξη του φαινομένου της ώσμωσης, καθώς ο διαλύτης προχωρά από την μεμβράνη προς το πυκνό



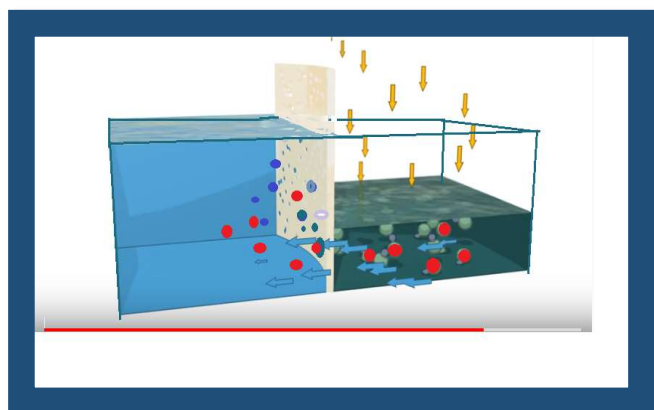
Εικ.4: 8 Διάλυση [28]



Εικ.4: 7 Διάχυση [28]



Εικ.4: 6 Ωσμωση [28]



Εικ.4: 9 Αντίστροφη [22]

διάλυμα ο όγκος του πυκνού τμήματος αυξάνεται η στάθμη ανυψώνεται και δημιουργείται διαφορά πίεσης γνωστή ως οσμωτική πίεση. Αν ασκηθεί τότε στην επιφάνεια του πυκνού υγρού πίεση μεγαλύτερη της οσμωτικής και συνεχώς αυξανόμενη τότε τα μόρια του διαλύτη μπορούν να περάσουν αντίστροφα. Αν δε η μεμβράνη έχει πόρους που χωρούν και άλλα υλικά στη συγκεκριμένη περίπτωση αλκοόλη τότε η αλκοόλη διαχωρίζεται από την μύρα. Η διαδικασία λέγεται αντίστροφη ώσμωση και εφαρμόζεται με τη σειρά της στη βιομηχανία παρασκευής AFBs. Με βάση τα παραπάνω φυσικά φαινόμενα διακρίνουμε τις εξής κατηγορίες απομάκρυνσης της αλκοόλης με μεμβράνες[3],[5],[7]

Μονάδες εφαρμογής της Διάλυσης

Η διάταξη περιλαμβάνει μια συστοιχία κοίλων ινών που αποτελούν τις μεμβράνες μέσω των οποίων πραγματοποιείται η διάλυση. Οι μεμβράνες είναι από κυτταρίνη ή από συνθετικά υλικά. Η αρχική μύρα προωθείται ανοδικά μέσα στις ίνες ενώ περιφερειακά και καθοδικά ρέει ο διαλύτης που προορίζεται να δεχτεί την αλκοόλη. Η αντίθετη ροή μύρας –διαλύτη διευκολύνει την επιτάχυνση της διάλυσης ενώ τόσο στη πλευρά της μύρας όσο και στη πλευρά του διαλύτη ασκείται πίεση ώστε να μην επιτρέψει στο CO₂ να διαταράξει την διάλυση ή να διαφύγει και αυτός. Μερικές φορές στο διαλύτη προστίθεται και CO₂ τόσο για να μη διαφύγει όσο και για να μην επιτρέψει στο O₂ να εισέλθει στη μύρα. Η θερμοκρασία που επικρατεί στο περιβάλλον της διάλυσης είναι 1-6⁰C ώστε να εξαλείφει το θερμικό φορτίο του προϊόντος. Μειονέκτημα αποτελεί ότι μαζί με την αλκοόλη την μεμβράνη διατηδούν και οι εστέρες μαζί με τις ανώτερες αλκοόλες. Ένας βασικός τρόπος ελέγχου της απώλειας των επιθυμητών ουσιών είναι ο λόγος αντίστροφης ροής αρχικής μύρας και διαλύτη.

• TRISEP® RO and NF Membranes > (<https://www.microdyn-nadir.com/wp-content/uploads/TB-002-TRISEP-NADIR-Membrane-Summary-Chart.pdf>)

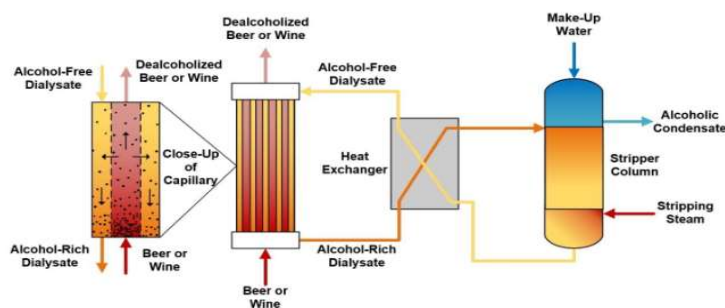


FIGURE 3. FLOW DIAGRAM OF DEALCOHOLIZATION BY DIALYSIS USING CAPILLARY MODULES.

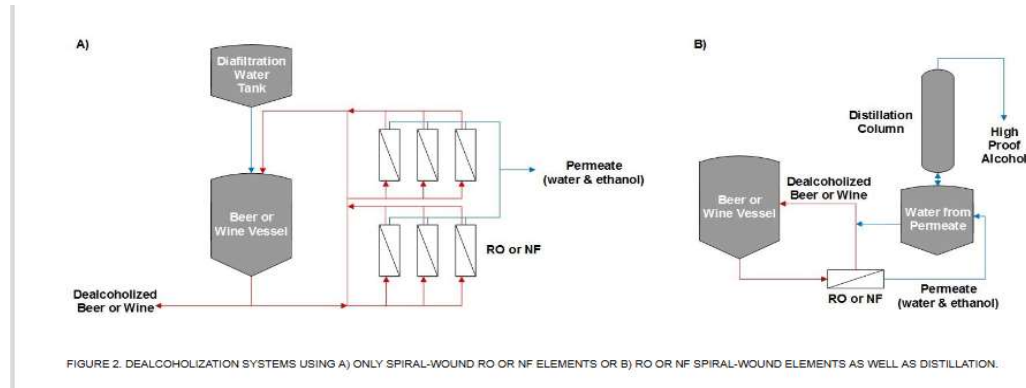
Back to Top (<https://www.microdyn-nadir.com/beverage#>)

Back to Applications by Market (<https://www.microdyn-nadir.com/applications-by-market/>)

Εικ.4: 10 Μονάδα εφαρμογής της διάλυσης[30]

Μονάδες αντίστροφης ώσμωσης

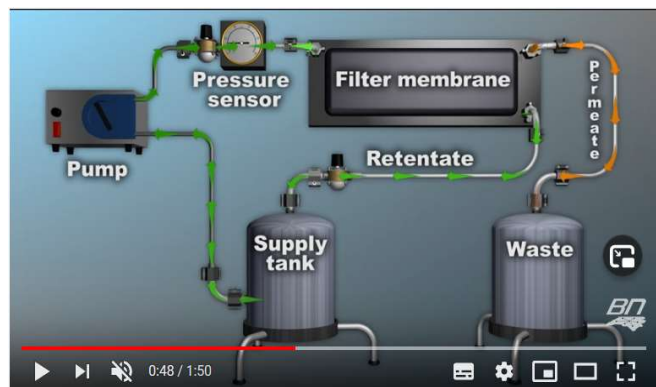
Οι διαμεμβρανικές πιέσεις που ασκούνται για να πραγματοποιηθεί η αντίστροφη ώσμωση είναι της τάξης του 2-8MP. Οι θερμοκρασία πρέπει να είναι κάτω από τους 15⁰C. Οι μεμβράνες είναι ασύμμετρης δομής, με ενεργό στρώμα οξικής κυτταρίνης, σε δομές υποστήριξης πολυεστέρα. Τα βασικά χαρακτηριστικά μιας μεμβράνης αντίστροφης ώσμωσης είναι:



Εικ.4: 11 Μονάδα αντίστροφης ώσμωσης[30]

- Υψηλή διαπερατότητα σε αιθανόλη και νερό.
- Χαμηλή διαπερατότητα για άλλα συστατικά μύρας (γεύση, άρωμα και πικρές ουσίες).
- Ανθεκτική στη θερμοκρασία.
- Ανθεκτική στους καθαριστικούς και απολυμαντικούς παράγοντες (pH 2-11).
- Ανθεκτική σε όλα τα είδη ρύπανσης (ανόργανα, οργανικά, κολλοειδή και μικροβιολογικά). Χημικά και μηχανικά ανθεκτικά.
- Είναι φθηνή.[3]

Στη εικόνα 4:11 πάνω βλέπουμε ένα σχεδιάγραμμα γραμμής παραγωγής AFB με αντίστροφη ώσμωση σπειροειδούς διάταξης των μεμβρανών. Υπάρχουν επίσης διατάξεις επίπεδες ή σωληνοειδής ή και διατάξεις που περιλαμβάνουν στήλη απόσταξης για παραλαβή αλκοόλης μεγάλης συγκέντρωσης (B εικόνας 4:11). στη πραγματικότητα η μέθοδος που χρησιμοποιείται στη βιομηχανία είναι μία εξειδίκευση της ώσμωσης με διαδοχικές φάσεις. Μία αρχική φάση συμπύκνωσης που δεν περιλαμβάνει την απομάκρυνση της αλκοόλης και μία δεύτερη φάση όπου το μέσο διήθησης αντικαθίσταται με απιονισμένο νερό και η διαπερατότητα της αλκοόλης αυξάνεται από τη μεγάλη διαφορά συγκέντρωσης των δύο μέσων. Η διαδικασία ονομάζεται concentration and diafiltration (συμπύκνωση και



Concentration and Diafiltration (GFP Purification part 6 of 6)

Εικ.4: 12 Concentration and Diafiltration [23]

διαδιήθηση) χρησιμοποιεί νερό αποστειρωμένο, απαερωμένο και απιονισμένο ενώ ακολουθεί ενανθράκωση της μη αλκοολούχας μπίρας. Στα μειονεκτήματα της αντίστροφης ώσμωσης περιλαμβάνονται οι σημαντικές απώλειες των χρήσιμων πτητικών ουσιών (εστέρες και ανώτερες αλκοόλες).

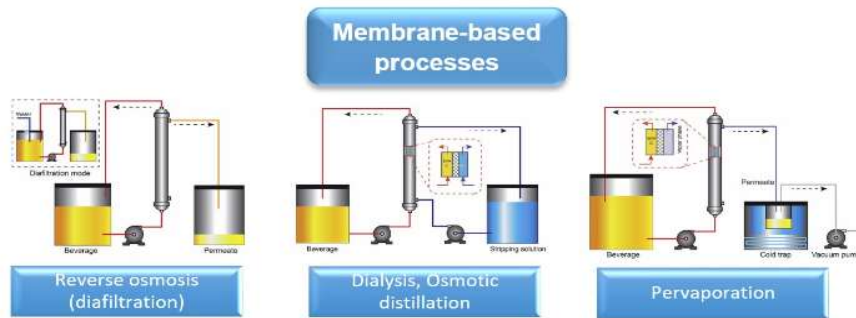


Figure 2. Graphical representation of membrane-based processes used to obtain NAB, adaptation from [69].

Εικ.4: 13 Διαδικασίες μεμβράνης[7]

4.2.ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ

Όπως αναφέρθηκε εξ αρχής στις βιολογικές διεργασίες συγκαταλέγονται όσες διαδικασίες αποσκοπούν στον περιορισμό της παραγόμενης αλκοόλης κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Αυτό μπορεί να γίνει με 2 διαφορετικούς τρόπους ως προς την ανάγκη εκσυγχρονισμού ή όχι, των εγκαταστάσεων της βιομηχανικής μονάδας παραγωγής μπίρας. Και ενώ φαίνεται πιο εφικτό να χρησιμοποιηθεί το «παραδοσιακό ζυθοποιείο» ώστε να αποφευχθούν τα περαιτέρω έξοδα στη πράξη η πλέον υποσχόμενη κερδοφόρα απόδοση παραγωγής AFBs είναι η συνεχής παραγωγή με ακινητοποιημένες ζύμες που απαιτούν φαινομενικά ένα πρόσθετο κεφάλαιο επένδυσης σε εξοπλισμό. Στη πράξη η επένδυση σε επιλογή, καλλιέργεια, απομόνωση ειδικών στελεχών ζυμών που παράγουν περιορισμένη αλκοόλη είναι ακόμη πολυέξοδη και το μέγιστο των στοιχείων ως προς την αποτελεσματικότητά τους προέρχεται από εργαστηριακές επιστημονικές έρευνες.

Σε πρακτικό επίσης επίπεδο οι βιομηχανικές εφαρμογές αναπτύσσουν ένα συνδυασμένο σύστημα, που περιλαμβάνει ότι μπορεί να εφαρμοστεί από όλες τις διαδικασίες που αναλύονται παρακάτω σε διακριτές κατηγορίες. Οι δύο βασικές κατηγορίες είναι οι αναφερόμενες ως διαδικασίες στο «παραδοσιακό ζυθοποιείο»

4.2.1. ΠΑΡΑΔΟΣΙΑΚΟ ΖΥΘΟΠΟΙΕΙΟ

Ότι αφορά την παρέμβαση στη ζύμωση και μπορεί θεωρητικά να πραγματοποιηθεί στις δεδομένες εγκαταστάσεις ανήκει σ' αυτή την κατηγορία. Επειδή με τη σειρά τους πολλοί παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν τη ζύμωση, αντίστοιχες κατηγορίες παρεμβάσεων

έχουν αναπτυχθεί και αφορούν τα διαφορετικά στάδια βυνοποίησης και ζυθοποίησης. Έτσι διακρίνουμε τις παρακάτω διαφοροποιήσεις:

Αλλαγή στις διαδικασίες Πολτοποίησης

Όπως είναι γνωστό η πολτοποίηση είναι η διαδικασία που ακολουθείται με στόχο τη αποικοδόμηση των μεγαλομορίων του αμύλου του κριθαριού με στόχο την παραγωγή σακχάρων που μπορούν να καταναλωθούν από τις ζύμες που με τη σειρά τους θα παράγουν την αλκοόλη. Η αποικοδόμηση γίνεται σε τρία στάδια που αναφέρονται ως Ζελατινοποίηση, Διαλυτοποίηση και Σακχαροποίηση [19]. Όλη η διαδικασία της πολτοποίησης είναι ένας συνδυασμός μηχανικών, χημικών αλλά και βιοχημικών παρεμβάσεων, με κύριο όμως στόχο να διευκολύνουμε τα ένζυμα που είναι απαραίτητα στην αποικοδόμηση και βρίσκονται στη βύνη, να κάνουν τη δουλειά τους

.Η **α-αμυλάση** είναι υπεύθυνη για την αποικοδόμηση της αμυλόζης μέσω της υδρόλυσης των α-1,4 γλυκοζυτικών δεσμών στο εσωτερικά της αμυλόζης και της αμυλοπηκτίνης που απελευθερώνονται στο γλεύκος κατά την ζελατινοποίηση. Δρα καλύτερα στους 72⁰ C και σε pH 5.6-5.8. Παράγει δεξτρίνες δηλαδή μικρά μόρια αποσπασμένα από το άμυλο και μικρές ποσότητες μαλτοτριόζης και γλυκόζης

Η **β-αμυλάση** είναι υπεύθυνη για την υδρόλυση των α-1,4 γλυκοζυτικών δεσμών των μη αναγόντων άκρων της αμυλόζης και παράγει κυρίως την μαλτόζη και δευτερευόντως την μαλτοτριόζη. Δρα στους 60-65⁰ C και σε pH 5.4-5.6.

Από τα παραγόμενα σάκχαρα δηλαδή τις δεξτρίνες, τη μαλτόζη τη μαλτοτριόζη, τη γλυκόζη και φρουκτόζη ζυμώσιμα σάκχαρα είναι για της ζύμες της μύρας η μαλτόζη και η μαλτοτριόζη που με τον μεταβολισμό τους παράγουν την αλκοόλη αλλά και τις άλλες ουσίες που δίνουν στη μύρα το τελικό της αποτέλεσμα. Γι' αυτό αποτελούν, στο συνολικό εκχύλισμα της βύνης, το ζυμώσιμο μέρος της και καθορίζουν και το τελικό ποσοστό αλκοόλης στη μύρα. Επομένως αλλάζοντας τη διαδικασία πολτοποίησης μπορεί να παραχθεί βυνογλεύκος με λιγότερα ζυμώσιμα σάκχαρα άρα λιγότερη αλκοόλη. Οι κύριοι τρόποι παρέμβασης θεωρητικά είναι οι [3]:

- Απενεργοποίηση της σακχαροποίησης της β-αμυλάσης με πολτοποίηση υψηλής θερμοκρασίας (75-80 ° C). [9]
- Εκχύλιση βύνης κρύου νερού. Βασίζεται στην εξαγωγή στο μέγιστο των γευστικών ενώσεων της βύνης χωρίς αύξηση της βαρύτητας του μούστου(wort gravity)
- Έχουν αναφερθεί ποικιλίες Barley με ευρείες παραλλαγές της θερμοσταθερότητας της β-αμυλάσης καθώς και ποικιλιών με ανεπάρκεια β-αμυλάσης (Kihara et al., 1998; Kihara et al., 1999).[3]

Η κύρια αξιοποιήσιμη μέθοδος είναι η πρώτη και σύμφωνα με μετρήσεις που αναφέρονται στο [11] για δυο γλεύκη ίδιου ειδικού βάρους που πολτοποιήθηκαν σε 85⁰ C και 65⁰ C και πραγματοποίησαν χαμηλή και υψηλή αντίστοιχα ζύμωση η μαλτόζη και η μαλτοτριόζη μειώθηκε σημαντικά στη πρώτη περίπτωση (Πίνακας 4:1)

Πίνακας 4 : 1 σύσταση σακχάρων σε πολτοποίηση στους 65 και 85⁰ C [11]

Sugar	Low fermentability	Normal fermentability
Glucose	0.17	0.58
Sucrose	0.27	0.38
Maltose	0.38	4.41
Maltotriose	0.14	0.81
Total	0.96	5.96

Note: Two worts (gravity 1.040) were prepared at 65°C (normal fermentability) and at 85°C (low fermentability) and the single fermentable sugars were determined by HPLC (g/100g).

Source: Muler (1991).

Στα δύο από όλα τα άρθρα της βιβλιογραφίας

που χρησιμοποιήθηκαν ([11] ,[3]) αναφέρονται ότι το ποσοστό του ζυμώσιμου εκχυλίσματος για την παραγωγή μύρας χωρίς αλκοόλη πρέπει να κυμαίνεται στο 25-30% όταν για παραγωγή μιας συμβατικής μύρας(pale) αυτό είναι 80 % .

Ένα πρόγραμμα υψηλής θερμοκρασίας που χρησιμοποιείται στη πράξη περιλαμβάνει πολτοποίηση στους 52⁰ C /αφαίρεση και βρασμό ενός μέρους του πολτού/επιστροφή του βρασμένου μέρους στον αρχικό πολτό και επίτευξη θερμοκρασίας 76⁰ C.[19]

Αυτή η θερμοκρασία, που χρησιμοποιείται για πολτοποίηση, πλύσιμο και ψεκασμό, απενεργοποιεί κυρίως την β-αμυλάση και με αυτό τον τρόπο αποτρέπει το σχηματισμό κανονικών συγκεντρώσεων ζυμώσιμων σακχάρων.



ΣΥΣΤΗΜΑ ΠΕΡΟΥΤΖΙΑ



Εικ'. 4 : 3 Σύστημα πολτοποίησης για μύρα χωρίς αλκοόλη, στο πιλοτικό εργοστάσιο βύνης και ζύθου CERB του πανεπιστημίου της Περούτζια [31]

Ειδικές ζύμες

Η επιλογή, η γενετική τροποποίηση ή η παρακολούθηση τυχαίων μεταλλάξεων στις ζύμες που ανήκουν σε κατάλληλα γένη έχει οδηγήσει στην ανακάλυψη στελεχών που αδυνατούν να ζυμώσουν την μαλτόζη και τη μαλτοτριόζη τα κύρια ζυμώσιμα σάκχαρα των βυνών του κριθαριού. Έτσι είναι πλέον δυνατόν να παραχθεί μύρα με λίγη ή καθόλου αλκοόλη χρησιμοποιώντας ειδικές για το σκοπό αυτό ζύμες. [3] [11]



Εικ.4: 15 Απεικόνιση κυττάρων *Saccharomyces ludwigii* [21]

Conclusion:



Maltose metabolism depends on the sugar concentration and the pH value of the wort.

An alcohol-free wheat beer produced with *S. ludwigii* contains more higher alcohols but no typical wheat beer **aroma compounds** like Ethyl acetate, Isoamyl acetate or 4-Vinylguajacol.

Εικ.4: 14 Αποτελέσματα μελέτης με ζύμωση *Saccharomyces ludwigii* [9]

Στη βιομηχανική παραγωγή το πιο πετυχημένο είδος που έχει χρησιμοποιηθεί είναι ο *Saccharomyces ludwigii*. [3] Αρχικά το 1929, οι Haehn και Glaubitz πήραν ένα δίπλωμα ευρεσιτεχνίας για την παραγωγή μιας μύρας με χαμηλή περιεκτικότητα σε αλκοόλ που έχει υποστεί ζύμωση με το *S. ludwigii*. Σήμερα στη Γερμανία βιομηχανικές μονάδες παράγουν έτσι την AFBs ενώ οι έρευνες συνεχίζονται πάνω σ' αυτό είδος. Πρόκειται για μη *Saccharomyces* είδος ζύμης που βρίσκεται, ως ζύμη αλλοίωσης στο τέλος μιας αργοπορημένης οινοποίησης ή κακής αποθήκευσης. Από εφιάλης όμως του οινοποιού [21] μετατρέπεται στη ζυθοποιεία σε «από μηχανής θεός» για να κάνει το οινόπνευμα, νερό. Επειδή του λείπει η Ιμβερτάση και η μαλτάση ώστε να μεταβολίσει την μαλτόζη και την μαλτοτριόζη ο S.I μπορεί να καταναλώσει μόνο γλυκόζη σακχαρόζη και φρουκτόζη. Όμως σάκχαρα όπως η γλυκόζη και η φρουκτόζη βρίσκονται σε μικρό ποσοστό στο ζυθογλεύκος με αποτέλεσμα η μύρα που παράγεται από αυτή τη ζύμωση να έχει έως 0.5% αιθανόλη. [21]

Στα **πλεονεκτήματα** εκτός από το βασικό που είναι ότι μπορεί να πραγματοποιηθεί σ' ένα παραδοσιακό ζυθοποιείο περιλαμβάνονται

- η αργή εξασθένηση ακόμη και στους 20 ° C, πράγμα που σημαίνει ότι η διαδικασία δεν απαιτεί συνεχή παρακολούθηση,
- σημαντικά υψηλό σχηματισμό αισθητικών ενεργών υποπροϊόντων (υψηλότερες αλκοόλες και εστέρες), που συμβάλουν θετικά στην πληρότητα και την ευχάριστη ζωντάνια των AFB

Στα **μειονεκτήματα** περιλαμβάνονται

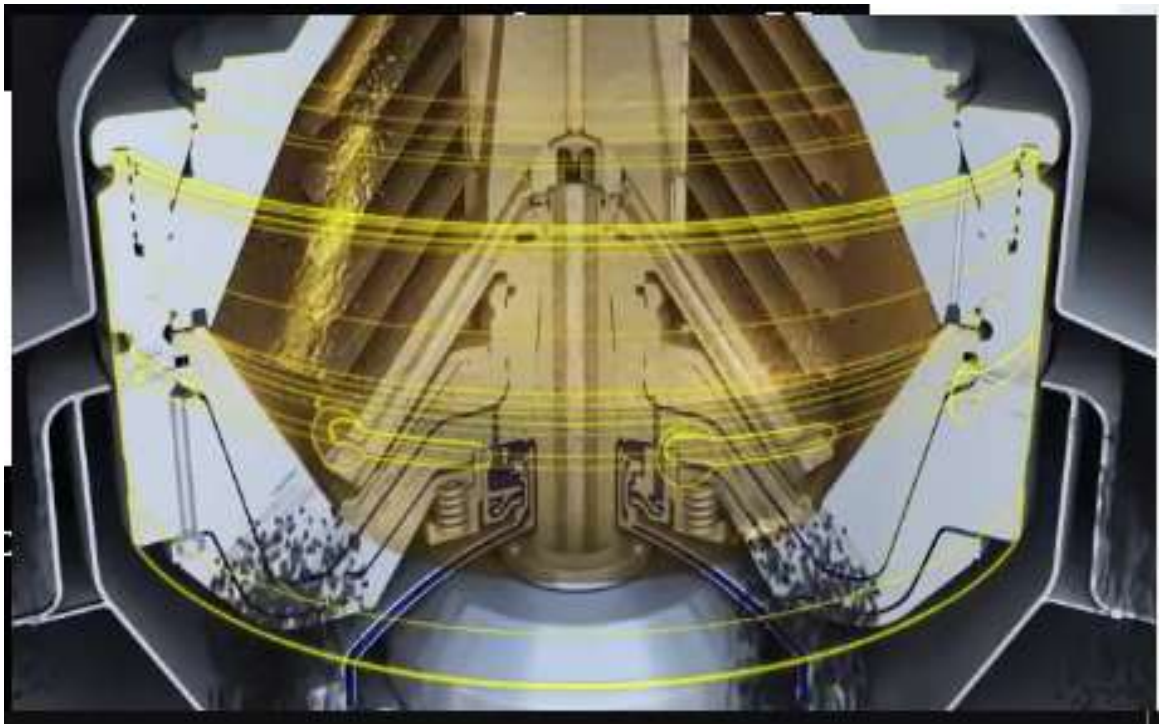
- η διαδικασία παραγωγής είναι ευάλωτη σε μικροβιακή μόλυνση λόγω περιορισμένης δραστηριότητας της ζύμης και της υψηλής περιεκτικότητας σε υπολείμματα εκχυλίσματος.

- Το AFBs που παράγεται με το *S. ludwigii* περιέχει διακετύλιο λίγο πάνω από το επίπεδο κατωφλίου γεύσης, που αφήνει μια υπολειπόμενη ελαφριά αρωματική ουσία.[9]

Οι έρευνες συνεχίζονται τόσο για την βελτίωση της συμμετοχής του s.I στη παραγωγή AFBs όσο και στην είσοδο κι άλλων στελεχών ή ειδών σ' αυτή.

Διακοπή ή περιορισμός της ζύμωσης

Στις διαδικασίες αυτές οι ζύμες είτε αφαιρούνται είτε απενεργοποιούνται πριν αρχίσουν να παράγουν μεγάλες ποσότητες αλκοόλης. Η δυσκολία αυτής της μεθόδου βρίσκεται στην



Εικ.4: 16 Τομή μηχανής φυγοκέντρισης [27]

επιλογή της χρονικής στιγμής στην οποία θα γίνει η διακοπή η απενεργοποίηση ώστε ταυτόχρονα να έχει γίνει επαρκής μετατροπή του ζυθογλεύκου σε μύζα.[7]

Η αφαίρεση ζυμών ή η απότομη απενεργοποίησή τους μπορεί να πραγματοποιηθεί με φυγοκέντριση ,φιλτράρισμα , με απότομη ψύξη ή και παστερίωση[3] . Τέλος κάποιες σύγχρονες μέθοδοι που βρίσκονται όμως ακόμη σε επίπεδο μελετών δείχνουν δυνατότητα αδρανοποίησης μέσω φυσαλίδων CO₂ σε χαμηλή πίεση.[12]

Η ζύμωση που προηγείται της διακοπής γίνεται γενικά σε χαμηλές θερμοκρασίες 2-3⁰ C, διαρκεί 150-200 ώρες, το γλεύκος δεν αερίζεται προς αποφυγή αναπαραγωγής της ζύμης ενώ

Πίνακας 4 : 2 Διαφορετικά προγράμματα ζύμωσης με αποτέλεσμα την χαμηλή αλκοόλη [3]

Table 3
The influence of yeast type and fermentation temperature on the composition of alcohol-free beers.

Fermentation yeast	Bottom	Bottom	Bottom	Bottom	Top	Top
Temperature (°C)	0	4	8	12	8	12
Original gravity (wt.%)	11.4	7.5	7.5	7.5	7.4	7.4
Ethanol (wt.%)	0.27	0.37	0.37	0.42	0.32	0.27
Real extract (wt.%)	10.64	6.79	6.79	6.52	6.87	6.94
Attenuation (wt.%)	8	12	12	16	9	8
Fermentation time (h)	48	24	7/24*	7/24*	24	7/24*
pH	5.01	4.87	4.92	4.89	4.87	4.89
Bitterness (EBC)	25.4	17.5	17.7	17.4	17.7	17.8
DMS (µg/l)	30	22	30	32	35	45
Total diacetyl (mg/l)	0.06	0.09	0.08	0.14	0.51	0.35
Total HAA (mg/l)	2.2	6.8	6.7	8.6	15.8	14.2
Total EAA (mg/l)	0.55	0.69	0.60	0.84	0.90	0.90
Reduction of aldehydes (%)	85.8	77.6	80.2	83.0	88.2	77.5

* After 7 h at the initial temperature the wort was cooled to 0 °C until 24 h were completed, source: Narziss et al. (1992).

λόγω των χαμηλών θερμοκρασιών επιμηκύνεται η φάση υστέρησης κατά την οποία οι ζύμες μεταβολίζουν αλλά δεν πολλαπλασιάζονται ούτε παράγουν αιθανόλη. [11] Βέβαια, πειράματα έχουν δείξει ότι για τον έλεγχο της διαδικασίας ζύμωσης μπορούν να υπάρξουν διαφοροποιήσεις στα προγράμματα θερμοκρασιών που σχετίζονται με το ειδικό βάρος του γλεύκους αλλά και το είδος των ζυμών, που όλα όμως μπορούν να πετύχουν το στόχο μιας μπύρας με ελάχιστο αλκοόλ δηλαδή λιγότερο από 0.5%.(πίνακας 4:3)

Υψηλές θερμοκρασίες ζύμωσης αυξάνουν την παραγωγή πτητικών ουσιών, η αφαίρεση οξυγόνου αυξάνει το σχηματισμό εστέρων, ενώ η παρατεταμένη διάρκεια της φάσης υστέρησης διευκολύνει την παραγωγή μεταβλητών που επηρεάζουν την γεύση της μπύρας. Μερικές ενώσεις του θείου παράγονται σε αυτή τη φάση , ενώσεις που δεν απομακρύνονται ούτε με τον βρασμό.

Μετά τη διακοπή της ζύμωσης και με αλκοόλη στα επιθυμητά επίπεδα η AFB μπύρα ωριμάζει στους 0⁰ C για 10 περίπου μέρες ώστε να απομακρυνθούν οι ενώσεις του

Η διαδικασία της **ψυχρής επαφής** η επονομαζόμενη **CCP (Cold Contact Process)** προτάθηκε το 1983 από τον Schur και περιλαμβάνει ένα στάδιο μακράς διάρκειας ζύμωσης σε χαμηλές όμως θερμοκρασίες 0-5⁰C , με συνέπεια τον περιορισμό της ζύμωσης μέχρι και μηδενισμό παραγωγής αλκοόλης. Στη διαδικασία αυτή η παραγωγή αλκοόλη είναι αργή αλλά η παραγωγή εστέρων και ανώτερων αλκοολών καθώς και η μείωση καρβονυλίων παρουσιάζει μέτρια δραστηριότητα.[11]

Το αρχικό βυνογλεύκος πρέπει να έχει μικρό ειδικό βάρος. Αρχικά ψύχεται στους 0-1⁰C πριν τον εμβολιασμό, και στις περισσότερες περιπτώσεις χρησιμοποιείται εμβόλιο υψηλής συγκέντρωσης κυττάρων(10⁸ κύτταρα /ml³). Ο πρωτογενής μεταβολισμός είναι αργός ενώ λαμβάνουν χώρα μεταβολικές αντιδράσεις που συμβάλλουν στη σύνθεση εστέρων. Για τη ρύθμιση του pH που συνήθως είναι υψηλό απαιτείται οξύνιση είτε χημικά είτε με ακινητοποιημένα γαλακτικά βακτήρια. Στις μπύρες AFBs που παράγονται με CCP αρκετές καρβονυλικές ενώσεις του γλεύκους όπως διακλαδισμένες αλδεϋδες με πολύ χαμηλό κατώφλι αντίληψης κάνουν αισθητή την παρουσία τους. Η λύση που έχει προταθεί για την

μείωση της παρουσίας είναι η χρήση τροποποιημένων ζυμών και η χρήση του PVPP αμέσως μετά τη ψύξη του γλεύκους.[17]

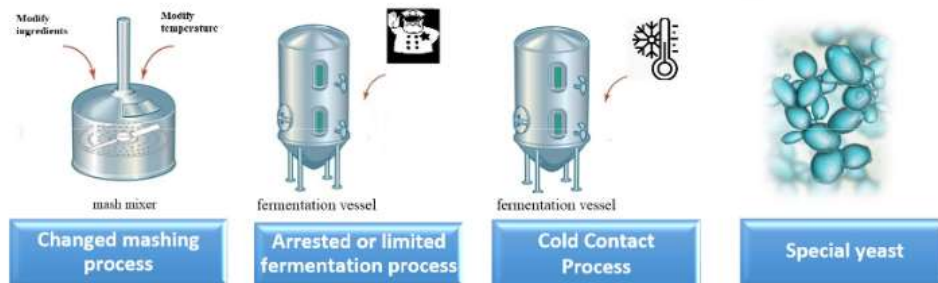


Figure 3. Graphical representation of membrane-based processes used to obtain NAB (Compilation from Encyclopedia Britannica's brewing process).

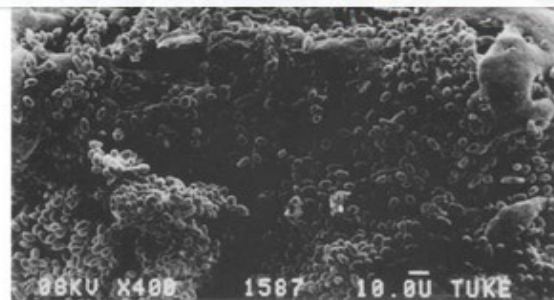
Εικ.4: 17 Συγκεντρωτική απεικόνιση διαδικασιών μείωσης της αλκοόλης σε παραδοσιακό ζυθοποιείο

4.2.2 Ειδικός εξοπλισμός για συνεχή ζύμωση με ακινητοποιημένες ζύμες

Συνεχής ζύμωση

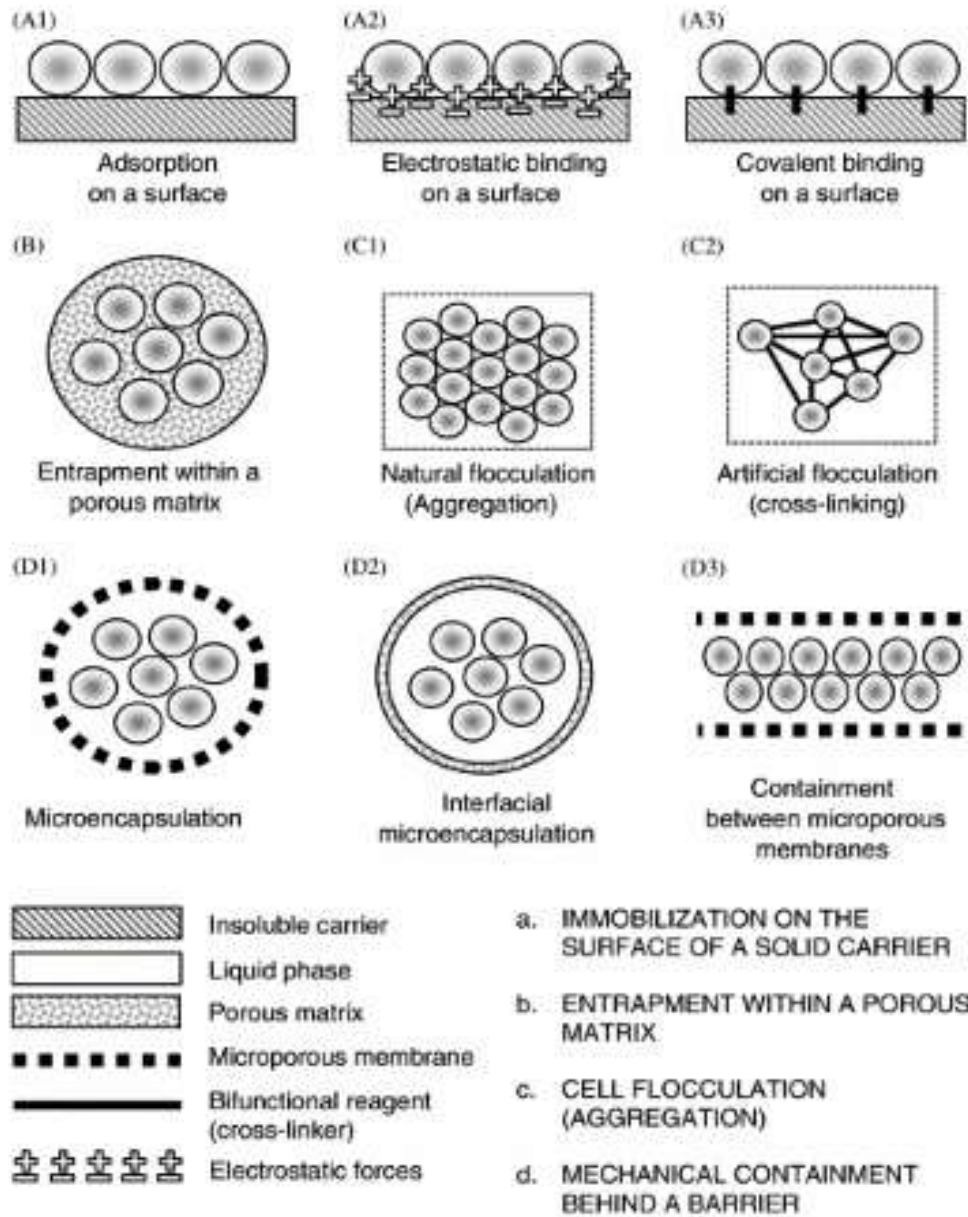
Γενικά όπως είναι γνωστό η ακινητοποίηση ζυμών και ενζύμων είναι μια μέθοδος αρκετά μελετημένη αλλά και εφαρμοσμένη με σύγχρονους τεχνολογικούς εξοπλισμούς σε πολλά διαφορετικά επίπεδα της παραγωγής που χρησιμοποιεί ζωντανούς οργανισμούς ή τμήματά τους. Πρόκειται για τον εγκλωβισμό μια βιολογικά ενεργής οντότητας μέσα σε κατάλληλο υλικό που έχει ως αποτέλεσμα τη βελτίωση της αποδοτικότητάς της, την αύξηση του χρόνου ζωής της και την παραγωγή προϊόντων υψηλού επιπέδου. Οι 4 βασικές τεχνικές ακινητοποίησης είναι:

- Ακινητοποίηση σε επιφάνεια στερεού φορέα
- Ακινητοποίηση σε πορώδες υλικό(entrapment)
- Ακινητοποίηση σε συμπλέγματα κυττάρων (cell flocculation)
- Ακινητοποίηση σε περιβάλλον με υγρό πυρήνα(encapsulation) [11] [3]



Εικ.4: 18 Μεγέθυνση ακινητοποιημένης ζύμης σε στερεό φορέα[11]

Στην εικόνα 4:19 σχηματοποιούνται οι 4 μηχανισμοί αλλά και οι υποπεριπτώσεις τους[19]



Σχήμα 4.1: Βασικές μέθοδοι ακινητοποίησης κυττάρων [Kourkoutas *et al.*, 2004].

Εικ.4: 19 Βασικές μέθοδοι ακινητοποίησης κυττάρων

Από τις παραπάνω τεχνικές η πιο προσιτή ως προς το κόστος και την ευκολία χρήσης για τη ζυθοποίηση είναι η ακινητοποίηση σε επιφάνεια στερεού(DEAE-κυτταρίνη, τσιπ ξύλου, αναλωμένοι κόκκοι) Παρόλα αυτά όλες οι τεχνικές μπορούν να χρησιμοποιηθούν αρκεί να συνδυαστούν με τους κατάλληλους βιοαντιδραστήρες. Ο εγκλωβισμός σε μικροκάψουλες έχει σημασία όταν παράγονται προϊόντα διαυγή. Σε κάθε περίπτωση, εφόσον ο στόχος παραμένει μια περιορισμένη στρατηγική ζύμωσης, ώστε να παραχθεί ελάχιστη έως καθόλου

αλκοόλη, τα συστήματα χρησιμοποιούν βιοαντιδραστήρες ενός σταδίου εφοδιασμένους με πρόσθετες συσκευές για συνεχή τροφοδοσία γλεύκους και έλεγχο της διαδικασίας. Επίσης ο σωστός συνδυασμός του κατάλληλου στελέχους παραγωγής, του υλικού φορέα ακινητοποίησης και του βιοαντιδραστήρα είναι πολύ σημαντικός στις συνεχείς ζυμώσεις ακινητοποιημένων κυττάρων και μπορεί να βελτιώσει τόσο την απόδοση του συστήματος όσο και την ποιότητα του προϊόντος.

Η ζύμωση σε κάθε περίπτωση συνεχούς ακινητοποιημένης διαδικασίας κρατά σε επαφή τις ζύμες με το γλεύκος για πολύ μικρό χρονικό διάστημα (1 έως 12 ώρες) , όμως οι ζύμες χρησιμοποιούνται συνεχώς για τις επόμενες δόσεις του γλεύκους που εισάγεται στον βιοαντιδραστήρα με συνεχή ροή. Η θερμοκρασία διατηρείται χαμηλή (0-4⁰C) και με σχεδόν αναερόβιες συνθήκες. Μπορούν επίσης να συνδυαστούν με τεχνικές CCP όπου η χαμηλή θερμοκρασία οδηγεί στην καταστολή της κυτταρικής ανάπτυξης , την δραματική μείωση της παραγόμενης αλκοόλης ,αλλά επίσης βοηθάει την παραγωγή ανώτερων αλκοολών και εστέρων . όσο αφορά την παραγωγή των πτητικών αποδίδεται στη προσπάθεια των μικροοργανισμών λόγω έλλειψης οξυγόνου να διατηρήσουν τη οξειδοαναγωγική τους ισορροπία με την επανοξειδωση του NADH σε συνδυασμό με τη μείωση των καρβονυλικών ενώσεων προς ανώτερες αλκοόλες. Παρόλα αυτά μία σχεδιασμένη , ελαχιστοποιημένη και ακριβής προσφορά οξυγόνου κατά τη ζύμωση κρίνεται απαραίτητη για μια ισορροπημένη γεύση του τελικού προϊόντος. Επειδή επίσης στη διαδικασία συνεχούς ζύμωσης όπως και στις διαδικασίες περιορισμού της αλκοόλης η πτώση του pH δεν είναι η απαιτούμενη μια συνεχής βιολογική οξίνιση για την άμεση ρύθμιση του pH του βυνογλεύκους και του ζυθογλεύκους από ακινητοποιημένα βακτήρια γαλακτικού οξέος (DEAE κυτταρίνη) κρίνεται απαραίτητη.

Σήμερα στη βιομηχανία της μύρας η χρήση της τεχνολογίας της ακινητοποιημένης ζύμωσης έχει εφαρμογή αλλά περιορισμένη . Έχει εισαχθεί κυρίως στο στάδιο της δεύτερης ζύμωσης και ωρίμανσης αλλά και στη παραγωγή των AFBs. Αν και απαιτεί επιπρόσθετο εξοπλισμό η απόσβεση από έξοδα κυρίως ανθρώπινου δυναμικού και η μέγιστη Εικόνα απόδοση των ζυμώσεων καθιστά ιδιαίτερα ανταγωνιστική την συνεχή απέναντι στην ασυνεχή παραγωγή.



Εικ.4: 20 Εργοστάσιο παραγωγής μύρας τεχνολογίας ακινητοποιημένης ζύμωσης

Οι ζυθοποιοί που χρησιμοποιούν αυτή τη μέθοδο εκτιμούν ότι τα πλεονεκτήματα της είναι η καλύτερη χρήση πρώτων υλών , η γρήγορη φάση εκκίνησης , η εξάλειψη περιβαλλοντικών προβλημάτων και απωλειών . Λίγες είναι οι πληροφορίες που είναι διαθέσιμες προς τους ερευνητές για τα αποτελέσματα της εφαρμογής αυτής της μεθόδου . Μία από αυτές ,η οικογενειακή ζυθοποιεία της οικογένειας Swinkels με έδρα της το χωριό Lieshout Ολλανδίας παράγει έτσι την μύρα Bavaria 0,0% Original Holland 0.0% , έχοντας δίπλωμα ευρεσιτεχνίας για την τεχνική της .



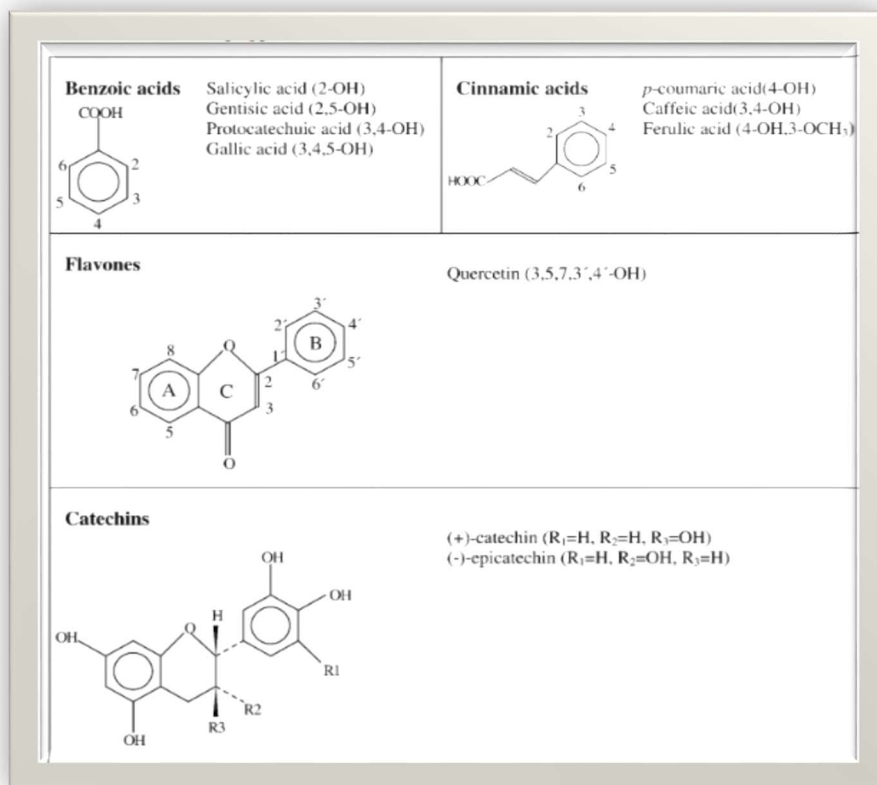
5. Επιστημονικές έρευνες στην παραγωγή AFBs

Οι επιστημονικές έρευνες την τελευταία 20ετία ήταν πυρετώδεις και εξακολουθούν. Αφορούν τόσο την εξέλιξη της τεχνολογίας κάθε σχετιζόμενης με την εκάστοτε διαδικασία για την παραγωγή μύρας χωρίς αλκοόλ, όσο και με τη βελτίωση της ποιότητας του τελικού προϊόντος και κυρίως την προσπάθεια ώστε τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά να μοιάζουν με αυτά της κανονικής μύρας.

5.1. Ανάπτυξη μεθόδων για τον προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών στις μύρες χωρίς αλκοόλ.

Επειδή οι πολυφαινόλες είναι υπεύθυνες για την γεύση αλλά και για την σταθερότητα της μύρας, ιδιαίτερα στις μύρες χωρίς αλκοόλ που επιδιώκεται η οργανοληπτική προσέγγιση της κανονικής μύρας, η ακριβής και γρήγορη μέτρηση της περιεκτικότητάς τους στα διαφορά σταδια ζύμωσης και ωρίμανσης είναι ιδιαίτερα σημαντική. Έρευνες αναπτύχθηκαν και χρησιμοποιήσαν διάφορες τεχνικές και συνδυασμούς της ενόργανης ανάλυσης.

Τρεις ομάδες πολυφαινολών που διακρίνονται στην εικόνα 5:1 συμπεριλαμβάνονται στις ουσίες, τις υπεύθυνες για την γεύση της μύρας. Απλές πολυφαινόλες που προέρχονται από υδροξυβενζοϊκά οξέα (γαλλικό οξύ, πρωτοκατεχικό οξύ, συριγγικό οξύ κ.λπ.) ή από υδροξυκινναμικά οξέα (φουρουλικό οξύ, ρ-κουμαρικό οξύ, καφεϊκό οξύ,.) εξάγονται κυρίως από βύνη αλλά μικρές ποσότητες και από τον λυκίσκο. Οι φλαβονόλες όπως η Κερκετίνη βρίσκεται στο λυκίσκο ενώ μονομερή όπως (+) - κατεχίνη και (-) - επικατεχίνη, διμερή (προπυλ-φινιδίνη B3 και προκυανιδίνη B3), τριμερή (προκυανιδίνη C2), εξάγονται εξίσου από

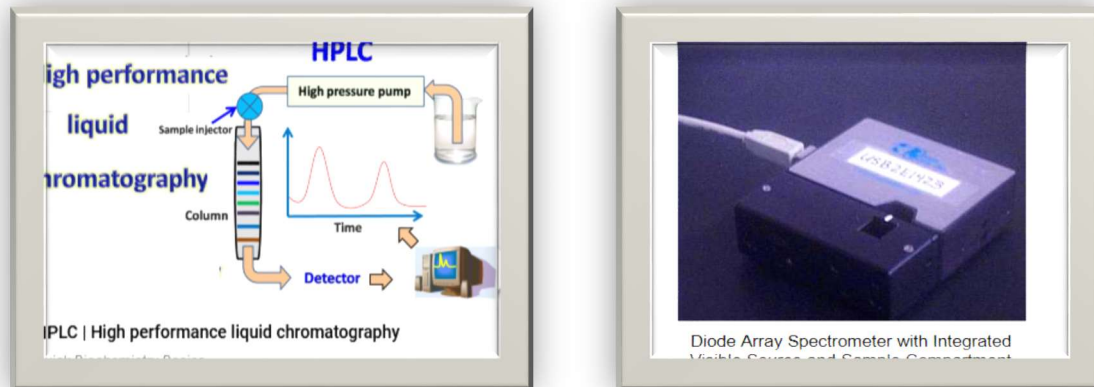


Εικ.5: 1 Τύποι πολυφαινολών που απαντώνται στις μύρες [1]

την βύνη και τον λυκίσκο

Για την ανίχνευση τους αλλά και τον ποσοτικός τους προσδιορισμό, έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι όπως

- Υψηλής Απόδοσης Υγρή Χρωματογραφία HPLC και ανίχνευση με απευθείας σύνδεση σε Φασματοσκοπία Συστοιχίας Διόδων μετά από χημική αντίδραση με ρ-διμεθυλαμινοκινναναλδεϋδη (DMACA)(DePascual-Teresa et al.)



Εικ.5: 2 περιγραφή διάταξης HPLC και δίπλα φασματοφωτόμετρο συστοιχίας διόδων

- Εκχύλιση υγρού – υγρού (LLE) με οργανικούς διαλύτες όπως το εξάνιο, το ισοοκτάνιο, οξικός αιθυλεστέρας και η ακετόνη / νερό'
- διαχωρισμός των φαινολικών ενώσεων στην μύρα με αντίστροφη-υγρή χρωματογραφία ακολουθούμενη από υπεριώδη ακτινοβολία ,σειρά φωτοδιόδων, φθοριομετρική, ηλεκτροχημική ή ανίχνευση με φασματογράφο μάζας
- Τέλος η εκχύλιση στερεά φάσης (SPE) ως τεχνική συμπύκνωσης και προετοιμασίας για τον καθαρισμό πριν τον HPLC- διαχωρισμό των φαινολικών ενώσεων που ήταν αρχικά μια κοινή διαδικασία για το κρασί εφαρμόστηκε ερευνητικά και στις μύρες χωρίς αλκοόλη. Οι έρευνες έδειξαν ότι μια μέθοδος που βασίζεται σε εκχύλιση στερεάς φάσης και ακολούθως υγρός χρωματογραφικός διαχωρισμός με ανίχνευση υπεριώδους ακτινοβολίας (HPLC-UV) είναι ένα αναλυτικό εργαλείο χρήσιμο στη βιομηχανία παρασκευής AFBs για τον προσδιορισμό των φαινολικών οξέων που



Εικ.5:4 SPE και δίπλα HPLC -UV

αναφέρθηκαν ως κύρια πολυφαινολικά συστατικά της μύρας (Εικόνα 5:3)

Τα αποτελέσματα ανάλυσης με την μέθοδο SPE και HPLC για τη σύσταση των φαινολών ενός δείγματος από την έρευνα των A. Alonso García, B. Cancho Grande, J. Simal Gándara (Ιταλία 2004) πάνω σε Ισπανικές μπίρες φαίνονται **Στην εικόνα 5:4 [1]**

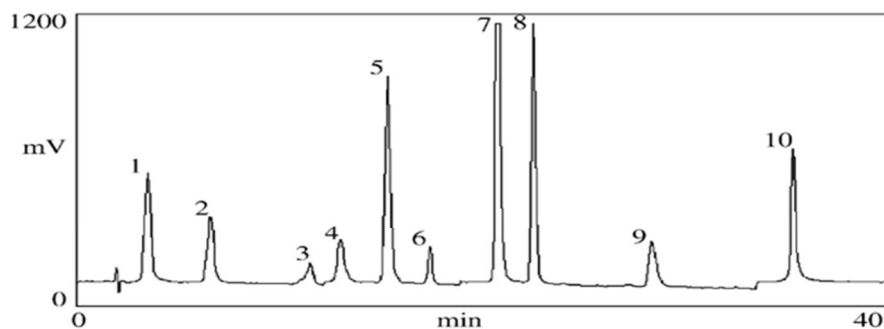


Fig. 1. HPLC–UV chromatogram for a polyphenolic mix standard solution (5 mg/L, in methanol. Peaks: (1) gallic acid, (2) protocatechuic acid, (3) (+)-catechin, (4) gentisic acid, (5) caffeic acid, (6) (–)-epicatechin, (7) *p*-coumaric acid, (8) ferulic acid, (9) salicylic acid, (10) quercetin.

Εικ.5: 4 Αποτελέσματα ανάλυσης

5.2. Έλεγχος της συγκέντρωσης των αλδευδών που προσδίδουν δυσάρεστη γεύση στις AFBs

Όπως είναι γνωστό υπολείμματα ακεταλδεϋδης που δεν έχουν μετατραπεί σε αλκοόλη προσδίδουν στη μύρα άρωμα που θυμίζει γρασίδι ή πράσινο μήλο, ανεπιθύμητα στα όρια ανίχνευσής τους. Ανεπιθύμητες είναι και οι αρωματικές αποχρώσεις του διακετύλιου και του ακετυλοπροπιόνυλου που στις κανονικές μπίρες μετατρέπονται κατά την ωρίμανση και τη δευτερογενή ζύμωση σε μη ενοχλητικές ενώσεις. Επίσης αλδεϋδες όπως **3-μέθυλοβουτανάλη**, **2 – μεθυλοβουτανάλη** και **3- μέθυλοθειοπροπιοναλδεϋδη**, αλδεϋδες που σχηματίζονται από αντιδράσεις strecker (κατά τις διαδικασίες που απαιτούν θέρμανση) παρατηρήθηκαν ότι δεν αφομοιώνονται από τις ζύμες στη βιομηχανική παραγωγή μύρας αφήνοντας μια δυσάρεστη επίγευση και το αντίστοιχο άρωμα. Πειράματα που πραγματοποιήθηκαν από **τον Phillipe Perpèt και Sonia Colline** στο εργαστήριο Ζυθοποιίας και Βιομηχανιών Τροφίμων του **Καθολικού Πανεπιστημίου του Louvain, στο Βέλγιο** έλεγξαν τους πιθανούς παράγοντες που εμποδίζουν τις ζύμες να ανάγουν τις αλδεϋδες. παρατηρήθηκε διαφοροποίηση της συμπεριφοράς των ζυμών μεταξύ των γραμμικών και των διακλαδωμένων αλδευδών όπως οι παραπάνω. Οι γραμμικές αλδεϋδες ανάγονταν κανονικά ακόμη και στις χαμηλές θερμοκρασίες. Τα πειράματα κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το πραγματικό εμπόδιο για τον καταβολισμό των παραπάνω αλδευδών αποτελεί η σύνδεσή τους με τα Φλαβονοειδή και η τελική πρόταση ήταν η χρήση ειδικών φίλτρων ή και PVPP αμέσως μετά τη ψύξη του γλεύκους στην περίπτωση της παραγωγής μύρας με χαμηλή περιεκτικότητα σε αλκοόλ. Ένα επιπλέον πλεονέκτημα αυτής της διήθησης θα αποτελεί η απομάκρυνση μέρους των αλδευδών. Για συστήματα ακινητοποιημένης ζύμης,

πρότειναν επίσης την ελαχιστοποίηση της περιόδου μεταξύ ψύξης γλεύκους και ζύμωσης προκειμένου να μειωθεί το δεσμευμένο κλάσμα πολυφαινόλης. [15]

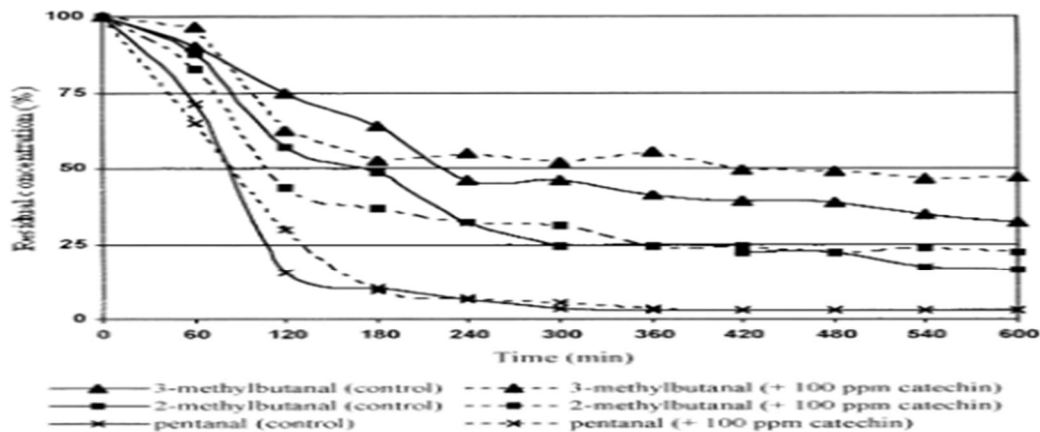


Fig. 6. Evolution of 3-methylbutanal and 2-methylbutanal (% of the initial concentration) in a 12°C wort containing 100 ppm catechin (cold contact fermentation, pitching at 10^7 cells/ml, purge vessel at 50°C).

Εικ.5: 5 Τα πειραματικά δεδομένα που δείχνουν την επίδραση της σύνδεσης με την κατεχίνη (πολυφαινόλη) στην μείωση των διαφόρων αλδεϋδών κατά τη ζύμωση

5.3.Γενετική τροποποίηση της ζύμης ζυθοποίησης με στόχο την μείωση της παραγωγής αλκοόλης:

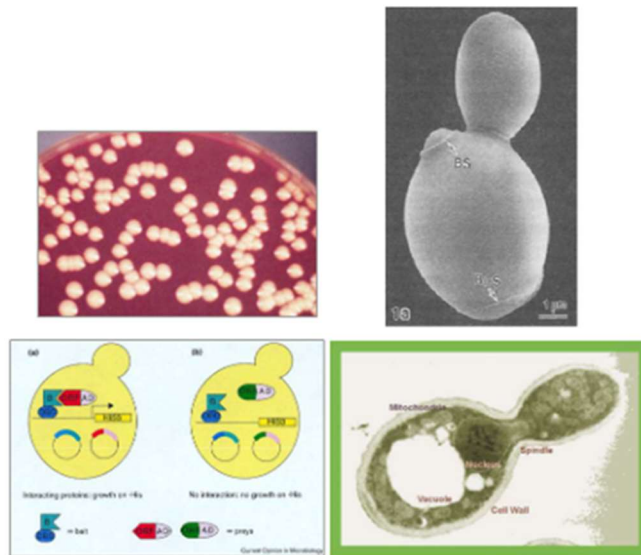
Στο πλαίσιο των διαδικασιών των ειδικών ζυμών έρχεται στις μέρες μας να συμβάλει η Γενετική Μηχανική με όλο το σύγχρονο οπλοστάσιό της, τις τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA και της μοριακής κλωνοποίησης, καθώς και τον χειρισμό του DNA μέσω των πλασμιδίων. Η πλέον εντυπωσιακή έρευνα έχει πραγματοποιηθεί από τους Elke Nevoigta, Rita Pilgera, Edeltraud Mast-Gerlacha, Ulrike Schmidta, Silke Freihammera, Martin Eschenbrennera, Leif Garbeb, Ulf Stahla στο Τεχνικό Πανεπιστήμιο του Βερολίνου τμήμα ζυθοποίησης, Ινστιτούτο Βιοτεχνολογίας τμήμα Μικροβιολογίας και Γενετικής και τμήμα Χημικής και Τεχνικής ανάλυσης. Στην έρευνα αυτή μελετήθηκε η δυνατότητα γενετικής τροποποίησης του *Saccharomyces cerevisiae* ώστε να σχηματίζει λιγότερη αλκοόλη κατά την πλήρη ζύμωση των σακχάρων του βυνογλεύκους. Η κεντρική ιδέα του πειράματος βασίζεται στην καθοδήγηση της μεταβολικής ροής του άνθρακα προς παραπροϊόντα διαφορετικά της αλκοόλης. Ένα τέτοιο παραπροϊόν αποτελεί η γλυκερόλη που έτσι και αλλιώς αποτελεί ένα βελτιωτικό γεύσης για τις AFBs.

Η παραγωγή γλυκερόλης είναι ένα μέσο για την διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας του κυτταροπλάσματος του ζυμομύκητα όταν υπάρχει περίσσεια NADH και επίσης ένα μέσο ρύθμισης της ωσμωτικής πίεσης του. Για να οδηγηθεί η γλυκόλυση στη παραγωγή γλυκερόλης σ' ένα ενδιάμεσο προϊόν της, στη DHAP (φωσφορική διϋδροξυ – ακετόνη), το ένζυμο CPD (αφυδρογονάση της 3- φωσφορικής γλυκερόλης) καταλύει τον μετασχηματισμό του G3P(3 φωσφορικής γλυκερόλης) που στη συνέχεια δίνει γλυκερόλη.

Τα δύο ισοένζυμα/ ισομορφές της GPD κωδικοποιούνται από τα γονίδια GPP1 και GPP2. Η παρέμβαση της γενετικής μηχανικής που προτείνεται σε τούτη την έρευνα συνιστάται στη

υπερέκφραση του γονιδίου GPP1 ώστε να οδηγήσει σε υπερπαραγωγή γλυκερόλης σε βάρος της παραγωγής αλκοόλης.

Τα πειράματα έγιναν τόσο με τροποποίηση τους στελέχους **Sa-07256** (*S. Cerevisiae ssp*



Εικ.5: 6 Αναπαράσταση τροποποίησης του *S. Cerevisiae* από τις ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ του τμήματος βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης

Carlsbergensis) σε συνθήκες βιομηχανικής παραγωγής όσο και με τροποποίηση του στελέχους *S. Cerevisiae* **YSH 1.1.-6B**. Τα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα πλασμίδια YEpTKm και YEpTKmGPD1 προέκυψαν από τα YEpKm και YEpKmGPD1 αντίστοιχα από αρχικά θραύσματα του EcoRV (*Eccerihia coli*). Έγιναν οι αντίστοιχες μεταφορές του υποκινητή (TEF1) της κωδικοποιούσας αλληλουχίας GPD1 και της αλληλουχίας λήξης TRP1. Επίσης εισήχθη και ένας επιλέξιμος δείκτης γονιδίου ο G418. Η τροποποίηση δηλ. η εισαγωγή του μετασχηματισμένου γονιδίου έγινε με ηλεκτροδιάτρηση των αρχικών στελεχών παρουσία των πλασμιδίων

Τα αποτελέσματα των δύο παράλληλων πειραμάτων έδειξαν για την βιομηχανική ζύμη **YSH 1.1.-6B** μείωση της αλκοόλης κατά 18% και αύξηση της παραγωγής γλυκερόλης κατά 5,6 φορές. Αντίθετα στην εργαστηριακή ζύμη **YSH 1.1.-6B** η μείωση της αλκοόλης έφρασε στα 37% και η αύξηση της γλυκερόλης κατά 8,1 φορές. Το πείραμα έδειξε ένα καινούργιο μονοπάτι παραγωγής μύρας χωρίς αλκοόλη, που απαιτεί περαιτέρω έρευνα για την βελτίωση της απόδοσης της μεθόδου και την ελαχιστοποίηση των μειονεκτημάτων όπως η δραματική αύξηση των επιπέδων ακεταλδεϋδης, ακετοΐνης και διακετυλίου.[14]

5.4. Έλεγχος της διαμόρφωσης της γεύσης στην AFB μέσω της παρακολούθησης της φυσιολογίας των ζυμομυκήτων κατά την ζυθοποίηση με ακινητοποιημένες ζύμες.

Οι βιοαντιδραστήρες ζύμωσης που λειτουργούν με ακινητοποίηση των ζυμών, παρέχουν τις καλύτερες δυνατότητες για ρύθμιση των συνθηκών και ελέγχου της πορείας της ζύμωσης. Ειδικά στη περίπτωση παραγωγής μπύρας με περιορισμό της αλκοόλης η εφαρμοζόμενη τεχνολογία υπερέχει στην υψηλή δυνατότητα ελέγχου την ευελιξία την υψηλή συγκέντρωση βιομάζας και τους μικρούς χρόνους επαφής. Με την παρατήρηση των αλλαγών στη φυσιολογία των κυττάρων κατά την παρακολούθηση της συνεχούς ζύμωσης επί 70 ημέρες μελέτες κατόρθωσαν να εντοπίσουν με ακρίβεια τις αλλαγές του ζυμομύκητα και την αντίστοιχη επίδραση στη γεύση της μπύρας. Οι **εστέρες** που στη πλειοψηφία τους συμβάλουν θετικά στη γεύση παρατηρήθηκαν μέσω της δραστηριότητας των **Αλκοολικών Ακέτυλο Τρασφερανσών** Alcohol acetyl transferase (**AAT**) που καταλύουν την σύνθεσή τους από αλκοόλες και οξικό οξύ (με τη μορφή ακέτυλο-CoA κυρίως). Επειδή όμως η έκφραση του γονιδίου AAT καταστέλλεται από το **Οξυγόνο** και τα **ακόρεστα λιπαρά** στη ποσοτική ανάλυση προστέθηκε και η παρακολούθηση των λιπαρών οξέων.

Το διακετύλιο από την άλλη που αποτελεί την μεγαλύτερη απειλή για μια αρνητική γεύση και άρωμα στη μπύρα παρατηρήθηκε μέσω της **Οξικογαλακτικής συνθετάσης (Acetohydroxy acid synthase -AHAS)** που καταλύει την παραγωγή **α-ακετογαλακτικού οξέος** από το πυροσταφυλικό.

Στη μελέτη που παρατίθεται οι *συγγραφείς M. F. M. van Iersel, U † B. van Dieren, † F. M. Rombouts, U and T. Abee* από το **Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφικών Επιστημών, Γεωργικό Πανεπιστήμιο Wageningen** μελέτησαν και συνέκριναν την ανάπτυξη του *Saccharomyces cerevisiae* τόσο σε αντιδραστήρα ακινητοποιημένων ζυμών συνεχούς ζύμωσης, περιορισμένης ως προς την αλκοόλη, όσο και σε ασυνεχή ζύμωση σε περιστροφικό αναδευτήρα στο εργαστήριο. Το στέλεχος της ζύμης ήταν το ίδιο τόσο στην συνεχή όσο και στην ασυνεχή ζύμωση ενώ μελετήθηκαν οι επιπτώσεις από τις μεταβολές της θερμοκρασίας και της παρουσίας ή όχι του Οξυγόνου. [8]

Παρατήρησαν ότι ο κύκλος ζωής των κυττάρων στη συνεχή ζύμωση κρατά 20 ημέρες. Τα λιπαρά οξέα μειώνονται με το χρόνο κατά τη συνεχή λειτουργία του αντιδραστήρα καθώς και το μήκος της αλυσίδας τους. οι αλλαγές στα λιπαρά συμπίπτουν με την μείωση της ανάπτυξης αλλά και την αύξηση της δραστηριότητας της AAT άρα την αύξηση των εστέρων. Τέλος επιβεβαιώθηκε ότι ο μοναδικός παράγοντας που επηρεάζει και μπορεί να καταστείλει την δραστηριότητα του AHAS είναι η χαμηλή θερμοκρασία άσχετα με την παροχή ή όχι οξυγόνου

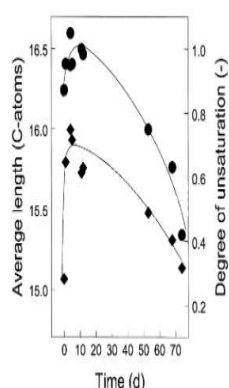


Figure 1 Average chain length (●) and degree of unsaturation (◆) of fatty acids from *S. cerevisiae*. Cells were harvested during production of alcohol-free beer, detached from the carrier and fatty acids were determined according to *Materials and methods*

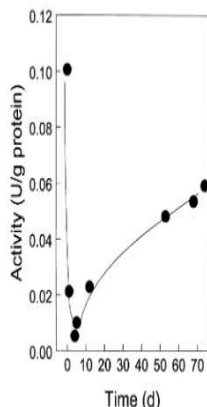


Figure 3 Alcohol acetyl transferase (AAT) in cell extract from *S. cerevisiae*. Cells were harvested during alcohol-free beer production and AAT was measured according to *Materials and methods*

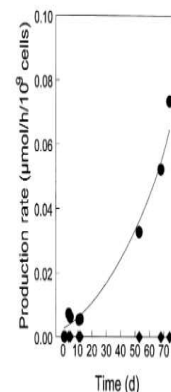


Figure 4 Production rate of α -acetolactate by *S. cerevisiae*. Cells were harvested during production of alcohol-free beer, and subsequently incubated in the wort of 12°C at 12°C (●) or 2°C (◆) under anaerobic conditions

Εικ.5: 7 Συμπεράσματα μελέτης τροποποιημένων ζυμών σε γραφήματα

Τα συμπεράσματα της μελέτης είναι **πρώτον** ότι κατά τη διάρκεια της παραγωγής μπίρας χωρίς αλκοόλ, ο μεταβολισμός της ζύμης επηρεάζεται συνεχώς από τις περιβαλλοντικές συνθήκες και τη σύνθεση του γλεύκους πράγμα που επιτρέπει στο ζυθοποιείο να παρεμβαίνει και να βελτιστοποιεί το προφίλ της γεύσης του τελικού προϊόντος. **Δεύτερον**, οι αναερόβιες συνθήκες αναστέλλουν την ανάπτυξη αλλά διεγείρουν την παραγωγή εστέρων ενώ η παρουσία οξυγόνου διεγείρει την ανάπτυξη προκαλώντας οξειδώσεις. **Τρίτο** η ιδανική θερμοκρασία για την απομάκρυνση του διακετυλίου είναι από 1-4 ° C. **Τέταρτο** με την εισαγωγή τακτικών αερόβιων διαστημάτων μπορεί ο ζυθοποιός να πετύχει την βέλτιστη παροχή οξυγόνου ώστε με τη ρύθμιση της ανάπτυξης να επιτευχθεί και η σταθερότητα στους εστέρες.

5.5. Προβιοτική μπίρα μια καινοτόμος πρόταση

Η χρήση προβιοτικών μικροοργανισμών είναι μια σύγχρονη τάση για την προώθηση προϊόντων που ενισχύουν το ανοσοποιητικό σύστημα του ανθρώπου κυρίως μέσω της προστασίας που παρέχουν στον γαστρεντερικό σωλήνα από επιβλαβείς μικροοργανισμούς. Παράλληλα βοηθούν στη πέψη την καλή λειτουργία του εντέρου αλλά και στην γενικότερη προστασία του οργανισμού. Είναι ένας καινούργιος τομέας στις επιστήμες υγείας και οι έρευνες συνεχίζονται. Μία από αυτές τις έρευνες αφορά και την χρήση προβιοτικών στην μπίρα χωρίς αλκοόλ αφού μια κανονική μπίρα δεν μπορεί να ενταχθεί στα προϊόντα που έχουν οφέλη για τη διατροφή και την υγεία. Ο κανονισμός της ΕΕ θέτει ως ανώτερο όριο συγκέντρωσης της αλκοόλης το 1,2% ώστε να συμπεριλάβει ένα τρόφιμο στα ασφαλή για την υγεία προϊόντα.

Εντωμεταξύ από τα 1920 ο Γάλλος επιστήμονας Henri Boulard που ήταν στην Ινδοκίνα στα χρόνια της χολέρας είχε παρατηρήσει ότι άνθρωποι που μασούσαν τα φυτά Λίτσι και Μαγγόστα ή έφτιαχναν τσάι από αυτά δεν νοσούσαν. Μελετώντας τα φυτά απομόνωσε ένα τροπικό στέλεχος ζύμης το *Saccharomyces boulardii*. Επιβεβαιωμένα σήμερα το *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii* μειώνει την διάρκεια της οξείας διάρροιας, αποτρέπει την διάρροια που σχετίζεται με αντιβιοτικά και βοηθά στη φλεγμονώδη νόσο του εντέρου αντιμετωπίζει λοιμώξεις από *Escherichia coli* ή το *Clostridium difficile*.

Έτσι σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους *Bara Senkarcinova, Ines Alexandra Graça Dias, Jakub Nespor, Tomas Branýk* στο τμήμα Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Χημείας και Τεχνολογίας της Πράγας πραγματοποιήθηκαν 13 πειράματα ζύμωσης βυνογλεύκου με το συγκεκριμένο στέλεχος.

Κάποια από τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με τη μεθοδολογία των αποκριτικών επιφανειών μία από τις πιο σημαντικές μεθοδολογίες στον στατιστικό σχεδιασμό. Συγκεκριμένα η ανάλυση επικεντρώθηκε στη μελέτη των συνθηκών που επηρεάζουν τον σχηματισμό εστέρων και ανώτερων αλκοολών κυρίως το αρχικό εκχύλισμα γλεύκου (E) η θερμοκρασία (T), και ο ρυθμός προώθησης δηλ. η αρχική συγκέντρωση ζύμης (P).

Η ζύμωση έγινε σε δοχεία των 500ml και σ' όλη τη διάρκεια λαμβάνονταν μετρήσεις με υδρόμετρο και αναλύσεις σακχάρων, αιθανόλης και πτητικών.

Τέλος πραγματοποιήθηκε μη θερμική διεργασία υψηλής πίεσης (HPP) σε ένα Hyperbaric 135 (Hyperbaric, USA), ώστε να επιτευχθούν τα επιτρεπτά χαμηλά όρια αλκοόλης ενώ αμέσως μετά μετρήθηκαν τα βιόσιμα κύτταρα οι εστέρες και οι ανώτερες αλκοόλες.

Τέλος η οργανοληπτική ανάλυση των τελικών προϊόντων έγινε από έμπειρους αξιολογητές.

Συμπεράσματα

Οι βέλτιστες θεωρητικές παράμετροι παρασκευής που είχαν ως αποτέλεσμα τον μέγιστο σχηματισμό ES και HA ήταν για την προβιοτική μαγιά: αρχικό εκχύλισμα μούστου (E) 9-12% w/v, θερμοκρασία (T) 14 °C, ρυθμός προώθησης (P) 12×10^6 cells/mL. Ενώ σύμφωνα με τα μοντέλα, αυτές οι συνθήκες πρέπει να έχουν ως αποτέλεσμα ES: 0,71-0,88 mg/L και AH: $15,82 \pm 0,3$ mg/L σε AFBs με αλκοόλη 3,945 g/L, που αντιστοιχεί σε λιγότερο από 1,5% v/v. Πραγματοποιήθηκε με επιτυχία και πειραματική επαλήθευση των συνθηκών που προβλέπονται από το μοντέλο.

Η μεγαλύτερη τεχνολογική πρόκληση της παραγωγής προβιοτικών AFB είναι το γεγονός ότι το *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii* είναι ικανό να μετατρέψει τα σάκχαρα της βύνης σε αιθανόλη ακόμη και στους 2 °C. Έτσι η απενεργοποίηση της β-αμυλάσης σε υψηλή θερμοκρασία κατά την πολτοποίηση είναι μια προσέγγιση ενώ επίσης η παστερίωση αποτελεί μια ακόμη διεξοδό. Το πλεονέκτημα είναι ότι ακόμη και τα νεκρά προβιοτικά κύτταρα έχουν τα ίδια θετικά αποτελέσματα στην υγεία του. [18]

B. Senkarcinova et al.

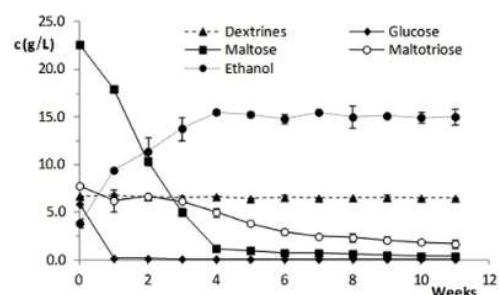


Fig. 3. Sugar and ethanol concentrations as modified by *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii* (pitching rate 4×10^6 cells/mL) in 4% w/v wort with addition of 0.5% v/v of ethanol (3.945 g/L) at 2 °C (without shaking).

DES

Saccharomyces cerevisiae var. boulardii

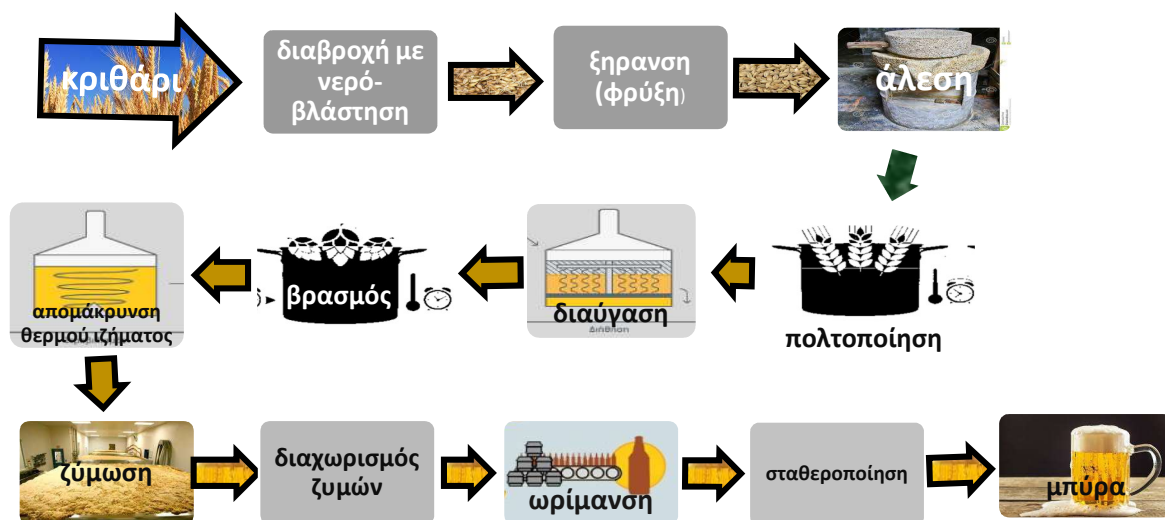
6. Τα στάδια παραγωγής μύρας με εστίαση στη πολτοποίηση και τη χρήση ειδικών ζυμών για παραγωγή μύρας χωρίς αλκοόλη

6.1. Τα στάδια παραγωγής μύρας

Στόχος αυτής της εργασίας είναι η μελέτη της παρέμβασης σε κάποιες από τις βιοχημικές διεργασίες κατά τη ζυθοποίηση που θα έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή μύρας με ελάχιστη αλκοόλη. Μελετήθηκαν κάποιες διεργασίες από την κατηγορία των βιολογικών διεργασιών. Όμως ανεξάρτητα της επιλογής ανάμεσα στις φυσικές ή βιολογικές διεργασίες τα στάδια ζυθοποίησης παραμένουν τα ίδια. Στο παρόν κεφάλαιο περιγράφονται αυτά τα στάδια και αναλύονται περαιτέρω εκείνα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία ώστε να επιτευχθεί η ελάχιστη παραγωγή αλκοόλης. Με βάση λοιπόν την ανάλυση αυτού του κεφαλαίου πραγματοποιήθηκε το πείραμα που περιγράφεται στο επόμενο κεφάλαιο

Τα στάδια της παραγωγής της μύρας αναφέρονται στο παρακάτω διάγραμμα ενώ σε διάφορα σημεία του διαγράμματος εισέρχονται και οι βασικές πρώτες ύλες ξεκινώντας πάντα από το κριθάρι. Το νερό που είναι η επόμενη πρώτη ύλη εισέρχεται κατ' ολίγο στη διαβροχή αλλά κυρίως στη πολτοποίηση τον βρασμό όπου απαιτείται υψηλής ποιότητας νερό και μεγάλη κατανάλωση νερού απαιτείται σε βοηθητικές διαδικασίες όπως η ψύξη η θέρμανση και η εμφιάλωση. Ο λυκίσκος εισέρχεται στο βρασμό και οι ζύμες στη ζύμωση.

Η διαβροχή του κριθαριού απαιτεί να φθάσει η υγρασία του από 40-48% ώστε όχι απλά να



Εικ. 6: 1 Στάδια παραγωγής μύρας

βλαστήσει αλλά να σχηματιστούν και εκείνες οι ποσότητες ενζύμων για τις επιθυμητές μετατροπές των αποθησαυριστικών ουσιών. Το ίδιο στάδιο περιλαμβάνει και κατάλληλη τροφοδοσία οξυγόνου, για να αποφευχθούν αναερόβιες αναπνοές και παραγωγή αλκοόλης. Η

επιτυχία της **βλάστησης** συνίσταται στην ανάπτυξη του ριζιδίου και του βλαστιδίου τόσο όσο να ενεργοποιηθούν η να σχηματιστούν ένζυμα όπως **αμυλάσες** , **πρωτεάσες** , **γλυκανάσες**, **πεντοζανάσες** και **φωσφατάσες**, χωρίς μεγάλες απώλειες σε αποθησαυριστικές ουσίες. Η **ζήρανση** είναι το απαιτούμενο βήμα ώστε να διακοπεί η βλάστηση στο κατάλληλο σημείο, να σταματήσει η παραπέρα παραγωγή ενζύμων ,να αδρανοποιηθούν τα ένζυμα χωρίς να καταστραφούν ενώ παράλληλα σχηματίζονται και ενώσεις που συνεισφέρουν στο άρωμα και τη γεύση ακόμη και στο χρώμα του τελικού προϊόντος .Το τελικό αποτέλεσμα μέχρι εδώ είναι η **βύνη**.

Το επόμενο στάδιο περιλαμβάνει την **άλεση** της βύνης , που πραγματοποιείται με σκοπό την αύξηση της επιφάνειας επαφής των αποθησαυριστικών ουσιών της με τα ένζυμα ώστε να δράσουν με τον καλύτερο τρόπο κατά την αποικοδόμηση και την εκχύλιση των ουσιών που απαιτούνται . Η **άλεση** γίνεται μέσα σε κάποια όρια ώστε να μη θρυμματιστούν τα λέπυρα , απαραίτητα κατά τη διήθηση. Η **πολτοποίηση** είναι ένα στάδιο στο οποίο βοηθούνται τα ένζυμα ώστε να ολοκληρώσουν με τον πιο αποδοτικό τρόπο την αποικοδόμηση των αδιάλυτων ουσιών της βύνης, ώστε να διαλυθούν παράγοντας το ζυμώσιμο και μη ζυμώσιμο εκχύλισμα. Με τη συμβολή της **θερμοκρασίας** , του **pH** και της **μηχανικής ανάδευσης** τα ένζυμα ενεργοποιούνται στο μέγιστο της απόδοσής τους ώστε να παραχθούν τόσο οι ουσίες οι αναγκαίες για την ανάπτυξη και τον μεταβολισμό των ζυμών όσο και ουσίες που προσδίδουν στη μύρα τα ιδιαίτερα γευστικά και αρωματικά χαρακτηριστικά . Το στάδιο αυτό είναι το προς μελέτη και πειραματισμό στάδιο της εργασίας αυτής και για αυτό θα αναλυθεί παρακάτω ως προς τον τρόπο που μπορεί να συμβάλει στον περιορισμό της παραγωγής αλκοόλης. Στη **διήθηση** ή διαύγαση απομακρύνονται όλες οι αδιάλυτες ουσίες και παραμένει το εκχύλισμα που ονομάζεται πλέον **βυνογλεύκος**. Ακολουθεί ο βρασμός κατά τον οποίο απενεργοποιούνται και καταστρέφονται όλα τα ένζυμα , προστίθεται ο **λυκίσκος** που προσδίδει την χαρακτηριστική πικράδα στη μύρα , αποστειρώνεται το βυνογλεύκος συμπυκνώνεται ,ενώ μέσω της κροκίδωσης των πρωτεϊνών διευκολύνεται η απομάκρυνση του παραμένου ιζήματος (θερμό ίζημα).[19]

Αφού ψυχθεί το εκχύλισμα και αεριστεί με αποστειρωμένο αέρα παραδίδεται στις ζύμες για **ζύμωση**, μια διαδικασία που στις κανονικές μύρες στοχεύει κυρίως στη παραγωγή αλκοόλης που συνοδεύεται από CO₂. Εδώ παράγονται επίσης και δευτερογενή προϊόντα πέρα από την αλκοόλη που συνεισφέρουν πάλι στις κανονικές μύρες στη σύνθεση της γεύσης του αρώματος και της επίγευσης της μύρας. Η ζύμωση είναι επίσης ένα στάδιο που στη παρούσα εργασία μετασχηματίζεται με στόχο την μείωση της αλκοόλης, με χρήση ειδικών ζυμών που η λειτουργία τους εξηγείται αναλυτικά παρακάτω σε ξεχωριστή παράγραφο. Ακολουθεί ο διαχωρισμός των ζυμών και ακολουθεί η **ωρίμανση** κατά την οποία παρουσία μέρους ζυμών γίνεται πλήρης αποζύμωση των εναπομεινάντων ζυμώσιμων σακχάρων σε κλειστή δεξαμενή ώστε να πραγματοποιηθεί φυσικός κορεσμός της μύρας με CO₂. Στο στάδιο αυτό πραγματοποιείται σχηματισμός νέων ευχάριστων αρωματικών και απομάκρυνση ανεπιθύμητων. Πριν την τελική παράδοση του προϊόντος προς κατανάλωση εναπομένει η **σταθεροποίηση** του προϊόντος. Εδώ τα βιολογικά θολώματα αποφεύγονται με παστερίωση οπότε και καταστρέφονται οι μικροοργανισμοί ενώ τα μη βιολογικά θολώματα απομακρύνονται με μακρά ψύξη σε χαμηλές θερμοκρασίες ή χρήση βοηθητικών υλικών κολλαρίσματος ή με φυγοκέντριση ή διήθηση με χρήση μεμβρανών.[19]

6.2.Πολτοποίηση και τροποποίηση προγράμματος πολτοποίησης για περιορισμό παραγωγής της αλκοόλης

Σε μια κανονική διαδικασία πολτοποίησης στοχεύουμε ρυθμίζοντας το χρόνο έκθεσης του πολτού νερού και βύνης σε διάφορες θερμοκρασίες καθώς επίσης και σε διαφορετικές τιμές του pH να αυξήσουμε τη δραστηριότητα όλων των ενζύμων που βοηθάνε στη αποικοδόμηση του αμύλου προς σάκχαρα ικανά να καταναλωθούν από τις ζύμες. Συγχρόνως ενεργοποιούνται και τα ένζυμα που αποικοδομούν και άλλες μεγαλομοριακές ενώσεις σε μικρότερες απαραίτητες και ικανές για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των ζυμών(αποικοδόμηση πρωτεϊνών, ημικυτταρινών, και φωσφορικών εστέρων. Ο λόγος για τον οποίο «παίζουμε» με τις θερμοκρασίες, το χρόνο και το pH είναι ότι κάθε ένζυμο δρα καλύτερα σε διαφορετικές θερμοκρασίες και pH. (Πίνακας 6 : 1[19]) . Δίνοντας λοιπόν τον ανάλογο χρόνο στη κατάλληλη θερμοκρασία το κάθε ένζυμο προλαβαίνει να αποικοδομήσει την ουσία για την οποία έχει την ειδικευση στο να την διασπά.

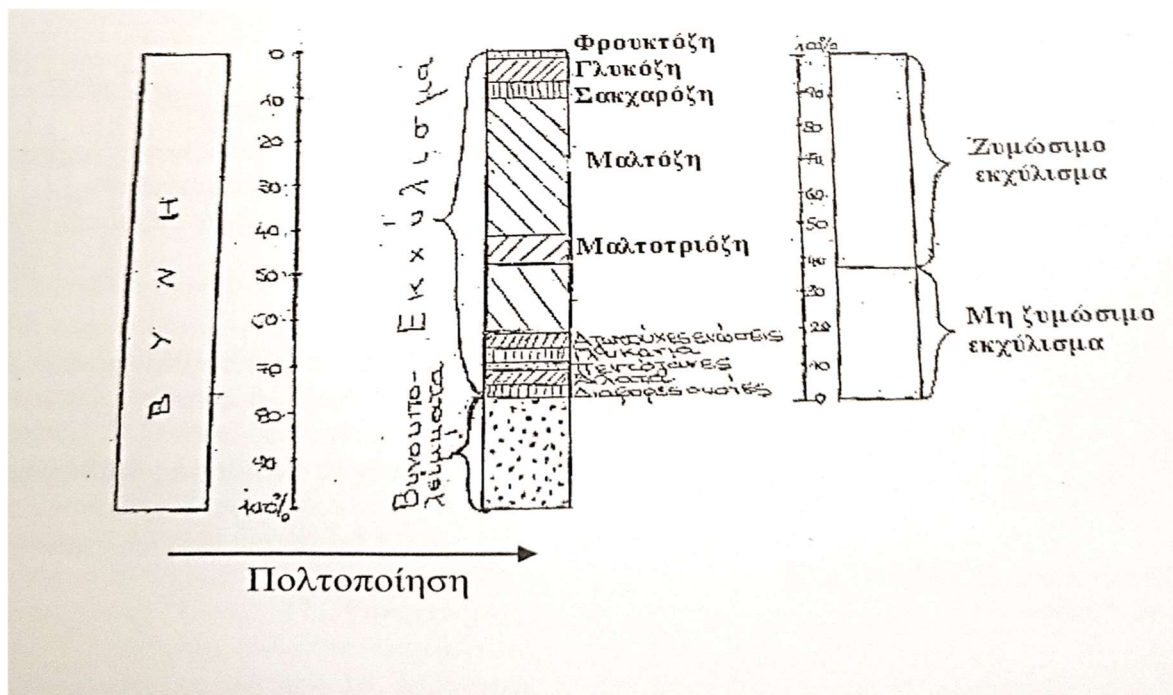
Πιο αναλυτικά για το άμυλο που είναι η πηγή παραγωγής των σακχάρων η α- αμυλάση έχει ειδικευση στη παραγωγή κυρίως δεξτρινών δηλ. μη ζυμώσιμων σακχάρων και μικρών ποσοτήτων γλυκοζών, ενώ η β- αμυλάση ειδικεύεται στη παραγωγή μαλτοζών και λιγότερων μαλτοτριοζών και γλυκοζών, που είναι τα κατεξοχήν ζυμώσιμα σάκχαρα των ζυμών της μύρας

Πίνακας6 : 1 Βέλτιστο pH και θερμοκρασία δράσης των αμυλασών στη βύνη

Αμυλάσες	pH	°C
α - αμυλάση	5,8- 5,6	72
β – αμυλάση	5,4-5,6	60-65
α -1,6 αμυλογλυκοζιδάση	5,1	55-60

Αν κατά την πολτοποίηση η θερμοκρασία παραμείνει για μεγάλο χρονικό διάστημα στους 62-65 °C ,πράγμα που αποτελεί για την β- αμυλάση βέλτιστη θερμοκρασία δράσης το τελικό αποτέλεσμα είναι μύρα με υψηλό τελικό βαθμό. Αν όμως παραμείνει στους 72-75 °C για μεγάλο χρονικό διάστημα , πράγμα που αποτελεί για την α- αμυλάση βέλτιστή θερμοκρασία το τελικό προϊόν είναι μύρα με χαμηλό τελικό βαθμό όμως λόγω των δεξτρινών η μύρα έχει ισχυρό σώμα.

Ρυθμίζοντας το pH επιλέγοντας μία από τις μεθόδους όπως απομάκρυνση της ανθρακικής σκληρότητας του νερού, μείωση της υπολειμματικής αλκαλικότητας του, τέλος με προσθήκη γαλακτικού ή φωσφορικού οξέος , μπορούμε να επιλέξουμε την κατεύθυνση προς την ενεργοποίηση περισσότερο της α ή της β – αμυλάσης. Αν βέβαια επιλέξουμε τη μέση τιμή των 2 περιοχών δηλ. 5,6 ενεργοποιούμε από κοινού και τις δύο αμυλάσες



Εικ. 6: 2 Σύσταση Εκχυλίσματος

Σε μια κανονική μύρα το αποτέλεσμα της πολτοποίησης είναι η εκχύλιση των διαλυτών ουσιών στο νερό και ο διαχωρισμός των μη διαλυτών ουσιών των λεγόμενων βυνοϋπολειμμάτων από το εκχύλισμα. Το εκχύλισμα με τη σειρά του έχει μια συγκεκριμένη σύσταση (**εικόνα 6:2 [19]**) αποτελούμενο από δύο βασικές κατηγορίες : α) τα ζυμώσιμα σάκχαρα Μαλτόζη , μαλτοτριόζη γλυκόζη, σακχαρόζη και φρουκτόζη β) το μη ζυμώσιμο εκχύλισμα που περιλαμβάνει αζωτούχες ενώσεις, γλυκάνια, πεντοζάνες και άλλα.

Χειραγωγώντας τη σύσταση του εκχυλίσματος με βάση το πρόγραμμα εκχύλισης μπορούμε να οδηγήσουμε σε ελαχιστοποίηση των ζυμώσιμων σακχάρων άρα και σε μικρότερους βαθμούς αλκοόλης. Μία τέτοια παρέκκλιση από μία νορμάλ πολτοποίηση ερευνήθηκε από τον **Robert Muller το 1990[13]** στην εργασία με τον τίτλο « **ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΠΟΛΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΒΑΘΜΟΥ ΠΟΛΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΤΗΝ ΣΥΝΘΕΣΗ ΥΔΡΟΓΟΝΑΝΘΡΑΚΩΝ ΤΟΥ ΓΛΕΥΚΟΥΣ**». Σύμφωνα με τον συγγραφέα τόσο η θερμοκρασία πολτοποίησης όσο και η αρχική πυκνότητα του πολτού (Plato) μπορούν να επηρεάσουν την δραστικότητα των ενζύμων αλλά και την εκχυλισματική απόδοση. Το πιο χαρακτηριστικό συμπέρασμα της έρευνας αποτελεί η μεγάλη αντοχή της α αμυλάσης στις υψηλές θερμοκρασίες με αντανάκλαση στην δυνατότητα ζύμωσης του βυνογλεύκου . Στα πειράματα η σύγκριση αφορούσε πάντα και την επίδραση της δραστικότητας των ενζύμων στην εκχυλισματική απόδοση του γλεύκου.

Συγκεκριμένα,

Στα πειράματα μεταβάλλονταν οι θερμοκρασίες , οι αρχικές πυκνότητες του γλεύκου (αρχικό plato) και φυσικά ο χρόνος ενώ μετρήσεις λαμβάνονταν για τα επίπεδα των υδατανθράκων συνολικά , του αμύλου , των ζυμώσιμων σακχάρων και της ενεργότητας της α- και β- αμυλάσης και τα βασικά συμπεράσματα μπορούν να συμπυκνωθούν στα κάτωθι:

- I. Σε μια τυπική θερμοκρασία πολτοποίησης δηλ. στους 65°C μετά από 1 ώρα η α-αμυλάση διατηρούσε το μισό της αρχικής της δραστικότητας ενώ η β-αμυλάση

διατηρούσε λιγότερο από το 10% της αρχικής της. Αυτό δείχνει ότι ύστερα από 1 ώρα πολτοποίησης υπάρχουν ένζυμα για να δώσουν ζυμώσιμο εκχύλισμα.

II. Σε πολτοποιήσεις που έγιναν σε 75⁰C (Α) σε 80⁰C (Β) σε 85⁰C (Γ) και σε 90⁰C (Δ) παρατηρήθηκαν οι εξής διαφοροποιήσεις

- στους 75⁰C σημαντική αποσύνθεση και των δύο ενζύμων αλλά μετά από μισή ώρα
- στους 90⁰C η β- αμυλάση καταστράφηκε στα πρώτα 10 λεπτά ενώ μετρά από 20 λεπτά ελάχιστη α- αμυλάση υπήρχε ακόμη στο γλεύκος γεγονός που δείχνει ότι σε τέτοιες θερμοκρασίες δεν μπορεί να διασπαστεί όλο το άμυλο.
- Μεταξύ 80 ⁰C και 85 ⁰C υπήρξε πλήρης απενεργοποίηση της β- αμυλάσης αλλά με επαρκή α- αμυλάση η οποία επιβιώνει καθ' όλη τη διάρκεια της πολτοποίησης πράγμα που εξασφαλίζει πλήρη μετατροπή του αμύλου

Figure 2A—75°C

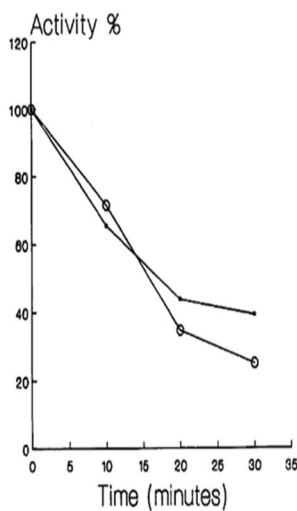


Figure 2B—80°C

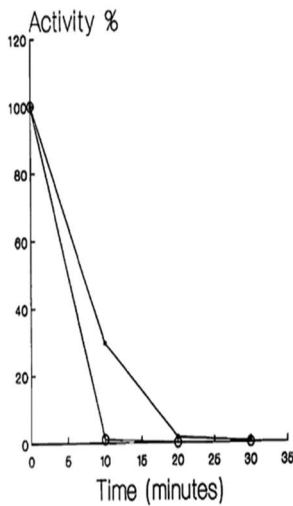
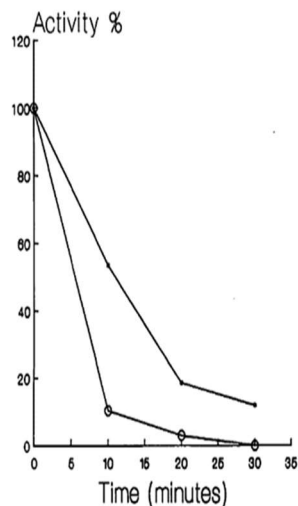
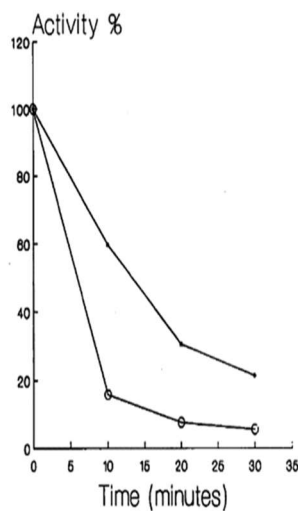
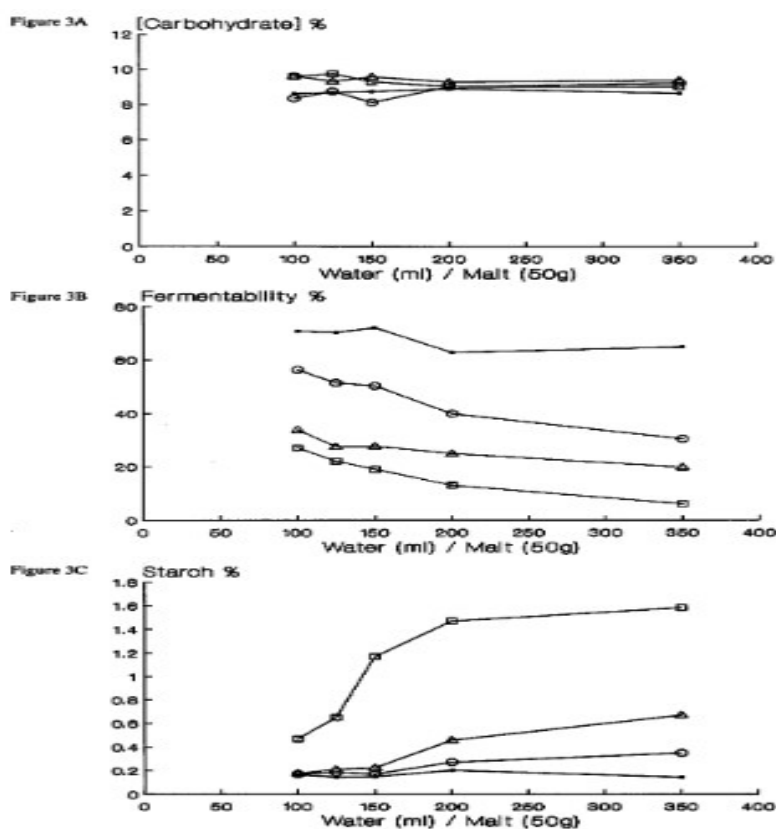


FIG. 2. Enzyme stability in mashes of different temperatures. As for figure 1 except that the striking temperature of the liquor was adjusted to give mash stand temperatures of 75°C, 80°C, 85°C and 90°C. In this case the enzyme activities are expressed as a percentage of the original so that a direct comparison can be made. Alpha amylase (■—■); beta amylase (○—○).

Εικ. 6: 3 γραφήματα ενεργότητας προς το χρόνο σε διαφορετικές θερμοκρασίες

III. Για την επίδραση της θερμοκρασίας πολτοποίηση στη σύσταση του βυνογλεύκου μελετήθηκαν ξεχωριστά διαφορετικές αρχικές πυκνότητες του γλεύκου με σταδιακές αραιώσεις νερού: βήνης από 2:1 έως 7:1 και τα συμπεράσματα για πολτοποιήσεις στους 70 °C -75 °C -80 °C -85 °C είναι

- Στου αραιούς πολτούς η τελική σύνθεση σε **υδατάνθρακες** ήταν η ίδια σε όλες τις θερμοκρασίες. Στους πυκνούς πολτούς υπήρχε διαφοροποίηση τέτοια που οι χαμηλές θερμοκρασίες να αποδίδουν λιγότερους υδατάνθρακες .
- Όσο πιο αραιό ήταν το διάλυμα πριν την πολτοποίηση τόσο λιγότερα **ζυμώσιμα σάκχαρα** είχε το βυνογλεύκος με εμφανή τη διαφοροποίηση για κάθε 5°C. Ειδικά στους 75°C και με αναλογία 7:1 τα ζυμώσιμα ήταν λιγότερα από τους 80°C και αναλογία 2:1. Επίσης στους 85°C και με 7:1 η απόδοση σε ζυμώσιμα ήταν μόνο 6% όταν στους 80 και με 2:1 τα ζυμώσιμα ήταν 33,8% .
- Όσο πιο αραιό ήταν το αρχικό διάλυμα τόσο πιο πολύ μεγάλωνε το ποσοστό του αμύλου στο βυνογλεύκος. Δραματική αύξηση του αμύλου παρουσιάζεται ανάμεσα στους 80°C και 85°C σε όλα τα κλάσματα με πιο μεγάλη τη διαφορά στα αραιά. Η αύξηση του αμύλου αντιστοιχεί στη μείωση της ικανότητας ζύμωσης του βυνογλεύκου.



ο. 3. Effect of mashing temperature on the carbohydrate contents of wort. Samples of malt (50 g) were mashed with varying amounts of water in the BRP mashing bath. After 1 hour at the temperatures shown, the mashes were cooled and adjusted to 450 g with cold water. After filtration the total carbohydrate levels (3A) were measured by the anthrose reaction. Fermentable sugar levels (3B) were determined by HPLC and are presented as a percentage of the total carbohydrate level. Wort starch (3C) was measured by iodine precipitation followed by anthrose reaction. Temperatures: 76°C (■) κ 75°C (●) κ 81°C (○) κ 85°C (△).

Εικ. 6: 4 Σχέση αρχικής πυκνότητας με την παραγωγή αμύλου-υδατανθράκων και ζυμωσιμότητας σε διαφορετικές θερμοκρασίες πολτοποίησης

- IV. Στη συνέχεια πραγματοποιώντας ανάλυση σε HPLC σε βυνογλεύκος, που προέκυψε από ένα μέσο αρχικό διάλυμα βύνης 3:1 μετά από πολτοποίηση στους 65°C και στους 85°C δηλαδή μιας νορμάλ πολτοποίησης και μια τροποποιημένης με στόχο την μειωμένη αλκοόλη έδωσαν τα εξής αποτελέσματα για την σύνθεση των ιδιαίτερων σακχάρων (Εικόνα 6:4)
- Η ποσότητα των ζυμώσιμων σακχάρων που παρήχθη στους 85°C ήταν πολύ χαμηλότερη από την αντίστοιχη του 65°C με τη γλυκόζη να μειώνεται κατά 70% η μαλτοτριόζη κατά 80% και η μαλτόζη κατά 91%
 - Η δραματική μείωση της μαλτόζης δείχνει και την κύρια επίδραση της υψηλής θερμοκρασίας στη β- αμυλάση που είναι ειδικευμένη στη κατάλυση της παραγωγής μαλτόζης

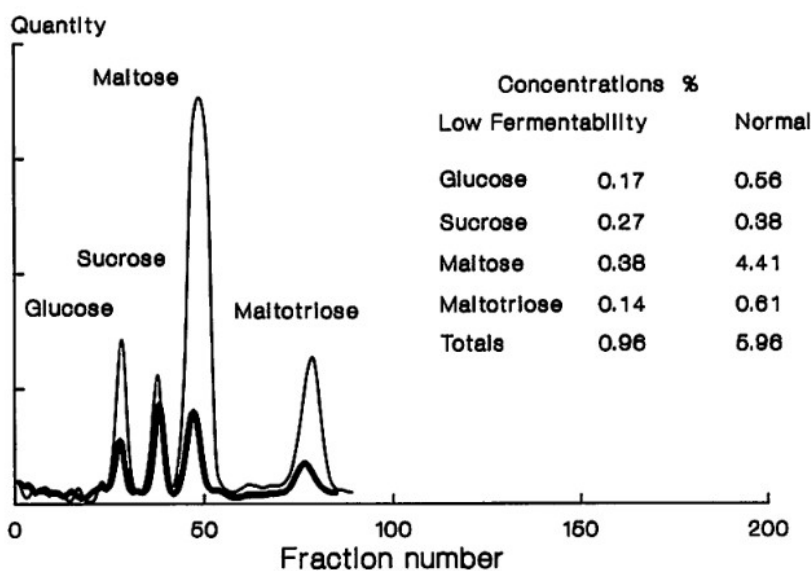


Fig. 6. Wort sugar analysis. Two worts (both 1.040 gravity) were prepared from the BRF mashing column, at 65°C and at 80°C. The individual fermentable sugars were determined by HPLC in conjunction with standard sugar solutions. Normal wort (—); wort produced at high temperature (—).

Εικ. 6: 5 Ανάλυση σακχάρων σε διαφορετικές θερμοκρασίες πολτοποίησης

- V. Τέλος πραγματοποιώντας ζύμωση με κανονική ζύμη στα δύο βυνογλεύκη που παρήχθησαν από τους 65 και 85 θερμοκρασίες πολτοποίησης παρατηρήθηκαν :
- Μετά από 24 ώρες η ανάπτυξη της βιομάζας συνεχιζόταν στο βυνογλεύκος των 65°C ενώ είχε ολοκληρωθεί στο αντίστοιχο των 85°C δείχνοντας ότι η υψηλή θερμοκρασία εμποδίζει και τον ρυθμό ανάπτυξης της ζύμης
 - Πραγματοποιώντας ξεχωριστή ζύμωση στο δεύτερο βυνογλεύκος των 85 °C με προσθήκη αμυλογλυκοζιδασών παρατηρήθηκε ανατροπή της προηγούμενης εξέλιξης και το βυνογλεύκος των 85°C υποστήριξε την ανάπτυξη της ζύμης σε υψηλούς ρυθμούς δείχνοντας ότι αν παραχθούν ζυμώσιμες μονάδες από τις δεξτρίνες ακόμη και αυτό το βυνογλεύκος μπορεί να παράξει αλκοόλη. Η παραπάνω ανατροπή μπορεί να γίνει και ειδικές ζύμες που αποζυμώνουν τις δεξτρίνες (εικόνα 6:5)

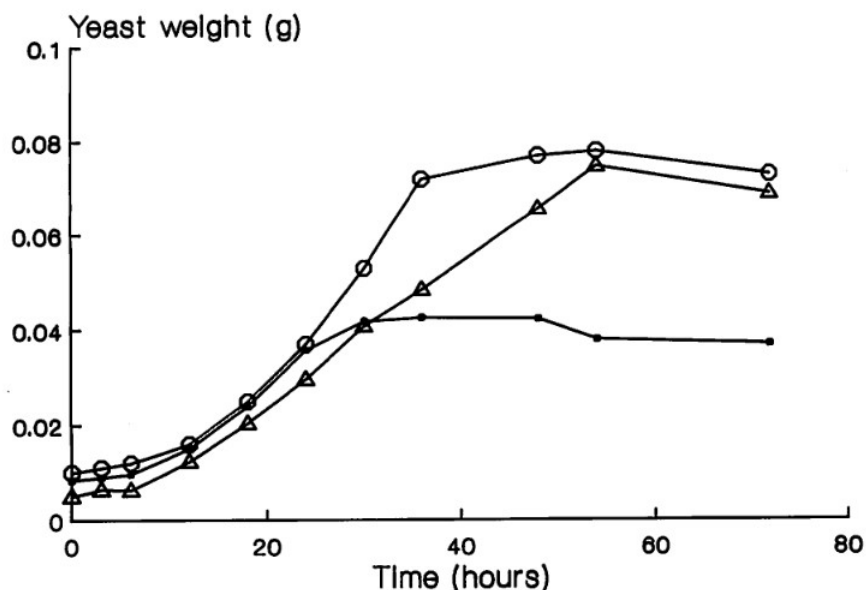


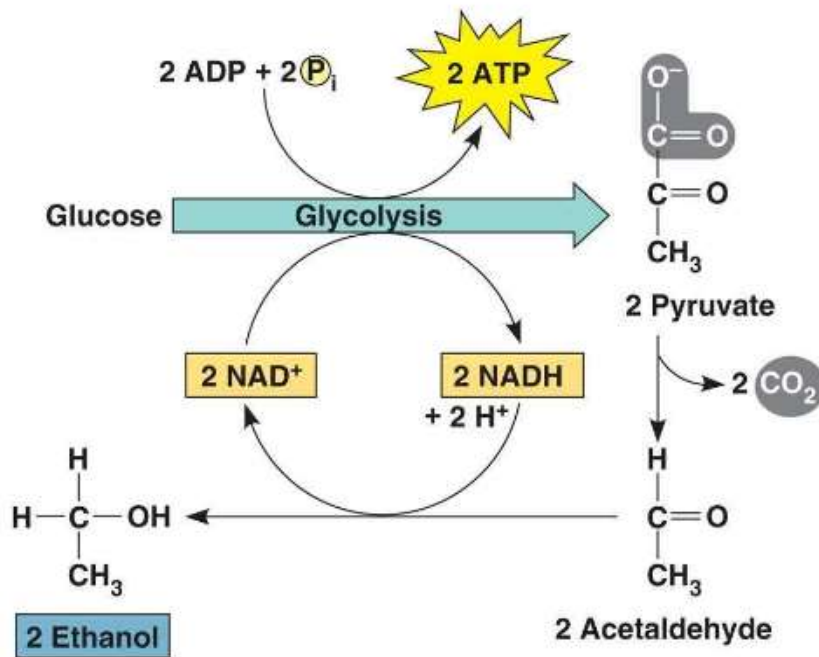
FIG. 7. Yeast growth in low fermentability wort. The two worts from Figure 6 were fermented in 1.5 litre stirred fermenters using NCYC 1681. In addition 10 ml of amyloglucosidase (Novo) was added to a third fermenter containing 80°C wort. During the growth period, 10 millilitre samples were removed, the yeast washed, and the dry weight measured. Normal wort (Δ—Δ); wort produced at high temperature (■—■); wort produced at high temperature and with amyloglucosidase (○—○).

Εικ. 6: Ανάπτυξη ζυμών σε σχέση με το χρόνο σε διαφορετικές θερμοκρασίες – προσθήκη ενζύμων

Το άρθρο που αναλύει τον τρόπο που επηρεάζει η θερμοκρασία πολτοποίησης και η αρχική πυκνότητα του διαλύματος βύνης- νερού απετέλεσε τον πρώτο πυλώνα στον οποίο στηρίχθηκε και το πειραματικό μέρος της παρούσης εργασίας. Ένα αρχικό διάλυμα 7:1 και πολτοποίηση σε θερμοκρασία μεγαλύτερη των 85⁰C μπορεί να δώσει χαμηλής ζυμωσιμότητας βυνογλεύκος άρα και χαμηλά ποσοστά αλκοόλης.

6.3.Χρήση ειδικών ζυμών για την μείωση της αλκοόλης κατά την ζύμωση

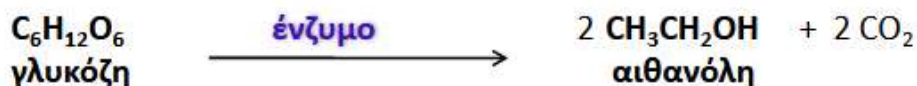
Όπως είναι γνωστό οι ζύμες είναι οι μικροοργανισμοί που μεταβολίζουν τα σάκχαρα προς CO₂ και νερό παρουσία αέρα και σε CO₂ και αλκοόλη απουσία αέρα. Αυτό που μας ενδιαφέρει γενικά στη ζυθοποίηση είναι βέβαια η παραγωγή αλκοόλης από τις ζύμες η ονομαζόμενη ζύμωση που σχηματικά περιγράφεται στη παρακάτω εικόνα 6:6



(a) Alcohol fermentation

Εικ. 6: 7 Περιγραφή της αλκοολικής ζύμωσης

Η γενικευμένη αντίδραση περιγράφεται ως :



Όπου στη μύρα μέρος του CO₂ εγκλωβίζεται στη φιάλη και παραμένει διαλυμένο μέσα στο προϊόν βοηθώντας στη δημιουργία αφρού στη μετάγγισή του στο ποτήρι.

Η επιλογή της ζύμης στις κανονικές μύρες γίνεται συνήθως ανάμεσα στις "αφροζύμες" και τις "βυθοζύμες"

- Οι αφροζύμες ή Ale (*Saccharomyces cerevisiae*) κατά τη διάρκεια της ζύμωσης ανέρχονται στην επιφάνεια, ζυμώνουν γρήγορα, έχουν έντονα αρώματα και σ' αυτές περιλαμβάνονται και οι άγριες ζύμες. Έχουν την ικανότητα να καταναλώνουν τον δισακχαρίτη μελιβιόζη γεγονός που χρησιμεύει ως μέσο διάκρισης από τις. Η τυπική θερμοκρασία ζύμωσης για τις αφροζύμες είναι 15-22 °C. Τόσο τα μητρικά όσο και τα θυγατρικά κύτταρα σχηματίζουν κυτταρικά συμπλέγματα που με τη βοήθεια του αερίου CO₂ ανέρχονται στην επιφάνεια αφρίζοντας.

- b. Βυθοζύμες ή Lager (*Saccharomyces pastorianus*) απαντώνται ως μεμονωμένα κύτταρα γι' αυτό και βυθίζονται εύκολα. Ζυμώνονται σε θερμοκρασίες 6-12 και έχουν μεταζύμωση που διαρκεί μερικούς μήνες. Γι' αυτό απαιτείται αποθήκευση για αρκετό χρόνο πράγμα που τους έδωσε την ονομασία lager που στα γερμανικά σημαίνει αποθήκη. Ως αποτέλεσμα έχουν απαλό και κομψό χαρακτήρα μπύρας και είναι διαύγεια

Πέρα από τις δύο βασικές κατηγορίες ζυμών αναζητούνται με την πάροδο του χρόνου επιλογή ή και δημιουργία καθαρών στελεχών με ειδικές ιδιότητες.

- Αλκοολοανθεκτικές ζύμες. Επειδή ο *Saccharomyces cerevisiae* με την αύξηση της αλκοόλης εμποδίζεται στη πρόσληψη γλυκόζης, μαλτόζης, αμμωνίου και αμινοξέων αναζητήθηκαν στελέχη μεγάλης αντοχής στην αλκοόλη στις περιπτώσεις γλευκών με υψηλή πυκνότητα.
- Κρυστανοανθεκτικές ζύμες. Επειδή ζύμωση σε χαμηλές θερμοκρασίες προσδίδει ιδιαίτερα ευχάριστα γευστικά και αρωματικά χαρακτηριστικά στη μπύρα αλλά δυσκολεύει την ανάπτυξη της ζύμωσης αναζητήθηκαν στελέχη με αντοχή στο κρύο(5-6) AXAZ-1, AXAZ-2 Visanto-
- Θερμοανθεκτικές ζύμες. Επειδή σε χώρες με υψηλές θερμοκρασίες η ζύμωση κινδυνεύει να γίνει πολύ γρήγορα
- Επιλογές με διάφορες μεθόδους με στόχο ζύμες που αντέχουν στην ωσμωτική πίεση, παράγουν λίγη ακεταλδεΐδη, υδροθείο διακετύλιο
- Επιλογές ζυμών με ιδιαίτερα αρώματα, που παράγουν γλυκερόλη, εστέρες ή ουσίες που αναστέλλουν την ανάπτυξη ανεπιθύμητων μικροοργανισμών
- Τέλος γενετικά τροποποιημένες ζύμες με απενεργοποίηση, ενεργοποίηση, υπερέκφραση γονιδίων με στόχο την μείωση ή την αύξηση κάποιων μεταβολιτών [6]

Μία τέτοια ειδική ζύμη που επιτελεί μια ακόμη τροποποίηση στην αλκοολική ζύμωση με στόχο την μειωμένη αλκοόλη είναι ένα στέλεχος του *Saccharomyces cerevisiae* var το *chevalierithat* και με τον κωδικό SafAleTMLA-01. Αυτή η ειδική ζύμη αποτελεί το δεύτερο πυλώνα του πειραματικού μέρους αυτής της εργασίας. Είναι μια ζύμη που δεν αφομοιώνει την μαλτόζη και την μαλτοτριόζη αλλά τα απλά σάκχαρα όπως γλυκόζη, φρουκτόζη και σακχαρόζη. Μια τέτοια μπύρα που θα έχει αφήσει σάκχαρα ή και άμυλο στο τελικό προϊόν απαιτεί παστερίωση προς αποφυγή επιμολύνσεων.

Η **παστερίωση** απαιτεί θέρμανση σε υψηλή θερμοκρασία για λίγα λεπτά με στόχο την αδρανοποίηση όλων των μικροοργανισμών που απομένουν με το τέλος της ζύμωσης. Μια συνηθισμένη παστερίωση απαιτεί 70°C για 40 δευτερόλεπτα. Παρόλα αυτά αποτελεί αιτία και για την καταστροφή του γευστικού και αρωματικού αποτελέσματος της μπύρας [20].

στις μεγάλες μονάδες παραγωγή η παστερίωση αποτελεί κανόνα για να επιμηκύνει την περίοδο ζωής της μύρας και να απομακρύνει τους κινδύνους αποθήκευσης ή το κόστος που



Εικ. 6: 8 Σύστημα παστερίωσης ροής



Εικ. 6: 9 Σύστημα σήραγγας

απαιτεί η αποθήκευση σε ψυγεία. Γίνεται με δύο τρόπους ή πριν την εμφιάλωση με το επονομαζόμενο σύστημα «παστερίωση ροής» είτε μετά την εμφιάλωση με το ονομαζόμενο σύστημα «σήραγγας» σε ζώνες προθέρμανσης – θέρμανσης- ψύξης.(εικόνα 6:7 και 6:8) Όμως στις μικροζυθοποιείες αποφεύγεται γιατί θεωρείται ότι καταστρέφει όλο το γευστικό υπόβαθρο που είναι και το πλεονέκτημα της μικρής παραγωγής. Άλλωστε οι μικροί παραγωγοί ελέγχουν καλύτερα την αποθήκευση αφού απευθύνονται σε μικρότερη αγορά σε συντομότερο χρόνο .

7. Υλικά και μέθοδοι

Για να διερευνηθεί η διαδικασία παρέμβασης στην πολτοποίηση ώστε να παραχθεί μύρα με χαμηλή αλκοόλη πραγματοποιήθηκαν 3 διαφορετικές πειραματικές ζυθοποιήσεις. Σε κάθε πειραματική ζυθοποίηση χρησιμοποιήθηκε ειδική ζύμη η οποία δεν ζυμώνει την μαλτόζη και την μαλτοτριόζη ενώ σε μία εξ' αυτών εναλλακτικά χρησιμοποιήθηκε και κανονική ζύμη για περαιτέρω σύγκριση. Βασικό εργαλείο για τον περιορισμό της αλκοόλης στα δύο εργαστηριακά μέρη ήταν η υψηλή θερμοκρασία, ενώ στο τρίτο το PH. Αναλυτικά αναφέρονται παρακάτω οι ξεχωριστές ζυθοποιήσεις.

7.1. Πειραματική ζυθοποίηση Α΄ - Υψηλή θερμοκρασίας σε αραιωμένο γλεύκος

Στο εργαστηριακό μέρος Α μελετήθηκε η επίδραση της υψηλής θερμοκρασίας κατά την πολτοποίηση σε αραιωμένο γλεύκος με προσθήκη ειδικής ζύμης . στο τέλος η διαδικασία διαφοροποιήθηκε ως προς τη πραγματοποίηση της δεύτερης ζύμωσης στο μπουκάλι.

Με στόχο μύρα με τελικό αλκοολικό βαθμό μικρότερο από 1% η αρχική ανάμειξη νερού προς βύνη έγινε αναμειγνύοντας 2,2Kg βύνης με 10,5 lt νερού με τελικό στόχο αναλογία 7:1, μετά το sparging. Χρησιμοποιήθηκε βύνη Pale Ale από το εργαστήριο της Βυνοποίησης (εικόνα 7:1) καθώς και νερό που είχε φιλτραριστεί για να απομακρυνθεί το χλώριο.



Εικ. 7: 1 Pale Ale



Εικ. 7: 2 Μύλος

Προηγήθηκε άλεση και παραλαβή χοντροκομμένης βύνης (εικόνα 7:2)

Το πρόγραμμα πολτοποίησης περιλάμβανε τα εξής βήματα:

- Με αρχική θερμοκρασία νερού 50°C, αναμείχτηκε η βύνη όπου η θερμοκρασία έπεσε στους 45°C και ο αναδέυτηκε για 30΄
- Στη συνέχεια η θερμοκρασία ανέβηκε στους 50°C σε διάστημα 5΄ με συνεχή ανάδευση
- Μετά η θερμοκρασία ανέβηκε στους 80°C σε διάστημα 10΄ πάλι με συνεχή ανάδευση
- Στο τέλος η θερμοκρασία ανέβηκε στο 90°C σε διάστημα 10΄
- Στους 90°C παρέμεινε με συνεχή ανάδευση για 20΄



Εικ. 7: 3 Mashing

Για τη διάγνωση (εικόνα 7:4) πραγματοποιήθηκε επαναροή και κατόπιν ακολούθησε έκπλυση βυνοϋπολειμμάτων με 5 Lt αποχλωριωμένο νερό στους 85⁰ C . στον παρακάτω

Πίνακας 7:1 αναφέρονται οι τιμές που ελήφθησαν μέχρι την ολοκλήρωση του sparging



Εικ. 7: 4 Sparging

Πίνακας 7: 1

	D _{20/20} πυκνότητα
1.αρχική	1.027
2.Πριν το sparging	1.026
3.	1.028
4.	1.027
5.	1.019
6.τελική	1.016
7.ολικό	1.022

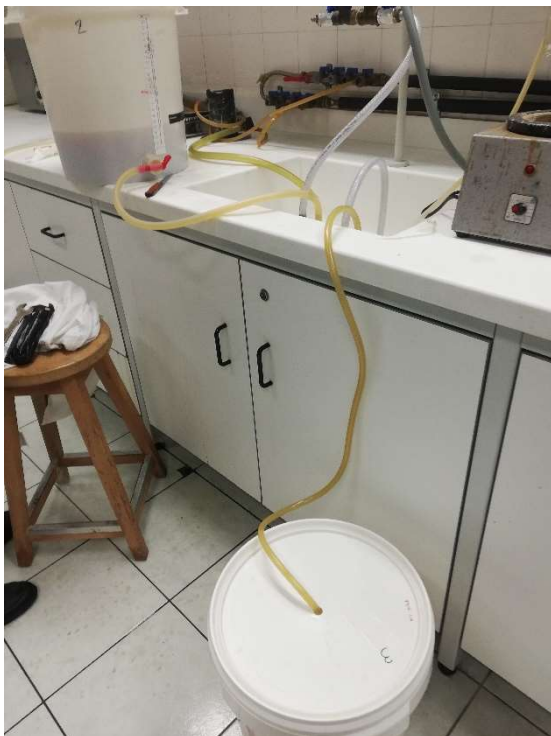
Ακολούθησε το στάδιο του βρασμού το οποίο πραγματοποιήθηκε στους 100⁰C για 60'.

- Στην αρχή του βρασμού προστέθηκαν 15 gr λυκίσκου ποικιλίας Amarillo
- στα 30' προστέθηκαν επιπλέον 10g λυκίσκου
- Στο τέλος του βρασμού προστέθηκαν 5 gr λυκίσκου
- Πραγματοποιήθηκε whirlpool για 30' (εικόνα 7:5)



Εικ. 7: 5 Whirpool

Ακολούθησε απομάκρυνση ψυχρού ιζήματος μέσω εναλλάκτη θερμότητας (εικόνες 7:6) και από τη διαδικασία παρελήφθησαν 10 Lt βυνογλεύκος πυκνότητας **1.029g/ml** δηλαδή **plato 7.3** έτοιμα για ζύμωση.



Εικ. 7: 6 Απομάκρυνση ψυχρού ιζήματος

Για μια πλήρως ολοκληρωμένη ζύμωση μια τέτοια αρχική πυκνότητα θα έδινε **3,7% αλκοολικό βαθμό**. Αυτό σημειώνεται ώστε να γίνει η τελική σύγκριση με την ζύμωση με ειδικές ζύμες.

Το επόμενο στάδιο δηλ. ο εμβολιασμός πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας την ειδική ζύμη safeAleLA –01(σε αναλογία 50-80 g/hl) (εικόνα 7:7) η ενυδάτωση της οποίας πραγματοποιήθηκε στους 27° C

TECHNICAL DATA SHEET - SafAle™ LA-01 - Rev: APR2019 -
Page 1/2



Εικ. 7: 7 Ζύμες SafAle LA-01

Χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 7,5 gr ζύμες στα 10Lt βυνογλεύκος και μετά την ενσωμάτωση αφέθηκε η πραγματοποίηση της ζύμωσης σε θερμοκρασία περιβάλλοντος που λόγω του χειμώνα κυμαίνονταν μεταξύ 8-12⁰ C.

Μετά την ολοκλήρωση της ζύμωσης που διήρκεσε 1,5 βδομάδα ελήφθησαν μετρήσεις για τον αλκοολικό βαθμό

Οι αρχικές μετρήσεις για την αλκοόλη πραγματοποιήθηκε με απόσταξη που έδωσε ως αποτέλεσμα 0.7% αλκοόλ. Πράγμα που επιβεβαίωσε αρχικά την χαμηλή παραγωγή αλκοόλης

Ακολούθησε εμφιάλωση κατά την οποία σε τμήμα των φιαλών προστέθηκε ζάχαρη για παραγωγή co2 και περεταίρω σύγκριση των αποτελεσμάτων.

Επειδή όμως η μέτρηση με απόσταξη δεν ενδείκνυται για μετρήσεις σε μύρες χωρίς αλκοόλ για τις υπόλοιπες μετρήσεις αναζητήθηκε ακριβές όργανο και συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε winescanner, εφόσον ήταν το μοναδικό όργανο που διατέθηκε από το οινολογικό εργαστήριο Γεώργιος Αναγνωστόπουλος.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων που ελήφθησαν μετά από 3 μήνες αναφέρονται στις (εικόνα 7:8)

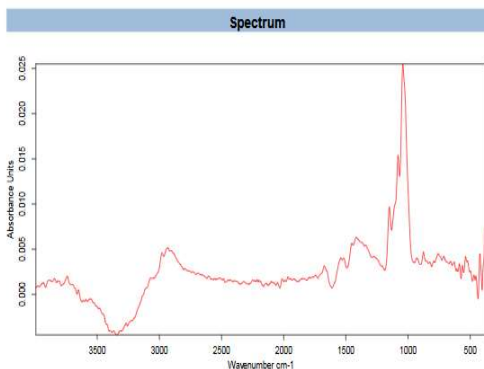
Wine-analysis

Spectrum file name br_2a__EVAL.1
 Spectrum file path C:\Users\Public\Documents\Bruker\OPUS_7.5.18\Wineanalysis
 Measurement date and time 09/09/2020 13:55:3 (GMT+3)
 Sample name br_2a
 Sample form

Quant

Method	1 Acetic acid May 2011.q2 - 2015/03/17 15:09:24 (GMT+2) 2 Alcohol Calibration-2011-May.q2 - 2015/03/17 15:09:27 (GMT+2) 3 Citric acid May 2011.q2 - 2015/03/17 15:09:29 (GMT+2) 4 Density Calibration-2011-May.q2 - 2015/03/17 15:09:33 (GMT+2) 5 Fructose Calibration-2011-May.q2 - 2015/03/17 15:09:36 (GMT+2) 6 Glucose Calibration-2011-May.q2 - 2015/03/17 15:09:40 (GMT+2) 7 Glycerol-Calibration-2011-May.q2 - 2015/03/17 15:09:43 (GMT+2) 8 Lactic-acid Calibration May 2011.q2 - 2015/03/17 15:09:46 (GMT+2) 9 Malic-acid Calibration-2011-May.q2 - 2015/03/17 15:09:48 (GMT+2) 10 pH Calibration-2011-May.q2 - 2015/03/17 15:09:52 (GMT+2) 11 Saccharose Calibration-2011-May.q2 - 2015/03/17 15:09:55 (GMT+2) 12 Tartaric acid May 2011.q2 - 2015/03/17 15:09:57 (GMT+2) 13 Total acid Calibration-2011-May.q2 - 2015/03/17 15:10:02 (GMT+2) 14 Total sugar Calibration-2011-May.q2 - 2015/03/17 15:10:06 (GMT+2)
---------------	---

Component	Prediction	MD out	Range out
Acetic acid	0.43 g/L	*	
Alcohol	1.9 %	*	
Citric acid	6.50 g/L	*	
Density	1.0135	*	
Fructose	0.0 g/L	*	
Glucose	23.1 g/L	*	
Glycerol	0.0 g/L	*	
Lactic Acid	0.00 g/l	*	
Malic acid	1.0 g/L	*	
pH	3.34	*	
Saccharose	12.4 g/L	*	
Tartaric acid	0.00 g/L	*	
Total acid	2.0 g/L	*	
Total sugar	28.4 g/L	*	
vwhite	0.32 g/l	*	
vared	0.08 g/l	*	
DAT	3.2 %	*	



Component	Prediction	MD out	Range out
Extrait	42.2	*	

Εικ. 7: 9 Αναλύσεις (χωρίς προσθήκη ζάχαρης)

Wine-analysis

Spectrum file name br_1a_EVAL.0
Spectrum file path C:\Users\Public\Documents\Bruker\OPUS_7.5.18\Wineanalysis
Measurement date and time 09/09/2020 14:3:46 (GMT+3)
Sample name br_1a
Sample form

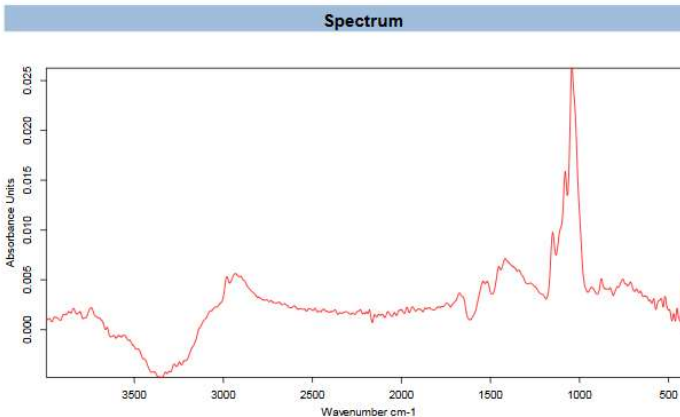
Quant

- Method
- 1 Acetic acid May 2011.q2 - 2015/03/17 15:09:24 (GMT+2)
 - 2 Alcohol Calibration-2011-May.q2 - 2015/03/17 15:09:27 (GMT+2)
 - 3 Citric acid May 2011.q2 - 2015/03/17 15:09:29 (GMT+2)
 - 4 Density Calibration-2011-May.q2 - 2015/03/17 15:09:33 (GMT+2)
 - 5 Fructose Calibration-2011-May.q2 - 2015/03/17 15:09:36 (GMT+2)
 - 6 Glucose Calibration-2011-May.q2 - 2015/03/17 15:09:40 (GMT+2)
 - 7 Glycerol-Calibration-2011-May.q2 - 2015/03/17 15:09:43 (GMT+2)
 - 8 Lactic-acid Calibration May 2011.q2 - 2015/03/17 15:09:46 (GMT+2)
 - 9 Malic-acid Calibration-2011-May.q2 - 2015/03/17 15:09:48 (GMT+2)
 - 10 pH Calibration-2011-May.q2 - 2015/03/17 15:09:52 (GMT+2)
 - 11 Saccharose Calibration-2011-May.q2 - 2015/03/17 15:09:55 (GMT+2)
 - 12 Tartaric acid May 2011.q2 - 2015/03/17 15:09:57 (GMT+2)
 - 13 Total acid Calibration-2011-May.q2 - 2015/03/17 15:10:02 (GMT+2)
 - 14 Total sugar Calibration-2011-May.q2 - 2015/03/17 15:10:06 (GMT+2)

18 -

Component	Prediction	MD out	Range out
Acetic acid	0.45 g/L	*	
Alcohol	2.1 %	*	
Citric acid	5.99 g/L	*	
Density	1.0132	*	
Fructose	0.0 g/L	*	
Glucose	22.2 g/L	*	
Glycerol	0.0 g/L	*	
Lactic Acid	0.00 g/l	*	
Malic acid	0.6 g/L	*	
pH	3.32	*	
Saccharose	12.0 g/L	*	
Tartaric acid	0.00 g/L	*	
Total acid	1.9 g/L	*	
Total sugar	27.5 g/L	*	
vawhite	0.35 g/l	*	
vared	0.10 g/l	*	
DAT	3.4 %	*	

Component	Prediction	MD out	Range out
Extrait	42.2	*	



Εκ. 7: 10 Ανάλυση (προσθήκη ζάχαρης για δεύτερη ζύμωση στο μπουκάλι)

7.2. Πειραματική ζυθοποίηση Β' - Υψηλή θερμοκρασία σε πυκνό γλεύκος

Στη δεύτερη πειραματική ζυθοποίηση μελετήθηκε η επίδραση της υψηλής θερμοκρασίας κατά την πολτοποίηση σε πυκνό γλεύκος με προσθήκη ειδικής ζύμης αλλά και με ζύμη συμβατικής ζυθοποίησης ώστε να συγκριθούν οι δύο ζυμώσεις. Στόχος και στις δύο περιπτώσεις ήταν η παραγωγή μπύρας με λίγη αλκοόλη στη πρώτη περίπτωση από την διπλή επίδραση υψηλής θερμοκρασίας και ειδικής ζύμης ενώ στη δεύτερη μόνο λόγω της υψηλής θερμοκρασίας πολτοποίησης.



Εικ. 7: 11 Grainfather

Αυτή η πειραματική ζυθοποίηση πραγματοποιήθηκε σε ειδικό σύστημα ζυθοποίησης το ονομαζόμενο Grainfather. Το συγκεκριμένο σύστημα χαρακτηρίζεται ως all in one δηλαδή όλες οι διεργασίες σ' ένα δοχείο. Η συσκευή παραχωρήθηκε από την ζυθοποιεία ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΥ και όλη η διαδικασία πραγματοποιήθηκε στο χώρο του ζυθοποιείου.

Χρησιμοποιήθηκε βύνη Weyermann προσφορά του ζυθοποιείου και συγκεκριμένα αλέσθηκαν 6 kg βύνης. Ο τελικός όγκος του νερού μετά την έκπλυση και των βυνοϋπολειμμάτων ήταν 27Lt πράγμα που εξασφάλιζε ένα πυκνό βυνογλεύκος αναλογίας αραιώσης 4,5:1 το οποίο μετά τον βρασμό έδωσε ένα πυκνό Plato 14,9

Το πρόγραμμα πολτοποίησης-διαύγασης – έκπλυσης που ενοποιείται στη συσκευή περιλάμβανε τα εξής βήματα:

- Με αρχικό όγκο νερού τα 20Lt και θερμοκρασία νερού 90°C, αναμείχτηκαν τα 6kg της βύνης όπου η θερμοκρασία έπεσε στους 85-87 και εισήχθησαν στο σύστημα. Τόσο η ανάδευση όσο και η επαναροή πραγματοποιήθηκε αυτόματα 45 '

- Στη συνέχεια η θερμοκρασία ανέβηκε στους 91 και για διάστημα 15' η συσκευή λειτουργούσε αυτόματα.

- για τον διαχωρισμό εκχυλίσματος – βυνοϋπολειμμάτων ανασηκώθηκε χειροκίνητα το εσωτερικό ειδικό δοχείο με τον διάτρητο πυθμένα

- Για την έκπλυση του ιζήματος προστέθηκαν 10 συνολικά Lt νερού

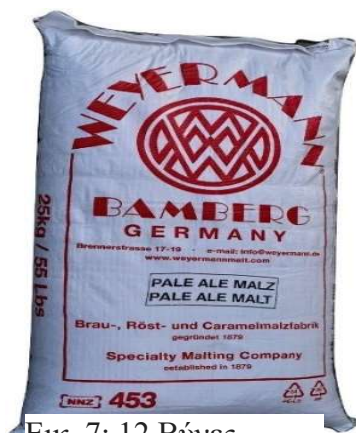
- Ο τελικός όγκος του γλεύκους πριν το βρασμό ήταν 27 Lt

- Μετρήθηκε το πλάτο $p= 14.3$ και το pH 5,8

Το επόμενο στάδιο ο βρασμός πραγματοποιείται στο ίδιο δοχείο για 60'

- Στην αρχή προστέθηκαν 15 gr λυκίσκο Amarillo

- 10' πριν το τέλος 10gr επιπλέον λυκίσκου



Εικ. 7: 12 Βύνες



Εικ. 7: 13 Grainfather

Για τις μετρήσεις plato και pH ένα δείγμα ψύχθηκε όπου ελήφθησαν οι τιμές 14,9 και 5,74 αντίστοιχα

Όλες οι μετρήσεις εμφανίζονται στον Πίνακα 7:2

Πίνακας 7: 2

Strike water volume	20Lt
Sparge water	10Lt
Pre boil plato/pH	14.3/5.8
Post boil plato/pH	14.9/5.74
Pre boil volume	27Lt

Το πείραμα διαχωρίζεται σε 2 μέρη ώστε να πραγματοποιηθούν δύο διαφορετικές ζυμώσεις . μία με την ειδική ζύμη SafAle LA- 01 και μία με την κανονική ζύμη Saf Ale S-04

Για την ζύμωση με την SafAle LA- 01 χρησιμοποιήθηκαν 22 lt βυνογλεύκους και 15 gr ζύμης και η ζύμωση πραγματοποιήθηκε σε συνθήκες ψύξης στους **18°C**, για **4,5 ημέρες** και κατόπιν στους **1,5° C** για περαιτέρω διαύγαση και προστασία, αφού αναμένεται χαμηλή αλκοόλη.

Για την ζύμωση με την ζύμη Saf Ale S-04 χρησιμοποιήθηκαν 5Lt βυνογλεύκους και 7 gr ζύμης. Η ζύμωση πραγματοποιήθηκε στους 18°C για 1 βδομάδα .Ακολούθησε εμφιάλωση και ελήφθησαν μετρήσεις στο winscanner και το αποτέλεσμα ήταν η αλκοόλη να φτάσει στο 5%.

Εμφιάλωση και ενανθράκωση με Beergun

Για την μύρα με την ειδική ζύμη SafAle LA- 01 επιλέχθηκε να γίνει ενανθράκωση.(False carbonation)



Εικ. 7: 15 Con. Keg ενανθράκωσης - δοχείο ζύμωσης



Εικ. 7: 14 Εμφιάλωση με beergun



Εικ. 7: 16 Φιάλες έτοιμες για παστερίωση

Παστερίωση

Ακολούθησε **παστερίωση** για την οποία χρησιμοποιήθηκε η μέθοδο των τριών σταδίων που περιλαμβάνει την σταδιακή άνοδο, θέρμανση και μετέπειτα ψύξη. Χρησιμοποιώντας μια δεξαμενή στην οποία τοποθετήθηκαν οι φιάλες διοχετεύτηκε ζεστό νερό η θερμοκρασία ανέβηκε στους 30°C για μερικά λεπτά, μετά στους 65°C για 3' λεπτά και πάλι στους 30°C για μερικά λεπτά μέχρι να αποκατασταθεί η ισορροπία. (εικόνα 7:14)

Κατά την διάρκεια της παστερίωσης σε κάποιες μπίρες καταστράφηκε η συσκευασία τους στην παστερίωση.

Κρατήθηκαν 6 φιάλες χωρίς παστερίωση για περαιτέρω αποτελέσματα.



Εικ. 7: 17 Διαδικασία παστερίωσης σε 3 φάσεις με σταδιακή μεταβολή της θερμοκρασίας

Με βάση τον τύπο της παστερίωσης και το χρόνο παραμονής στους 65°C προκύπτει ο βαθμός παστερίωσης της μπίρας $P_U = t \cdot 1.393^{(T-60)}$ ότι είναι 15,7 PE βαθμούς.

Η ανάλυση την μπίρας στο Winscanner έδωσε τα αποτελέσματα που φαίνονται στην Εικόνα 7:18

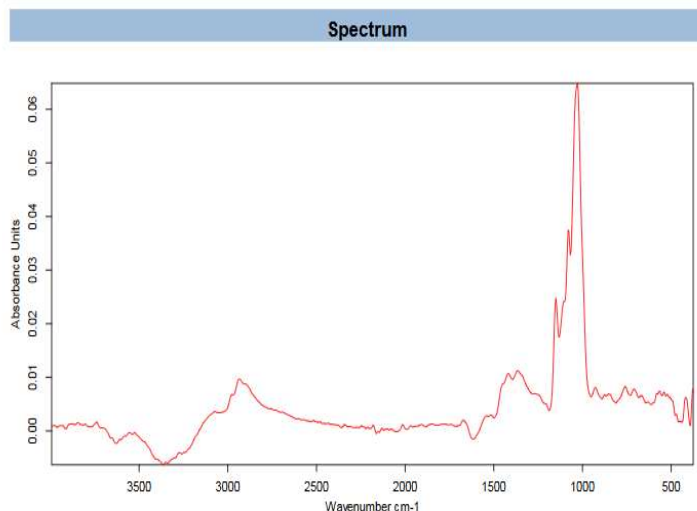
Wine-analysis

Spectrum file name br_15a_EVAL.0
 Spectrum file path C:\Users\Public\Documents\Bruker\OPUS_7.5.18\Wineanalysis
 Measurement date and time 09/09/2020 13:41:41 (GMT+3)
 Sample name br_15a
 Sample form

Quant

Method	1 Acetic acid May 2011.q2 - 2015/03/17 15:09:24 (GMT+2) 2 Alcohol Calibration-2011-May.q2 - 2015/03/17 15:09:27 (GMT+2) 3 Citric acid May 2011.q2 - 2015/03/17 15:09:29 (GMT+2) 4 Density Calibration-2011-May.q2 - 2015/03/17 15:09:33 (GMT+2) 5 Fructose Calibration-2011-May.q2 - 2015/03/17 15:09:36 (GMT+2) 6 Glucose Calibration-2011-May.q2 - 2015/03/17 15:09:40 (GMT+2) 7 Glycerol-Calibration-2011-May.q2 - 2015/03/17 15:09:43 (GMT+2) 8 Lactic-acid Calibration May 2011.q2 - 2015/03/17 15:09:46 (GMT+2) 9 Malic-acid Calibration-2011-May.q2 - 2015/03/17 15:09:48 (GMT+2) 10 pH Calibration-2011-May.q2 - 2015/03/17 15:09:52 (GMT+2) 11 Saccharose Calibration-2011-May.q2 - 2015/03/17 15:09:55 (GMT+2) 12 Tartaric acid May 2011.q2 - 2015/03/17 15:09:57 (GMT+2) 13 Total acid Calibration-2011-May.q2 - 2015/03/17 15:10:02 (GMT+2) 14 Total sugar Calibration-2011-May.q2 - 2015/03/17 15:10:06 (GMT+2) 15 -
--------	---

Component	Prediction	MD out
Acetic acid	0.94 g/L	*
Alcohol	3.0 %	*
Citric acid	20.02 g/L	*
Density	1.0442	*
Fructose	0.0 g/L	*
Glucose	72.6 g/L	*
Glycerol	0.0 g/L	*
Lactic Acid	0.00 g/l	*
Malic acid	1.2 g/L	*
pH	3.21	*
Saccharose	38.8 g/L	*
Tartaric acid	0.00 g/L	*
Total acid	4.1 g/L	*
Total sugar	87.0 g/L	*
vawhite	1.03 g/l	*
vared	0.94 g/l	*
DAT	7.3 %	*
Extrait	126.3	*



Εικ. 7: 18 Ανάλυση παστεριωμένης μύρας

Οι μετρήσεις επαναλήφθηκαν μετά από 3 μήνες παραμονής της μύρας στην φιάλη, οπότε στις απαστεριώτες φιάλες διαπιστώθηκε ότι συνέχισε η ζύμωση και αυξήθηκε η αλκοόλη δίνοντας τελικό αποτέλεσμα 3,4%, ενώ στις παστεριωμένες η αλκοόλη παρέμεινε σταθερή. Η παραπάνω μέτρηση είχε μεγάλη σημασία για την εκτίμηση του ρόλου της παστερίωσης στην μείωση της αλκοόλης.

Wine-analysis

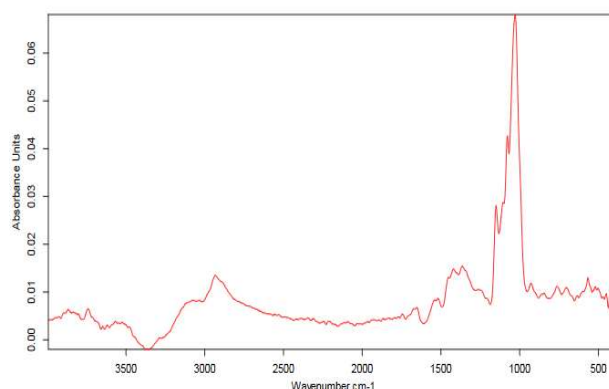
Spectrum file name: zgl_2_EVAL.0
 Spectrum file path: C:\Users\Public\Documents\Bruker\OPUS_7.5.18\Wineanalysis
 Measurement date and time: 18/08/2020 15:8:11 (GMT+3)
 Sample name: zgl_2
 Sample form:

Quant

Method	
1	Acetic acid May 2011.q2 - 2015/03/17 15:09:24 (GMT+2)
2	Alcohol Calibration-2011-May.q2 - 2015/03/17 15:09:27 (GMT+2)
3	Citric acid May 2011.q2 - 2015/03/17 15:09:29 (GMT+2)
4	Density Calibration-2011-May.q2 - 2015/03/17 15:09:33 (GMT+2)
5	Fructose Calibration-2011-May.q2 - 2015/03/17 15:09:36 (GMT+2)
6	Glucose Calibration-2011-May.q2 - 2015/03/17 15:09:40 (GMT+2)
7	Glycerol-Calibration-2011-May.q2 - 2015/03/17 15:09:43 (GMT+2)
8	Lactic-acid Calibration May 2011.q2 - 2015/03/17 15:09:46 (GMT+2)
9	Malic-acid Calibration-2011-May.q2 - 2015/03/17 15:09:48 (GMT+2)
10	pH Calibration-2011-May.q2 - 2015/03/17 15:09:52 (GMT+2)
11	Saccharose Calibration-2011-May.q2 - 2015/03/17 15:09:55 (GMT+2)
12	Tartaric acid May 2011.q2 - 2015/03/17 15:09:57 (GMT+2)
13	Total acid Calibration-2011-May.q2 - 2015/03/17 15:10:02 (GMT+2)
14	Total sugar Calibration-2011-May.q2 - 2015/03/17 15:10:06 (GMT+2)
15	-

Spectrum

Component	Prediction	MD out
Acetic acid	0.81 g/L	*
Alcohol	2.2 %	*
Citric acid	18.81 g/L	*
Density	1.0496	*
Fructose	0.0 g/L	*
Glucose	75.8 g/L	*
Glycerol	0.0 g/L	*
Lactic Acid	0.00 g/l	*
Malic acid	0.1 g/L	*
pH	3.26	*
Saccharose	42.0 g/L	*
Tartaric acid	0.00 g/L	*
Total acid	3.6 g/L	*
Total sugar	100.5 g/l	*
Extrait	137.2	*
vared	0.72 g/l	*
DAT	6.7 %	*



Εικ. 7: 1 Αυθόρμητη ζύμωση

Στην προσπάθεια μέτρησης σακχάρων πριν την ζύμωση βρέθηκαν αυτές οι μετρήσεις
Με ζύμωση από άγριες ζύμες από το εξωτερικό περιβάλλον. Εικόνα 7:1

7.3.Πειραματική ζυθοποίηση Γ'- Μεταβολή του pH προς όξινο

Στο τρίτο εργαστηριακό μέρος επιχειρήθηκε η μεταβολή του pH ώστε να περιοριστεί η δραστηριότητα της α-β αμυλάσης.

Όπως ήδη έχει αναφερθεί Το βέλτιστο pH για την δράση της α-αμυλάσης είναι 5,6 – 5,8 και της β-αμυλάσης είναι 5,4-5,6. Στην περίπτωση αυτή στόχος ήταν η πραγματοποίηση της πολτοποίησης σε pH περίπου 4.

Με στόχο μύρα με τελικό αλκοολικό βαθμό μικρότερο από 1% η αρχική ανάμειξη νερού προς βύνη έγινε αναμειγνύοντας 4,2Kg βύνης με 10 lt νερού με τελικό σκοπό αναλογία 3,5:1, μετά το sparging. Χρησιμοποιήθηκε βύνη Pale Ale από το εργαστήριο της Βυνοποίησης καθώς και νερό που είχε φιλτραριστεί για να απομακρυνθεί το χλώριο.

Προηγήθηκε άλεση και παραλαβή χοντροκομμένης βύνης 1,2

Το πρόγραμμα πολτοποίησης περιλάμβανε τα εξής βήματα:



- Με αρχική θερμοκρασία νερού 50°C προστέθηκε η βύνη, η θερμοκρασία έπεσε στους 45°C και επακολούθησε ανάδευση για 30' .
- Ακολουθεί μέτρηση pH = 5,6
- Προστέθηκαν 15 ml φωσφορικού οξέος και το pH έφτασε στο 4,7
- Ακολούθησε άνοδος της θερμοκρασίας και ανάδευση για 40'
- Μέτρηση του pH 4,77
- Συνέχιση της ανάδευσης μέχρι το τεστ ιωδίου να δείξει την πέψη του αμύλου (35')



Εικ. 7: 20 Test Ιωδίου



Εικ. 7: 21 Διαύγαση βυνογλεύκουσ μέσα από τις στιβάδες των βυνοπολειμμάτων.

Ακολουθεί διαύγαση και έκλυση των βυνοϋπολειμμάτων με 5 L αποχλωριωμένου νερού στους 45 °C

- Μέτρηση του pH 5,02
- Προσθήκη 2 ml φωσφορικού οξέος πάνω από την πίτα βυνοϋπολειμμάτων
- Μέτρηση του pH σε 4,56
- Μέτρηση Plato (πίνακας 7:2)

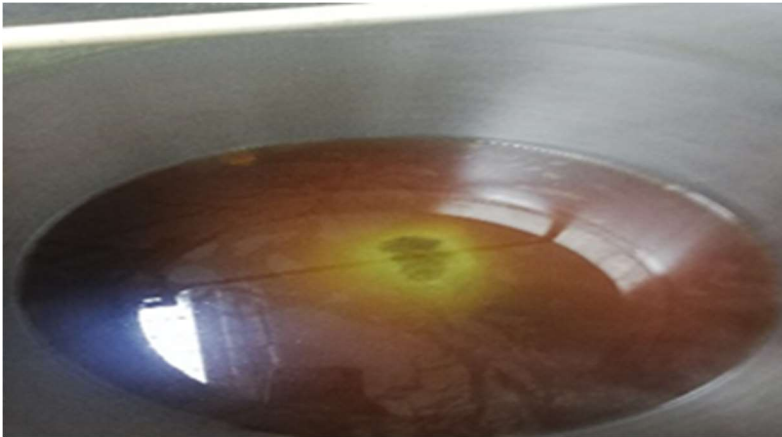
Πίνακας 7: 2

Πρώτη ροή	1,059	14,5	4,70
Πριν το sparge	1,060	14,7	
	1,061	15	4,77
	1,060	14.7	
	1,058	14,3	4,79
sparge	1,055	13,6	4,83
	1,059	14,5	5,02 + 2 ml
Τελικό πριν το βρασμό	1,052	12,9	4,54
Τελικό μετά το βρασμό	1,057	14	4,39

Το επόμενο στάδιο ήταν ο βρασμός που πραγματοποιήθηκε στους 100 για 60'

- Στην αρχή του βρασμού προστέθηκαν 10 gr του Amarillo
- Στα 30' 10 gr
- Και στο τέλος 5 gr

Ακολούθησε το whirlpool :



Εικ. 7: 22 Whirpool

Ακολούθησε απομάκρυνση ψυχρού ιζήματος μέσω εναλλάκτη θερμότητας και από τη διαδικασία παρελήφθησαν 10 Lt βυνογλεύκος πυκνότητας **1.057g/ml** δηλαδή **plato 14 pH 4,39** έτοιμα για ζύμωση.

Στην συνέχεια έγινε η προετοιμασία ενυδάτωσης ζύμης SafAle LA-01 (50-80 g / hl) στους 27 °C αφήνω να ξεκουραστεί για 15- 30' ανακατεύω προσεκτικά και προσθέτω στο δοχείο ζύμωσης.

Χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 7 gr ζύμες στα 9Lt βυνογλεύκος και μετά την ενσωμάτωση η ζύμωση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία ψύξης μεταξύ 10-14⁰ C.

Για την σύγκριση των ίδιων δεδομένων με διαφορετικό Plato πολτού πραγματοποιήθηκε η εξής αραίωση:

Σε 1L βυνογλεύκος με plato 14 έγινε αραίωση με βρασμένο πρώτα νερό 2 L για να γίνει η ζύμωση με plato 7 όπου προστέθηκαν 2 gr ζύμης.

Το ζυθογλεύκος παρέμεινε για ζύμωση 2 εβδομάδες όπου κατόπιν εμφιαλώθηκε.

Η αλκοόλη που μετρήθηκε με απόσταξη βρέθηκε πριν την εμφιάλωση να είναι:



Εικ. 7: 23 Απόσταξη

- Για το δείγμα με plato 14 η περιεκτικότητα σε αλκοόλη βρέθηκε **6,47 %vol**
- Για το δείγμα με plato 7 η περιεκτικότητα σε αλκοόλη βρέθηκε **3,23 %vol**

Λόγω της μη αποτελεσματικής μείωσης της αλκοόλης δεν πραγματοποιήθηκαν περαιτέρω μετρήσεις των δειγμάτων αυτού του εργαστηριακού μέρους.

8. Συγκριτική ανάλυση αποτελεσμάτων

8.1. Αποτελέσματα και συζήτηση

I. Από τα τρία πειραματικά μέρη, το πείραμα με στόχο την μελέτη της επίδρασης ενός χαμηλού pH κατά την πολτοποίηση στην παραγωγή αλκοόλης γενικά δεν έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα. Κατά τη διαδικασία επιχειρήθηκε η μείωση του pH στο 4 ώστε να αδρανοποιηθεί τόσο η α αμυλάση που έχει βέλτιστο στο 5.6-5,8 όσο και η β αμυλάση με αντίστοιχο βέλτιστο το 5.4-5,6. Τελικά κατά την πολτοποίηση σε 10 L νερού το μικρότερο pH ήταν 4,7 και το υψηλότερο 5,02 με την προσθήκη 17 ml φωσφορικού οξέος. Παρόλο που το pH πριν την προσθήκη ζυμών ήταν 4,39, δεν κατάφερε να φτάσει στο επιθυμητό επίπεδο, γιατί το ζυθογλεύκος έγινε ρυθμιστικό διάλυμα σταθεροποιώντας το pH σε τιμές που δεν αδρανοποίησαν τα ένζυμα. Γενικά το πείραμα με την μείωση του pH τεχνικά δεν πραγματοποιήθηκε σωστά με αποτέλεσμα μετά την ζύμωση το αλκοόλ να φτάσει στα **6, 47 %vol, για το βυνογλεύκος με αρχικό plato 14.**

Όμως επιβεβαιώθηκε η επίδραση του αρχικού Plato στη ζύμωση αφού παρατηρήθηκε πως το αραιωμένο **βυνογλεύκος με αρχικό plato 7** έδωσε τελικό βαθμό **3,23%vol** παρόλο που οι ζύμες ήταν ειδικές ώστε να μη καταναλώνουν την μαλτόζη. Παρατηρείται λοιπόν πως οι ζύμες παρόλη την ιδιαιτερότητά τους σ' αυτό το πείραμα έδρασαν κανονικά ενώ το αρχικό plato είναι πολύ σημαντικός παράγοντας στην τελική παραγωγή αλκοόλης.

II. Στο πείραμα του Α εργαστηριακού μέρους με την υψηλή θερμοκρασία πολτοποίησης στόχος ήταν η μελέτη της επίδρασης της υψηλής θερμοκρασίας στην απενεργοποίηση της α-β αμυλάσης. Οι 80°C, είναι το κατώτατο σημείο για να μην παραχθεί η β αμυλάση στα πρώτα 10 λεπτά όμως παραμένει η α - αμυλάση. Έτσι η θερμοκρασία έμεινε στους 90°C για 20 λεπτά με στόχο τη μείωση της δραστηριότητας και της α- αμυλάσης.

Στο πείραμα με αραιώση 7:1 το μειωμένο Plato βοήθησε στην ελάχιστη παραγωγή αλκοόλ πριν την δεύτερη ζύμωση στο μπουκάλι αφού μετρήθηκε και ήταν 0,7 % vol. Βέβαια 3 μήνες μετά μια νέα μέτρηση έδειξε πως χωρίς προσθήκη ζάχαρης το αλκοόλ είχε φτάσει 1,9 % vol ενώ με προσθήκη ζάχαρης 2,1% vol

Πράγματι διαπιστώθηκε η αστάθεια του προϊόντος χωρίς παστερίωση. Αφού τα υπολειμματικά σάκχαρα είναι 28,4 και 28,5 αντίστοιχα σχεδόν τα ίδια ενώ η ζύμωση φαίνεται να συνεχίστηκε από τις υπολειπόμενες ζύμες.

- III. Στη δεύτερη πειραματική ζυθοποίηση με θερμοκρασία $>80^{\circ}\text{C}$ το plato 14,9 παραπάνω από το διπλάσιο του προηγούμενου πειράματος πρέπει να αναφερθεί πως εκτός από την διαφοροποίηση της αραίωσης πραγματοποιήθηκε και διαφορετικό σύστημα πολτοποίησης. Στο πρώτο πείραμα με χαμηλό plato η θερμοκρασία αυξήθηκε σταδιακά έως τους 90°C με γκάζι ενώ στο δεύτερο έγινε με grainfather απευθείας στους 80°C - 90°C . Επίσης σε αυτό το πείραμα δεν έγινε δεύτερη ζύμωση με προσθήκη ζάχαρης και το CO_2 προστέθηκε τεχνητά κατά την εμφιάλωση. Το τελικό αλκοόλ που μετρήθηκε πριν την εμφιάλωση ήταν 3,0% με 87 gr/l αζύμωτα σάκχαρα όταν αναμενόταν ως τελικός βαθμός αλκοόλ η τιμή 7,3%. Συνεπώς οι ζύμες ακόμα ακόμα και σε τόσο πυκνό βυνογλεύκος ζύμωσαν δίνοντας μειωμένο αλκοόλ.
- Όμως σαν μέθοδος βλέπουμε πως με υψηλό Plato δεν λειτουργεί τουλάχιστον στο βαθμό που απαιτείται για να δώσει αλκοόλη λιγότερη από 0,5%.
- Στην ζύμωση του ίδιου βυνογλεύκους με ζύμες κανονικές το αλκοόλ έφτασε στο 5% με 54,7 αζύμωτα
- IV. Δύο μήνες μετά μετρήθηκε η αλκοόλη για να διαπιστωθεί το εάν δούλεψε η παστερίωση. Τα παστεριωμένα δείγματα παρέμειναν σε χαμηλό αλκοόλ 3% με 86,8 gr/l αζύμωτα.
- Ενώ τα μπουκάλια που δεν παστεριώθηκαν, ανέβηκαν στο 3,4% με 79 gr/l αζύμωτα.

8.2.Συμπεράσματα

Συνοψίζοντας καμία μέθοδος από μόνη της δεν είναι ικανή να παράγει μύρα με μειωμένο ή καθόλου αλκοόλ, καθώς η υψηλή θερμοκρασία με υψηλό Plato δεν αρκεί. Η υψηλή θερμοκρασία με χαμηλό Plato επειδή μένουν κάποια αζύμωτα χρειάζεται σταθεροποίηση. Και σίγουρα τα στελέχη των ζυμών και οι ειδικές ζύμες έχουν σημαντικό ρόλο στην ελαχιστοποίηση παραγωγής αλκοόλης.

Άρα ιδανικά σε ένα Plato περίπου 7 με υψηλή θερμοκρασία πολτοποίησης και χρήση ειδικών ζυμών, χωρίς δεύτερη ζύμωση αλλά τεχνητή προσθήκη CO_2 και κάνοντας παστερίωση μπορεί να δώσει ένα προϊόν με μειωμένο αλκοόλ.

Ένα πείραμα που λόγω covid19 δεν έγινε κατορθωτό να πραγματοποιηθεί και απομένει για παραπέρα μελέτη.

9. Βιβλιογραφία

1. Alonso García A., B. Cancho Grande, J. Simal Gándara Development of a rapid method based on solid-phase extraction and liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection for the determination of polyphenols in alcohol-free beers-
<file:///C:/Users/user/Documents/%CF%87%CF%81%CE%B9%CF%83%CF%84+%CE%B4%CE%B7%CE%BC%CE%B7%CF%84%CF%81%CE%B1/%CE%92%CE%99%CE%92%CE%9B%CE%99%CE%9F%CE%93%CE%A1%CE%91%CE%A6%CE%99%CE%91%20%CE%94%CE%97%CE%9C%CE%97%CE%A4%CE%A1%CE%91/1-s2.0-S0021967304012968-main.pdf>
2. Botrytis Πώς παράγεται η μπίρα χωρίς αλκοόλ; <https://www.krasiagr.com/pws-paragetai-i-mpira-xwris-alkool/>
3. Brányik Tomas, Daniel P. Silva, Martin Baszczynska, Radek Lehnerta, João B. Almeida e Silva: A review of methods of low alcohol and alcohol-free beer production
[file:///C:/Users/user/Documents/%CF%87%CF%81%CE%B9%CF%83%CF%84+%CE%B4%CE%B7%CE%BC%CE%B7%CF%84%CF%81%CE%B1/%CE%92%CE%99%CE%92%CE%9B%CE%99%CE%9F%CE%93%CE%A1%CE%91%CE%A6%CE%99%CE%91%20%CE%94%CE%97%CE%9C%CE%97%CE%A4%CE%A1%CE%91/1-s2.0-S0260877411005140-main\(1\).pdf](file:///C:/Users/user/Documents/%CF%87%CF%81%CE%B9%CF%83%CF%84+%CE%B4%CE%B7%CE%BC%CE%B7%CF%84%CF%81%CE%B1/%CE%92%CE%99%CE%92%CE%9B%CE%99%CE%9F%CE%93%CE%A1%CE%91%CE%A6%CE%99%CE%91%20%CE%94%CE%97%CE%9C%CE%97%CE%A4%CE%A1%CE%91/1-s2.0-S0260877411005140-main(1).pdf)
4. Brewup- Definition of low and non-alcoholic beer
[file:///C:/Users/user/Documents/%CF%87%CF%81%CE%B9%CF%83%CF%84+%CE%B4%CE%B7%CE%BC%CE%B7%CF%84%CF%81%CE%B1/%CE%BD%CE%BF%CE%BC%CE%BF%CE%B8%CE%B5%CF%83%CE%B9%CE%B1/National%20definitions%20on%20low%20and%20nonalcoholic%20beer%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/user/Documents/%CF%87%CF%81%CE%B9%CF%83%CF%84+%CE%B4%CE%B7%CE%BC%CE%B7%CF%84%CF%81%CE%B1/%CE%BD%CE%BF%CE%BC%CE%BF%CE%B8%CE%B5%CF%83%CE%B9%CE%B1/National%20definitions%20on%20low%20and%20nonalcoholic%20beer%20(1).pdf)
Flavor formation and cell physiology during the production of alcohol-free beer with immobilized *Saccharomyces cerevisiae*
<https://www.e-nomothesia.gr/kat-oikonomia/n-1839-1989.html>
https://www.researchgate.net/publication/286327980_Production_of_alcohol-free_beer
5. Jackowski Mateusz, Anna Trusek Non-alcoholic beer production- an overview
<file:///C:/Users/user/Documents/%CF%87%CF%81%CE%B9%CF%83%CF%84+%CE%B4%CE%B7%CE%BC%CE%B7%CF%84%CF%81%CE%B1/%CE%A0%CE%91%CE%A1%CE%93%CE%A9%CE%93%CE%97%20%CE%9C%CE%A0%CE%A5%CE%A1%CE%91%CE%A3%20%CE%A7%CE%A9%CE%A1%CE%99%CE%A3%20%CE%91%CE%9B%CE%9A%CE%9F%CE%9F%CE%9B%20%CE%A3%CE%97%CE%9C%CE%95%CE%A1%CE%91/%CE%9C%CE%A0%CE%A5%CE%A1%CE%91%20%CE%A7%CE%A9%CE%A1%CE%99%CE%A3%20%CE%91%CE%9B%CE%9A%CE%9F%CE%9F%CE%9B%20%20%CE%A0%CE%9F%CE%9B%CE%99%CE%A3%20%CE%A4%CE%96%CE%9F%CE%A5%CE%A1%CE%9D%CE%91%CE%9B.pdf>

6. Kopsaxilis Alexandros ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ «Αλκοολική ζύμωση στην παραγωγή της μπίρας -Νέες τάσεις»
7. Liana Claudia Salant,¹ Teodora Emilia Coldea^{2,*}, Maria Valentina Ignat², Carmen Rodica Pop¹, Maria Tofan¹, Elena Mudura², Andrei Bors,^{a2} Antonella Pasqualone³ and Haifeng Zhao- Review :Non-Alcoholic and Craft Beer Production and Challenges ‘2.1. Market Landscape and Consumers Preference’ <file:///C:/Users/user/AppData/Local/Temp/processes-08-01382-v2.pdf>
8. M. F. M. van Iersel,^U B. van Dieren,[†] F. M. Rombouts,^U and T. Abee^U
9. Meier-Dörnberg Tim , Hubertus Schneiderbanger, Fritz Jacob, Mathias Hutzler https://www.researchgate.net/publication/307992436_Alcohol-Free_Wheat_Beer_with_Maltose_Negative_Yeast_Strain_Saccharomyces_ludwigii
10. Miller Anistatia and Jared Brown Ποτοαπαγόρευση: Η ιστορία <https://www.diffordsguide.com/el-gr/encyclopedia/536/bws/prohibition>
11. Montanari Luigi , Ombretta Marconi, Heidi Mayer and Paolo Fantozzi Italian Brewing Research Centre (CERB), University of Perugia, Via San Costanzo, Perugia, Italy: Production of Alcohol-Free Beer
12. MULLER¹ Carlos, Luis Eduardo NEVES¹, Luciana GDMES¹, Munique GUOMARÃES¹, Grace GHESTO^{1*} Processes for alcohol-free beer production: a review * <http://orcid.org/0000-0003-1043-5748>
13. Mullet Robert . The effects of mashing temperature and mash thickness on wort carbohydrate composition 1991
14. Nevoigt Elke;, Rita Pilgera, Edeltraud Mast-Gerlacha, Ulrike Schmidta, Silke Freihammera, Martin Eschenbrennera, Leif Garbeb, Ulf Stahl- Genetic engineering of brewing yeast to reduce the content of ethanol in beer <https://academic.oup.com/femsyr/article/2/2/225/536731>
15. Perpete Philippe , Sonia Collin How to improve the enzymatic wort flavour reduction in a cold contact fermentation <https://www.semanticscholar.org/paper/How-to-improve-the-enzymatic-wort-flavour-in-a-Perp%C3%A8te-Collin/410cb2e122b4b956540bb8fb8b7a461e09884183>
16. Preedy R. Victor Beer in health and disease prevention
17. Salant,¹ Liana Claudia , Teodora Emilia Coldea^{2,*}, Maria Valentina Ignat², Carmen Rodica Pop¹, Maria Tofan¹, Elena Mudura², Andrei Bors,^{a2} Antonella Pasqualone³ and Haifeng Zhao- Review Non-Alcoholic and Craft Beer Production and Challenges- 3.2. Membrane Separation Processes
18. Senkarcinova Bara , Ines Alexandra Graça Dias, Jakub Nespór, Tomas Branyik Probiotic alcohol-free beer made with *Saccharomyces cerevisiae* var. *bouardii*- <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643818309289>
19. Tataridis Panagiotis Τεχνολογία βυνοποίησης
20. Tzamtzi Maria Φυσικοχημικές και Μικροβιολογικές Αναλύσεις σε Όλα τα Στάδια Παραγωγής Ζύθου Πτυχιακή εργασία Πάτρα 2016
21. Vegerano Ricardo *Saccharomyces ludwigii*, Control and Potential Uses in Winemaking Processes <https://www.mdpi.com/2311-5637/4/3/71/html>
22. YOUTUBE https://www.youtube.com/watch?v=87i3mE_-4-4
23. YOUTUBE <https://www.youtube.com/watch?v=qEJVK0hhA0w>
24. Σαν Σήμερα Η Ποτοαπαγόρευση <https://www.sansimera.gr/articles/198>

25. YOU TUBE <https://efps.gr/el/proionta/exatmistis-kai-krystallopoiites/typos-exatmisti/xaerotis-lepton-stroseon>
26. YOU TUBE <https://www.youtube.com/watch?v=5gVVu2-2AmY>
27. YOU TUBE <https://www.youtube.com/watch?v=ituGQnzAIKk>
28. YOU TUBE <https://www.youtube.com/watch?v=tHzkRtzVmUM>
29. <https://www.diffordsguide.com/el-gr/encyclopedia/536/bws/prohibitio>
30. <https://www.microdyn-nadir.com/beverage/#wine-&-beer-dealcoholization>
31. https://www.ebc-symposium.org/uploads/mycms-files/documents/2014/presentations/BSG/L10_G_Perretti_EBC_BSG.pdf
32. <https://www.mdpi.com/2311-5637/4/3/71/htm>
33. Φ.Ε.Κ. 90/Α/1989 Ν. 1839/1989