



Σχολή Επιστημών Τροφίμων

Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Παρασκευή χαρουπόμελου και μελέτη βιοδραστικότητας

Preperation of carob syrup and study of its bioactivity



Πηγή εικόνας: [Carob Syrup \(visitcyprus.com\)](http://CarobSyrup.visitcyprus.com)

ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ/NAME OF STUDENT

Ινώ-Ανελίζα Κώνστα

Ino-Aneliza Konsta

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR

Ανθιμία Μπατρίνου

Anthimia Batrinou

ΑΙΓΑΛΕΩ/ΑΙΓΑΛΕΟ 2023

Επιτροπή αξιολόγησης

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εξετάστηκε επιτυχώς από την κάτωθι Εξεταστική Επιτροπή:

A/α	ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ	ΒΑΘΜΙΔΑ/ΙΔΙΟΤΗΤΑ	ΨΗΦΙΑΚΗ ΥΠΟΓΡΑΦΗ
1.	Μπατρίνου Ανθμία	Επίκουρη καθηγήτρια/ Επιβλέπουσα	
2.	Κοντελής Σπυρίδων	Επίκουρος καθηγητής/ Μέλος επιτροπής	
3.	Στρατή Ειρήνη	Επίκουρη καθηγήτρια/ Μέλος επιτροπής	

Δήλωση περί λογοκλοπής/Copyright

Έχοντας πλήρη επίγνωση των συνεπειών του νόμου περί πνευματικής ιδιοκτησίας, δηλώνω ότι είμαι αποκλειστική συγγραφέας της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Δηλώνω, επίσης, ότι αναλαμβάνω όλες τις συνέπειες, όπως αυτές νομίμως ορίζονται, στην περίπτωση που διαπιστωθεί διαχρονικά ότι η εργασία μου αυτή ή τμήμα αυτής αποτελεί προϊόν λογοκλοπής.

Ινώ-Ανελίζα Κώνστα

Ευχαριστίες

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με την κα. Αικατερίνη Πυροβόλου, Τεχνολόγο Τροφίμων MSc, στα πλαίσια εκπόνησης της διδακτορικής της διατριβής με τίτλο: «Αξιοποίηση των συστατικών του χαρουπιού (*Ceratonia siliqua*) μέσω μικροβιακών ζυμώσεων», στο εργαστήριο Μικροβιολογίας τροφίμων του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής με επιβλέπουσα την επίκουρη καθηγήτρια Α. Μπατρίνου. Ένα τμήμα της εργασίας δημοσιεύθηκε σε διεθνές επιστημονικό συνέδριο (Aikaterini PYROVOLOU, Spyridon KONTELES, Irini STRATI, Panagiotis TATARIDIS, Artemis TSIOKA, Ino - Aneliza KONSTA, Vasileios SPILLOTIS & Anthimia BATRINOU (2023). Fermentation of stout beer and its upgrade to imperial stout, by carob syrup addition, improving functional characteristics of the final product. 7th International ISEKI-Food Conference - Next-Generation of Food Research).

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα και επίκουρη καθηγήτρια Α. Μπατρίνου για την καθοδήγηση και εμπιστοσύνη που μου έδειξε κατά τη διάρκεια εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας. Την Αικατερίνη Πυροβόλου, η οποία ήταν δίπλα μου σε όλη τη διάρκεια των εργαστηριακών πειραμάτων και επεξεργασία των αποτελεσμάτων, απαντώντας μου σε όλες τις ερωτήσεις και προσφέροντάς μου πολλές γνώσεις. Επίσης, θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στο τμήμα της οινολογίας για την άψογη συνεργασία μας και τη διάθεση των εργαστηριακών της χώρων και εργαστηριακού της εξοπλισμού. Κυρίως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή Π. Ταταρίδη για όλες τις γνώσεις και καθοδηγήσεις που μας προσέφερε στο κομμάτι της παρασκευής και ελέγχου της μύρας, την Άρτεμη Τσιόκα και την ομάδα ζυθοποίησης για την συνεργασία και τη βοήθειά τους. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τον καθηγητή Σ. Κοντελέ που ήταν πάντα πρόθυμος να βοηθήσει και να απαντήσει σε τυχόν απορίες μου. Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην οικογένειά μου και κυρίως στη μητέρα μου, στους φίλους και συμφοιτητές μου που ήταν δίπλα μου σε όλα τα χρόνια των σπουδών μου.

Περίληψη

Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον των επιστημόνων τροφίμων έχει στραφεί στη μελέτη των φυσικών αντιοξειδωτικών και τις πηγές προέλευσής τους, με σκοπό την αντικατάσταση των συνθετικών αντιοξειδωτικών. Μία πηγή πλούσια σε αντιοξειδωτικά και με μεγάλη ιστορία στον ελλαδικό χώρο είναι ο καρπός του χαρουπιού. Το χαρούπι έχει μια μοναδική σύσταση και έχει θρέψει πολλούς μεσογειακούς πληθυσμούς σε εποχές πολέμου, σώζοντάς τους από την πείνα. Η εκχύλιση του καρπού σε νερό και στη συνέχεια συμπύκνωση του μείγματος, οδηγεί σε ένα παχύρευστο υγρό με γλυκιά γεύση που ονομάζεται χαρουπόμελο. Η ευχάριστη γλυκιά του γεύση το καθιστά ένα υγιεινό υποκατάστατο της ζάχαρης κατάλληλο για χρήση σε πληθώρα τροφίμων. Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η δημιουργία ενός καινοτόμου αλκοολούχου ροφήματος με χαρουπόμελο και η μελέτη της βιοδραστικότητάς του. Η παρασκευή του χαρουπόμελου έγινε στο εργαστήριο με χαρούπια από τον προαύλιο χώρο του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής και το ρόφημα που παρασκευάστηκε είναι μύρα τύπου Stout (Control stout beer 6% vol.), που με προσθήκη χαρουπόμελου αναβαθμίστηκε σε Imperial stout (Imperial stout carob beer 8% και 10% vol.). Η μελέτη της βιοδραστικότητας των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα το υψηλότερο φαινολικό περιεχόμενο, με στατιστικά σημαντική διαφορά, είχε το προϊόν με τη μεγαλύτερη ποσότητα χαρουπόμελου (Imperial stout carob beer 10% vol.) σε όλα τα στάδια παρασκευής του ζύθου. Συνεπώς, η παρασκευή ζύθου Imperial stout με προσθήκη χαρουπόμελου είχε ως αποτέλεσμα ένα βιοδραστικό προϊόν με υψηλότερο φαινολικό περιεχόμενο από την control stout μύρα (6% vol.), το οποίο πληρούσε τις προδιαγραφές μιας μύρας Imperial stout.

Λέξεις κλειδιά: *Ceratonia siliqua*, χαρουπόμελο, πολυφαινόλες, ζύμωση, Imperial stout

Abstract

In recent years, the interest of food scientists has turned to the study of natural antioxidants and their sources of origin, with the aim of replacing synthetic antioxidants. A source rich in antioxidants and with a long history in Greece is the carob fruit. Carob has a unique nutritional composition and has nourished many Mediterranean populations in times of war, saving them from starvation. Extracting the fruit into water and then concentrating the mixture results in a thick, sweet-tasting liquid called carob syrup. Its pleasant, sweet taste makes it a healthy substitute for sugar suitable for use in a multitude of foods. The purpose of this thesis is the creation of an innovative alcoholic beverage with carob syrup and the study of its bioactivity. The preparation of the carob syrup was done in the laboratory with carob fruit from the courtyard of the University of Western Attica and the beverage that was prepared is a Stout type beer (Control stout beer 6% vol.), which with the addition of carob syrup was upgraded to an Imperial stout (Imperial stout carob beer 8 % and 10% vol.). The study of the bioactivity of the samples was carried out by the Folin-ciocalteu method. According to the results, the product with the largest amount of carob syrup (Imperial stout carob beer 10% vol.) had the highest phenolic content, with a statistically significant difference, in all stages of beer preparation. Therefore, brewing Imperial stout with added carob syrup resulted in a bioactive product with a higher phenolic content than the control stout beer (6% vol.), which met the specifications of an Imperial stout beer.

Key words: *Ceratonia siliqua*, carob syrup, polyphenols, fermentation, Imperial stout

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	4
Περίληψη.....	5
Abstract	6
Κατάλογος Πινάκων	8
Κατάλογος Σχημάτων/Εικόνων	9
Κατάλογος διαγραμμάτων.....	11
Εισαγωγή	11
Κεφάλαιο 1	14
1.1 Ιστορικά στοιχεία	14
1.2 Η χαρουπιά.....	14
1.2.1 Ταξινόμηση	15
1.2.2 Μορφολογικά χαρακτηριστικά	15
1.2.3 Εδάφη και κλίμα καλλιέργειας	16
1.2.4 Παραγωγή χαρουπιάς στην Ευρώπη	16
1.3 Σύσταση.....	17
1.3.1 Υδατάνθρακες.....	17
1.3.2 Πρωτεΐνες	18
1.3.3 Βιταμίνες.....	19
1.3.4 Ανόργανα άλατα.....	19
1.4 Οφέλη στην υγεία	19
1.4.1 Αντιδιαβητική δράση.....	19
1.4.2 Αντιοξειδωτική δράση	20
1.4.3 Μείωση χοληστερόλης.....	21
1.4.4 Αντικαρκινική δράση	22
1.4.5 Ενίσχυση μεταβολισμού.....	22
1.5 Προϊόντα λοβού χαρουπιού και εφαρμογές σε τρόφιμα	22
1.5.1 Λοβός χαρουπιού σε σκόνη (χαρουπάλευρο).....	22
1.5.2 Χαρουπόμελο	23
1.5.3 Ροφήματα χαρουπιού.....	25
Κεφάλαιο 2	28
2.1 Αντιοξειδωτικά σε φυτικούς ιστούς.....	28
2.2 Βιοδραστικές ενώσεις χαρουπιού.....	29
2.2.1 Πολυφαινόλες.....	29
2.2.2 Ινοσιτόλες, D-πινιτόλη	30
2.3 Μέθοδοι ποσοτικοποίησης φαινολικών ενώσεων	32
2.3.1 Αέρια χρωματογραφία (GC)	32
2.3.2 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)	32
2.3.3 Φασματοφωτομετρία ορατού-υπεριώδους - Μέθοδος Folin-Ciocalteu.....	34
2.4 Μέθοδοι προσδιορισμού αντιοξειδωτικής δράσης.....	34

2.4.1	FRAP	35
2.4.2	DPPH	35
2.4.3	ABTS	36
2.5	Ζύμωση.....	37
2.5.1	Αλκοολική ζύμωση.....	37
2.5.2	Αλκοολική ζύμωση με χρήση του <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	37
2.6	Ζύθος.....	41
2.6.1	Ζυθοποίηση	41
Κεφάλαιο 3		43
Πειραματικό μέρος.....		43
3.1	Σκοπός	43
3.2	Μέθοδοι και υλικά	43
3.2.1	Παρασκευή χαρουπόμελου	43
3.2.2	Μέτρηση pH και ποσοστού διαλυτών στερεών συστατικών χαρουπόμελου.....	45
3.2.3	Μέτρηση ποσοστού σακχάρων χαρουπόμελου με τη μέθοδο Fehling	45
3.2.4	Παρασκευή μύρας «Stout»	46
3.2.5	Μετρήσεις δειγμάτων μύρας	50
3.2.6	Μέτρηση ολικού φαινολικού περιεχομένου δειγμάτων χαρουπόμελου και μύρας.....	52
Κεφάλαιο 4		54
4.1	Αποτελέσματα και συζήτηση	54
4.1.1	Αποτελέσματα μετρήσεων pH και ποσοστού διαλυτών στερεών συστατικών δειγμάτων χαρουπόμελου.....	54
4.1.2	Αποτελέσματα μετρήσεων ποσοστού σακχάρων χαρουπόμελου με τη μέθοδο Fehling	54
4.1.3	Ολικό φαινολικό περιεχόμενο δειγμάτων χαρουπόμελου.....	55
4.1.4	Αποτελέσματα μετρήσεων δειγμάτων μύρας.....	56
4.1.5	Ολικό φαινολικό περιεχόμενο δειγμάτων μύρας.....	60
Κεφάλαιο 5		62
5.1	Συμπεράσματα και υποδείξεις για περαιτέρω έρευνα.....	62
Βιβλιογραφία.....		63

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1: Μέσος όρος παραγωγής σε τόνους και συνολική παραγωγή σε τόνους, σε 9 από τις βασικότερες χώρες παραγωγής χαρουπιού κατά το διάστημα 2013-2019 (FAOSTAT, 2021), *δεν υπάρχουν δεδομένα για το 2019 Πηγή: (Tzatzani & Ouzounidou, 2023)	16
Πίνακας 2: Χημική σύσταση χαρουπιού. Πηγές: (Azab, 2022; Nasar-Abbas et al., 2016)	17

Πίνακας 3: Κύρια χαρακτηριστικά ροφημάτων με βάση το χαρούπι, τα οποία είναι είτε παραδοσιακά ροφήματα είτε έχουν παρασκευαστεί και επεξεργαστεί σε εργαστήρια για πειραματικές αναλύσεις. Πηγή: (Vitali et al., 2023)	26
Πίνακας 4: Συγκεντρικός πίνακας προϊόντων με χαρούπι (που αναλύθηκαν παραπάνω) και η θετική επίδραση που προσφέρει το χαρούπι στη σύσταση και δομή τους.....	27
Πίνακας 5: Οφέλη στην υγεία των βιοδραστικών συστατικών που περιλαμβάνονται στα διάφορα μέρη του χαρουπιού. Πηγή: (Ikram et al., 2023)	31
Πίνακας 6: Πρώτες ύλες και ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή μύρας Imperial Stout.....	46
Πίνακας 7: Απαρίθμηση δειγμάτων προς μελέτη.....	49
Πίνακας 8: Μετρήσεις παρασκευασθέντων χαρουπόμελων και εμπορίου.....	54
Πίνακας 9: Μετρήσεις pH στα δείγματα μύρας αρχικά (t=0d), μετά την 1 ^η και 2 ^η ζύμωση.....	57
Πίνακας 10: Μετρήσεις °plato και ειδικού βάρους (SG) στα δείγματα μύρας αρχικά (t=0d), μετά την 1 ^η και 2 ^η ζύμωση με χρήση του ψηφιακού πυκνόμετρου χειρός Anton paar (Handheld density meter, DMA 35 Basic).....	57
Πίνακας 11: Μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν με το όργανο Anton Paar Alex 500 (Alcohol and extract meter), μετά την 1 ^η ζύμωση.....	57
Πίνακας 12: Μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν με το όργανο Anton Paar Alex 500 (Alcohol and extract meter), μετά την 2 ^η ζύμωση.....	58
Πίνακας 13: Απορροφήσεις δειγμάτων μύρας με χρήση του Φασματοφωτομέτρου UV mini 1240 (UV/Vis spectrophotometer) στα 430nm και 700nm, αρχικά (t=0d), μετά την 1 ^η και 2 ^η ζύμωση...	59
Πίνακας 14: Μετρήσεις χρώματος με τη μέθοδο EBC και SRM, αρχικά (t=0d), μετά της 1 ^η και μετά τη 2 ^η ζύμωση.....	59
Πίνακας 15: Συγκεντρικός πίνακας μετρήσεων δειγμάτων μύρας πριν τη ζύμωση (t=0d).....	59
Πίνακας 16: Συγκεντρικός πίνακας μετρήσεων δειγμάτων μύρας μετά την 1 ^η ζύμωση.....	60
Πίνακας 17: Συγκεντρικός πίνακας μετρήσεων δειγμάτων μύρας μετά την 2 ^η ζύμωση.....	60

Κατάλογος Σχημάτων/Εικόνων

Εικόνα 1: Α) Μέρη λοβού του χαρουπιού, Β) τμήμα λοβού, Γ) τμήμα σπόρου. Πηγή: (Battle et al., 1997)	15
Εικόνα 2: α) η χαρουπιά (<i>Ceratonia siliqua</i>), β) τα φύλλα, γ) τα άνθη, δ) ο καρπός και στο εσωτερικό του οι σπόροι. Πηγές: (“ <i>Ceratonia Siliqua</i> (Algaroba, Beans, Carob, Carob Tree Kharoub, Locust Pods, Saint John’s Bread, Sugar Pod) North Carolina Extension Gardener Plant Toolbox,” n.d.; “Χαρουπιά (Ξυλοκερατιά),” n.d.; Lopes, 2021; Volder, 2011).....	16

Εικόνα 3: Κύριες πολυφαινόλες που ανιχνεύονται στο χαρούπι. Πηγές: (Clodoveo et al., 2022; Ikram et al., 2023; Owen et al., 2003; Stavrou, Christou, & Kapnissi-Christodoulou, 2018).....	30
Εικόνα 4: Οι ινοσιτόλες και μεθυλαιθέρες που απομονώθηκαν από τον καρπό του χαρουπιού. Πηγή: (Azab, 2022)	31
Εικόνα 5: Αντίδραση του γαλλικού οξέος με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu. Πηγή: (Christodoulou et al., 2022)	34
Εικόνα 6: Αναγωγικός μηχανισμός FRAP παρουσία αντιοξειδωτικής ουσίας. Πηγή: (Christodoulou et al., 2022)	35
Εικόνα 7: Θεωρητικός μηχανισμός μεθόδου DPPH με παρουσία αντιοξειδωτικού. Πηγή: (Christodoulou et al., 2022).....	36
Εικόνα 8: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , 3D απεικόνιση. Πηγή: (“ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Yeast,” 2023)	40
Εικόνα 9: Αλκοολική ζύμωση, αλληλουχία ενζυμικών αντιδράσεων του <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Πηγή: (Faria-Oliveira, Puga, & Ferreira, 2013).....	41
Εικόνα 10: Διαδικασία παρασκευής χαρουπόμελου.	44
Εικόνα 11: Πεχάμετρο, Hanna instruments HI 8010 (αριστερά) και ψηφιακό διαθλασίμετρο, XS instruments LDR-500 (DRB 95) (δεξιά), , που έγιναν οι μετρήσεις.....	45
Εικόνα 12: (Αριστερά) διάλυμα Fehling A και B με κυανό του μεθυλενίου. (Κέντρο) το διάλυμα Fehling στη θερμαντική πλάκα και η προχοΐδα με το διάλυμα B. (Δεξιά) Τέλος ογκομέτρησης, έχει εξαφανιστεί ο μπλε χρωματισμός.	46
Εικόνα 13: Το βυνογλεύκος μετά την προσθήκη μαγιάς και χαρουπόμελου σε μπουκάλια με αεροπαγίδα (αριστερά) και τα μπουκάλια μπύρας μετά την εμφιάλωση (δεξιά).....	49
Εικόνα 14: (Αριστερά) Φυγόκεντρος (certifunge, mrc Scientific instruments). (Δεξιά) Πάνω είναι τα δείγματα μπύρας μόλις προστέθηκαν $ZnSO_4$ και $Ba(OH)_2$ και ξεκινά η καθίζηση πρωτεϊνών, ενώ κάτω είναι μετά την ανάμειξη και φυγοκέντρωση.....	50
Εικόνα 15: (Αριστερά) Πεχάμετρο (Hanna instruments HI 8010). (Δεξιά) Ψηφιακό πυκνόμετρο χειρός Anton paar (Handheld density meter, DMA 35 Basic).	51
Εικόνα 16: (Αριστερά) Anton Paar Alex 500 (Alcohol and extract meter), από των σωλήνα δεξιά του μηχανήματος συλλέγεται το δείγμα και από τον σωλήνα αριστερά απορρίπτεται στα απόβλητα. (Δεξιά) ο ειδικός σωλήνας σχήματος U που περνάει το δείγμα και γίνεται η μέτρηση, βρίσκεται στο επάνω μέρος του μηχανήματος.....	51
Εικόνα 17: Φασματοφωτόμετρο UV mini 1240 (UV/Vis spectrophotometer).	52
Εικόνα 18: Πορεία διεργασίας Folin-Ciocalteu. Αντιδραστήρια, πιπέτα, κυψελίδες και στατό. Στη δεξιά εικόνα φαίνεται η αλλαγή χρώματος από κίτρινο σε κυανό.....	53

Εικόνα 19: : Τιμές χρώματος μύρας με βάση τη μέθοδο SRM και EBC. Πηγή: (“Standard Reference Method,” 2021).....	58
---	----

Κατάλογος διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1: Σύγκριση του φαινολικού περιεχομένου εκχυλισμάτων χαρουπιού ανάλογα με τη μέθοδο εκχύλισης που ακολουθήθηκε. Τα σύμβολα W, M, AW, AA απεικονίζουν αντίστοιχα τη χρήση νερού, μεθανόλης, ακετόνης-νερού και οξικής ακετόνης, ως μέσα εκχύλισης. Πηγή: (Goulas & Georgiou, 2020).....	30
Διάγραμμα 2: Δυναμική ζύμωσης. Μεταβολή εκχυλίσματος, αιθανόλης και συγκέντρωσης βιομάζας (A). Μεταβολή σε καρβονυλικές ενώσεις, pH και χρώμα μύρας (B). Πηγή: (Shopska et al., 2014).....	42
Διάγραμμα 3: Μέσος όρος ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) παραγόμενων χαρουπόμελων και εμπορίου.....	55
Διάγραμμα 4: Μέση τιμή ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) δειγμάτων μύρας αρχικά (t=0d) και μετά την 1 ^η και 2 ^η ζύμωση.....	61
Διάγραμμα 5: Μεταβολή ολικού φαινολικού περιεχομένου δειγμάτων μύρας μεταξύ 0-60 μέρες.....	61

Εισαγωγή

Το χαρούπι συναντάται στη διατροφή των ανθρώπων από την αρχαιότητα. Η αξία του καρπού οφείλεται στην ιδιαίτερη θρεπτική του σύσταση με υψηλή περιεκτικότητα σε φυσικά σάκχαρα, φυτικές ίνες, πρωτεΐνες, πολυφαινόλες, βιταμίνες και μέταλλα. Τα τελευταία χρόνια έχουν πραγματοποιηθεί πολλές έρευνες για τη μελέτη του καρπού του χαρουπιού και τα οφέλη που προσφέρει στην υγεία του ανθρώπου, όπως μείωση χοληστερόλης, αντιδιαβητική δράση, αντιοξειδωτική δράση, αντικαρκινική δράση και ενίσχυση του μεταβολισμού. Οι περισσότερες από τις μελέτες επιβεβαιώνουν την ευεργετική του δράση, η οποία οφείλεται, κυρίως, στις βιοδραστικές ενώσεις που περιλαμβάνει (πχ. πολυφαινόλες).

Η χαρουπιιά (*Ceratonia siliqua*) αποτελεί ένα μακρόβιο, θερμόφιλο, αειθαλές δέντρο, ο καρπός της οποίας είναι ένας καμπυλός λοβός (χαρούπι). Το κέντρο παραγωγής του χαρουπιού είναι η λεκάνη της μεσογείου, συμπεριλαμβανομένης και της Ελλάδας με ετήσια παραγωγή 11.468 τόνους. Ωστόσο, τα προϊόντα του χαρουπιού έχουν διαδοθεί πλέον σε ολόκληρη την Ευρώπη και σύντομα θα είναι γνωστά σε όλο τον κόσμο, λόγω της ευεργετικής τους δράσης στην υγεία του ανθρώπου.

Ο καρπός του χαρουπιού μπορεί να επεξεργαστεί με διάφορους τρόπους και να χρησιμοποιηθεί από τη βιομηχανία τροφίμων και φαρμάκων. Μπορεί να αλεστεί και να δημιουργήσει μια λεπτή σκόνη (χαρουπάλευρο) ή να εκχυλιστεί σε νερό και να συμπυκνωθεί σε ένα παχύρευστο υγρό με γλυκιά γεύση (χαρουπόμελο). Τα προϊόντα αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρόσθετα ή υποκατάστατα σε διάφορα τρόφιμα, με σκοπό να παρασκευαστεί ένας μεγάλος αριθμός νέων καινοτόμων και λειτουργικών τροφίμων. Για παράδειγμα η φυσική γλυκιά γεύση του χαρουπόμελου, το καθιστά κατάλληλο ως ένα θρεπτικό υποκατάστατο της ζάχαρης σε μεγάλη γκάμα τροφίμων όπως ροφήματα, γλυκά αρτοσκευάσματα και επιδόρπια. Ενώ, η ιδιαίτερα θρεπτική του σύνθεση με υψηλή περιεκτικότητα σε απλά σάκχαρα το καθιστά κατάλληλο ως μέσο καλλιέργειας μικροοργανισμών για δημιουργία προϊόντων ζύμωσης ή παραγωγή επιθυμητών μεταβολιτών για βιομηχανική χρήση. Επίσης, όσον αφορά το χαρουπάλευρο φαίνεται να αντικαθιστά με επιτυχία το αλεύρι σίτου σε ποικίλα αρτοσκευάσματα αναβαθμίζοντας τα προϊόντα σε λειτουργικά και καθιστώντας τα κατάλληλα για άτομα με δυσανεξία στη γλουτένη.

Τα τελευταία χρόνια έχει αναπτυχθεί ένα ιδιαίτερο ενδιαφέρον από τους επιστήμονες του κλάδου των τροφίμων για τα φυσικά αντιοξειδωτικά. Στόχος τους είναι η αντικατάσταση των συνθετικών αντιοξειδωτικών, τα οποία προστίθενται ως συντηρητικά στα τρόφιμα και κατηγορούνται ότι είναι επιβλαβή για την υγεία, με τα φυσικά αντιοξειδωτικά. Τα φυσικά αντιοξειδωτικά αποτελούνται κυρίως από πολυφαινόλες και συναντώνται σε μεγάλο αριθμό φυτικών εκχυλισμάτων (όπως το χαρούπι). Για την ποσοτικοποίηση των φαινολικών ενώσεων υπάρχει ένας αρκετά

μεγάλος αριθμός μεθόδων που ακολουθούνται με αρκετά αξιόπιστα αποτελέσματα, ωστόσο οι διαδικασίες και τα στάδια που απαιτούν είναι αρκετά χρονοβόρες και το κόστος του απαραίτητου εξοπλισμού παραμένει υψηλό.

Η ζύμωση αποτελεί μια χρησιμοποιούμενη μέθοδος συντήρησης από την αρχαιότητα. Με τη ζύμωση εκτός από συντήρηση επιτυγχάνεται και βελτίωση των θρεπτικών και οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του τροφίμου. Μία από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες ζυμώσεις στα τρόφιμα με μεγάλη οικονομική αξία, αποτελεί η αλκοολική ζύμωση. Η αλκοολική ζύμωση πραγματοποιείται με χρήση κυρίως στελεχών του είδους *Saccharomyces cerevisiae* και τα πιο γνωστά προϊόντα που παράγονται είναι το ψωμί, το κρασί και η μπύρα.

Ο ζύθος ή μπύρα αποτελεί ένα δροσιστικό αλκοολούχο ποτό γνωστό από την αρχαιότητα, το οποίο παράγεται με τη διαδικασία της βυνοποίησης και ζυθοποίησης. Πολλοί ζυθοποιοί αναφέρουν ότι όσο και αν προσπαθείς να ακολουθήσεις ακριβώς την ίδια συνταγή το τελικό προϊόν μπορεί να είναι διαφορετικό, κάτι που αληθεύει μιας και η ζυθοποίηση αποτελεί μια μικροβιακή ζύμωση. Υπάρχουν πολλά είδη μπύρας, με διαφορετικό χρώμα, άρωμα και γεύση, τα οποία εξαρτώνται από τις πρώτες ύλες που χρησιμοποιήθηκαν και τη διαδικασία παραγωγής που ακολουθήθηκε. Η Stout είναι μια σκουρόχρωμη μπύρα με γεύση καβουρδισμένης βύνης, η οποία ανήκει στην κατηγορία ales. Με προσθήκη υποστρωμάτων με υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα αυξάνεται η περιεκτικότητα σε αλκοόλη της standard stout και δημιουργείται η Imperial stout. Η Imperial stout είναι, επίσης, μια σκουρόχρωμη έως μαύρη μπύρα με πλούσιο άρωμα και έντονη πικράδα λυκίσκου.

Κεφάλαιο 1

1.1 Ιστορικά στοιχεία

Το χαρούπι συναντάται στη διατροφή των ανθρώπων και των ζώων από την αρχαιότητα. Ως κέντρο προέλευσης της χαρουπιιάς ορίζεται η περιοχή της Ανατολικής Μεσογείου και η Νότια Αραβία. Η αξία του καρπού αναγνωρίστηκε από τους αρχαίους Έλληνες, που τον έφεραν από τη Μέση Ανατολή στην Ελλάδα και την Ιταλία, και τους Άραβες, οι οποίοι τον διέδωσαν κατά μήκος της βορειο-αφρικανικής ακτής και βόρεια στην Ισπανία και την Πορτογαλία (Vekiari, Ouzounidou, Ozturk, & Görk, 2011).

Τα πρώτα δείγματα χαρουπιού που εντοπίστηκαν σε αρχαιολογικές ανασκαφές βρέθηκαν στο Ισραήλ και χρονολογούνται το 8000-6000 π.Χ. Αρκετά, επίσης, υπολείμματα χαρουπιού βρέθηκαν σε Αιγυπτιακούς τάφους, μερικοί από τους οποίους χρονολογούνται τον 20^ο-18^ο αιώνα π.Χ. Καρποί χαρουπιού έχουν βρεθεί στο Σπήλαιο της Πισίνας, στην Ιουδαϊκή Έρημο, στο Ισραήλ, σε κοιτάσματα της ρωμαϊκής περιόδου (3^{ος} αιώνας) και στην Αυρώνα (Πρώιμη Αραβική περίοδος, 7^{ος} αιώνας) (RAMÓN-LACA & MABBERLEY, 2004).

Σύμφωνα με αρχαία ελληνικά κείμενα, στην Αρχαία Ελλάδα ο καρπός ονομαζόταν «κεράτια», λόγω του σχήματός του καρπού, το οποίο μοιάζει με κέρατο ζώου. Ενώ, στη Βαβυλώνα περίπου το 310 π.Χ., ο Θεόφραστος αναφέρει ένα δέντρο που ονομαζόταν από τους Έλληνες «κερωνία» και ο καρπός του «αιγυπτιακό σύκο» (RAMÓN-LACA & MABBERLEY, 2004).

Το χαρούπι αποτέλεσε βασικό στοιχείο της διατροφής των ανθρώπων σε περιόδους πείνας, λόγω της αφθονίας του στις μεσογειακές χώρες, την ευκολία συντήρησης και τα θρεπτικά συστατικά του. Κατά τον Ισπανικό εμφύλιο (1936-1939) και κατά τον Β΄ Παγκόσμιο Πόλεμο (1939-1945), στην Ελλάδα και κυρίως στην Κρήτη, σώθηκαν πολλοί άνθρωποι από την ασιτία (Tzatzani & Ouzounidou, 2023).

1.2 Η χαρουπιιά

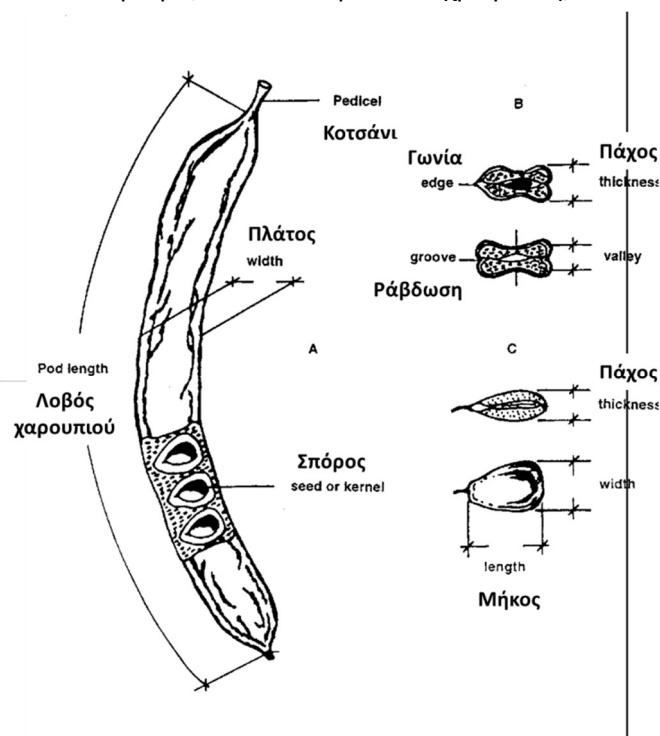
Η χαρουπιιά αποτελεί σημαντικό στοιχείο της μεσογειακής βλάστησης και η καλλιέργειά της σε περιθωριακά και κυρίως ασβεστούχα εδάφη της περιοχής της Μεσογείου είναι σημαντική περιβαλλοντικά και οικονομικά. Ο καρπός του χαρουπιού και τα προϊόντα του έχουν διαδοθεί, πλέον, σε όλη την Ευρώπη και σύντομα θα είναι γνωστά σε όλο τον κόσμο, λόγω των ευεργετικών τους στοιχείων. Οι χαμηλές απαιτήσεις σε αρδευτικές ανάγκες, καθιστούν τη χαρουπιιά κατάλληλη για μερική καλλιέργεια και δυνατότητες φύτευσης σε ημίξηρες μεσογειακές ή υποτροπικές περιοχές. Τα δέντρα είναι, επίσης, χρήσιμα ως καλλωπιστικά σε αστικές περιοχές, προστασία καλλιεργειών από τον άνεμο και πυροπροστασία (Battle, Tous, & Research, 1997).

1.2.1 Ταξινόμηση

Το γένος *Ceratonia* ανήκει στην οικογένεια *Leguminosae* (Χεδρωπά) ή *Fabaceae* (Κυαμοειδή) και στην τάξη Κυαμώδη (*Fabales*). Αρχικά, υποστηριζόταν ότι το γένος *Ceratonia* περιλάμβανε μόνο ένα είδος το *Ceratonia siliqua*, όμως το 1980 οι Hillcoat, Lewis and Verdc. περιέγραψαν ένα δεύτερο είδος το *Ceratonia oreothauma*, το οποίο διακρίνεται σε δύο υποείδη: *Ceratonia oreothauma subsp. Oreothauma*, εγγενές στην Αραβία και *Ceratonia oreothauma subsp. somalensis* που είναι ιθαγενές στα βόρεια της Σομαλίας. Μορφολογικά τα δύο αυτά είδη έχουν διαφορετικό μέγεθος γυρεόκοκκων, το *oreothauma* έχει ελαφρώς μικρότερους γυραιόκοκκους και είναι tricolorate παρά tetracolorate . Καθώς οι tetracolorate γυρεόκοκκοι είναι περισσότερο εξελιγμένοι από τους tricolorate κόκκους, ο *C. oreothauma* προτάθηκε ως ο άγριος πρόγονος του *C. siliqua* από τους Hillcoat et al. (1980) (Battle et al., 1997).

1.2.2 Μορφολογικά χαρακτηριστικά

Η χαρουπιά αποτελεί ένα μακρόβιο, αειθαλές δέντρο, ύψους μέχρι 10 μ. Επίσης, συνήθως είναι διοικό είδος, δηλαδή κάθε δέντρο φέρει άνθη του ίδιου γένους (αρσενικά ή θυληκά), με μερικές ερμαφρόδιτες μορφές (votaniki, 2018). Τα φύλλα της έχουν κατ' εναλλαγή πτεροειδώς σύνθετη διάταξη, με ελλειψοειδές έως και αντίστροφα ωσειδές σχήμα και χρώμα βαθύ πράσινο γυαλιστερό στο επάνω μέρος και πιο ανοιχτό πράσινο στο κάτω. Είναι σκληρόφυλλα και έχουν παχιά μονοστρωματική άνω επιδερμίδα, τα κύτταρα της οποίας περιέχουν φαινολικές ενώσεις στα μεγάλα κενοτόπια. Τα άνθη της είναι μικρά και πολυάριθμα, κόκκινου-πράσινου χρώματος, σπειρωειδώς διατεταγμένα κατά μήκος του άξονα ταξιανθίας, αναπτύσσονται επικορμικά, δεν περιλαμβάνουν πέταλα και έχουν μια ιδιαίτερα έντονη οσμή. Ο καρπός της είναι ένας επιμήκης, συμπιεσμένος, ευθύς ή καμπυλός λοβός (χαρούπι), μήκους 10-30cm και χρώματος σκούρο καφέ με δερματώδη, σκληρή επιφάνεια (περικάρπιο) και σαρκώδης εσωτερική περιοχή (μεσοκάρπιο). Οι σπόροι (σπέρματα) περιλαμβάνονται στο εσωτερικό του καρπού, χωρισμένοι από το μεσοκάρπιο, είναι πολύ σκληροί και έχουν σχήμα ωσειδές (Battle et al., 1997; votaniki, 2018).



Εικόνα 1: Α) Μέρη λοβού του χαρουπιού, Β) τμήμα λοβού, Γ) τμήμα σπόρου. Πηγή: (Battle et al., 1997)



α)



β)



γ)



δ)

Εικόνα 2: α) η χαρουπιιά (*Ceratonía siliqua*), β) τα φύλλα, γ) τα άνθη, δ) ο καρπός και στο εσωτερικό του οι σπόροι. Πηγές: ("Ceratonía Siliqua (Algaroba, Beans, Carob, Carob Tree Kharoub, Locust Pods, Saint John's Bread, Sugar Pod) | North Carolina Extension Gardener Plant Toolbox," n.d.; "Χαρουπιιά (Ξυλοκερατιά)," n.d.; Lopes, 2021; Volde, 2011)

1.2.3 Εδάφη και κλίμα καλλιέργειας

Η χαρουπιιά είναι θερμοφίλο είδος, δηλαδή έχει υψηλή ανθεκτικότητα στην ξηρασία και τις υψηλές θερμοκρασίες, αλλά ευαίσθησια στο ψύχος. Επομένως, ευδοκμεί σε περιοχές με θερμό και ξηρό υποτροπικό μεσογειακό κλίμα. Μπορεί να προσαρμοστεί σε διάφορα είδη εδάφους, από φτωχά αμμώδη και βραχώδη έως βαθιά εδάφη. Το καταλληλότερο, όμως, είναι το αλκαλικό, αμμώδες και καλά στραγγισμένο έδαφος (Battle et al., 1997).

1.2.4 Παραγωγή χαρουπιιάς στην Ευρώπη

Η λεκάνη της Μεσογείου αποτελεί το βασικότερο κέντρο παραγωγής χαρουπιού, με ετήσια παραγωγή άνω των 135.000 τόνων, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Τροφίμων (FAO) για το 2019. Οι χώρες με τη μεγαλύτερη παραγωγή χαρουπιού είναι η Πορτογαλία, η Ιταλία, η Ισπανία, το Μαρόκο, η Τουρκία και η Ελλάδα (βλ. Πίνακας 1) (Tzatzani & Ouzounidou, 2023).

Πίνακας 1: Μέσος όρος παραγωγής σε τόνους και συνολική παραγωγή σε τόνους, σε 9 από τις βασικότερες χώρες παραγωγής χαρουπιού κατά το διάστημα 2013-2019 (FAOSTAT, 2021), *δεν υπάρχουν δεδομένα για το 2019 Πηγή: (Tzatzani & Ouzounidou, 2023)

Χώρα παραγωγής	Μέσος όρος (σε τόνους)	Συνολικά (σε τόνους)
Ισπανία*	44.283	265.700
Πορτογαλία*	44.214	265.284
Ιταλία	29.025	203.175
Μαρόκο	21.790	152.707
Τουρκία	14.469	101.280
Ελλάδα*	12.912	129.116
Κύπρος	7.769	54.380
Λίβανος	3.589	25.124
Αλγερία	3.577	25.037

Με βάση τα στοιχεία που συλλέχθηκαν από το Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, το έτος 2021 σε ολόκληρη την Ελλάδα καλλιεργήθηκε συνολική έκταση 27.073 στρεμμάτων χαρουπιάς με συνολική απόδοση παραγωγής 11.468 τόνους καρπού. Οι κύριες περιοχές καλλιέργειας της χαρουπιάς αποτελούν η Κρήτη (7.646 τόνοι) και η Πελοπόννησος (2.566 τόνοι) (“Στατιστικά Στοιχεία Εκτάσεων Και Παραγωγής Φυτικών Προϊόντων,” n.d.).

1.3 Σύσταση

Η χημική σύνθεση του χαρουπιού δίνεται στον Πίνακα 2, ωστόσο μπορεί να διαφοροποιηθεί ανάλογα με γενετικούς, περιβαλλοντικούς και κλιματικούς παράγοντες, αλλά και τον χρόνο συγκομιδής του χαρουπιού. Ο τύπος του φυτού (αρσενικό, θηλυκό ή ερμαφρόδιτο) και η ποικιλία του επηρεάζουν σημαντικά τη χημική σύνθεση (ιδιαίτερα το φαινολικό προφίλ) και τις βιολογικές δραστηριότητες του καρπού. Το χαρούπι έχει υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα και αξιόλογες ποσότητες φυτικών ινών (έως 40%), πρωτεϊνών (2-7%), πολυφαινόλων (1,5-2%) , βιταμινών (B₂, B₆, B₉) και μετάλλων όπως κάλιο, ασβέστιο, φώσφορο και μαγνήσιο, ενώ έχει πολύ μικρή ποσότητα σε λιπαρά (0,9%-1,3%) (Nasar-Abbas et al., 2016).

Πίνακας 2: Χημική σύσταση χαρουπιού. Πηγές: (Azab, 2022; Nasar-Abbas et al., 2016)

Συστατικό	Ποσότητα (%)
Ολικά σάκχαρα	45-52
Σακχαρόζη	35-45
Φρουκτόζη	6-7
Γλυκόζη	2-4
Συνολικές διαιτητικές ίνες	11,7-47
Πρωτεΐνες	2-7
Λιπίδια	0,5-1
Τέφρα	2-3
Συνολικές πολυφαινόλες	1,4-2,0
D-Πινιτόλη	5,5

1.3.1 Υδατάνθρακες

Στον οργανισμό οι υδατάνθρακες χρησιμοποιούνται ως άμεση πηγή διαθέσιμης ενέργειας (Brown, 2016). Οι υδατάνθρακες κατηγοριοποιούνται σε απλά σάκχαρα (μονοσακχαρίτες, ολιγοσακχαρίτες) και σύνθετους υδατάνθρακες (πολυσακχαρίτες). Στους φυτικούς ιστούς βασικοί μονοσακχαρίτες είναι οι γλυκόζη και φρουκτόζη, δισακχαρίτες οι σακχαρόζη και μαλτόζη και πολυσακχαρίτες το άμυλο, η κυτταρίνη, οι φυτικές ίνες και η πηκτίνη. Τα απλά σάκχαρα δίνουν άμεσα ποσότητα ενέργειας στον οργανισμό και ενεργούν στο τρόφιμο κυρίως ως γλυκαντικά, αυξάνουν το ιξώδες, ενισχύουν τη γεύση, αναστέλλουν την πήξη των πρωτεϊνών και βοηθούν στη συντήρηση των τροφίμων (Rodríguez-Solana, Romano, & Moreno-Rojas, 2021). Από την άλλη, οι φυτικές ίνες, επιβραδύνουν τον ρυθμό απορρόφησης της γλυκόζης στον οργανισμό και παρέχουν όγκο στη

φυσιολογική διαδικασία της αφόδευσης και ενδέχεται να συμβάλλουν στην πρόληψη της καρδιαγγειακής νόσου και της παχυσαρκίας (Brown, 2016).

Απλά σάκχαρα: Το χαρούπι έχει υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα, 45% έως 52%, με κύρια σάκχαρα τη σακχαρόζη (65%-75% των ολικών σακχάρων), τη φρουκτόζη και τη γλυκόζη (15%-25% των ολικών σακχάρων). Η υψηλή περιεκτικότητα του χαρουπιού σε σάκχαρα το καθιστά κατάλληλο μέσο για ζυμώσεις με χρήση ποικίλων μικροοργανισμών (π.χ. *Aspergillus niger*, *Lactobacillus casei*, *Saccharomyces cerevisiae*), για παραγωγή νέων προϊόντων (Nasar-Abbas et al., 2016).

Φυτικές ίνες: Οι φυτικές ίνες που περιλαμβάνονται στο χαρούπι έχουν ιδιαίτερη σύνθεση, λόγω της παρουσίας υψηλών ποσοτήτων πολυφαινόλων και κυρίως ταννινών. Περίπου το 50% του βάρους των φυτικών ινών του χαρουπιού αντιστοιχεί σε πολυφαινόλες. Οι ίνες του χαρουπιού είναι κυρίως αδιάλυτες, όπως η λιγνίνη, η κυτταρίνη και η ημικυτταρίνη, όμως περιλαμβάνει και μικρή ποσότητα διαλυτών ινών (μέγιστο 10g ανά 100g φυτικών ινών χαρουπιού) όπως το γαλλικό οξύ, οι υδρολυμένες ταννίνες και οι γλυκοσίδες φλαβονόλης (Ikram et al., 2023; Nasar-Abbas et al., 2016).

1.3.2 Πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες αποτελούν πολυμερή των αμινοξέων. Στα τρόφιμα ορισμένες από τις ιδιότητες που εμφανίζουν είναι επιφανειοδραστικές (αφριστικές, γαλακτωματοποιητικές), δεσμεύουν μόρια νερού και σχηματίζουν πηκτές, έχουν ενζυμική δράση και κροκιδώνονται (Σφλώμος 2019). Οι δομικές μονάδες των πρωτεϊνών, τα αμινοξέα έχουν αμφολυτικό χαρακτήρα και περιλαμβάνουν μία αμινομάδα, μια καρβοξυλομάδα και διαφορετικούς υποκαταστάτες (Σφλώμος 2019). Τα αμινοξέα είναι απαραίτητα στον οργανισμό για τη δημιουργία και διατήρηση των ιστών, αλλά και ως πηγή ενέργειας. Από το σύνολο των αμινοξέων 9 είναι απαραίτητο να λαμβάνονται μέσω της τροφής και για αυτό ονομάζονται «απαραίτητα» αμινοξέα (Brown, 2016). Αυτά είναι η βαλίνη, η λευκίνη, η ισολευκίνη, η μεθειονίνη, η τρυπτοφάνη, η φαινυλαλανίνη, η λυσίνη, η ιστιδίνη και η θρεονίνη.

Ο καρπός του χαρουπιού περιλαμβάνει ποικίλα αμινοξέα, όπως μεθειονίνη, κυστεΐνη, ασπαρτικό οξύ, γλουταμινικό οξύ, σερίνη, τυροσίνη, αλανίνη, γλυκίνη, ισολευκίνη, λευκίνη, προλίνη, βαλίνη, αργινίνη, ιστιδίνη, λυσίνη, αρπαραγίνη και γλουταμίνη. Το 57% περίπου των αμινοξέων του λοβού του χαρουπιού αποτελείται από βασικές και αμιδικές αμινομάδες. Σύμφωνα με τις απαιτήσεις του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ, WHO) για τις πρωτεΐνες, οι καρποί του χαρουπιού απεδείχθη ότι αποτελούν εξαιρετική πηγή πρωτεϊνών και μάλιστα με υψηλή συγκέντρωση των «απαραίτητων» αμινοξέων (Ikram et al., 2023).

1.3.3 Βιταμίνες

Οι βιταμίνες που περιλαμβάνονται στα τρόφιμα είναι χημικές ουσίες που επιτελούν συγκεκριμένες λειτουργίες στον οργανισμό. Ταξινομούνται ως λιποδιαλυτές (A, D, E, K) ή υδατοδιαλυτές (βιταμίνες συμπλέγματος B και C). Ρόλος των βιταμινών στον οργανισμό δεν αποτελεί να παρέχουν ενέργεια, αλλά να δρουν κυρίως ως συνένζυμα σε χημικές αντιδράσεις και ως αντιοξειδωτικά (Brown, 2016).

Το χαρούπι περιέχει αξιόλογη ποσότητα ορισμένων βιταμινών, κυρίως, του συμπλέγματος B. Οι βασικότερες εκ των οποίων είναι η ριβοφλαβίνη ή βιταμίνη B₂ (0,461mg/100g, 35%DV), η βιταμίνη B₆ (0,366mg/100g, 22%DV), η νιασίνη ή βιταμίνη B₃ (1,897mg/100g, 12%DV) και το φολικό οξύ ή βιταμίνη B₉ (29μg/100g, 7%DV) (USDA, 2019) ("FoodData Central," n.d.).

1.3.4 Ανόργανα άλατα

Στα ανόργανα άλατα περιλαμβάνονται τα μέταλλα και τα ιχνοστοιχεία και αποτελούνται από μονά άτομα, τα οποία φέρουν φορτίο όταν βρίσκονται σε διάλυμα. Στον οργανισμό συμβάλλουν σε διάφορες λειτουργίες του οργανισμού, όπως στη διατήρηση επαρκούς ποσότητας νερού στους ιστούς, στη ρύθμιση της οξύτητας των σωματικών υγρών και αυτά που είναι φορτισμένα δρουν ως πηγή ηλεκτρικού δυναμικού, διεγείροντας τους μυς προς σύσπαση (Brown, 2016).

Ο καρπός του χαρουπιού περιλαμβάνει αρκετά μεγάλες ποσότητες καλίου (993-1089 mg/100g) και ασβεστίου (266-319 mg/100g). Το γάλα για παράδειγμα περιλαμβάνει 120mg ασβεστίου ανά 100gr, άρα το χαρούπι έχει παραπάνω ποσότητα ασβεστίου σε σύγκριση με το γάλα. Επίσης, περιέχει σε μικρότερες ποσότητες φώσφορο (76-79 mg/100g) και μαγνήσιο (55-56 mg/100g) και ορισμένα ιχνοστοιχεία όπως σίδηρος, μαγγάνιο, ψευδάργυρος και σελήνιο. Μεγαλύτερη συγκέντρωση βιολογικών συστατικών περιλαμβάνει ο σπόρος σε σύγκριση με τον λοβό του χαρουπιού (Ikram et al., 2023).

1.4 Οφέλη στην υγεία

1.4.1 Αντιδιαβητική δράση

Οι σύγχρονες διατροφικές συνήθειες, με υψηλή κατανάλωση επεξεργασμένων τροφίμων, είναι μία βασική αιτία της αύξησης εμφάνισης του διαβήτη τύπου 2 στον ανεπτυγμένο κόσμο. Σύμφωνα με μελέτες που πραγματοποιήθηκαν, σε άτομα μετά από τη λήψη γεύματος, βρέθηκε ότι υπάρχει άμεση συσχέτιση του γλυκαιμικού δείκτη και δείκτη ινσουλίνης των τροφίμων, με τον διαβήτη τύπου 2. Όταν, ο γλυκαιμικός δείκτης του τροφίμου είναι χαμηλός θεωρείται ότι ωφελεί στην πρόληψη ή διαχείριση του διαβήτη τύπου 2. Τα τρόφιμα, δηλαδή, που είναι αργά εύπεπτα και άρα έχουν χαμηλή απόκριση γλυκόζης στο αίμα, είναι ευεργετικά για την υγεία, βοηθώντας στη διαχείριση του διαβήτη και της υπερλιπιδαιμίας (Nasar-Abbas et al., 2016).

Από μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε αρουραίους, ύστερα από χορήγηση σε αυτούς ακατέργαστου πολυφαινολικού εκχυλίσματος από τον λοβό του χαρουπιού, βρέθηκε ότι η γλυκόζη στο αίμα τους μειώθηκε μετά από 30, 60, και 120 λεπτά σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Το χαρούπι, πιθανότατα, περιλαμβάνει ενώσεις οι οποίες έχουν τη δυνατότητα να μειώνουν την απόκριση της γλυκόζης στο αίμα αναστέλλοντας την ενζυμική δραστηριότητα (αμυλάσες), με αποτέλεσμα τον αργό ρυθμό πέψης του αμύλου (Nasar-Abbas et al., 2016).

Μια άλλη κλινική δοκιμή η οποία πραγματοποιήθηκε σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, έδειξε ότι η κατανάλωση D-πινιτόλης πριν από ένα γεύμα μειώνει την μεταγευματική αύξηση στα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα. Επομένως, η D-πινιτόλη αποδείχθηκε ότι έχει ευεργετικές ιδιότητες στην υγεία, ελέγχοντας τις μεταγευματικές αυξήσεις της γλυκόζης στο αίμα σε ασθενείς με διαβήτη τύπου 2. Αντιυπεργλυκαιμικά αποτελέσματα της πινιτόλης λήφθηκαν και από πείραμα σε ποντικούς με διαβήτη, στους οποίους χορηγήθηκαν πινιτόλη σόγιας και πινιτόλη χαρουπιού (10mg/kg). Συμπερασματικά, υπάρχουν τεκμηριωμένα ευρήματα που αποδεικνύουν ότι η D-πινιτόλη που περιέχεται στο χαρούπι (5,5%) μπορεί να αξιοποιηθεί για τη μείωση του προβλήματος του διαβήτη τύπου 2 (Nasar-Abbas et al., 2016).

1.4.2 Αντιοξειδωτική δράση

Κατά τη διάρκεια μολύνσεων για την καταστροφή ιών και βακτηρίων στα βιολογικά συστήματα (όπως το ανθρώπινο σώμα) παράγονται ενεργές μορφές οξυγόνου ή αντιδραστικές μορφές αζώτου. Αυτές οι μορφές ονομάζονται ελεύθερες ρίζες, είναι τυπικά ασταθείς και μπορούν να προκαλέσουν βλάβες στα λιπίδια, στις πρωτεΐνες και το DNA και κατηγορούνται ότι συμμετέχουν στην παθογένεση και τη γήρανση. Η έκθεση του οργανισμού για μεγάλο χρονικό διάστημα στο οξειδωτικό στρες, ανισορροπία μεταξύ ελεύθερων ριζών και αντιοξειδωτικών στο σώμα, θεωρείται ως ένας αρχικός παράγοντας στην ανάπτυξη εκφυλιστικών ασθενειών. Η ευεργετική δράση των πολυφαινολών βασίζεται στην ικανότητάς τους να δεσμεύουν και να αδρανοποιούν τις ελεύθερες ρίζες, μειώνοντας το οξειδωτικό στρες. Αυτό συμβαίνει λόγω προσφοράς ηλεκτρονίων του αντιοξειδωτικού προς την ελεύθερη ρίζα, με αποτέλεσμα τη δημιουργία σχετικά σταθερών ριζών φαινοξυλίου ή μέσω μηχανισμού συμπλοκοποίησης ιόντων, όπως Fe και Cu, των αντιοξειδωτικών (Nasar-Abbas et al., 2016).

Ο καρπός του χαρουπιού αποτελεί πλούσια πηγή πολυφαινολικών αντιοξειδωτικών, η εξαγωγή των οποίων έχει προσελκύσει το επιστημονικό ενδιαφέρον για τη χρήση τους ως φυσικά αντιοξειδωτικά σε τρόφιμα, κυρίως για την πρόληψη της τάγγισης και οξείδωσης των λιπιδίων, αντικαθιστώντας τα συνθετικά πρόσθετα. Τα συνθετικά πρόσθετα έχουν κατηγορηθεί για βλάβες στο ήπαρ, καρκινογένεσεις και γενικότερα τοξικές δράσεις (Nasar-Abbas et al., 2016).

Σύμφωνα με τα 2 παρακάτω in vitro μοντέλα φαίνεται ότι το χαρούπι περιλαμβάνει πολυφαινόλες με ισχυρή αντιριζική και αναγωγική δράση. Στην πρώτη έρευνα μελετήθηκαν δύο εκχυλίσματα χαρουπιού, το ένα με 35% ταννίνες και το άλλο με 85% συμπυκνωμένες ταννίνες. Τα εκχυλίσματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν σε μαγειρεμένο χοιρινό κρέας, το οποίο διατηρήθηκε για έξι μήνες σε συνθήκες κατάψυξης και συγκρίθηκαν ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση με την α-τοκοφερόλη (γνωστό πρόσθετο ως αντιοξειδωτικό τροφίμων). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν έδειξαν ότι και τα δύο εκχυλίσματα χαρουπιού είχαν σημαντικά υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με την α-τοκοφερόλη. Στη δεύτερη έρευνα προστέθηκαν 50mg ινών χαρουπιού πλούσια σε ταννίνες στο ηλιέλαιο, οι οποίες διπλασίασαν τη διάρκεια του τηγανίσματος του λαδιού αναστέλλοντας τον σχηματισμό ανεπιθύμητων ενώσεων (π.χ. πολικές ουσίες και πολυμερή). Συνεπώς, θα μπορούσε ο καρπός του χαρουπιού να χρησιμοποιηθεί σε προϊόντα τροφίμων ως ένα φυσικό αντιοξειδωτικό με στόχο την αντικατάσταση των συνθετικών (Nasar-Abbas et al., 2016).

1.4.3 Μείωση χοληστερόλης

Στις ανεπτυγμένες χώρες μία από τις πιο συχνές αιτίες θανάτου είναι τα καρδιαγγειακά νοσήματα. Πολλές μελέτες αποδεικνύουν τη συσχέτιση καρδιαγγειακών νοσημάτων με αύξηση της LDL χοληστερόλης στο αίμα. Η κατανάλωση ινών χαρουπιού, οι οποίες είναι πλούσιες σε πολυφαινόλες, έχει δείξει ευεργετικά αποτελέσματα στο λιπιδικό προφίλ του ανθρώπινου αίματος.

Μέσω πιλοτικής μελέτης, 8 εβδομάδων, στην οποία συμμετείχαν 47 εθελοντές με μέτρια υπερχοληστερολαιμία, βρέθηκε ότι προσθέτοντας στην διατροφή τους 15g χαρουπιού την ημέρα ως συστατικό σε τρία τρόφιμα (δημητριακά πρωινού, μπάρα δημητριακών και ρόφημα), είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της μέσης ολικής χοληστερόλης κατά 7,1% και της LDL κατά 10,6%, μετά από 4 εβδομάδες (Zunft et al., 2001). Την πιλοτική αυτή μελέτη ακολούθησε τυχαίοποιημένη κλινική μελέτη με εικονικό φάρμακο (placebo), στην οποία συμμετείχαν 58 εθελοντές που έπασχαν από υπερχοληστερολαιμία. Οι μισοί από τους εθελοντές κατανάλωναν 15g χαρουπιού ημερησίως ως συστατικό από 4 φέτες ψωμί και 1 μπάρα φρούτου (χωρίς το εικονικό φάρμακο). Μετά το πέρας 6 εβδομάδων, παρατηρήθηκε ότι οι συγκεντρώσεις ολικής χοληστερόλης και LDL χοληστερόλης ήταν 9,5% και 10,5% χαμηλότερες αντίστοιχα, στην ομάδα που κατανάλωναν χαρούπι σε σχέση με τη ομάδα που έπαιρνε το εικονικό φάρμακο. Σε μία άλλη πιο πρόσφατη μελέτη των Ruiz-Roso και άλλων, το 2010, η κατανάλωση χαρουπιών με υψηλή περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες (4g δύο φορές την ημέρα) για 4 εβδομάδες, είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της ολικής χοληστερόλης κατά 18% και των τριγλυκεριδίων κατά 16%. Η μείωση της χοληστερόλης, μέσω των ινών που περιλαμβάνονται στο χαρούπι βρέθηκε να συσχετίζεται με αυξημένη δραστηριότητα της 7 α-υδροξυλάσης της χοληστερόλης και με αυξημένη απέκκριση χολικού οξέος (η σύνθεση χολικών αλάτων αποτελεί κύρια οδό αποικοδόμησης της χοληστερόλης)(Nasar-Abbas et al., 2016).

1.4.4 Αντικαρκινική δράση

Το ποσοστό εμφάνισης καρκίνου τα τελευταία χρόνια αυξάνεται ανησυχητικά. Από διάφορες μελέτες έχει προταθεί ο προστατευτικός ρόλος των τανινών και άλλων πολυφαινόλων έναντι διάφορων μορφών καρκίνου. Έχει παρατηρηθεί ότι το εκχύλισμα από ίνες χαρουπιού, που αποτελείται από πολυφαινόλες, έχει προστατευτική δράση έναντι του οξειδωτικού στρες των κυττάρων του αδενώματος, τα οποία έχουν την ικανότητα να αμυνθούν ή να επιβραδύνουν την εξάπλωση του καρκίνου του παχέος εντέρου. Οι πολυφαινόλες αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό τόσο των κυττάρων του αδενώματος όσο και του αδενοκαρκινώματος του ανθρώπινου παχέος εντέρου. Σε μελέτη ηπατοκυτταρικού καρκινώματος ποντικού, τα υδατικά εκχυλίσματα από καρπούς χαρουπιού έδειξαν αξιοσημείωτη μεταβολή στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μιας κυτταρικής σειράς του καρκινώματος και προκάλεσαν απόπτωση στα κύτταρα. Επομένως, οι λοβοί του χαρουπιού φαίνεται να έχουν αντιπολλαπλασιαστικούς παράγοντες, οι οποίοι θα μπορούσαν να παίξουν βασικό ρόλο στην ανάπτυξη λειτουργικών τροφίμων και χημειοπροληπτικών φαρμάκων. Επίσης, υπάρχουν μελέτες που έχουν δείξει ότι το εκχύλισμα σπόρων χαρουπιού φαίνεται να έχει σημαντική αντιοξειδωτική δράση και μάλιστα παρατηρήθηκε μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας (Nasar-Abbas et al., 2016).

1.4.5 Ενίσχυση μεταβολισμού

Οι τροφές που περιέχουν χαρούπι είναι αργά εύπεπτες, δίνοντας το αίσθημα κορεσμού για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Αυτό το χαρακτηριστικό τις καθιστά χρήσιμες τροφές για την αντιμετώπιση του προβλήματος της παχυσαρκίας. Επίσης, το χαρουπάλευρο έχει σημαντική αξία ως διατροφική θεραπεία για διαρροϊκές διαταραχές και βακτηριακή δυσεντερία σε βρέφη, μειώνοντας τη διάρκεια της νόσου. Ενώ, ο χυμός χαρουπιού όταν χρησιμοποιήθηκε σε συνδυασμό με ORS (διάλυμα για ενυδάτωση από του στόματος χρήση από τον ΠΟΥ) για τη θεραπεία της οξείας διάρροιας σε παιδιά, είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της διάρκειας της νόσου κατά 45% και την παραγωγή κοπράνων κατά 44% σε σύγκριση με τη χρήση αποκλειστικά του ORS. Άλλη μία ευεργετική ιδιότητα των ινών που περιλαμβάνονται στο χαρούπι είναι ότι δεν ζυμώνονται εύκολα στον κόλον του ανθρώπου, προκαλώντας σημαντική αύξηση του όγκου των κοπράνων, γεγονός που μπορεί να βοηθήσει στη μείωση της δυσκοιλιότητας (Nasar-Abbas et al., 2016).

1.5 Προϊόντα λοβού χαρουπιού και εφαρμογές σε τρόφιμα

1.5.1 Λοβός χαρουπιού σε σκόνη (χαρουπάλευρο)

Ο καρπός του χαρουπιού (ψημένος ή μη) μπορεί να αλεσθεί και να δημιουργήσει μια λεπτή σκόνη (χαρουπόσκηνη ή χαρουπάλευρο), η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως συστατικό σε διάφορα αρτοποιητικά προϊόντα (ψωμί, κουλουράκια, παξιμάδια κλπ.) και γλυκά ή ως υποκατάστατο της σκόνης κακάο. Έχει λεπτή σύσταση, οπότε είναι κατάλληλο για να αναμειχθεί με άλλα

αλεύρια και δίνει μια ιδιαίτερη γλυκιά γεύση (Nasar-Abbas et al., 2016). Το χαρουπάλευρο, λόγω της ιδιαίτερης σύστασής του σε φυτικές ίνες, πολυφαινόλες κλπ., μπορεί να εμπλουτίσει ένα τρόφιμο με αυτές τις ευεργετικές ουσίες για την ανθρώπινη υγεία, μετατρέποντας το τρόφιμο σε λειτουργικό.

Το χαρουπάλευρο κατά τη χρήση του στην παρασκευή άρτου έχει την ικανότητα να βελτιώνει και τα ρεολογικά χαρακτηριστικά της ζύμης. Έρευνα έδειξε ότι η προσθήκη ποσότητας χαρουπάλευρου (15%) στη ζύμη κατά την παρασκευή ψωμιού χωρίς γλουτένη (από ρυζάλευρο), αύξησε την περιεκτικότητα του ζυμαριού σε νερό, βελτιώνοντας τη σταθερότητα και δομή της ψίχας (Tsatsaragkou, Gounaropoulos, & Mandala, 2014).

Ως υποκατάστατο του κακάο το χαρουπάλευρο έχει διατροφικά πλεονεκτήματα. Χαμηλότερη περιεκτικότητα λίπους, υψηλότερο ποσοστό φυτικών ινών και αντιοξειδωτικών και δεν περιέχει καφεΐνη, θεοβρωμίνη και οξαλικό οξύ (Nasar-Abbas et al., 2016). Επίσης, το χαρουπάλευρο κατά την επεξεργασία, λόγω της υψηλής του περιεκτικότητας σε σάκχαρα (σε υψηλότερη αναλογία σακχαρόζη), χρειάζεται μικρή ποσότητα επεξεργασμένης ζάχαρης σε αντίθεση με το κακάο. Σύμφωνα με τους Berna και άλλους (1997), για να επιτευχθεί η χαμηλότερη ποσότητα ισοβουτυρικού οξέος (το οποίο δημιουργεί ένα δυσάρεστο άρωμα) κατά το καβούρδισμα του χαρουπιού θα πρέπει να θερμανθεί στους 150°C για 60 min (Berna, Pérez-Gago, Guardiola, Salazar, & Mulet, 1997).

Το χαρουπάλευρο χρησιμοποιείται και στην παρασκευή ζυμαρικών χωρίς γλουτένη, είτε μόνο του είτε σε συνδυασμό με άλλα αλεύρια, όπως ρυζιού και φασολιού. Σε πειραματική μελέτη που μετρήθηκε το φαινολικό περιεχόμενο, το χρώμα και η υφή ζυμαρικών χωρίς γλουτένη με χαρούπι (10%) και ζυμαρικών χωρίς την παρουσία χαρουπιού, βρέθηκε ότι τα ζυμαρικά συμπληρωμένα με χαρούπι είχαν πιο σκούρο χρώμα, εμφάνιζαν καλύτερες παραμέτρους υφής (λιγότερο σκληρό, κολλώδες και συγκολλητικό) και υψηλότερη ποσότητα βιοδραστικών ενώσεων (Arribas, Cabellos, Cuadrado, Guillamón, & Pedrosa, 2020).

Άλλη μία εφαρμογή του χαρουπάλευρου αποτελεί η παρασκευή αλείμματος. Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε για την παρασκευή αλείμματος, ως κύρια συστατικά χρησιμοποιήθηκαν το χαρουπάλευρο και υδρογονωμένο φοινικέλαιο και εξετάστηκαν η υφή, το χρώμα και ορισμένες θρεπτικές ιδιότητες του αλείμματος. Οι αναλογίες για την παραγωγή αλείμματος με τις βέλτιστες οργανοληπτικές ιδιότητες βρέθηκε ότι αποτελούν τα 38 g χαρουπάλευρου σε 100 g αλείμματος και 42 g υδρογονωμένο φοινικέλαιο σε 100 g αλείμματος (Aydin & Özdemir, 2017).

1.5.2 Χαρουπόμελο

Σε περιοχές που καλλιεργείται η χαρουπιά, παραδοσιακή χρήση του καρπού αποτελεί η παρασκευή σιροπιού από χαρούπι, το οποίο ονομάζεται χαρουπόμελο. Λόγω της υψηλής περιεκτικότητας του χαρουπιού σε σάκχαρα, η εκχύλιση των λοβών σε νερό που ακολουθείται από

συμπύκνωση με θέρμανση, δίνει ένα παχύρευστο υγρό με γλυκιά γεύση, πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά. Το χαρουπόμελο έχει τη δυνατότητα να προστεθεί σε τρόφιμα ως γλυκαντικό ή να λειτουργήσει ως μέσω καλλιέργειας μικροοργανισμών για παραγωγή διάφορων προϊόντων, όπως η μαννιτόλη (Carvalho, Moniz, Duarte, Esteves, & Gírio, 2011; Nasar-Abbas et al., 2016). Το χαρουπόμελο ως υποκατάστατο της ζάχαρης μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε αρτοσκευάσματα, ροφήματα, σάλτσες και διάφορα γλυκά (Nasar-Abbas et al., 2016). Έχει δοκιμαστεί και στη παραγωγή αρωματισμένου γιαουρτιού (Atasoy, 2009). Συχνά, το χαρουπόμελο συνδυάζεται με χαρουπάλευρο για την παρασκευή κυρίως αρτοσκευασμάτων (κέικ, μπισκότα κλπ.).

Σε μία πρόσφατη μελέτη διερευνήθηκε η προσθήκη χαρουπόμελου (σε διαφορετικές συγκεντρώσεις) αντί για ζάχαρη, κατά την παραγωγή μαρμελάδας πικρού πορτοκαλιού, ώστε να καλυφθεί η πικράδα της φλούδας χωρίς, όμως να σχηματιστούν λευκές κηλίδες. Στα δείγματα μετρήθηκαν οι ιδιότητες σύνθεσης (pH, οξύτητα, Brix°, υγρασία, ολική περιεκτικότητα σε σάκχαρα και ακατέργαστες ίνες), οι ολικές φαινολικές ενώσεις, η αντιοξειδωτική δράση και οι οργανοληπτικές ιδιότητες (εμφάνιση, χρώμα, υφή, γεύση και ρευστότητα). Επίσης, αναλύθηκε αισθητηριακά και φασματοφωτομετρικά η αλληλεπίδραση του γαλλικού και ταννικού οξέος με τη ναριγκίνη, ώστε να προσδιοριστεί η αιτία που καλύπτει την πικρία. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι με τη χρήση χαρουπόμελου η συνολική περιεκτικότητα σε σάκχαρα μειώθηκε, ενώ οι ακατέργαστες ίνες, το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο και η αντιοξειδωτική δράση στη μαρμελάδα αυξήθηκε. Επίσης, βελτιώθηκαν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της μαρμελάδας όπως η φωτεινότητα, η υφή, η οσμή, η γεύση και η πικράδα. Μάλιστα, στο δείγμα μαρμελάδας με 100% χαρουπόμελο δεν ανιχνεύθηκε καθόλου πικράδα. Αυτό βρέθηκε να οφείλεται στις φαινολικές ενώσεις (κυρίως το γαλλικό οξύ), οι οποίες σχημάτισαν ένα σύμπλοκο με τη ναριγκίνη, εξαλείφοντας την πικρή της γεύση (Özbek, 2023).

Άλλη μία εφαρμογή του χαρουπόμελου ως υποκατάστατο της ζάχαρης αποτελεί η προσθήκη του στην παρασκευή κέικ (παντεσπάνι), καθιστώντας το λειτουργικό τρόφιμο. Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε παρασκευάστηκαν 3 δείγματα παντεσπάνι, παντεσπάνι ελέγχου χωρίς χαρουπόμελο, παντεσπάνι με 25% χαρουπόμελο και παντεσπάνι με 50% χαρουπόμελο. Η αντικατάσταση της ζάχαρης με χαρουπόμελο αύξησε την περιεκτικότητα του δείγματος κέικ σε πρωτεΐνη και επηρέασε θετικά τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά του (γλυκύτητα και τρυφερότητα ψίχας) (στο ίδιο πείραμα πραγματοποιήθηκε και εμπλουτισμός του κέικ με χαρουπάλευρο με εξίσου θετικά αποτελέσματα, εμφανίζοντας και μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε διαιτητικές ίνες και υδατάνθρακες) (Fidan et al., 2019).

Το χαρουπόμελο ως μέσο καλλιέργειας μικροοργανισμών μελετήθηκε από τους Florbela Carvalho και άλλους, το 2011. Σε αυτή την έρευνα μελετήθηκαν 8 στελέχη γαλακτικών βακτηρίων (LAB) που παράγουν μαννιτόλη και παρακολούθηθηκαν διεξοδικά για 30 ώρες, ώστε να

αξιολογηθεί κατανάλωση σακχάρων, καθώς και η παραγωγή βιομάζας και μεταβολιτών. Αποδείχτηκε ότι όλα κατάφεραν να αναπτυχθούν και να παράγουν μαννιτόλη με σχετικά υψηλή απόδοση και ογκομετρική παραγωγικότητα σε θρεπτικό μέσο με βάση το χαρούπι. Την υψηλότερη ογκομετρική παραγωγικότητα και ανθεκτικότητα εμφάνισε το *L. fructosum* NRRL B-2041 (Carvalho et al., 2011).

Αξιοσημείωτη είναι και μία έρευνα που πραγματοποιήθηκε για την ανάπτυξη ενός καινοτόμου βιοϋλικού επικάλυψης για την συσκευασία των τροφίμων με αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή δράση, μέσω του πολυμερισμού των φαινολικών ενώσεων του λοβού του χαρουπιού (παραλαβή μέσω εκχύλισης με μεθανόλη). Αρχικά, η πολυφαινολική επικάλυψη δοκιμάστηκε σε γυάλινες επιφάνειες, πολυμερίζοντας διαφορετικές συγκεντρώσεις εκχυλισμάτων χαρουπιού (2 και 4 mg/ml) με διαφορετικές τιμές pH (7, 8 και 9). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα η επικάλυψη που παράγεται με τιμή pH 8 και με συγκέντρωση 4 mg/ml είχε την ισχυρότερη αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή δράση. Στη συνέχεια, εφαρμόστηκε επικάλυψη απευθείας στο φιλέτο του σολομού και στο πλαστικό δοχείο (ενεργή συσκευασία). Τα αποτελέσματα έδειξαν και για τις δύο συσκευασίες σημαντική μείωση της οξειδωσης των λιπιδίων κατά την ψυχρή αποθήκευση των φιλέτων σολομού και μάλιστα φάνηκε υπεροχή της εφαρμοσμένης επικάλυψης απευθείας στα φιλέτα σολομού. Όσον αφορά την αντιμικροβιακή ισχύ, η πολυφαινολική επικάλυψη εξάλειψε την ανάπτυξη της *Listeria monocytogenes* μετά από αποθήκευση 10 ημερών, ενώ η ενεργή συσκευασία δεν είχε καμία επίδραση στη *Listeria monocytogenes*. Επομένως, η χρήση πολυφαινολών από χαρούπι, οι οποίες είναι χαμηλού κόστους, για τον σχηματισμό επικαλύψεων σε τρόφιμα αποτελεί πολλά υποσχόμενη εφαρμογή στη συσκευασία τροφίμων (Goulas et al., 2019).

1.5.3 Ροφήματα χαρουπιού

Το χαρούπι περιλαμβάνει απλούς υδατάνθρακες καθιστώντας το κατάλληλο ως υπόστρωμα για ζύμωση από μικροοργανισμούς. Στην επιστημονική βιβλιογραφία μπορούν να βρεθούν ποικίλες μελέτες για βιομηχανικές ζυμώσεις με χρήση του καρπού του χαρουπιού για παραγωγή μεγάλης ποικιλίας χρήσιμων ενώσεων, όπως το γαλακτικό οξύ ή το ηλεκτρικό οξύ για παραγωγή βιοϋδρογόνου (Vitali et al., 2023).

Στην παραγωγή ροφημάτων ο πιο συνηθισμένος τρόπος χρήσης του χαρουπιού είναι ως συστατικό σε ροφήματα με βάση το γάλα, για να γλυκάνει και να αρωματίσει (υποκαθιστώντας το κακάο). Σε ορισμένους πολιτισμούς η χρήση του χαρουπιού για την παραγωγή ποτών (που έχουν υποστεί ζύμωση ή όχι) είναι παραδοσιακή διαδικασία. Ο Πίνακας 3 παρουσιάζει τα κύρια χαρακτηριστικά παραδοσιακών ροφημάτων με βάση το χαρούπι και ροφημάτων που έχουν παρασκευαστεί σε εργαστήρια για ερευνητικούς σκοπούς (Vitali et al., 2023).

Πίνακας 3: Κύρια χαρακτηριστικά ροφημάτων με βάση το χαρούπι, τα οποία είναι είτε παραδοσιακά ροφήματα είτε έχουν παρασκευαστεί και επεξεργαστεί σε εργαστήρια για πειραματικές αναλύσεις. Πηγή: (Vitali et al., 2023)

Όνομα	Προέλευση	Συστατικά	Μικροοργανισμοί	Μέθοδος παρασκευής
Jallab	Συρία/Παλαιστίνη/Λίβανος	Χαρούπι, χουρμάδες, μελάσα σταφυλιού, ροδόνερο	Δεν υπάρχει, δεν έχει υποστεί ζύμωση	Αφήνεται το μείγμα από τα υλικά να πάρει βράση, φιλτράρεται και πίνουμε με πάγο.
Khar-rub	Μαρόκο	Χαρούπι και νερό	Δεν υπάρχει, δεν έχει υποστεί ζύμωση	Βύθιση κομματιών καρπού σε νερό στους 80°C με ανάδευση για 45 λεπτά. Διήθηση και ψύξη.
Aloja (μπύρα από χαρούπι)	Αργεντινή/Χιλή	Νερό, λοβός χαρουπιού, ζάχαρη (προαιρετικά)	Αυθόρμητη ζύμωση (LAB and <i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	Σύνθλιψη καρπών με γουδοχέρι και μουλιάσουν στο σκοτάδι για περισσότερο από 48 ώρες.
Αλκοολούχο ποτό με βάση το χαρούπι που έχει υποστεί ζύμωση	Εργαστηριακό	Νερό, χαρούπι, ζάχαρη, enofer (μεταόξινο θειώδες κάλιο, διφασικό φωσφορικό αμμώνιο, θειικό αμμώνιο) και levital	<i>S. cerevisiae</i>	Ανάμειξη ζάχαρης με νερό, προσθήκη μαγιάς για να ζυμωθεί ο πρώτος ζωμός. Προσθήκη ψιλοκομμένου χαρουπιού και τα πρόσθετα. Ζύμωση.
Γαλακτοκομικό ρόφημα με βάση το χαρούπι	Εργαστηριακό	Νερό, σκόνη γάλακτος χωρίς λιπαρά, σκόνη χαρουπιού 4% (άψητο ή ψητό), γλυκαντικές ουσίες χωρίς θερμίδες, λεκιθίνη σόγιας, εκχύλισμα βανίλιας, κόμμα καραγενάνης	Δεν υπάρχει, δεν έχει υποστεί ζύμωση	Ψήσιμο λοβών για 60 λεπτά στους 150°C και θρυμματίσμα. Ανάμειξη υλικών και ψήσιμο στους 75°C για δύο λεπτά. Διήθηση μείγματος και φύλαξη στους 4 °C.
Ρόφημα γάλακτος με βάση το χαρούπι που έχει υποστεί ζύμωση	Εργαστηριακό	Νερό, χαρούπι σε σκόνη, γάλα σε σκόνη και καλλιέργειες	<i>Lactococcus lactis</i>	Προσθήκη 4% (w/v) σκόνης χαρουπιού σε ένα ανασυσταμένο ρόφημα αποβουτυρωμένου γάλακτος εμβολιασμένο με <i>Lactobacillus</i> και επώαση στους 30°C για 16 ώρες.
Ρόφημα που μοιάζει με κεφίρ με βάση το χαρούπι	Εργαστηριακό	Λοβοί χαρουπιών, κόκκοι κεφίρ, ορός γάλακτος και αλεύρι βρώμης	Δεν υπάρχει, δεν έχει υποστεί ζύμωση	Βρασμός μείγματος, φιλτράρισμα και σερβίρισμα με πάγο.

Πίνακας 4: Συγκεντρωτικός πίνακας προϊόντων με χαρούπι (που αναλύθηκαν παραπάνω) και η θετική επίδραση που προσφέρει το χαρούπι στη σύσταση και δομή τους.

Προϊόντα με βάση το χαρούπι	Θετική επίδραση
Χαρουπάλευρο	
Ψωμί ενισχυμένο με αλεύρι από λοβό χαρουπιού	Βελτίωση σταθερότητας και δομής της ψίχας του ψωμιού, υψηλή περιεκτικότητα σε αντιοξειδωτικά και φαινόλες και βελτίωση στα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά
Χαρουπάλευρο ως υποκατάστατο του κακάο	Υψηλότερη περιεκτικότητα σε φαινόλες, αντιοξειδωτικά και φυτικές ίνες, απουσία καφεΐνης, θεοβρωμίνης και οξαλικού οξέος, χαμηλότερη περιεκτικότητα λίπους και λιγότερη απαιτούμενη προσθήκη ζάχαρη
Ζυμαρικά με βάση το χαρουπάλευρο	Υψηλή ποσότητα βιοδραστικών ενώσεων και βελτιωμένα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά
Άλειμμα χαρουπιού	Βελτιωμένα χαρακτηριστικά υφής και χρώματος
Κέικ με βάση το χαρουπάλευρο	Βελτιωμένη περιεκτικότητα σε διαιτητικές ίνες, πλούσια σε πρωτεΐνες και καλές οργανοληπτικές ιδιότητες
Χαρουπόμελο	
Αρωματισμένη γιαούρτη με χαρουπόμελο	Παραγωγή γιαούρτης με χαμηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά, υψηλή περιεκτικότητα σε φυτικές ίνες, χαμηλή λακτόζη και αυξημένη γλυκύτητα
Χαρουπόμελο που χρησιμοποιείται ως υποκατάστατο της ζάχαρης:	
A) Σε μαρμελάδα πορτοκάλι	Μείωση ποσότητας σακχάρων, αυξημένη περιεκτικότητα σε φυτικές ίνες, φαινολικές ενώσεις και αντιοξειδωτικά και βελτιωμένα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά
B) Σε κέικ	Αυξημένη περιεκτικότητα πρωτεϊνών και καλύτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά
Μέσο καλλιέργειας για παραγωγή μαννιτόλης	Αυξημένη απόδοση σε μαννιτόλη, ειδικότερα με χρήση του <i>L. fructosum</i>
Βιοϋλικό επικάλυψης τροφίμων	Εμφάνιση αντιοξειδωτικής και αντιμικροβιακής δράσης και παρεμπόδιση ανάπτυξης <i>Listeria monocytogenes</i>

Κεφάλαιο 2

2.1 Αντιοξειδωτικά σε φυτικούς ιστούς

Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον των επιστημόνων έχει στραφεί στα φυσικά αντιοξειδωτικά (πχ φαινολικές, ουσίες βιταμίνη E και C και καροτενοειδή), τα οποία περιέχονται φυσικά στα τρόφιμα και συμβάλουν στην αύξηση της διάρκειας ζωής των τροφίμων, αλλά και στην προώθηση της ανθρώπινης υγείας. Τα αντιοξειδωτικά (φυσικά και συνθετικά) χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων ως πρόσθετα με σκοπό την καλύτερη συντήρηση των τροφίμων (συντηρητικά). Η δράση των αντιοξειδωτικών βασίζεται στην προστασία των τροφίμων από αλλοιώσεις που προκαλούνται από την οξείδωση, όπως οι αλλαγές του χρώματος και η τάγγιση των λιπών (ή ελαίων) (Σφλώμος & Βαρζάκης, 2019). Τα φυσικά αντιοξειδωτικά θα μπορούσαν να αντικαταστήσουν τα συνθετικά αντιοξειδωτικά, τα οποία έχουν κατηγορηθεί ότι είναι επιβλαβή για την υγεία του ανθρώπου, με τοξικές και καρκινογόνες επιδράσεις (Rodríguez-Solana et al., 2021).

Όσον αφορά την προώθηση της ανθρώπινης υγείας τα αντιοξειδωτικά που περιέχονται στα φυτικά εκχυλίσματα (όπως το χαρούπι), δρουν ευεργετικά στα κύτταρα, βοηθώντας στην πρόληψη του οξειδωτικού στρες που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την πρόληψη ασθενειών όπως ο καρκίνος, τα καρδιαγγειακά νοσήματα, η αθηροσκλήρωση και διαταραχές που σχετίζονται με την γήρανση (Rodríguez-Solana et al., 2021).

Οι βιοφαινόλες είναι οι κυριότερες αντιοξειδωτικές ουσίες που βρίσκονται στα τρόφιμα και ποτά. Οι βιοφαινόλες και γενικότερα οι ουσίες με αντιοξειδωτική δράση, εντάσσονται στην κατηγορία των φυτοχημικών συστατικών και συχνά μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως τροφοφάρμακα, λόγω κυρίως της αντιριζικής τους δράσης (Σφλώμος, 2019).

Οι φαινολικές ενώσεις ή πολυφαινόλες είναι μία σύνθετη ομάδα φυτοχημικών ουσιών που διαθέτουν μεγάλο αριθμό υδροξυλομάδων σε αρωματικούς δακτυλίους (Martel, Monteiro, & Calhau, 2010). Στις πολυφαινόλες περιλαμβάνονται απλά φαινολικά οξέα, όπως το κινναμικό οξύ και τα παράγωγά του, φλαβονοειδή, ισοφλαβόνες, λιγνάνες, ανθοκυάνες και ταννίνες (Owen et al., 2003). Οι βασικότερες φαινολικές ουσίες οι οποίες περιέχονται στα τρόφιμα και παρουσιάζουν βιολογική δραστηριότητα, ανήκουν στην κατηγορία των φλαβονοειδών και των ταννινών (Σφλώμος, 2019). Τα φλαβονοειδή ανήκουν στην τάξη των φυτικών χρωστικών ουσιών και είναι πολυυδροξυ-παράγωγα της 2-φαινυλοβενζο-γ-πυρόνης (μεθυλαιθέρες ή γλυκοζίτες τους) με βασικό τους σκελετό τη φλαβόνη. Στα φλαβονοειδή περιλαμβάνονται οι κατεχίνες και οι ανθοκυάνες. Στη βιβλιογραφία πολλές φορές τα (βιο)φλαβονοειδή, λόγω της βιταμινικής τους δράσης, αναφέρονται ως Βιταμίνες P. Τα φλαβονοειδή ανιχνεύονται κυρίως στο τσάι, στη φλούδα των εσπεριδοειδών, στα κόκκινα, μπλε, μωβ και ρόζ φρούτα και λαχανικά (Σφλώμος, 2019). Οι ταννίνες, από την άλλη, είναι πολυμερείς πολυφαινολικές ενώσεις, εστέρες του γαλλικού και μ-διγαλλικού οξέος με γλυκόζη.

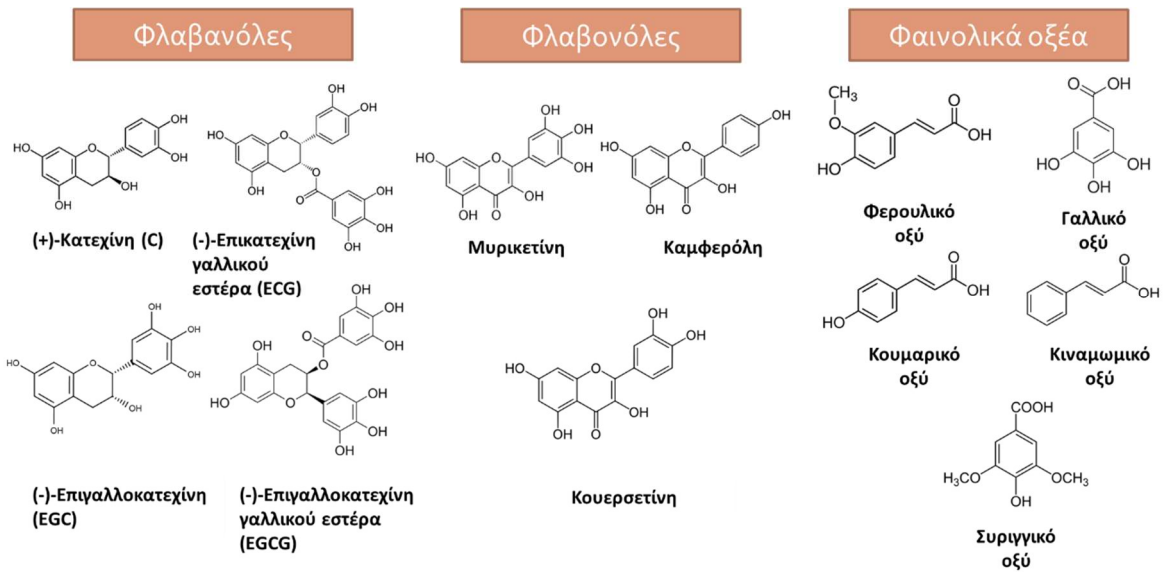
Ανήκουν στις δεψικές ύλες (φυτικής προέλευσης άμορφα υλικά μεγάλου μοριακού βάρους) και χαρακτηρίζονται από στυφή γεύση. Βασικότερη ένωση από τις ταννίνες αποτελεί το ταννικό οξύ (ή ταννίνη). Σημαντικότερες πηγές ταννινών αποτελούν τα τροπικά φρούτα (μάνγκο, χουρμάδες κλπ.), τα σταφύλια (και το κρασί), το τσάι, ο καφές και το κακάο (Σφλώμος, 2019).

2.2 Βιοδραστικές ενώσεις χαρουπιού

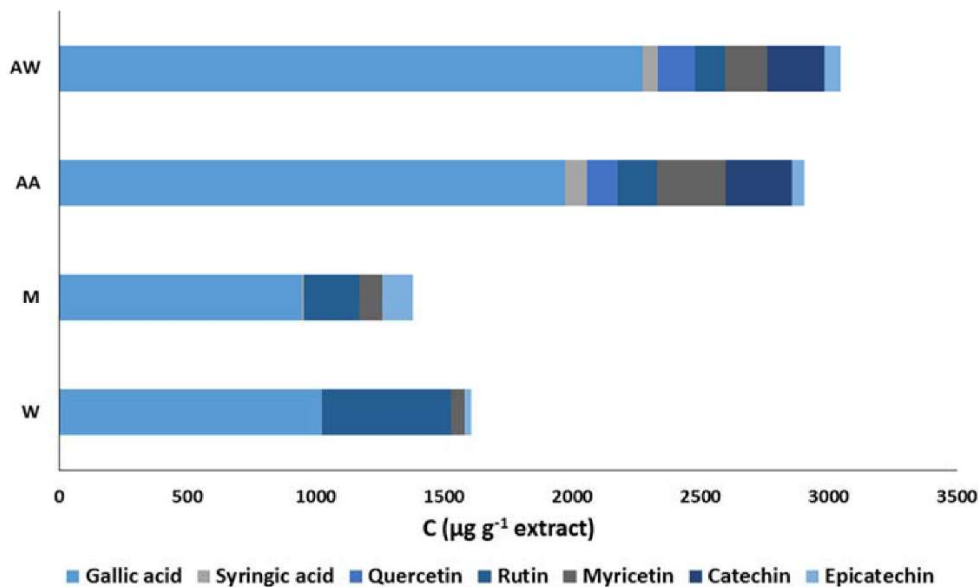
Η σύνθεση των βιοδραστικών συστατικών των λοβών της χαρουπιιάς ποικίλλει και εξαρτάται κυρίως από το κλίμα (γεωγραφική προέλευση), την ποικιλία και το στάδιο ωριμότητας του καρπού, αλλά και τη μέθοδο εκχύλισης που εφαρμόζεται για την παραλαβή του δείγματος (Ikram et al., 2023). Παρακάτω περιγράφονται κάποιες από τις βασικότερες βιοδραστικές ενώσεις του χαρουπιού.

2.2.1 Πολυφαινόλες

Οι φαινολικές ενώσεις εκτός από τη συμβολή τους σε μεγάλο μέρος των οργανοληπτικών ιδιοτήτων ενός τρόφιμου, κυρίως στο χρώμα και τη γεύση, προσδίδουν και μεγάλα οφέλη στην υγεία του ανθρώπου (Nasar-Abbas et al., 2016). Το χαρούπι αποτελεί ένα προϊόν με υψηλή συγκέντρωση πολυφαινολών. Οι βασικές φαινολικές ενώσεις που ανιχνεύονται στον λοβό του χαρουπιού (με εφαρμογή HPLC) κατατάσσονται στα φαινολικά οξέα, στις ταννίνες και στα φλαβονοειδή (Clodoneo, Crupi, Muraglia, & Corbo, 2022). Σε πειράματα επιταχυνόμενης φθοράς με χρήση θειογλυκολικού οξέος ή υδροχλωρικού οξέος στον πολτό του χαρουπιού ανιχνεύτηκαν πολυμερή των υπομονάδων φλαβαν-3-όλης και φλαβαν-3,4-διόλης όπως οι (+)-κατεχίνη, (-)-επικατεχίνη γαλλικού εστέρα, (-)-επιγαλλοκατεχίνη γαλλικού εστέρα και (-)-επιγαλλοκατεχίνη. Σε εκχύλιση με νερό εντοπίστηκαν το γαλλικό οξύ (σε μεγαλύτερη ποσότητα), η (-)-επιγαλλοκατεχίνη, η (+)-κατεχίνη, η (-)-επικατεχίνη γαλλικού εστέρα και η (-)-επιγαλλοκατεχίνη γαλλικού εστέρα. Ενώ, σε εκχύλιση με μεθανόλη (90%) και οξικό οξύ (0.5%) ανιχνεύτηκαν, επιπλέον, γλυκοζίτες της κουερσετίνης και ελλαγικό οξύ (Owen et al., 2003).



Εικόνα 3: Κύριες πολυφαινόλες που ανιχνεύονται στο χαρούπι. Πηγές: (Clodoveo et al., 2022; Ikram et al., 2023; Owen et al., 2003; Stavrou, Christou, & Kapnissi-Christodoulou, 2018)

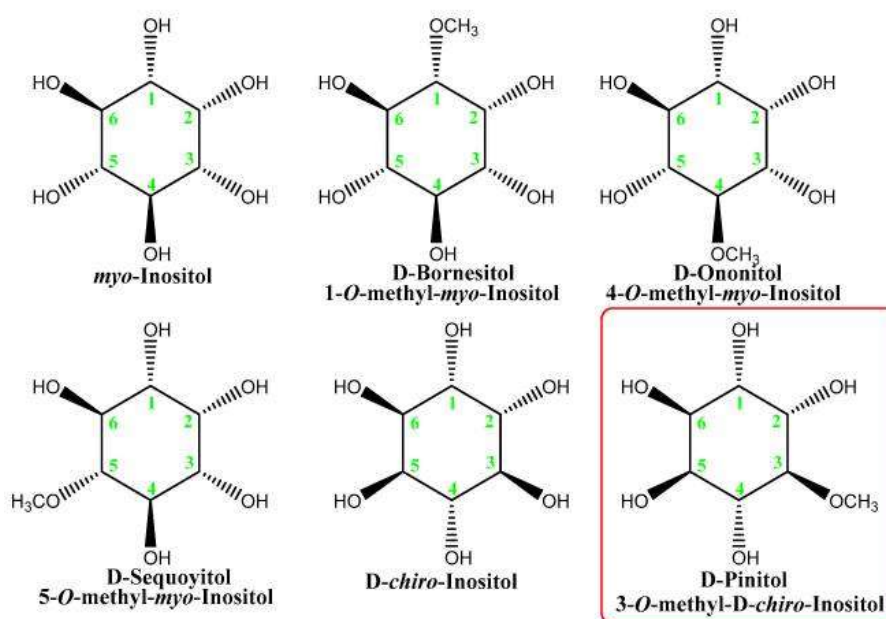


Διάγραμμα 1: Σύγκριση του φαινολικού περιεχομένου εκχυλισμάτων χαρουπιού ανάλογα με τη μέθοδο εκχύλισης που ακολουθήθηκε. Τα σύμβολα W, M, AW, AA απεικονίζουν αντίστοιχα τη χρήση νερού, μεθανόλης, ακετόνης-νερού και οξικής ακετόνης, ως μέσα εκχύλισης. Πηγή: (Goulas & Georgiou, 2020).

2.2.2 Ινοσιτόλες, D-πινιτόλη

Εκτός από τα κύρια σάκχαρα (σακχαρόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη), ο λοβός χαρουπιού περιέχει χαμηλή συγκέντρωση και άλλων σακχάρων όπως μαλτόζη, ραφινόζη, σταχυόζη, βερμπα-σκόζη, ξυλόζη, ινοσιτόλες και άλλα. Οι ινοσιτόλες είναι φυσικές πολυόλες, στερεοϊσομερή του εξαυδροξύ κυκλοεξανίου με τον εμπειρικό τύπο $C_6H_{12}O_6$ (Azab, 2022). Υπάρχουν 9 στερεοϊσομερή της ινοσιτόλης, αλλά μόνο 5 απαντώνται στην φύση (Nasar-Abbas et al., 2016). Από το χαρούπι, απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν έξι ινοσιτόλες και παράγωγά τους (μεθυλαιθέρες) (Εικόνα 4). Η μυο-ινοσιτόλη και η D-πινιτόλη είναι οι πιο συχνά εμφανιζόμενες στους φυτικούς ιστούς. Η D-

πινιτόλη είναι ένα βιοδραστικό συστατικό των φυτικών ιστών και συναντάται σε υψηλή περιεκτικότητα στους λοβούς των χαρουπιών σε σχέση με άλλες φυτικές πηγές (Azab, 2022; Nasar-Abbas et al., 2016).



Εικόνα 4: Οι ινοσιτόλες και μεθυλαιθέρες που απομονώθηκαν από τον καρπό του χαρουπιού. Πηγή: (Azab, 2022)

Πίνακας 5: Οφέλη στην υγεία των βιοδραστικών συστατικών που περιλαμβάνονται στα διάφορα μέρη του χαρουπιού. Πηγή: (Ikram et al., 2023)

Βιοδραστικές ενώσεις	Οφέλη στην υγεία	Πηγή
Πολυφαινόλες, γαλλικό οξύ, επιγαλλοκατεχίνη, κατεχίνη, κουερσετίνη, μυρικετίνη και ρουτίνη	Αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη, αντικαρκινική και αντιβακτηριδιακή δράση και αποτελεσματικό σε νευρογενετικές διαταραχές	Πολτός χαρουπιού, ίνες χαρουπιού, λοβός χαρουπιού και εκχύλισμα σπόρων χαρουπιού
D-πινιτόλη	Αντικαρκινική και αντιδιαβητική δράση	Εκχύλισμα πολτού χαρουπιού
Ταννίνες	Αντιδιαρροϊκή δράση	Χυμός από καρπούς χαρουπιού
Κινναμωμικό οξύ	Αντιοξειδωτική και ηπατοπροστατευτική δράση	Χυμός από τον καρπό χαρουπιού
Γαλακτομαννάνη	Αποτελεσματικό στην γαστρεντερική υγεία	Ενδοσπέρμιο λοβού χαρουπιού
Χλωρογενικό οξύ και επικατεχίνη	Μειώνει την εντερική απορρόφηση γλυκόζης και τις καθαρτικές δραστηριότητες	Σπόροι χαρουπιού
Γλυκοζίτες της φλαβονόλης	Αυξημένος μεταβολισμός λιπιδίων και μείωση του επιπέδου LDL χοληστερόλης	Εκχύλισμα πολτού χαρουπιού

2.3 Μέθοδοι ποσοτικοποίησης φαινολικών ενώσεων

Η ποσοτικοποίηση των φαινολικών ενώσεων είναι μια αρκετά δύσκολη διαδικασία, αλλά πολύ σημαντική στη βιομηχανία τροφίμων και τη φαρμακοβιομηχανία, λόγω των ευεργετικών επιδράσεων αυτών των ενώσεων στην υγεία του ανθρώπου. Οι κύριες τεχνικές που χρησιμοποιούνται για αυτόν τον σκοπό είναι τεχνικές χρωματογραφίας και φασματοφωτομετρίας. Από τις χρωματογραφικές τεχνικές οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες είναι η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) και η αέρια χρωματογραφία (GC) (Khoddami, Wilkes, & Roberts, 2013).

2.3.1 Αέρια χρωματογραφία (GC)

Ένας συχνά χρησιμοποιούμενος τύπος χρωματογραφίας, που χρησιμοποιείται στην αναλυτική χημεία, είναι η αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography, GC), με την οποία γίνεται διαχωρισμός και ανάλυση ενώσεων που μπορούν να εξατμιστούν χωρίς να προκληθεί αποσύνθεση (Μπρατάκος, 2021). Οι φαινολικές ενώσεις μπορούν να διαχωριστούν, να ταυτοποιηθούν και να ποσοτικοποιηθούν με αέρια χρωματογραφία. Τα βασικά βήματα εφαρμογής τη GC είναι η επιλογή κατάλληλης στήλης διαχωρισμού, η σωστή προετοιμασία του δείγματος και η εισαγωγή του δείγματος στην κεφαλή της στήλης με τον κατάλληλο τρόπο. Για την ανάλυση των φαινολικών ενώσεων των τροφίμων είναι απαραίτητο να γίνει καθαρισμός του δείγματος (πχ απομάκρυνση λιπιδίων από το εκχύλισμα) και απελευθέρωση των φαινολικών από τους γλυκοζιτικούς και εστερικούς δεσμούς με χρήση ενζυμικών, αλκαλικών και όξινων χημικών μέσων, με σκοπό τον μετασχηματισμό τους σε περισσότερο πτητικά παράγωγα. Υπάρχουν διάφορα είδη αντιδραστηρίων τα οποία χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία και τροποποίηση πτητικών παραγώγων, όπως ο χλωρομυρμηκικός αιθυλεστέρας και μεθυλεστέρας, το διαζωμεθάνιο και το διμεθυλοσουλφοξείδιο σε συνδυασμό με τον ιωδικό μεθυλεστέρα αλλά και ενώσεις της οικογένειας τριμεθυλοσουλίου. Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη στήλη είναι τριχοειδής στήλη μήκους 30 m από τηγμένο διοξείδιο του πυριτίου με εσωτερική διάμετρο 25-32μm και μέγεθος σωματιδίων στατικής φάσης 0,25μm. Η εφαρμογή της GC παρέχει μεγαλύτερη ευαισθησία και εκλεκτικότητα σε συνδυασμό με τη φασματομετρία μάζας (MS) (Khoddami et al., 2013).

2.3.2 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Η υγρή χρωματογραφία (LC) αποτελεί μία από τις πιο διαδεδομένες και ισχυρές χρωματογραφικές μεθόδους διαχωρισμού και ανάλυσης σύνθετων μειγμάτων, η οποία εφαρμόζεται σε ποικίλους τομείς (τεχνολογία τροφίμων, ιατρική, φαρμακευτική κλπ.) και περιλαμβάνει όλα τα είδη χρωματογραφίας που ως κινητή φάση χρησιμοποιούν ένα υγρό. Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) είναι μια βελτιωμένη μορφή της υγρής χρωματογραφίας στήλης. Με την HPLC μπορεί να αναλυθεί οποιαδήποτε ένωση διαλύεται σε ένα υγρό και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως κινητή φάση, ανεξαρτήτως του μεγέθους των σωματιδίων. Αυτό οφείλεται στη χρήση

αντλίας η οποία αναγκάζει το υγρό να διέλθει στην κινητή φάση, ώστε να γίνει ο διαχωρισμός των συστατικών του μείγματος (Μπρατάκος, 2021).

Η HPLC είναι μία προτιμώμενη τεχνική τόσο για τον διαχωρισμό όσο και για τον ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολικών ενώσεων. Ωστόσο, διάφοροι παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν την ανάλυση των φαινολικών ενώσεων με HPLC, όπως ο κατάλληλος καθαρισμός του δείγματος και η επιλογή του κατάλληλου μέσου έκλουσης (κινητή φάση), τύπου της στήλης (στατική φάση), αλλά και του ανιχνευτή. Ο καθαρισμός του δείγματος (αφαίρεση ανεπιθύμητων ενώσεων από το ακατέργαστο εκχύλισμα) είναι μια χρονοβόρα και επίπονη διαδικασία η οποία περιλαμβάνει πληθώρα σταδίων, όπως εκχύλιση στερεάς φάσης, φυγοκέντρηση, λυοφιλίωση, διήθηση κλπ. (Μπρατάκος, 2021).

Στον ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολικών ενώσεων με HPLC ως κινητές φάσεις χρησιμοποιούνται, συνηθέστερα, ακετονιτρίλιο και μεθανόλη (ή οι υδατικές τους μορφές) και η έκλυση γίνεται με βαθμίδωση. Σε ορισμένες περιπτώσεις, έχουν χρησιμοποιηθεί αιθανόλη, τετραϋδροφουράνιο (THF) και 2-προπανόλη. Ιδιαίτερη σημασία πρέπει να δίνεται, επίσης, στη διατήρηση του pH της κινητής φάσης (επιθυμητή περιοχή pH 2–4) για να αποφευχθεί ο ιονισμός των φαινολικών ενώσεων κατά την ταυτοποίηση. Για τη ρύθμιση και διατήρηση του pH χρησιμοποιείται κυρίως οξικό οξύ, αλλά και μυρμηκικά και φωσφορικά οξέα ή ρυθμιστικά διαλύματα φωσφορικού, κιτρικού και οξικού αμμωνίου (σε χαμηλά αρχικά pH) (Khoddami et al., 2013).

Όσον αφορά την επιλογή στήλης για τον προσδιορισμό των φαινολικών ενώσεων, με βάση την πολικότητα, μπορούν να ανιχνευθούν διαφορετικές κατηγορίες φαινολικών χρησιμοποιώντας στήλη κανονικής φάσης C18 ή αντίστροφης φάσης C18 (RP-C18) μήκους 10–30 cm, εσωτερικής διαμέτρου 3,9–4,6 mm και μεγέθους σωματιδίων 3–10 μm. Ωστόσο, νέοι τύποι στηλών (μονολιθικές και επιφανειακά πορώδεις στήλες σωματιδίων) με 3–25 cm μήκος, 1–4,6 mm εσωτερική διάμετρος και 1,7–10 μm μέγεθος σωματιδίων χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση φαινολών με προηγμένες τεχνικές HPLC, όπως η UHPLC (υγρή χρωματογραφία υπερ-ψηλής απόδοσης), HTLC (υγρή χρωματογραφία υψηλής θερμοκρασίας) και δισδιάστατη υγρή χρωματογραφία (LC × LC). Οι περισσότερες αναλύσεις HPLC φαινολικών ουσιών διεξάγονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος στήλης, ωστόσο έχουν προταθεί υψηλότερες θερμοκρασίες (φτάνουν τους 120°C) λόγω εφαρμογής νέων στηλών και οργάνων. Ο χρόνος λειτουργίας HPLC είναι ένας ακόμα παράγοντας που επηρεάζει την ανίχνευση των φαινολικών και μπορεί να κυμαίνεται από 10 έως 150 λεπτά (Khoddami et al., 2013).

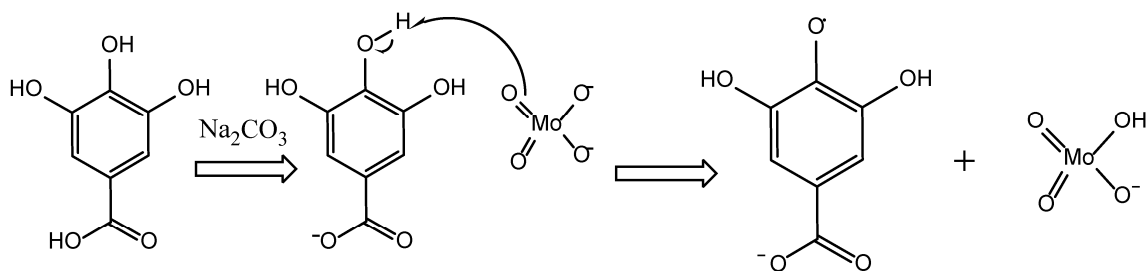
Για τον εντοπισμό των φαινολικών ενώσεων χρησιμοποιούνται συνήθως ανιχνευτές UV-Vis και συστοιχία φωτοδιοδίων (PDA) με μήκη κύματος 190–380 nm, αλλά και ανιχνευτές φθορισμού (FLD), χρωματομετρικές συστοιχίες και συστοιχίες φωτοδιοδίων σε συνδιασμό με φθορισμό. Επίσης, για δομικό χαρακτηρισμό και επιβεβαίωση διαφορετικών φαινολικών τάξεων έχουν

χρησιμοποιηθεί ανιχνευτές φασματομετρίας μαζών (MS) προσαρτημένοι σε υγρό χρωματογράφο υψηλής απόδοσης (HPLC–MS). Το HPLC σε συνδυασμό με ανιχνευτές MS είναι εξαιρετικά ευαίσθητο και έχει τη δύναμη να επιτύχει υψηλή εξειδίκευση λόγω της ικανότητας προσδιορισμού της μάζας (μοριακό βάρος) ενός μορίου (Khoddami et al., 2013).

Άλλες χρωματογραφικές τεχνικές που έχουν χρησιμοποιηθεί για τον εντοπισμό βιοδραστικών ενώσεων σε νέες πηγές φυσικών προϊόντων είναι η HPLC–NMR, η υγρή χρωματογραφία υπερ-ψηλής απόδοσης (UHPLC), η υγρή χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης (HILIC), καθώς και η δισδιάστατη υγρή χρωματογραφία (LC x LC) (Khoddami et al., 2013).

2.3.3 Φασματοφωτομετρία ορατού-υπεριώδους - Μέθοδος Folin-Ciocalteu

Η φασματοφωτομετρία είναι μια από τις σχετικά απλές τεχνικές για τον ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολικών ενώσεων των φυτών. Μία συχνά χρησιμοποιούμενη φασματοφωτομετρική δοκιμασία για τη μέτρηση των συνολικών φαινολικών ενώσεων σε φυτικά δείγματα είναι η μέθοδος Folin-Ciocalteu (F-C). Το αντιδραστήριο F-C είναι ένα μείγμα αλάτων μολυβδαινίου (Mo) και βολφραμίου (W) το οποίο αντιδρά με φαινόλες και μη φαινολικές αναγωγικές ουσίες (πχ ασκορβικό οξύ, αρωματικές αμίνες και σάκχαρα) και σχηματίζει χρωμογόνες ομάδες (Lamuela-Raventós, 2018). Όταν το μείγμα βρίσκεται σε αλκαλικό περιβάλλον οι φαινολικές ενώσεις οξειδώνονται και το αντιδραστήριο F-C ανάγεται προς οξείδια, αυτά τα προϊόντα της αντίδρασης έχουν χαρακτηριστικό μπλε χρώμα με ευρύ φάσμα απορρόφησης φωτός γύρω στα 760 nm (Khoddami et al., 2013). Η ένταση αυτού του κυανού χρωματισμού είναι ανάλογη του φαινολικού περιεχομένου του εξεταζόμενου δείγματος και μετριέται με τη βοήθεια φασματοφωτομέτρου. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του ολικού φαινολικού περιεχομένου του δείγματος, σύμφωνα με τη συγκεκριμένη μέθοδο, γίνεται χρήση πρότυπης καμπύλης αναφοράς και η συγκέντρωση εκφράζεται σε ισοδύναμα ενός επιλεγμένου πρότυπου διαλύματος (συνήθως γαλλικού οξέος) ανά L ή g δείγματος (Lamuela-Raventós, 2018).



Εικόνα 5: Αντίδραση του γαλλικού οξέος με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu. Πηγή: (Christodoulou et al., 2022)

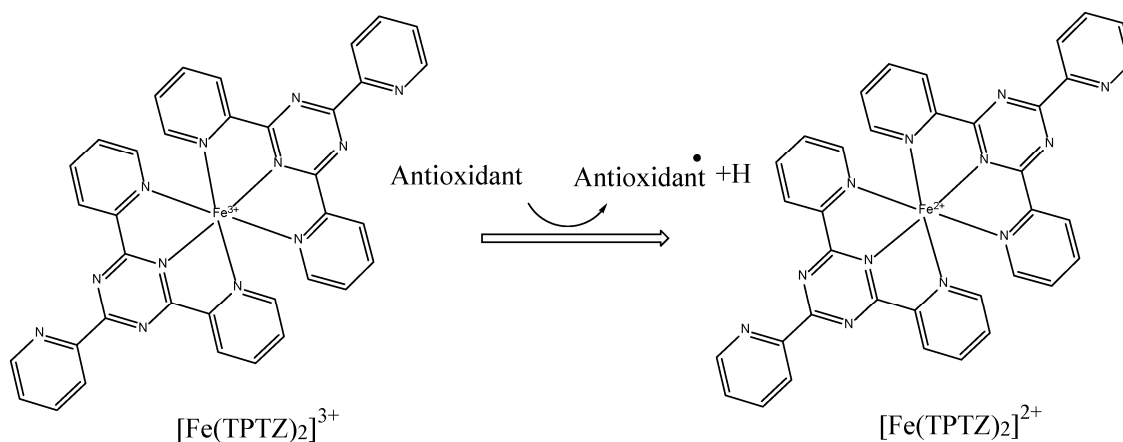
2.4 Μέθοδοι προσδιορισμού αντιοξειδωτικής δράσης

Για να μπορέσει να γίνει αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης διαφόρων φυσικών προϊόντων, χρειάζεται να πραγματοποιηθούν πολλές *in vitro* δοκιμές με διαφορετικούς μηχανισμούς, λαμβάνοντας υπόψιν τις αντιδράσεις οξείδωσης που γίνονται στα τρόφιμα. Για τη μέτρηση

της συνολικής αντιοξειδωτικής δράσης μιας ένωσης ή μείγματος ενώσεων χρησιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι όπως οι FRAP, SET, ORAC, CUPRAC, ABTS, DPPH κλπ. (Rodríguez-Solana et al., 2021).

2.4.1 FRAP

Η μέθοδος FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) είναι μια απλή και γρήγορη φασματοφωτομετρική μέθοδος με την οποία γίνεται υπολογισμός της συνολικής αντιοξειδωτικής δράσης (αναγωγικής ικανότητας) ενός δείγματος. Η μέθοδος είναι βασισμένη στο SET (Single Electron Transfer) και μετράει την αναγωγή του συμπλόκου ιόντων σιδήρου (Fe^{3+}) στο έντονα μπλε σύμπλοκο σιδήρου (Fe^{2+}) λόγω παρουσίας αντιοξειδωτικών σε όξινο περιβάλλον. Η αντιοξειδωτική δράση προσδιορίζεται ως αύξηση της απορρόφησης στα 593 nm και τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μικρομοριακά ισοδύναμα του Fe^{2+} ή σε σχέση με ένα τυπικό αντιοξειδωτικό. Σε αντίθεση με άλλες μεθόδους που βασίζονται σε SET, η δοκιμή FRAP πραγματοποιείται σε όξινες συνθήκες pH (pH = 3,6) για τη διατήρηση της διαλυτότητας του σιδήρου. Η αντίδραση σε χαμηλό pH μειώνει το δυναμικό ιονισμού που οδηγεί σε μεταφορά ηλεκτρονίων και αυξάνει το δυναμικό οξειδοαναγωγής, προκαλώντας μια μετατόπιση στον κυρίαρχο μηχανισμό αντίδρασης. Στη δοκιμή FRAP χρησιμοποιείται συνήθως 2,4,6-τρι-(2-πυριδυλ)-τριαζίνη (TPTZ) ως συνδετική ένωση με το ιόν σιδήρου (Fe^{3+} -TPTZ), ωστόσο έχουν χρησιμοποιηθεί και άλλες ενώσεις, όπως η φερροζίνη για την αξιολόγηση της αναγωγικής ισχύος του ασκορβικού οξέος (Munteanu & Apetrei, 2021).



Εικόνα 6: Αναγωγικός μηχανισμός FRAP παρουσία αντιοξειδωτικής ουσίας. Πηγή: (Christodoulou et al., 2022)

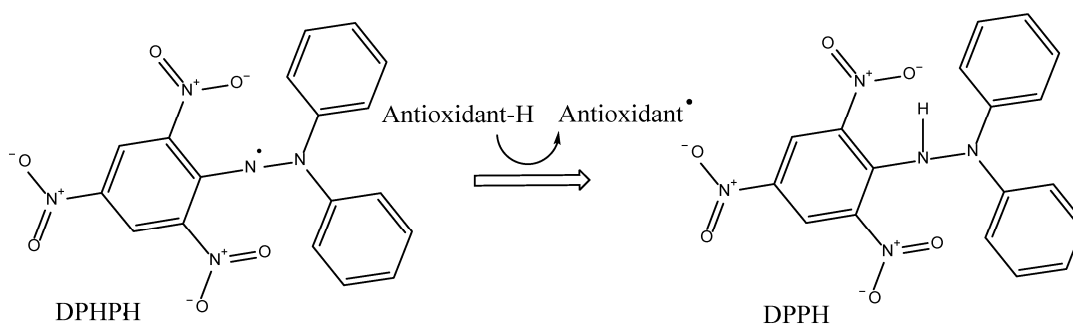
2.4.2 DPPH

Η DPPH είναι μία απλή, φθηνή και γρήγορη μέθοδος και από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης (δέσμευση ελεύθερων ριζών) ενός δείγματος. Η ρίζα DPPH (2,2-διφαινυλ-1-πικρυλυδραζύλιο) είναι μία σταθερή οργανική ρίζα αζώτου με σκούρο μωβ χρώμα, η οποία παρουσία ουσίας με αντιοξειδωτική δράση ανάγεται στην 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (DPPH-H) που έχει κίτρινο χρώμα, λόγω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου (ή ηλεκτρονίου) (Christodoulou et al., 2022). Για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση το μείγμα

αφήνεται σε σκοτεινό μέρος για περίπου 30 λεπτά. Η ρίζα DPPH (μωβ) απορροφά στα 520 nm και η αναγωγή της σε DPPH-H (κίτρινη) έχει ως αποτέλεσμα της ελάττωση της οπτικής απορρόφησης. Η αλλαγή αυτή της απορρόφησης παρακολουθείται με χρήση φασματοφωτόμετρου, ώστε να υπολογιστεί η αντιοξειδωτική δράση του εξεταζόμενου δείγματος. Η ρίζα DPPH μπορεί να διαλυθεί σε αρκετούς οργανικούς διαλύτες, αλλά δεν μπορεί να διαλυθεί στο νερό. Για τη διάλυσή της χρησιμοποιούνται τυπικά μεθανόλη, αιθανόλη ή υδατικά μείγματα αυτών των ενώσεων (η ποσότητα νερού δεν πρέπει να υπερβαίνει το 60% του μείγματος) (Christodoulou et al., 2022). Για τον υπολογισμό του ποσοστού αναγωγής (εξουδετέρωσης) τη ρίζας DPPH χρησιμοποιείται ο τύπος:

$$\text{αναστολή (\%)} = (\text{Απορρόφηση Control} - \text{Απορρόφηση δείγματος} / \text{Απορρόφηση Control}) \times 100$$

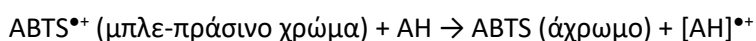
Η DPPH έχει χρησιμοποιηθεί σε πολλές μελέτες για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής δράσης κοινών αντιοξειδωτικών όπως ασκορβικό οξύ, BHT, γαλλικός προπυλεστέρας, φλαβονοειδή, πεπτίδια και φαινολικά οξέα. Ακόμη και με αδύναμα αντιοξειδωτικά, η περίοδος καθαρισμού των ριζών των 30 λεπτών επιτρέπει στην DPPH να αντιδράσει αποτελεσματικά. Για να αποφευχθεί η πιθανότητα θερμικής καταστροφής των ενώσεων που εξετάζονται, η αντιοξειδωτική δράση αξιολογείται σε θερμοκρασία δωματίου (Christodoulou et al., 2022).



Εικόνα 7: Θεωρητικός μηχανισμός μεθόδου DPPH με παρουσία αντιοξειδωτικού. Πηγή: (Christodoulou et al., 2022)

2.4.3 ABTS

Η μέθοδος ABTS είναι μια γρήγορη και εύκολη, ευρέως γνωστή δοκιμή, για τη μέτρηση της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας ενός δείγματος, πρόσφατα ανεπτυγμένη από τους Miller et al (1993). Στη μέθοδο αυτή αξιολογείται η αντιριζική ισχύ των ουσιών που εξετάζονται μέσω της χρήσης της ρίζας ABTS^{•+} [2,2'-αζινο-δισ(3-αιθυλοβεζοθειαζολινο-6-σουλφονικό οξύ)]. Η ρίζα ABTS^{•+}, που έχει χρώμα μπλε-πράσινο, εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση στα 734nm και σχηματίζεται μέσω της οξείδωσης του μη ριζικού μορίου ABTS με υπερθειικό κάλιο ή νάτριο. Η παρουσία αντιοξειδωτικών που είναι δότες υδρογόνου, μειώνουν ποσοτικά τη ρίζα ABTS^{•+}, ανάλογα με τη δραστηριότητά τους, τη συγκέντρωσή τους και τη διάρκεια της αντίδρασης. Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να εξουδετερώσουν τη μονοκατιοντική ρίζα ABTS^{•+} είτε με μεταφορά υδρογόνου είτε με μεταφορά ηλεκτρονίου, σύμφωνα με τις εξής αντιδράσεις:



ABTS^{•+} (μπλε-πράσινο χρώμα) + AH → ABTS-H (άχρωμο) + A[•]

Με τη μέθοδο αυτή αξιολογούνται με ακρίβεια οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί σε διατροφικά συστατικά σε ένα ευρύ φάσμα pH τόσο σε λιπόφιλες όσο και σε υδρόφιλες ενώσεις στο νερό και σε οργανικούς διαλύτες. Η συγκέντρωση των δειγμάτων (δραστικότητα των δειγμάτων απέναντι στη ρίζα ABTS^{•+}) εκφράζεται σε ισοδύναμα της πρότυπης ουσίας Trolox (TE, Trolox Equivalents), μέσω της πρότυπης καμπύλης αναφοράς.

2.5 Ζύμωση

Από την αρχαιότητα κοινωνίες σε όλο το κόσμο χρησιμοποιούσαν τη ζύμωση των τροφίμων ως φθινό μέσο συντήρησης, βελτίωσης της θρεπτικής αξίας και ενίσχυσης των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του τροφίμου. Στοιχεία από αγγειογραφίες, στην Κίνα, τα οποία απεικονίζουν τρόφιμα, όπως ρύζι, μέλι και ροφήματα φρούτων, που έχουν υποστεί ζύμωση, χρονολογούνται από το 7000 π.Χ. (Marsh, Hill, Ross, & Cotter, 2014). Η διαπίστωση, όμως, ότι οι μικροοργανισμοί είναι υπεύθυνοι για τη ζύμωση έγινε στα τέλη του περασμένου αιώνα (Κοτζεκίδου - Ρούκα, 2009). Υπάρχουν διάφορα είδη ζυμώσεων ανάλογα με τους μικροοργανισμούς που χρησιμοποιούνται και τα προϊόντα που παράγονται: αλκοολική ζύμωση, γαλακτική ζύμωση, οξική ζύμωση και μηλογαλακτική ζύμωση.

2.5.1 Αλκοολική ζύμωση

Η αλκοολική ζύμωση αποτελεί μία από τις παλαιότερες και πιο σημαντικές, από οικονομική άποψη, βιοτεχνολογίες. Η ζύμωση πραγματοποιείται με χρήση ζυμομυκίων (κυρίως στελεχών του είδους *Saccharomyces cerevisiae*) και οι κύριες πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται ως πηγή σακχάρων είναι άμυλα δημητριακών (βύνη κριθαριού, σιτάρι κλπ.), φυτά πλούσια σε σακχαρόζη (μελάσα, σιρόπι ζάχαρης κλπ.) και φρούτα (σταφύλι, ρόδι κλπ.). Η επιλογή των κατάλληλων στελεχών ζύμης στην ποτοποιία είναι απαραίτητη για τη μεγιστοποίηση της απόδοσης αλκοόλης και για τη διατήρηση της οργανοληπτικής ποιότητας του ποτού. Το είδος ζύμης που κυριαρχεί στην παραγωγή αλκοολούχων ποτών παγκοσμίως είναι ο *Saccharomyces cerevisiae*. Σε ζυμώσεις μεγάλης κλίμακας, όπως στη ζυθοποιία, την οινοποίηση και την παραγωγή αποστάγματος, χρησιμοποιούνται συνήθως καθαρές καλλιέργειες επιλεγμένων στελεχών *S. cerevisiae*. Σε μικρότερης κλίμακας διεργασίες, είναι επιτρεπτή η πραγματοποίηση αυθόρμητων ζυμώσεων που βασίζονται στη γηγενή μικροβιολογική χλωρίδα (άγριες ζύμες και βακτήρια) που υπάρχει στην πρώτη ύλη και στις εγκαταστάσεις παραγωγής (Walker & Stewart, 2016).

2.5.2 Αλκοολική ζύμωση με χρήση του *Saccharomyces cerevisiae*

Ο *Saccharomyces cerevisiae*, όπως όλοι οι ζυμομύκητες, είναι μονοκύτταρος μύκητας που έχει παρόμοια δομικά χαρακτηριστικά με αυτά των ανώτερων ευκαρυωτικών κυττάρων (κυτταρικό

τοίχωμα, πυρήνα, μιτοχόνδρια, ενδοπλασματικό δίκτυο, συσκευή Golgi, κενοτόπια, μικροσώματα κλπ.)(Walker & Stewart, 2016).

Για την ανάπτυξή του απαιτεί υψηλή ποσότητα διαθέσιμου νερού (ελάχιστη τιμή aw περίπου 0,65). Κατά τη ζύμωση προϊόντων υψηλής περιεκτικότητας σε ζάχαρη ο ζυμομύκητας μπορεί να υποβληθεί σε οσμωτικό στρες, λόγω μειωμένης διαθεσιμότητας νερού. Αυτό συναντάται συχνά στη ζυθοποιία, στις ζυμώσεις πολύ υψηλής βαρύτητας (VHG, Very High Gravity) και στην παραγωγή ουίσκι. Τα κύτταρα των ζυμομυκήτων έχουν την ικανότητα να επιβιώσουν σε συνθήκες αρκετά χαμηλής ενεργότητας νερού παράγοντας μεγάλη ποσότητα γλυκερόλης ή άλλους οσμολίτες, όπως η τρεαλόζη, που προστατεύουν τις μεμβράνες της ζύμης από την ξήρανση. Αυτές οι «συμβατές» ουσίες μπορούν να αντικαταστήσουν το διαθέσιμο νερό στο εσωτερικό του κυττάρου, να αποκαταστήσουν τον όγκο του και να επιτρέψουν την επανέναρξη των μεταβολικών αντιδράσεων της ζύμης. Ωστόσο, η μεγάλη ποσότητα γλυκερίνης είναι πιθανό να μειώσει την απόδοση αιθανόλης, σε ζυμώσεις υψηλής βαρύτητας (Walker & Stewart, 2016).

Οι ζύμες ευδοκούν σε θερμά και όξινα περιβάλλοντα, με τα περισσότερα στελέχη *S.cerevisiae* να αναπτύσσονται καλύτερα μεταξύ 20 και 30 °C και pH 4,5 και 6,5. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης οι ζύμες οξινίζουν το περιβάλλον που αναπτύσσονται μέσω μίας σειράς αντιδράσεων, έκκρισης πρωτονίων κατά τη μεταφορά θρεπτικών συστατικών, άμεσης έκκρισης οργανικών οξέων, απομάκρυνση ρυθμιστικών παραγόντων και παραγωγής διοξειδίου του άνθρακα (CO₂) (Walker & Stewart, 2016).

Ο *S. cerevisiae* αναφέρεται συχνά ως προαιρετικά αναερόβιος, διότι δεν μπορεί να αναπτυχθεί σε αυστηρά αναερόβιες συνθήκες. Αυτό οφείλεται στην απαίτηση οξυγόνου για τη βιοσύνθεση λιπαρών οξέων και στερόλης, απαραίτητα συστατικά για την αύξηση του κυττάρου. Επομένως, για να είναι αποτελεσματική μία ζύμωση με τον *Saccharomyces cerevisiae* είναι απαραίτητη η παρουσία οξυγόνου. Εναλλακτικά, μπορούν να προστεθούν στο υπόστρωμα στην αρχή της ζύμωσης αυξητικοί παράγοντες στερόλης και λιπαρά οξέα (Walker & Stewart, 2016).

Για την παραγωγή αλκοολούχων ποτών από το *S. cerevisiae*, η θρεπτική σύνθεση του μέσου ζύμωσης είναι βασικός παράγοντας για την ανάπτυξη και το μεταβολισμό της ζύμης, αλλά και την ποιότητα του τελικού προϊόντος. Εκτός από πηγή σακχάρων και νερού οι ζυμομύκητες απαιτούν, άλατα αμμωνίου, ανόργανα ιόντα και μερικούς αυξητικούς παράγοντες. Συγκεκριμένα, τα μακροθρεπτικά συστατικά πρέπει να παρέχονται σε χιλιοστογραμμομοριακές συγκεντρώσεις και περιλαμβάνουν πηγές άνθρακα (σάκχαρα), ελεύθερο αμινο άζωτο (αμινοξέα, μικρά πεπτίδια και άλατα αμμωνίου), οξυγόνο, θείο, φώσφορο, κάλιο και μαγνήσιο. Ενώ, τα μικροθρεπτικά συστατικά χρειάζονται σε μικρομοριακές συγκεντρώσεις και περιλαμβάνουν ιχνοστοιχεία όπως το ασβέστιο, ο χαλκός, ο σίδηρος, το μαγγάνιο και ο ψευδάργυρος. Τα σύνθετα μέσα ζύμωσης που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή αλκοολούχων ποτών (πχ βύνη, μελάσα, γλεύκος κρασιού) συνήθως

περιέχουν επαρκή επίπεδα ανόργανων ιόντων και αυξητικών παραγόντων για την ανάπτυξη της ζύμης, αλλά υπάρχουν περιπτώσεις όπου η συμπλήρωση με πρόσθετα μέταλλα είναι απαραίτητη (Walker & Stewart, 2016).

Ο *S. cerevisiae* μπορεί εύκολα να ζυμώσει γλυκόζη, φρουκτόζη, μαννόζη, γαλακτόζη, σακχαρόζη, μαλτόζη και μαλτοτριόζη και να παράγει αιθανόλη. Για την παραγωγή ενέργειας οι ζυμομύκητες υπόκεινται στη μεταβολική πορεία της γλυκόλυσης. Η γλυκόλυση είναι η αλληλουχία των αντιδράσεων μετατροπής της γλυκόζης σε πυροσταφυλικό οξύ με τη βοήθεια ενζύμων (Walker & Stewart, 2016). Κάποια βασικά σημεία της γλυκόλυσης αποτελούν: η γλυκόζη με διάσπαση του ATP μετατρέπεται σε γλυκόζη-6P, η οποία ισομεριώνεται και φωσφορυλιώνεται και σχηματίζονται 1,6-διφωσφορική φρουκτόζη και 2 μόρια ADP. Στη συνέχεια, η 1,6-διφωσφορική φρουκτόζη διασπάται από την αλδολάση (χαρακτηριστικό ένζυμο γλυκόλυσης) για να σχηματιστούν δύο φωσφορυλιωμένες τριόζες. Με αναγωγή του NAD γίνεται οξείδωση της 3P-γλυκεριναλδεΐδης και ακολουθεί φωσφορυλίωση του υποστρώματος και σχηματισμός του 1,3-φωσφογλυκερικού οξέος. Ο ένας φωσφοεστερικός δεσμός του μορίου (1,3-φωσφογλυκερικό οξύ) μεταφέρεται στο ADP. Έπειτα, σχηματίζεται το φωσφοενολοπυροσταφυλικό οξύ με ισομερίωση και αφυδάτωση του 3P-γλυκερικού οξέος. Τέλος, γίνεται μεταφορά του φωσφοεστερικού δεσμού του φωσφοενολοπυροσταφυλικού οξέος στο ADP και σχηματίζονται 2 μόρια πυροσταφυλικού οξέος και 2 μόρια ATP. Επομένως, με την αποικοδόμηση ενός μορίου γλυκόζης σχηματίζονται 2 μόρια πυροσταφυλικού οξέος, 2 μόρια ATP και ταυτόχρονα ανάγονται 2 μόρια NAD⁺ σε NADH (Σπηλιώτης & Μπατρίνου, 2014). Σύνομα γραμμένη είναι:



Για να ακολουθήσει η ζύμη τη μεταβολική πορεία της αλκοολικής ζύμωσης θα πρέπει να επικρατούν αναερόβιες συνθήκες. Κατά την αλκοολική ζύμωση το πυροσταφυλικό οξύ αποκαρβοξυλιώνεται και σχηματίζονται ακεταλδεΐδη και διοξείδιο του άνθρακα (CO₂). Ύστερα, η ακεταλδεΐδη ανάγεται με τη βοήθεια της αλκοολικής αφυδρογονάσης και σχηματίζεται αιθυλική αλκοόλη (Σπηλιώτης & Μπατρίνου, 2014). Η αναλυτική πορεία φαίνεται στην Εικόνα 9.

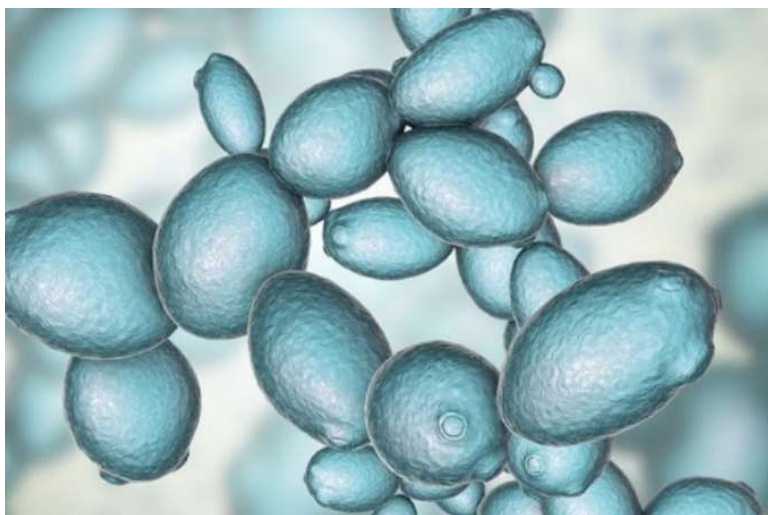
Εκτός από αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα παράγονται και δευτερογενείς μεταβολίτες κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του *S. cerevisiae*, σε αυτούς περιλαμβάνονται ανώτερες αλκοόλες, πολυόλες, εστέρες, οργανικά οξέα, γειτονικές δικετόνες και αλδεΐδες. Αυτοί οι μεταβολίτες, αν και παράγονται από ζυμομύκητες σε πολύ χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε σύγκριση με την αιθανόλη και το διοξείδιο του άνθρακα, παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη δημιουργία του αρώματος των αλκοολούχων ποτών (Walker & Stewart, 2016).

Δύο από τους βασικότερους δευτερογενείς μεταβολίτες είναι η γλυκερίνη και το ηλεκτρικό οξύ. Μετά την αιθανόλη και το CO₂, ο μεταβολίτης με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση στο κρασί είναι η γλυκερίνη. Το ηλεκτρικό οξύ παράγεται από τον *S. cerevisiae* είτε από τον κύκλο του

κιτρικού οξέος (κύκλος Krebs) είτε από οξειδωτική απαμίνωση του γλουταμινικού, το οποίο μετατρέπεται σε α-κετογλουταρικό και αποκαρβοξυλιώνεται σε ηλεκτρική αλδεΐδη, η οποία οξειδώνεται σε ηλεκτρικό οξύ (Walker & Stewart, 2016) .

Όσον αφορά τους εστέρες, αυτές οι ενώσεις αντιπροσωπεύουν μια πολύ σημαντική ομάδα ενεργών γευστικών ενώσεων που γενικά καταλήγουν σε επιθυμητές (φρουτώδεις/λουλουδένιες) γεύσεις και αρώματα σε ποτά που έχουν υποστεί ζύμωση. Οι περισσότεροι εστέρες παράγονται σε αντιδράσεις μεταξύ αλκοολών και μορίων ακυλο-CoA, υπάρχουν, όμως, ορισμένοι, κυρίως ο γαλακτικός αιθυλεστέρας, που συνδέονται με βακτηριακή αλλοίωση (πχ από *Lactobacillus spp.*). Σημαντικότερος εστέρας, λόγω της συμβολής του στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των οινοπνευμάτων και αποσταγμάτων, αποτελεί ο οξικός αιθυλεστέρας, ο οποίος σχηματίζεται είτε από μικροοργανισμούς είτε από την αντίδραση παλαίωσης, μεταξύ αλκοόλης και οξικού οξέος (Walker & Stewart, 2016).

Το διακετύλιο είναι μια δικετόνη που παράγεται από τον *S. cerevisiae* κατά τη διάρκεια μιας παράπλευρης αντίδρασης κατά τη σύνθεση του αμινοξέος βαλίνη. Μπορεί, όμως, να υπάρχει στην μπύρα και λόγω αλλοίωσης από μολυσματικά βακτήρια του γαλακτικού οξέος. Στη ζυθοποίηση το διακετύλιο χρησιμοποιείται ως δείκτης ωρίμανσης της μπύρας. Ιδιαίτερα στην μπύρα τύπου lager, είναι ανεπιθύμητη καθώς προσδίδει μια γεύση ταγγισμένου βουτύρου. Στις μπύρες έχει καθιερωθεί ως όριο το 0,1ppm (Walker & Stewart, 2016).

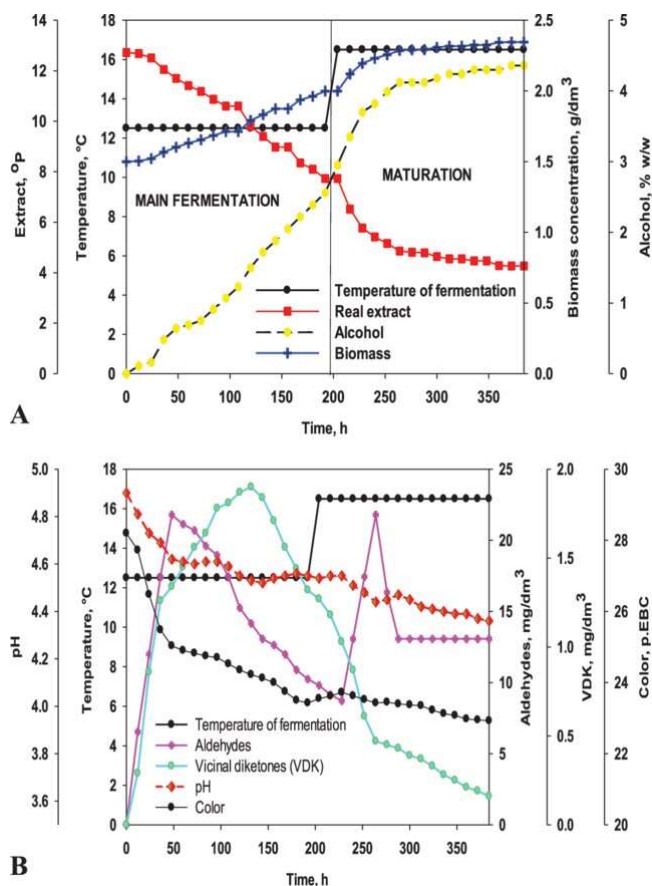


Εικόνα 8: *Saccharomyces cerevisiae*, 3D απεικόνιση.
Πηγή: ("Saccharomyces cerevisiae Yeast," 2023)

πολτοποίηση, διήθηση, βρασμός, ψύξη, ζύμωση, ωρίμανση και σταθεροποίηση (Νερατζής et al., 2014).

Η μύρα παράγεται με πολλές διαφορετικές παραλλαγές και υπάρχουν πολλά είδη μύρας. Ανάλογα με την τεχνολογία που έχουν παρασκευαστεί διακρίνονται σε δύο κατηγορίες τις ales (και stouts) και τις lagers. Οι ales και οι stouts παράγονται με αφροζύμες, ενώ οι lagers με βυθοζύμες (Νερατζής et al., 2014). Οι αφροζύμες (ή ζύμες επιφανείας) χρησιμοποιούνται σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες από 10°C και κατά τη ζύμωση ανεβαίνουν στην επιφάνεια υπό τη μορφή συσσωματωμάτων (budding, sprouting). Ενώ, οι βυθοζύμες χρησιμοποιούνται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (0°C - 10°C) και κατά τη ζύμωση καθιζάνουν στον πυθμένα (Belitz, Schieberle, & Grosch, 2020).

Η Imperial stout ανήκει στην κατηγορία ale και είναι μια μύρα με σκούρο χάλκινο έως μαύρο χρώμα. Σύμφωνα με ιστορικά δεδομένα, στους τσάρους (Ρώσους ηγέτες) άρεσαν πολύ οι αγγλικές stout μύρες και επιθυμούσαν να τις φέρνουν και στη Ρωσία. Το ταξίδι, όμως, ήταν μεγάλο και δεν άντεχαν καλά οι μύρες, οπότε για να τις διατηρήσουν αύξησαν την περιεκτικότητα σε αλκοόλη, δημιουργώντας με αυτόν τον τρόπο τη γνωστή Ρωσική «Imperial stout» (Νερατζής et al., 2014). Η γεύση της Imperial stout είναι πλούσια και πολύπλοκη με υψηλή πικράδα λυκίσκου και άρωμα καβουρδισμένης βύνης. Οι αλκοολικοί της βαθμοί μπορούν να φτάσουν και τα 12% vol («Imperial Stout,” 2015).



Διάγραμμα 2: Δυναμική ζύμωσης. Μεταβολή εκχυλίσματος, αιθανόλης και συγκέντρωσης βιομάζας (Α). Μεταβολή σε καρβονυλικές ενώσεις, pH και χρώμα μύρας (Β). Πηγή: (Shopska et al., 2014)

Κεφάλαιο 3

Πειραματικό μέρος

3.1 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η παρασκευή ενός καινοτόμου βιοδραστικού αλκοολούχου ροφήματος με χαρουπόμελο. Το χαρουπόμελο παρασκευάστηκε σύμφωνα με ελληνικές παραδοσιακές συνταγές, από ελληνικά χαρούπια και το ολικό φαινολικό περιεχόμενο μετρήθηκε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Κατά την παρασκευή του ζυθογλεύκους δοκιμάστηκαν διαφορετικές ποσότητες αλκοόλης και προσθήκης χαρουπόμελου και πραγματοποιήθηκαν διάφορες αναλύσεις για την αξιολόγηση του παραγόμενου ζύθου. Επίσης, εξετάστηκε η μεταβολή του ολικού φαινολικού περιεχομένου του ζύθου πριν και μετά την 1^η και 2^η ζύμωση και συγκρίθηκε με το ολικό φαινολικό περιεχόμενο που περιλάμβανε αρχικά το χαρουπόμελο.

3.2 Μέθοδοι και υλικά

3.2.1 Παρασκευή χαρουπόμελου

Για την μέθοδο παρασκευής του χαρουπόμελου έγινε αναζήτηση στο διαδίκτυο. Προτιμήθηκαν συνταγές παραδοσιακές από ελληνικές ιστοσελίδες. Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν είναι ολόκληρα χαρούπια, που μαζεύτηκαν από τις χαρουπιές στον προαύλιο χώρο του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής καθώς και ολόκληρα χαρούπια που προμηθεύτηκαν από τη Κρήτη και νερό (εμφιαλωμένο).

A. Μικρή παραλλαγή συνταγής από [Χαρουπόμελο - cretangastronomy.gr](http://cretangastronomy.gr) :

- 1) Ποσότητα χαρουπιών πλένεται σχολαστικά
- 2) Πραγματοποιείται τεμαχισμός των χαρουπιών (σε κομμάτια 2-4 cm) με χρήση πένσας και διαχωρισμός του σπόρου
- 3) Με αναλογία 1:3, ζυγίζεται ποσότητα των τεμαχισμένων χαρουπιών (χωρίς τους σπόρους) και ογκομετρείται ποσότητα εμφιαλωμένου νερού αντίστοιχα
- 4) Γίνεται μεταφορά αυτών σε κατσαρόλα και βρασμός για 10 min
- 5) Αφού κρυώσει το μίγμα, τοποθετείται μεμβράνη προστασίας και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 48-72h
- 6) Μετά το πέρας των 48h τουλάχιστον, το μίγμα σουρώνεται 3 φορές, ώστε να απομακρυνθούν τα κομμάτια χαρουπιού και να μείνει το εκχύλισμά τους
- 7) Πραγματοποιείται βρασμός του εκχυλίσματος, μέχρι να συμπυκνωθεί και να αποκτήσει παχύρρευστη υφή σαν το πετιμέζι

B. Συνταγή από [Πως φτιάχνουμε χαρουπόμελο \(cretanmagazine.gr\)](http://cretanmagazine.gr) :

- 1) Ποσότητα χαρουπιών πλένεται σχολαστικά

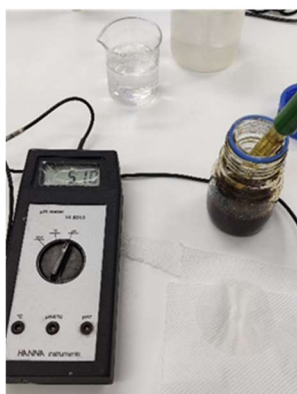
- 2) Πραγματοποιείται τεμαχισμός των χαρουπιών (σε κομμάτια 2-4 cm) με χρήση πένσας και διαχωρισμός του σπόρου
 - 3) Με αναλογία 1:2,4, ζυγίζεται ποσότητα των τεμαχισμένων χαρουπιών (χωρίς τους σπόρους) και ογκομετρείται ποσότητα εμφιαλωμένου νερού αντίστοιχα
 - 4) Γίνεται μεταφορά αυτών σε κατσαρόλα και αφήνεται το μείγμα για 48-72h σε θερμοκρασία δωματίου, αφού έχει καλυφθεί με προστατευτική μεμβράνη
 - 5) Μετά το πέρας των 48h τουλάχιστον, γίνεται βρασμός του μίγματος για 10min
 - 6) Το μίγμα σουρώνεται 3 φορές, ώστε να απομακρυνθούν τα κομμάτια χαρουπιού και να μείνει το εκχύλισμά τους και αφήνεται σκεπασμένο με προστατευτική μεμβράνη σε θερμοκρασία δωματίου για 24h
 - 7) Μεταφέρεται το μίγμα σε καινούρια κατσαρόλα, προσπαθώντας να μην γίνει μεταφορά του ιζήματος που έχει σχηματιστεί στον πάτο της κατσαρόλας
 - 8) Πραγματοποιείται βρασμός του εκχυλίσματος, μέχρι να συμπυκνωθεί και να αποκτήσει παχύρρευστη υφή σαν το πετιμέζι
- C. Συνδυασμός των δύο συνταγών :
- 1) Ποσότητα χαρουπιών πλένεται σχολαστικά
 - 2) Πραγματοποιείται τεμαχισμός των χαρουπιών (σε κομμάτια 2-4 cm) με χρήση πένσας και διαχωρισμός του σπόρου
 - 3) Με αναλογία 1:2,4, ζυγίζεται ποσότητα των τεμαχισμένων χαρουπιών και ογκομετρείται ποσότητα εμφιαλωμένου νερού αντίστοιχα
 - 4) Γίνεται μεταφορά αυτών σε κατσαρόλα και βρασμός για 10 min
 - 5) Αφού κρυώσει το μίγμα, τοποθετείται μεμβράνη προστασίας και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 48-72h
 - 6) Το μίγμα σουρώνεται 3 φορές, ώστε να απομακρυνθούν τα κομμάτια χαρουπιού και να μείνει το εκχύλισμά τους
 - 7) Πραγματοποιείται διήθηση του εκχυλίσματος και βρασμός αυτού, μέχρι να συμπυκνωθεί και να αποκτήσει παχύρρευστη υφή σαν το πετιμέζι



Εικόνα 10: Διαδικασία παρασκευής χαρουπόμελου.

3.2.2 Μέτρηση pH και ποσοστού διαλυτών στερεών συστατικών χαρουπόμελου

Για κάθε δείγμα μετρήθηκε η τιμή pH και το ποσοστό διαλυτών στερεών συστατικών. Οι τιμές pH των σιροπιών μετρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου με πεχάμετρο (Hanna instruments HI 8010). Τα διαλυτά στερεά συστατικά προσδιορίστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου με χρήση ψηφιακού διαθλασίμετρου (XS instruments LDR-500, DRB 95), τοποθετώντας 2-3 σταγόνες σιροπιού ώστε να καλύπτουν ομοιόμορφα το πρίσμα του διαθλασίμετρου. Μονάδα μέτρησης του διαθλασίμετρου αποτελούν οι μονάδες Brix, οι οποίες αντιπροσωπεύουν το κλάσμα μάζας της σακχαρόζης ($1^{\circ}\text{Brix} = 1 \text{ g σακχαρόζης ανά } 100 \text{ g διαλύματος}$). Κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκε 3 φορές και υπολογίστηκε ο μέσος όρος των τιμών αυτών.



Εικόνα 11: Πechάμετρο, Hanna instruments HI 8010 (αριστερά) και ψηφιακό διαθλασίμετρο, XS instruments LDR-500 (DRB 95) (δεξιά), που έγιναν οι μετρήσεις.

3.2.3 Μέτρηση ποσοστού σακχάρων χαρουπόμελου με τη μέθοδο Fehling

3.2.3.1 Προετοιμασία δείγματος

Ζυγίζονται 4-5 g χαρουπόμελου και μεταφέρονται σε ποτήρι ζέσεως. Προστίθενται 100ml ζεστού απιονισμένου νερού και το μείγμα αναδεύεται μέχρι να διαλυθεί το χαρουπόμελο. Ύστερα, το μείγμα διηθείται σε ογκομετρική φιάλη των 250ml και αραιώνεται με απιονισμένο νερό μέχρι τη χαραγή (Διάλυμα Α).

3.2.3.2 Πειραματική πορεία

Αρχικά, πρέπει να πραγματοποιηθεί η χημική υδρόλυση των μη ανάγοντων σακχάρων σε ανάγοντα, για να γίνει αυτό 100ml του παραπάνω διαλύματος μεταφέρονται με σιφώνι σε κωνική φιάλη και προστίθενται 10ml πυκνού HCl (0,1M). Η κωνική φιάλη τοποθετείται σε θερμαντική πλάκα και αφήνεται να βράσει για 10min. Έπειτα, αφού ψυχθεί το διάλυμα, πραγματοποιείται εξουδετέρωση με 10% NaOH και δείκτη φαινολοφθαλεΐνη και αραιώση του μείγματος σε ογκομετρική φιάλη μέχρι τα 250ml (Διάλυμα Β). Προσδιορισμός ανάγοντων σακχάρων: Μέρος του αρχικού διαλύματος (Α) μεταφέρονται σε προχοΐδα. Σε κωνική φιάλη μεταγγίζονται 5ml διαλύματος Fehling A (3,5g κρυσταλλικού θειικού χαλκού διαλυμένα σε 50ml νερού) και 5ml διαλύματος Fehling B (17,3g τρυγικού καλιονατρίου και 5,0g NaOH, διαλυμένα σε 50ml νερού), προστίθενται 4

σταγόνες κυανού του μεθυλενίου (1%) και το διάλυμα θερμαίνεται μέχρι βρασμού. Ενώ, βράζει γίνεται προσθήκη του διαλύματος A από την προχοΐδα μέχρι να εξαφανιστεί ο κυανός χρωματισμός και καταγράφεται ο όγκος του καταναλωθέντος διαλύματος. Η ογκομέτρηση επαναλαμβάνεται 3 φορές και γίνεται υπολογισμός του μέσου όρου των τιμών. Προσδιορισμός ολικών σακχάρων: Η ίδια πορεία εργασίας ακολουθείται και με τη χρήση του διαλύματος B, στη θέση του A, δηλαδή μεταφέρεται, αρχικά, σε προχοΐδα, πραγματοποιείται η ογκομέτρηση στο διάλυμα Fehling, ενώ βράζει και καταγράφεται ο όγκος διαλύματος που καταναλώθηκε.



Εικόνα 12: (Αριστερά) διάλυμα Fehling A και B με κυανό του μεθυλενίου. (Κέντρο) το διάλυμα Fehling στη θερμαντική πλάκα και η προχοΐδα με το διάλυμα B. (Δεξιά) Τέλος ογκομέτρησης, έχει εξαφανιστεί ο μπλε χρωματισμός.

3.2.4 Παρασκευή μύρας «Stout»

Ο τύπος μύρας που παρασκευάστηκε είναι η Stout και επιλέχθηκε λόγω του σκούρου χρώματός της, μιας και το χαρουπόμελο είναι, επίσης, σκουρόχρωμο και σε οποιαδήποτε ανοιχτόχρωμη μύρα θα επηρέαζε το φυσικό της χρώμα.

3.2.4.1 Πρώτες ύλες

Πίνακας 6: Πρώτες ύλες και ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή μύρας Imperial Stout.

Ποσότητα	Πρώτες ύλες	Όνομα	%IBU
16.0L	Νερό	Εμφιαλωμένο νερό ζαγόρι (μπουκάλια 1,5 l)	-
4.00kg	Βύνη	Pale Malt (2 Row) Vergina (5,5 EBC)	75.0%
0.36kg		Vienna Malt (Weyermann) (9,0 EBC)	6.7%
0.27kg		Caramunich II (Weyermann) (110,0 EBC)	5.0%
0.25kg		Chocolate Malt (Simpsons) (1000,0 EBC)	4.7%
0.18kg		Special W (Weyermann) (300,0 EBC)	3.3%
0.15kg		Carafa Special I (Weyermann) (1000,0 EBC)	2.8%
0.13kg		Wheat Malt, Pale (Weyermann) (3,9 EBC)	2.4%
40.0g		Λυκίσκος	Northern Brewer (10.0%)
	Ζύμη	New World Strong Ale (Mangrove Jack's, M42)	

3.2.4.2 Εξοπλισμός

1. Βραστήρες Brewferm, 18L
2. Πλαστικός κάδος ζύμωσης με καπάκι και βρυσάκι, από πολυπροπυλένιο, 30L (Beeramatistirio)
3. Πλαστικός κάδος με φίλτρο (lauter tun) και βρυσάκι, από πολυπροπυλένιο, 30L (Bewferm)
4. Μύλος για άλεση της βύνης
5. Ηλεκτρονικό θερμόμετρο
6. Θερμόμετρο
7. Πεχάμετρο
8. Πυκνόμετρο ψηφιακό, Anton Paar, DMA35
9. Πλαστική κουτάλα ανάδευσης
10. Ηλεκτρονική ζυγαριά
11. Εναλλάκτης θερμότητας 24 πλακών
12. Σωλήνες μετάγγισης από σιλικόνη
13. Πλαστική κανάτα
14. Πλαστικά μπουκάλια 1,5L
15. Σουρωτήρι
16. Ποτηράκια ζέσεως
17. Κωνική φιάλη
18. Πάγος

3.2.4.3 Ζυθοποίηση

Αρχικά, προστέθηκαν στον βραστήρα 18L εμφιαλωμένου νερού και ξεκίνησε η θέρμανσή του μέχρι να φτάσει τους 70 °C. Μόλις, φτάσει το νερό τους 70 °C, προστίθεται η λεπτοαλεσμένη βύνη και το μίγμα ανακατεύεται με τη χρήση πλαστικής σπάτουλας. Η θερμοκρασία συνεχίζει να μετριέται και μόλις φτάσει τους 65 °C, ενεργοποιείται το χρονόμετρο. Μετά την προσθήκη της βύνης, γίνεται μέτρηση και ρύθμιση του pH, αν είναι απαραίτητο, με χρήση φωσφορικού οξέος, το επιθυμητό pH είναι 5,4 (βέλτιστο pH για δράση α- και β- αμυλάσης) (είχε γίνει εξαρχής προσθήκη 2,4ml φωσφορικού οξέος στο νερό, ποσότητα γνωστή από ίδια ζυθοποίηση στο παρελθόν). Κατά την πρώτη μέτρηση του pH το αποτέλεσμα ήταν 5,9 οπότε προστέθηκαν άλλα 0,5ml φωσφορικού (συνολικά 2,9ml).

Μετά το πέρας 1 ώρας , ξεκινάει το 2^ο στάδιο πολτοποίησης, κατά το οποίο αυξάνεται η θέρμανση, μέχρι η θερμοκρασία να φτάσει τους 72°C (εντός 8 min) και διατήρηση της θερμοκρασίας αυτής για 10min. Μόλις περάσουν τα 10min αυξάνεται περαιτέρω η θερμοκρασία μέχρι τους

75,6 °C και διατηρείται σταθερή για ακόμα 10min. Μετά το πέρας των 10min η διαδικασία βρασμού ολοκληρώνεται. Πραγματοποιείται μέτρηση του pH, του ειδικού βάρους και των ° Plato. Οι βαθμοί ° Plato είναι βασική μέτρηση στη ζυθοποιία και δηλώνει πόσα γραμμάρια σακχάρων υπάρχουν σε 100g ζυθογλεύκους.

Στη συνέχεια, μεταφέρεται το μίγμα στον κάδο πολυπροπυλενίου με φίλτρο και βρυσάκι, με τη χρήση της πλαστικής κανάτας, ρίχνοντας το μίγμα γύρω γύρω στα τοιχώματα με κυκλικές κινήσεις. Για 15min (τουλάχιστον) πραγματοποιείται ανακυκλοφόρηση του γλεύκους (γέμισμα της κανάτας από το βρυσάκι με χαμηλή ροή και επανατοποθέτηση του γλεύκους από πάνω στον κουβά). Ταυτόχρονα, τοποθετούνται σε διαφορετικό βραστήρα άλλα 15L νερού (επιθυμητή θερμοκρασία 75,6 °C).

Μόλις το νερό φτάσει στην επιθυμητή θερμοκρασία (75,6 °C), ξεκινάει η διαβροχή του γλεύκους (αραιό γλεύκος) με τη χρήση ειδικού σωλήνα μετάγγισης από σιλικόνη και χωρίς να διακοπεί η ροή από το βρυσάκι γίνεται μεταφορά του αραιού γλεύκους σε κανάτα. Το γλεύκος που συλλέγεται στην κανάτα, μεταφέρεται στον δεύτερο βραστήρα (πυκνό γλεύκος), τηρώντας την κυκλική μέθοδο ρίψης του γλεύκους γύρω γύρω στα τοιχώματα του βραστήρα. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι να φτάσει η τιμή του γλεύκους τα επιθυμητά ° Plato (επιθυμητά ° Plato = 10,2 πριν τον βρασμό του γλεύκους). Το γλεύκος θερμαίνεται και μόλις φτάσει τους 100 °C προστίθεται ο λυκίσκος (35g).

Μόλις ολοκληρωθεί ο βρασμός του βυνογλεύκους, διενεργείται η διαδικασία του Whirlpool για 15min (απότομη και σταθερή ανάδευση με κουτάλα προς μια κατεύθυνση για τη δημιουργία ιζήματος) και ηρεμία για ακόμα 15min. Ακολουθεί ψύξη του βυνογλεύκους με τη χρήση εναλλάκτη πλακών και μεταφορά στον κάδο πολυπροπυλενίου. Για να γίνει ρύθμιση των τελικών ° Plato (επιθυμητά τελικά ° Plato = 12) προστέθηκαν 5,1L εμφιαλωμένου νερού.

Τελικό βάρος μύρας: 16,2 kg

Από τη συνολική ποσότητα βυνογλεύκους μεταφέρεται 1 L σε κάθε μπουκάλι (τρία μπουκάλια συνολικά) και προστίθεται η ζύμη (New World Strong Ale Yeast, Mangrove Jack's, M42), το χαρουπόμελο και οι αεροπαγίδες. Στο πρώτο μπουκάλι η ζητούμενη ποσότητα αλκοόλης είναι 6% vol. και δεν προστίθεται ποσότητα χαρουπόμελου (control), στο δεύτερο 8% vol. και προστίθεται 100g χαρουπόμελου και στο τρίτο 10% vol. και 222g χαρουπόμελου. Επίσης, συλλέγονται σε τρεις φιάλες ποσότητες από το αρχικό βυνογλεύκος στις οποίες προστίθενται οι ίδιες ποσότητες συστατικών με τα 3 δείγματα, εκτός από την ζύμη (t=0d). Για την ανάπτυξη στο τελικό προϊόν της ζητούμενης ποσότητας της αλκοόλης γίνεται η κατάλληλη ρύθμιση των ° Plato στο κάθε μπουκάλι ξεχωριστά (Μπουκάλι 1: 13,8 ° Plato, Μπουκάλι 2: 18,8 ° Plato, Μπουκάλι 3: 23,8 ° Plato). Στο τελικό μείγμα γίνεται μέτρηση του pH, των ° Plato και του ειδικού βάρους. Η ζύμωση πραγματοποιείται σε

θερμοκρασία 18°C. Η ολοκλήρωση της ζύμωσης γίνεται αντιληπτή από την σταθεροποίηση του βάρους του δείγματος (η 1^η ζύμωση διήρκεσε 1 μήνα).

Μόλις, σταθεροποιηθεί το βάρος των 3 δειγμάτων, τα μπουκάλια τοποθετούνται στο ψυγείο για 3 μέρες. Στη συνέχεια, πραγματοποιούνται οι απαραίτητες μετρήσεις στα δείγματα (pH, °plato, ειδικό βάρος, ποσότητα αλκοόλης, χρώμα και αντιοξειδωτικά) και το υπόλοιπο μείγμα από κάθε μπουκάλι εμφιαλώνεται σε 3 γυάλινα μπουκάλια των 330 ml, αφού έχει προστεθεί πρώτα η απαραίτητη ποσότητα ζάχαρης (ίδια ποσότητα σε κάθε μπουκάλι 2,15g), για την πραγματοποίηση της 2^{ης} ζύμωσης. Η δεύτερη ζύμωση πραγματοποιείται για τον εμπλουτισμό του αλκοολούχου προϊόντος με διοξείδιο του άνθρακα και όπως και η πρώτη γίνεται σε θερμοκρασία 18°C. Μετά από ένα μήνα τα μπουκάλια ανοίγονται και επαναλαμβάνονται οι μετρήσεις (pH, °plato, ειδικό βάρος, ποσότητα αλκοόλης, χρώμα και αντιοξειδωτικά).



Εικόνα 13: Το βυνογλεύκος μετά την προσθήκη μαγιάς και χαρουπόμελου σε μπουκάλια με αεροπαγίδα (αριστερά) και τα μπουκάλια μύρας μετά την εμφιάλωση (δεξιά).

Πίνακας 7: Απαρίθμηση δειγμάτων προς μελέτη.

Δείγματα		
t=0d	1 ^η ζύμωση (t=30d)	2 ^η ζύμωση (t=60d)
t=0d, control stout beer (6% vol.)	Μπουκάλι 1: Control stout beer 6% vol.	Μπουκάλι 1: Control stout beer 6% vol.
t=0d, imperial stout carob beer (8% vol.)	Μπουκάλι 2: Imperial stout carob beer 8% vol.	Μπουκάλι 2: Imperial stout carob beer 8% vol.
t=0d, imperial stout carob beer (10% vol.)	Μπουκάλι 3: Imperial stout carob beer 10% vol.	Μπουκάλι 3: Imperial stout carob beer 10% vol.

3.2.5 Μετρήσεις δειγμάτων μύρας

3.2.5.1 Προετοιμασία δειγμάτων μύρας

Για να πραγματοποιηθούν οι μετρήσεις στα δείγματα μύρας μετά την πρώτη και τη δεύτερη ζύμωση, γίνεται μεταφορά σε falcon, εκτόνωση του CO₂ (x3) με ανακίνηση και φυγοκέντρηση των δειγμάτων (3500 RPM για 10 min). Στη συνέχεια, μεταφέρονται τα δείγματα σε νέα falcon χωρίς το ίζημα και γίνεται η μέτρηση του pH, των °plato, του ειδικού βάρους (Specific Gravity, SG) και του ολικού φαινολικού περιεχομένου. Κάθε μέτρηση επαναλαμβάνεται 3 φορές για βέλτιστη ακρίβεια.

Για τις υπόλοιπες μετρήσεις (χρώμα, ποσότητα αλκοόλης, real extract % w/w κλπ.) τα δείγματα χρειάζονται περαιτέρω επεξεργασία, λόγω της υψηλής τους θολερότητας. Για τον σκοπό αυτό, έγινε μικροφιλτράρισμα των δειγμάτων με χρήση μικροσύριγγας. Αυτή, όμως, η διαδικασία αποδείχθη αναποτελεσματική, διότι τα δείγματα δεν μπορούσαν να περάσουν μέσα από το φίλτρο. Επομένως, για την διαύγαση των δειγμάτων επιλέχθηκε η μέθοδος καθίζησης πρωτεϊνών. Σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο 8ml δείγματος αναμειγνύονται με 1ml ZnSO₄ (5%) και 1ml Ba(OH)₂ (0,3 N), το μείγμα ανακινείται και αφήνεται σε ηρεμία για 10 λεπτά (στα 5 λεπτά ανακινείται ξανά). Ύστερα, το μείγμα φυγοκεντρείται για 20 min (3500 RPM) και μεταφέρεται σε νέα falcon χωρίς το ίζημα.

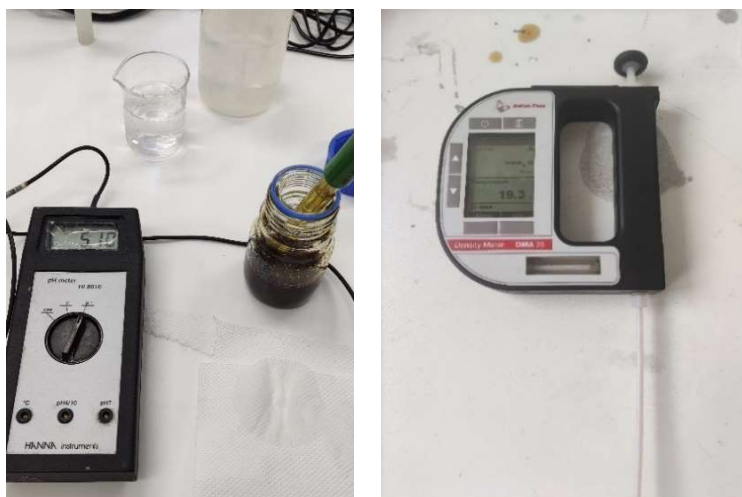


Εικόνα 14: (Αριστερά) Φυγόκεντρος (certifunge, mrc Scientific instruments). (Δεξιά) Πάνω είναι τα δείγματα μύρας μόλις προστέθηκαν ZnSO₄ και Ba(OH)₂ και ξεκινά η καθίζηση πρωτεϊνών, ενώ κάτω είναι μετά την ανάμειξη και φυγοκέντρωση.

3.2.5.2 Μέτρηση pH, ειδικού βάρους και °plato δειγμάτων μύρας

Για κάθε δείγμα μύρας πραγματοποιήθηκε η μέτρηση της τιμής pH, του ειδικού βάρους (specific gravity) και των βαθμών °plato. Οι βαθμοί °plato είναι βασική μέτρηση στη ζυθοποιία και δηλώνει πόσα γραμμάρια σακχάρων υπάρχουν σε 100g ζυθογλεύκου. Οι τιμές pH των δειγμάτων μύρας μετρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου με πεχάμετρο (Hanna instruments HI 8010). Το

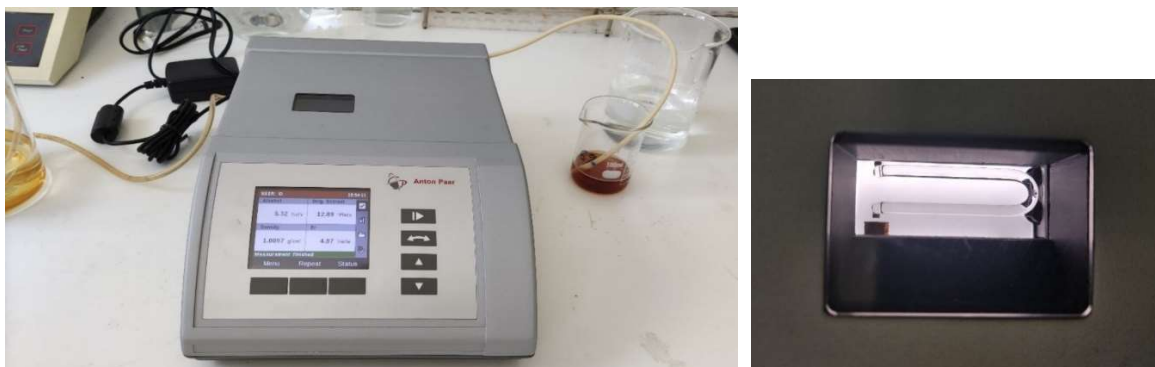
ειδικό βάρος και το ρ Plato μετρήθηκαν με τη χρήση του ψηφιακού πυκνόμετρου χειρός Anton Paar (DMA 35). Το ψηφιακό πυκνόμετρο Anton Paar (DMA 35) είναι ένα πυκνόμετρο χειρός που λαμβάνει δείγμα με τη χρήση ενσωματωμένης αντλίας. Αρχικά, έγινε μέτρηση απιονισμένου νερού για την αποφυγή σφάλματος και ύστερα μετρήθηκαν τα δείγματα. Κάθε μέτρηση επαναλήφθηκε 3 φορές.



Εικόνα 15: (Αριστερά) Πεχάμετρο (Hanna instruments HI 8010). (Δεξιά) Ψηφιακό πυκνόμετρο χειρός Anton paar (Handheld density meter, DMA 35 Basic).

3.2.5.3 Μέτρηση αλκοόλης, πυκνότητας, original extract και real extract δειγμάτων μύρας

Για την μέτρηση του ποσοστού αλκοόλης, της πυκνότητας (g/cm^3), του original extract % w/w και real extract % w/w των δειγμάτων μύρας χρησιμοποιήθηκε το όργανο Anton Paar Alex 500 (Alcohol and extract meter). Το Alex 500, συνδυάζει τη μέτρηση απορρόφησης μέσω φασματοσκοπίας NIR και τη μέτρηση πυκνότητας με βάση την αρχή ταλαντευόμενου σωλήνα U. Αρχικά, το όργανο καθαρίστηκε και μηδενίστηκε με χρήση απιονισμένου νερού και στη συνέχεια μετρήθηκαν τα δείγματα 3 φορές το καθένα.



Εικόνα 16: (Αριστερά) Anton Paar Alex 500 (Alcohol and extract meter), από των σωλήνα δεξιά του μηχανήματος συλλέγεται το δείγμα και από τον σωλήνα αριστερά απορρίπτεται στα απόβλητα. (Δεξιά) ο ειδικός σωλήνας σχήματος U που περνάει το δείγμα και γίνεται η μέτρηση, βρίσκεται στο επάνω μέρος του μηχανήματος.

3.2.5.4 Μέτρηση χρώματος δειγμάτων μύρας

Για την μέτρηση του χρώματος των δειγμάτων μύρας πραγματοποιείται μέτρηση της απορρόφησης σε φασματοφωτόμετρο απλής δέσμης στα 430nm και 700nm με χρήση κυψελίδας 1cm. Αρχικά, γίνεται η απαραίτητη αραιώση των δειγμάτων (1:6). Έπειτα, μηδενίζεται το φασματοφωτόμετρο με απιονισμένο νερό και στη συνέχεια τοποθετούνται τα δείγματα από το πιο αραιό στο πιο πυκνό. Οι μετρήσεις για κάθε δείγμα επαναλήφθηκαν 3 φορές.



Εικόνα 17: Φασματοφωτόμετρο UV mini 1240 (UV/Vis spectrophotometer).

3.2.6 Μέτρηση ολικού φαινολικού περιεχομένου δειγμάτων χαρουπόμελου και μύρας

Για τον προσδιορισμό του ολικού φαινολικού περιεχομένου (Total Phenolic Content, TPC) χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Folin-Ciocalteu. Σύμφωνα με την συγκεκριμένη μέθοδο, τοποθετούνται 20ml δείγματος (κατάλληλα αραιωμένου και φυγοκεντρημένου), 250ml απιονισμένου νερού και 200ml αντιδραστήριου Folin-Ciocalteu (το F-C αποτελείται από άλατα του μολυβδαινίου και του βολφραμίου) σε πλαστικές κυψελίδες των 4,0 ml με χρήση μικροσύριγγας (των 20-200μl). Κλείνονται με ειδικό καπάκι, αναδεύονται ισχυρά και τοποθετούνται σε σκιερό μέρος για 8 min. Ύστερα, προστίθενται 500,0 μl κορεσμένου διαλύματος Na_2CO_3 , αναδεύονται ξανά και τοποθετούνται σε υδατόλουτρο σταθερής θερμοκρασίας 40°C σε συνθήκες σκότους για 30min, ώστε να πραγματοποιηθεί η αντίδραση (οι φαινολικές ενώσεις οξειδώνονται σε αλκαλικό περιβάλλον και το αντιδραστήριο F-C ανάγεται προς οξείδια που έχουν το χαρακτηριστικό κυανό χρώμα του πεντασθενούς μολυβδαινίου). Μετά το πέρας των 30 min παρατηρείται η ανάπτυξη ενός χαρακτηριστικού κυανού χρώματος, η ένταση του οποίου είναι ανάλογη του φαινολικού περιεχομένου του δείγματος (αν το δείγμα έχει πολύ σκούρο χρώμα δεν μπορεί να μετρηθεί στο φασματοφωτόμετρο και χρειάζεται μεγαλύτερη αραιώση). Μόλις τα δείγματα αποκτήσουν θερμοκρασία περιβάλλοντος γίνεται

μέτρηση της απορρόφησης τους στα 750nm με χρήση φασματοφωτομέτρου (Thermo Spectronic, Helios epsilon). Για τη διόρθωση του σφάλματος της τιμής απορρόφησης, λόγω του διαλύτη των δειγμάτων, χρησιμοποιείται το «τυφλό» δείγμα (blank). Κάθε μέτρηση επαναλήφθηκε τρεις φορές.



Εικόνα 18: Πορεία διεργασίας Folin-Ciocalteu. Αντιδραστήρια, πιπέτα, κυψελίδες και στατό. Στη δεξιά εικόνα φαίνεται η αλλαγή χρώματος από κίτρινο σε κυανό.

Κεφάλαιο 4

4.1 Αποτελέσματα και συζήτηση

4.1.1 Αποτελέσματα μετρήσεων pH και ποσοστού διαλυτών στερεών συστατικών δειγμάτων χαρουπόμελου

Οι βαθμοί Brix αποτελούν ένα μέτρο των διαλυτών στερεών συστατικών σε ένα υδατικό διάλυμα. Ένας βαθμός Brix αντιστοιχεί σε 1 γραμμάρια σακχαρόζης ανά 100 γραμμάρια διαλύματος. Τα περιεχόμενα διαλυτά στερεά συστατικά στο χαρουπόμελο, με βάση διάφορες βιβλιογραφικές αναφορές, κυμαίνονται από 62-74 °Brix και καθορίζουν το ιξώδες του σιροπιού (υψηλότεροι βαθμοί Brix, υψηλότερο ιξώδες άρα πιο παχύρευστο σιρόπι) (Clodoveo et al., 2022; Petit & Pinilla, 1995; Toufeili, Itani, Zeidan, Al Yamani, & Kharroubi, 2022). Συνήθως, εξαρτώνται από τα εθνικά πρότυπα και προτιμήσεις του καταναλωτικού κοινού. Στα δείγματα χαρουπόμελου που παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο παρατηρείται μια διαφοροποίηση των βαθμών Brix, αλλά όλες οι τιμές συμφωνούν με την βιβλιογραφία. Η διαφοροποίηση αυτή οφείλεται στον διαφορετικό χρόνο τελικού βρασμού (συμπύκνωσης) του σιροπιού.

Η τιμή pH στο χαρουπόμελο, με βάση τη βιβλιογραφία, κυμαίνεται στο 4,3-5,4. Το pH των σιροπιών από χυμό φρούτων και δέντρων εξαρτάται από την περιεκτικότητά τους σε οργανικά οξέα και μέταλλα, καθώς και από τυχόν μικροβιακή μόλυνση κατά την επεξεργασία και την αποθήκευση (Toufeili et al., 2022). Παρατηρείται λοιπόν, ότι οι τιμές pH που μετρήθηκαν συμφωνούν με τις τιμές της βιβλιογραφίας.

Να σημειωθεί ότι τα χαρουπόμελα Α, Β και Γ+Δ έχουν παρασκευαστεί με χρήση χαρουπιών από τον προαύλιο χώρο του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, ενώ το χαρουπόμελο Ε με χαρούπια που προμηθεύτηκαν από την Κρήτη.

Πίνακας 8: Μετρήσεις παρασκευασθέντων χαρουπόμελων και εμπορίου.

Δείγμα	Χαρουπόμελο Α (ΠΑΔΑ)	Χαρουπόμελο Β (ΠΑΔΑ)	Χαρουπόμελο Γ + Δ (ΠΑΔΑ)	Χαρουπόμελο Ε (Κρήτης)	Χαρουπόμελο εμπορίου
pH	5,08	4,91	5,08	5,41	5,31
Brix	67,80	64,30	71,35	74,43	72,61

4.1.2 Αποτελέσματα μετρήσεων ποσοστού σακχάρων χαρουπόμελου με τη μέθοδο Fehling

Η ποσότητα δείγματος χαρουπόμελου (Β) που ζυγίστηκε, αρχικά, ισούται με 4,46g (W). Σύμφωνα με την πρώτη ογκομέτρηση, για τον υπολογισμό των αναγόντων σακχάρων, ο μέσος όρος των τιμών κατανάλωσης διαλύματος Α καταγράφηκε ίσος με 18,9ml (T_{av}). Ενώ, ο μέσος όρος των

τιμών κατανάλωσης διαλύματος Β, από την δεύτερη ογκομέτρηση, υπολογίστηκε ίσος με 12,5ml (T_{ολ}).

Για να προσδιοριστεί η συγκέντρωση των σακχάρων απαιτείται η χρήση συντελεστών μετατροπής, οι οποίοι υπολογίστηκαν με κατάλληλους συσχετισμούς (τιτλοδοτήσεις) με 1ml συνολικού διαλύματος Fehling (Α και Β). Έχει υπολογιστεί ότι 1ml συνολικού διαλύματος Fehling (Α και Β) ισοδυναμεί με: 4,95mg γλυκόζης ή 5,25mg φρουκτόζης ή 7,68mg μαλτόζης ή 4,75mg σακχαρόζης. Για τον υπολογισμό των σακχάρων του χαρουπόμελου, επιλέχτηκε η ισοδυναμία με τη σακχαρόζη (4,75mg), διότι είναι το σάκχαρο το οποίο εντοπίζεται στο χαρουπόμελο σε μεγαλύτερο ποσοστό.

Οι τύποι υπολογισμού του ποσοστού αναγόντων και ολικών σακχάρων, ως ισοδύναμα σε σακχαρόζη, είναι:

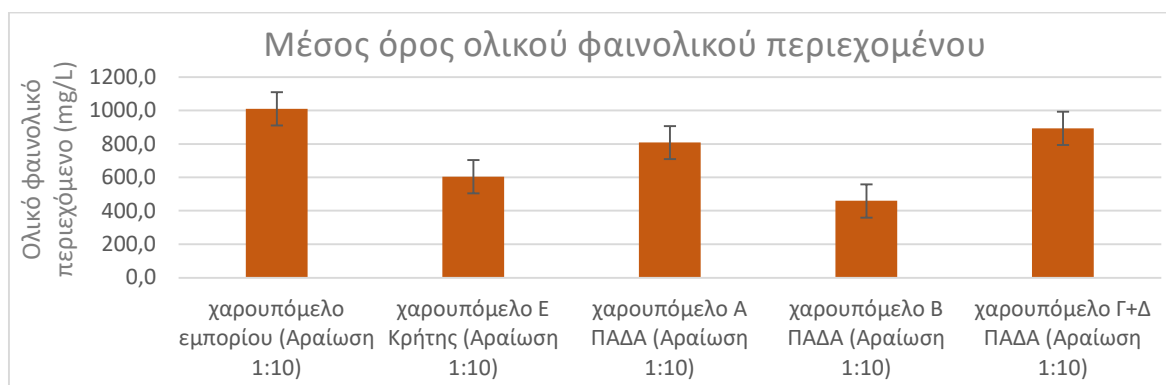
$$\% \text{ ανάγοντα σάκχαρα} = \frac{47,5 \times 250}{T_{αν} \times W \times 10} \quad \% \text{ ολικά σάκχαρα} = \frac{47,5 \times 250 \times 2,5}{T_{ολ} \times W \times 10}$$

Τα μη ανάγοντα σάκχαρα υπολογίζονται από τη διαφορά των ολικών και αναγόντων σακχάρων (% ολικά σάκχαρα - % ανάγοντα σάκχαρα = % μη ανάγοντα σάκχαρα).

Επομένως, εφαρμόζοντας τους παραπάνω τύπους τα ανάγοντα σάκχαρα υπολογίστηκαν ίσα με 14,1%, τα ολικά σάκχαρα ίσα με 53,3% και τα μη ανάγοντα σάκχαρα με 39,2%. Τα αποτελέσματα που υπολογίστηκαν συμφωνούν με αυτά που βρέθηκαν στη βιβλιογραφία (Azab, 2022; Nasar-Abbas et al., 2016).

4.1.3 Ολικό φαινολικό περιεχόμενο δειγμάτων χαρουπόμελου

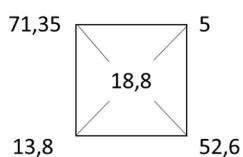
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από τη μέθοδο folin-ciocalteu, παρατηρείται ότι το ολικό φαινολικό περιεχόμενο (TPC) όλων των δειγμάτων χαρουπόμελου, που παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο, είναι πολύ υψηλό (όλα πάνω από 4000mgGAE/L). Επομένως, τα δείγματα χαρουπόμελου που παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο είναι πλούσια σε πολυφαινόλες και θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως πρόσθετα για τον εμπλουτισμό τροφίμων με αντιοξειδωτικά. Οι διαφορές που παρατηρούνται στις τιμές του φαινολικού περιεχομένου μπορεί να οφείλονται στο διαφορετικό κλίμα (Κρήτη/Αιγάλεω), τη διαφορετική ποικιλία και το στάδιο ωριμότητας του καρπού, αλλά και τη μέθοδο/χρόνο εκχύλισης και παρασκευής του χαρουπόμελου.



Διάγραμμα 3: Μέσος όρος ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) παραγόμενων χαρουπόμελων και εμπορίου.

4.1.4 Αποτελέσματα μετρήσεων δειγμάτων μύρας

Αρχικά, γίνεται παραγωγή βυνογλεύκους stout με original extract 13,8 °plato και αναμενόμενους αλκοολικούς βαθμούς 6% vol. (Μπουκάλι 1: control stout beer με 6% vol. χωρίς χαρουπόμελο). Στο βυνογλεύκος προστίθεται συγκεκριμένη ποσότητα χαρουπόμελου (πηγή σακχάρων), με αποτέλεσμα να αυξάνονται τα °plato του βυνογλεύκους και άρα οι αναμενόμενοι αλκοολικοί βαθμοί του τελικού προϊόντος, μετατρέποντας το τελικό προϊόν σε Imperial stout (Μπουκάλι 2: Imperial stout carob beer 8% vol. και μπουκάλι 3: Imperial stout carob beer 10% vol.). Στο μπουκάλι 2 και μπουκάλι 3 προστέθηκε το χαρουπόμελο Γ+Δ (71,35 °Brix), το οποίο έχει παρασκευαστεί με χαρούπια από τον προαύλιο χώρο του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής. Για τον υπολογισμό της ποσότητας χαρουπόμελου που προστέθηκε χρησιμοποιήθηκε το τετράγωνο του Pearson με βάση τα °plato και το ειδικό βάρος του βυνογλεύκους και τους επιθυμητούς αλκοολικούς βαθμούς του τελικού προϊόντος. Για το μπουκάλι 2: Οι επιθυμητοί αλκοολικοί βαθμοί του τελικού προϊόντος είναι 8% vol., από τη βιβλιογραφία για 8% vol. τα απαιτούμενα °plato του βυνογλεύκους είναι 18,8, άρα για να βρεθεί η κατάλληλη ποσότητα χαρουπόμελου (71,35 °Brix) που θα προστεθεί γίνονται οι εξής υπολογισμοί:



Συνολική ποσότητα: $5 + 52,6 = 57,6$

$4 / 57,6 = 0,087$ ή 8,7% και $52,6 / 57,6 = 0,913$ ή 91,3%

Στο βυνογλεύκος που θα παρασκευαστεί το ειδικό βάρος πρέπει να είναι ίσο με 1,056 SG = 1056g σακχάρων σε 1000ml βυνογλεύκους τα οποία αντιστοιχούν στο 91,3% των συνολικών σακχάρων, άρα τα χ g χαρουπόμελου αντιστοιχούν στο 8,7% των συνολικών σακχάρων:

$\chi = 1056 * 8,7 / 91,3 = 100,6$ g χαρουπόμελο πρέπει να προστεθούν σε 1000ml βυνογλεύκους, ώστε στο τελικό μείγμα να περιλαμβάνονται 18,8 °plato.

Οι ίδιοι υπολογισμοί πραγματοποιούνται και για το μπουκάλι 3, στο οποίο οι επιθυμητοί αλκοολικοί βαθμοί του τελικού προϊόντος είναι 10% vol. και τα °plato είναι 23,8, άρα η ποσότητα χαρουπόμελου που πρέπει να προστεθεί σε 1000ml βυνογλεύκους είναι 222,4 g.

Κατά την ολοκλήρωση της 1^{ης} ζύμωσης παρατηρείται πτώση του pH και στα 3 δείγματα, αυτό συμβαίνει διότι κατά την ζύμωση παράγονται ασθενή οργανικά οξέα, τα οποία μειώνουν το pH της μύρας. Οι τιμές pH του βυνογλεύκους πρέπει να είναι ρυθμισμένες μεταξύ του 5,3-5,6, ενώ οι τιμές pH της μύρας πρέπει να είναι μεταξύ του 4,3-4,6.

Πίνακας 9: Μετρήσεις pH στα δείγματα μύρας αρχικά (t=0d), μετά την 1^η και 2^η ζύμωση.

Δείγμα	Τιμές pH		
	t = 0d	1 ^η Ζύμωση (t = 30d)	2 ^η Ζύμωση (t = 60d)
Control stout beer (6% vol.)	5,24	4,56	4,43
Imperial stout carob beer (8% vol.)	5,27	4,93	4,79
Imperial stout carob beer (10% vol.)	5,26	5,16	5,07

Τα σάκχαρα που περιλαμβάνονται στην μύρα (°plato) προέρχονται από τα σάκχαρα της βύνης, που εκχυλίστηκε κατά την παραγωγή της μύρας (Control stout beer 6% vol.) και από το χαρουπόμελο που προστέθηκε (Imperial stout carob beer 8% vol. και 10% vol.). Τα σάκχαρα αυτά μεταβολίζονται από τις ζύμες που προστέθηκαν στο βυνογλεύκος και μέσω μεταβολικών οδών, παράγονται διάφοροι μεταβολίτες, με κύριους εκπροσώπους την αιθανόλη και το διοξείδιο του άνθρακα (CO₂). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μειώνεται η ποσότητα σακχάρων στην μύρα (°plato) και να αυξάνεται η ποσότητα αλκοόλης (% v/v), όπως φαίνεται στους παρακάτω πίνακες. Παρατηρείται ότι το ποσοστό αλκοόλης που μετρήθηκε στο τελικό προϊόν είναι πολύ κοντά στους αρχικά επιθυμητούς αλκοολικούς βαθμούς (6% vol., 8% vol. και 10% vol.) και όλες οι τιμές (με μικρές αποκλίσεις) είναι στα όρια της βιβλιογραφίας για τις μύρες stout και Imperial stout (“Brewers Association Beer Style Guidelines,” n.d.).

Πίνακας 10: Μετρήσεις °plato και ειδικού βάρους (SG) στα δείγματα μύρας αρχικά (t=0d), μετά την 1^η και 2^η ζύμωση με χρήση του ψηφιακού πυκνόμετρου χειρός Anton paar (Handheld density meter, DMA 35 Basic).

Δείγμα	t = 0d		1 ^η Ζύμωση (t = 30d)		2 ^η Ζύμωση (t = 60d)	
	°plato	Ειδικό βάρος (SG)	°plato	Ειδικό βάρος (SG)	°plato	Ειδικό βάρος (SG)
Control stout beer (6% vol.)	13,6	1,055	3,8	1,014	3,1	1,012
Imperial stout carob beer (8% vol.)	13,9	1,056	4,8	1,018	4,3	1,016
Imperial stout carob beer (10% vol.)	14,8	1,060	6,3	1,024	6,5	1,025

Πίνακας 11: Μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν με το όργανο Anton Paar Alex 500 (Alcohol and extract meter), μετά την 1^η ζύμωση.

1 ^η Ζύμωση (t = 30d)				
Δείγμα	Alcohol (% v/v)	Density (g/cm ³)	Original extract (°plato)	Real extract (% w/w)
Control stout beer 6% vol.	5,42	1,0129	13,80	5,69
Imperial stout carob beer 8% vol.	7,97	1,2663	19,37	7,55
Imperial stout carob beer 10% vol.	10,31	1,2724	24,63	9,80

Πίνακας 12: Μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν με το όργανο Anton Paar Alex 500 (Alcohol and extract meter), μετά την 2^η ζύμωση.

2 ^η Ζύμωση (t = 60d)				
Δείγμα	Alcohol (% v/v)	Density (g/cm ³)	Original extract (°plato)	Real extract (% w/w)
Control stout beer 6% vol.	5,57	1,2610	13,91	5,43
Imperial stout carob beer 8% vol.	7,97	1,2660	19,31	7,49
Imperial stout carob beer 10% vol.	9,97	1,2752	24,70	10,38

Το χρώμα της μπίρας αποτελεί μια σημαντική παράμετρος στον ποιοτικό έλεγχο της μπίρας κατά τη διαδικασία παρασκευής. Οι πιο γνωστές μέθοδοι μέτρησης χρώματος της μπίρας είναι οι Standard Reference Method (SRM) και Color Units EBC (European Brewery Convention).

Η Standard Reference Method (SRM) είναι μια μέθοδος που καθιερώθηκε από την American Society of Brewing Chemists (ASBC), ενώ η μέθοδος Color Units EBC (European Brewery Convention) καθιερώθηκε από την European Brewery Convention. Και οι δύο μέθοδοι μέτρησης χρώματος περιλαμβάνουν τη μέτρηση του δείγματος μπίρας σε φασματοφωτόμετρο με μήκος κύματος στα 430 nm. Η διαφορά τους είναι ότι στη μέθοδο SRM το δείγμα τοποθετείται σε κυψελίδα με πάχος ½ ίντσας, ενώ στη μέθοδο EBC σε κυψελίδα με πάχος 1cm. Οι εξισώσεις για την μετατροπή από μονάδες SRM σε μονάδες EBC είναι: $SRM = EBC \times 0.508$. Στην **Σφάλμα! Το αρχείο προέλευσης της αναφοράς δεν βρέθηκε.** φαίνονται οι τιμές χρώματος μπίρας με βάση τις δύο μεθόδους και τον τύπο της μπίρας.

Όσον αφορά τη μέθοδο EBC για την έκφραση του αποτελέσματος εφαρμόζεται η εξίσωση: $EBC = A_{430} \times 25 \times \Sigma$ ντελεστής αραίωσης. Στα δείγματα μπίρας που μετρήθηκαν λόγω του σκούρου χρώματος εφαρμόστηκε αραίωση 1:6. Οι αρκετά αυξημένες τιμές χρώματος, σε σύγκριση με την βιβλιογραφία, οφείλονται στο χαρουπόμελο, το οποίο έχει πολύ σκούρο χρώμα και στις σκουρόχρωμες βύνες που χρησιμοποιήθηκαν κατά την προετοιμασία του βυνογλεύκους.

SRM/Lovibond	Example	Beer color	EBC
2	Pale lager, Witbier, Pilsener, Berliner Weisse		4
3	Maibock, Blonde Ale		6
4	Weissbier		8
6	American Pale Ale, India Pale Ale		12
8	Weissbier, Saison		16
10	English Bitter, ESB		20
13	Biere de Garde, Double IPA		26
17	Dark lager, Vienna lager, Marzen, Amber Ale		33
20	Brown Ale, Bock, Dunkel, Dunkelweizen		39
24	Irish Dry Stout, Doppelbock, Porter		47
29	Stout		57
35	Foreign Stout, Baltic Porter		69
40+	Imperial Stout		79

Εικόνα 19: : Τιμές χρώματος μπίρας με βάση τη μέθοδο SRM και EBC. Πηγή: ("Standard Reference Method," 2021)

Εκτός από το χρώμα στα δείγματα μπίρας εξετάζεται και η θολερότητα. Σύμφωνα με τη μέθοδο ASBC Turbidity, για τον προσδιορισμό της θολερότητας μετρείται η απορρόφηση των

δειγμάτων μύρας στο φασματοφωτόμετρο στα 430nm και 700nm. Εάν η απορρόφηση (A) στα 700nm $\leq 0,039 \times A_{430nm}$, τότε η μύρα αξιολογείται ως «ελεύθερη θολερότητας», διαφορετικά αναφέρεται ως «θολή». Όλα τα δείγματα μύρας Control stout beer 6% vol., Imperial stout carob beer 8% vol., Imperial stout carob beer 10% vol. μετά την 1^η και 2^η ζύμωση αξιολογήθηκαν, με τη συγκεκριμένη μέθοδο, ως «θολά».

Πίνακας 13: Απορροφήσεις δειγμάτων μύρας με χρήση του Φασματοφωτομέτρου UV mini 1240 (UV/Vis spectrophotometer) στα 430nm και 700nm, αρχικά (t=0d), μετά την 1^η και 2^η ζύμωση.

Δείγμα	t = 0d		1 ^η ζύμωση (t = 30d)		2 ^η ζύμωση (t = 60d)	
	430nm	700nm	430nm	700nm	430nm	700nm
Control stout beer 6% vol. (Αραίωση 1:6)	0,851	0,070	0,796	0,051	0,473	0,030
Imperial stout carob beer 8% vol. (Αραίωση 1:6)	0,893	0,085	0,693	0,048	0,508	0,031
Imperial stout carob beer 10% vol. (Αραίωση 1:6)	0,618	0,029	0,641	0,029	0,542	0,027

Πίνακας 14: Μετρήσεις χρώματος με τη μέθοδο EBC και SRM, αρχικά (t=0d), μετά της 1^η και μετά τη 2^η ζύμωση.

Δείγμα	t = 0d		1 ^η Ζύμωση (t = 30d)		2 ^η Ζύμωση (t = 60d)	
	EBC	SRM	EBC	SRM	EBC	SRM
Control stout beer (6% vol.)	127,69	64,86	119,35	60,63	88,75	45,09
Imperial stout carob beer (8% vol.)	133,87	68,01	126,94	66,01	95,25	48,38
Imperial stout carob beer (10% vol.)	92,75	47,12	120,12	61,02	101,69	51,66

Παρακάτω παρατίθενται οι συγκεντρωτικοί πίνακες όλων των μετρήσεων που πραγματοποιήθηκαν πριν τη ζύμωση του βυνογλεύκου (t=0d), μετά την 1^η ζύμωση (t=30d) και μετά τη 2^η ζύμωση (t=60d), για την αξιολόγηση της οργανοληπτικής εικόνας των δειγμάτων μύρας που παρασκευάστηκαν.

Πίνακας 15: Συγκεντρωτικός πίνακας μετρήσεων δειγμάτων μύρας πριν τη ζύμωση (t=0d).

t = 0 d			
Δείγμα	Control stout beer (6% vol.)	Imperial stout carob beer (8% vol.)	Imperial stout carob beer (10% vol.)
pH	5,24	5,27	5,26
°plato	13,6	13,9	14,8
Ειδικό βάρος (SG)	1,055	1,056	1,060
Alcohol (% v/v)	-	-	-
EBC	127,69	133,87	92,75
SRM	64,86	68,01	47,12

Πίνακας 16: Συγκεντρωτικός πίνακας μετρήσεων δειγμάτων μύρας μετά την 1^η ζύμωση.

1 ^η Ζύμωση (t = 30d)			
Δείγμα	Μπουκάλι 1: Control stout beer 6% vol.	Μπουκάλι 2: Imperial stout carob beer 8% vol.	Μπουκάλι 3: Imperial stout carob beer 10% vol.
pH	4,56	4,93	5,16
°plato	3,8	4,8	6,3
Ειδικό βάρος (SG)	1,014	1,018	1,024
Alcohol (% v/v)	5,42	7,97	10,31
Density (g/cm ³)	1,0129	1,2663	1,2724
Original extract (°plato)	13,80	19,37	24,63
Real extract (% w/w)	5,69	7,55	9,80
EBC	119,35	129,94	120,13
SRM	60,63	66,01	61,02

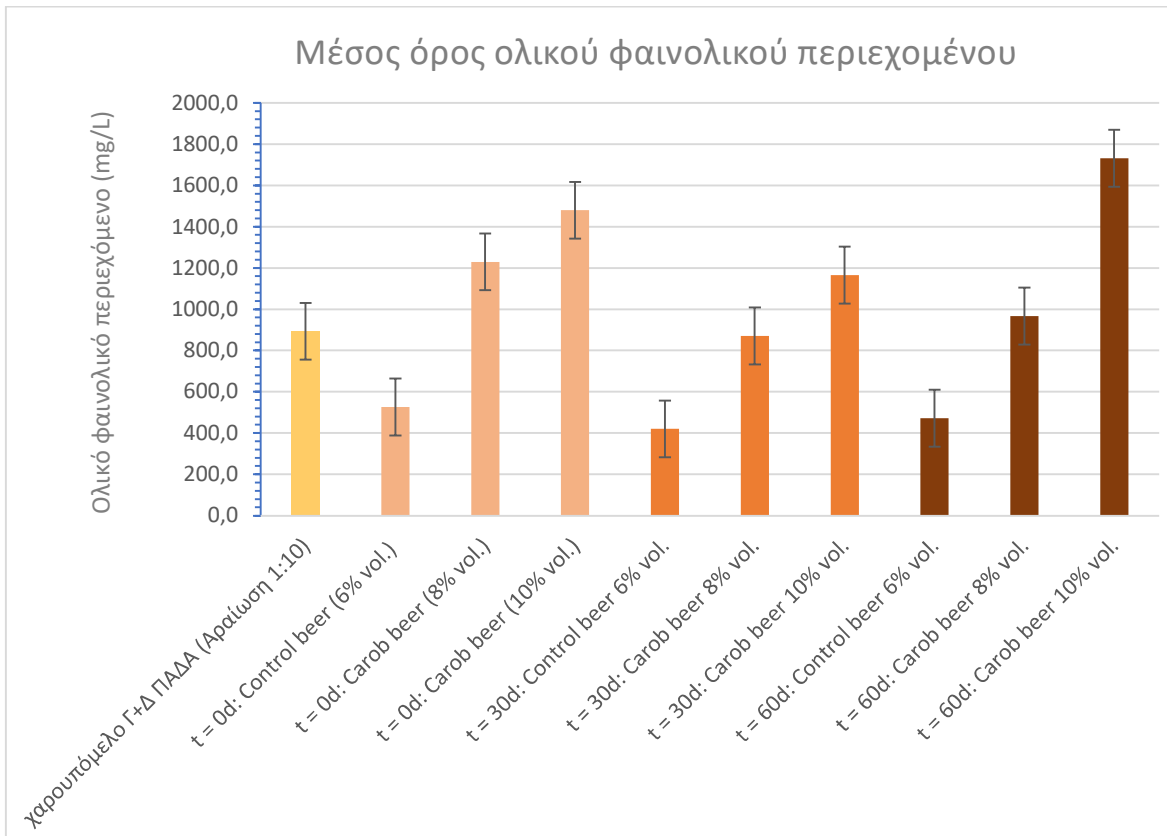
Πίνακας 17: Συγκεντρωτικός πίνακας μετρήσεων δειγμάτων μύρας μετά την 2^η ζύμωση.

2 ^η Ζύμωση (t = 60d)			
Δείγμα	Μπουκάλι 1: Control stout beer 6% vol.	Μπουκάλι 2: Imperial stout carob beer 8% vol.	Μπουκάλι 3: Imperial stout carob beer 10% vol.
pH	4,43	4,79	5,07
°plato	3,1	4,3	6,5
Ειδικό βάρος (SG)	1,012	1,016	1,025
Alcohol (% v/v)	5,57	7,97	9,97
Density (g/cm ³)	1,2610	1,2660	1,2752
Original extract (°plato)	13,91	19,31	24,70
Real extract (% w/w)	5,43	7,49	10,38
EBC	88,75	95,25	101,69
SRM	45,08	48,39	51,66

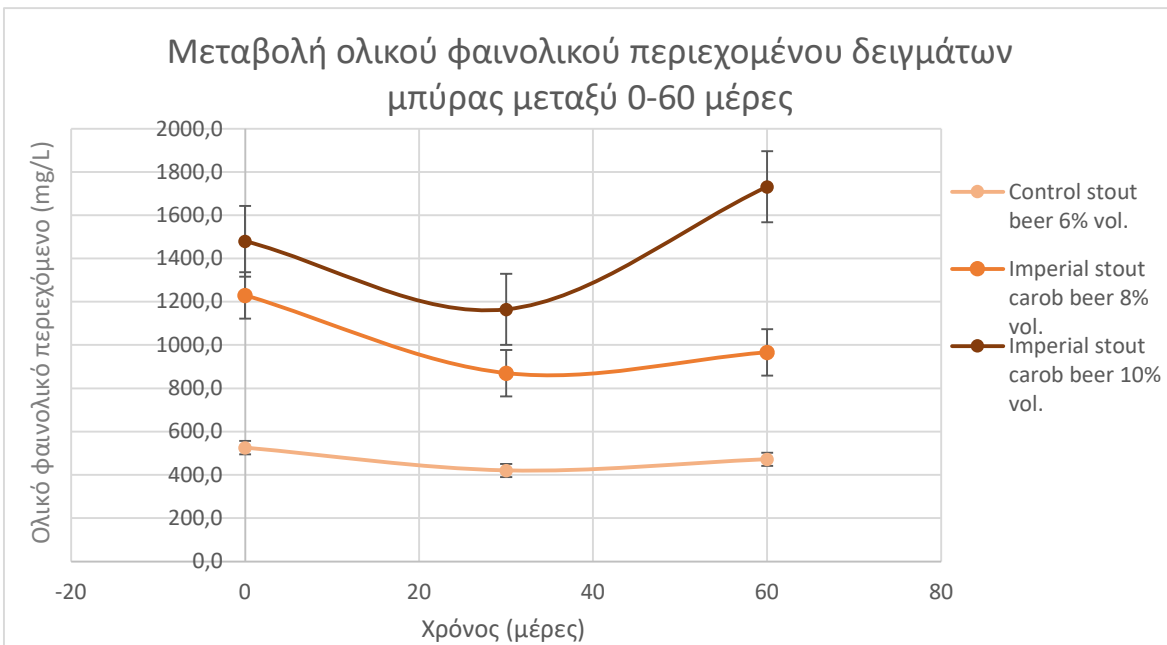
4.1.5 Ολικό φαινολικό περιεχόμενο δειγμάτων μύρας

Για τα δείγματα μύρας αναδεικνύεται ότι το ολικό φαινολικό περιεχόμενο της μύρας stout (stout control beer 6%) χωρίς χαρουπόμελο είναι χαμηλότερο (στατιστικά σημαντική διαφορά) σε όλα τα στάδια παρασκευής της μύρας (t=0d, t=30d, t=60d) σε σχέση με τις άλλες δύο μύρες, στις οποίες έχει προστεθεί χαρουπόμελο (Imperial stout carob beer 8% vol. και Imperial stout carob beer 10% vol.). Επίσης, παρατηρείται ότι όσο αυξάνεται η ποσότητα χαρουπόμελου στις μύρες αυξάνεται και το ολικό φαινολικό περιεχόμενο. Η μύρα Imperial stout με 10% vol. έχει το υψηλότερο ολικό φαινολικό περιεχόμενο σε όλα τα στάδια παρασκευής της (t=0d, t=30d,

t=60d) σε σχέση με τα άλλα 2 δείγματα και μάλιστα το υψηλότερο ποσοστό παρατηρείται στο τέλος της 2^η ζύμωσης. Επιπλέον, στο διάγραμμα φαίνεται και το υψηλό ολικό φαινολικό περιεχόμενο του χαρουπόμελου (Γ+Δ, ΠΑΔΑ) που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή της μύρας.



Διάγραμμα 4: Μέση τιμή ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) δειγμάτων μύρας αρχικά (t=0d) και μετά την 1^η και 2^η ζύμωση.



Διάγραμμα 5: Μεταβολή ολικού φαινολικού περιεχομένου δειγμάτων μύρας μεταξύ 0-60 μέρες.

Κεφάλαιο 5

5.1 Συμπεράσματα και υποδείξεις για περαιτέρω έρευνα

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε η παρασκευή και μελέτη βιοδραστικότητας δειγμάτων χαρουπόμελου και στη συνέχεια η παρασκευή και μελέτη βιοδραστικότητας ζύθου stout, που με προσθήκη παρασκευασθέντος χαρουπόμελου αναβαθμίστηκε σε Imperial stout. Τα συμπεράσματα που προέκυψαν από αυτές τις διεργασίες είναι τα εξής:

Παρασκευή δειγμάτων χαρουπόμελου:

- Τα δείγματα χαρουπόμελου που παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο με χαρούπια από τον προαύλιο χώρο του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, εφαρμόζοντας διαφορετικές ελληνικές συνταγές, είχαν όλα αποδεκτά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και τα αποτελέσματα των μετρήσεων που πραγματοποιήθηκαν (pH και °Brix) συμφωνούσαν με σχετικές βιβλιογραφικές αναφορές, που βρέθηκαν στο διαδίκτυο. Επίσης, με την εφαρμογή της μεθόδου Folin-ciocalteu αποδείχτηκε ότι είναι πλούσια σε πολυφαινόλες (πάνω από 4000 mgGAE/L). Επομένως, το χαρουπόμελο θα μπορούσε να προστεθεί σε μεγάλο αριθμό τροφίμων, εμπλουτίζοντάς τα με αντιοξειδωτικά. Απαιτούνται περαιτέρω έρευνες σχετικές με την δράση και απορρόφηση αυτών των πολυφαινολών από τον ανθρώπινο οργανισμό.

Παρασκευή βιοδραστικού αλκοολούχου ροφήματος με βάση το χαρουπόμελο:

- Σύμφωνα με τις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν στα δείγματα ζύθου (Imperial stout 8% vol., Imperial stout 10% vol.), αναδεικνύεται ότι πληρούν τις προδιαγραφές μιας μπίρας Imperial stout με μικρές αποκλίσεις, που μπορεί να οφείλονται στο πειραματικό σφάλμα.
- Η παρασκευή μπίρας Imperial stout με προσθήκη χαρουπόμελου (Imperial stout 10% vol.) έχει αποτέλεσμα ένα προϊόν με στατιστικά σημαντικό αυξημένο ολικό φαινολικό περιεχόμενο (σχεδόν τρεις φορές περισσότερο) σε σύγκριση με την μπίρα stout χωρίς προσθήκη χαρουπόμελου (Stout 6% vol.). Επίσης, παρατηρήθηκε ότι όσο αυξανόταν η προσθήκη χαρουπόμελου στην μπίρα αυξανόταν και το φαινολικό περιεχόμενό της, αφού η μπίρα Imperial stout 8% vol είχε μικρότερο ολικό φαινολικό περιεχόμενο από την Imperial stout 10% vol, η οποία περιείχε περισσότερη ποσότητα χαρουπόμελου. Η μπίρα Imperial stout 10% vol έχει το μεγαλύτερο φαινολικό περιεχόμενο σε όλα τα στάδια παραγωγής της. Τέλος, το χαρουπόμελο που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των Imperial stout είχε την υψηλότερη συγκέντρωση πολυφαινολών από όλα τα δείγματα. Απαιτούνται πρόσθετες μελέτες για την ανάπτυξη ενός προϊόντος με το βέλτιστα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και αντιοξειδωτικές ιδιότητες.

Βιβλιογραφία

- Arribas, C., Cabellos, B., Cuadrado, C., Guillamón, E., & Pedrosa, M. M. (2020). Cooking Effect on the Bioactive Compounds, Texture, and Color Properties of Cold-Extruded Rice/Bean-Based Pasta Supplemented with Whole Carob Fruit. *Foods*, *9*(4), 415. doi: 10.3390/foods9040415
- Atasoy, A. (2009). The effects of carob juice concentrates on the properties of yoghurt. *International Journal of Dairy Technology*, *62*, 228–233. doi: 10.1111/j.1471-0307.2009.00465.x
- Aydın, S., & Özdemir, Y. (2017). Development and Characterization of Carob Flour Based Functional Spread for Increasing Use as Nutritious Snack for Children. *Journal of Food Quality*, *2017*, e5028150. doi: 10.1155/2017/5028150
- Azab, A. (2022). D-Pinitol—Active Natural Product from Carob with Notable Insulin Regulation. *Nutrients*, *14*(7), 1453. doi: 10.3390/nu14071453
- Battle, I., Tous, J., & Research, L. I. of P. G. and C. P. (1997). *Carob tree Ceratonia siliqua L.* Retrieved from <https://cgspace.cgiar.org/handle/10568/104277>
- Belitz, H.-D., Schieberle, P., & Grosch, W. (2020). *Χημεία Τροφίμων* (4η έκδοση). ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΤΖΙΟΛΑ.
- Berna, A., Pérez-Gago, M. B., Guardiola, V. G., Salazar, D., & Mulet, A. (1997). Effect of Temperature on Isobutyric Acid Loss during Roasting of Carob Kibble. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45*(10), 4084–4087. doi: 10.1021/jf970136p
- Brewers Association Beer Style Guidelines. (n.d.). Retrieved September 9, 2023, from Brewers Association website: <https://www.brewersassociation.org/edu/brewers-association-beer-style-guidelines/>
- Brown, J. E. (2016). *Η διατροφή στον κύκλο της ζωής* (Πέμπτη Έκδοση). Αθήνα: Ιατρικές Εκδόσεις Λαγός Δημήτριος.
- Carvalho, F., Moniz, P., Duarte, L. C., Esteves, M. P., & Gírio, F. M. (2011). Mannitol production by lactic acid bacteria grown in supplemented carob syrup. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *38*(1), 221–227. doi: 10.1007/s10295-010-0823-5

- Ceratonia siliqua (Algaroba, Beans, Carob, Carob Tree Kharoub, Locust Pods, Saint John's Bread, Sugar Pod) | North Carolina Extension Gardener Plant Toolbox. (n.d.). Retrieved August 9, 2023, from <https://plants.ces.ncsu.edu/plants/ceratonia-siliqua/>
- Christodoulou, M. C., Orellana Palacios, J. C., Hesami, G., Jafarzadeh, S., Lorenzo, J. M., Domínguez, R., ... Hadidi, M. (2022). Spectrophotometric Methods for Measurement of Antioxidant Activity in Food and Pharmaceuticals. *Antioxidants*, *11*(11), 2213. doi: 10.3390/antiox11112213
- Clodoveo, M. L., Crupi, P., Muraglia, M., & Corbo, F. (2022). Ultrasound Assisted Extraction of Polyphenols from Ripe Carob Pods (*Ceratonia siliqua* L.): Combined Designs for Screening and Optimizing the Processing Parameters. *Foods*, *11*(3), 284. doi: 10.3390/foods11030284
- Faria-Oliveira, F., Puga, S., & Ferreira, C. (2013). Yeast: World's Finest Chef. In *Food Industry*. IntechOpen. doi: 10.5772/53156
- Fidan, H., Petkova, N., Sapundzhieva, T., Baeva, M., Goranova, Z., Slavov, A., & Krastev, L. (2019). *CAROB SYRUP AND CAROB FLOUR (CERATONIA SILIQUA L.) AS FUNCTIONAL INGREDIENTS IN SPONGE CAKES*.
- FoodData Central. (n.d.). Retrieved August 12, 2023, from <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/173755/nutrients>
- Goulas, V., & Georgiou, E. (2020). Utilization of Carob Fruit as Sources of Phenolic Compounds with Antioxidant Potential: Extraction Optimization and Application in Food Models. *Foods*, *9*(1), 20. doi: 10.3390/foods9010020
- Goulas, V., Hadjivasileiou, L., Primikyri, A., Michael, C., Botsaris, G., Tzakos, A. G., & Gerothanassis, I. P. (2019). Valorization of Carob Fruit Residues for the Preparation of Novel Bi-Functional Polyphenolic Coating for Food Packaging Applications. *Molecules*, *24*(17), 3162. doi: 10.3390/molecules24173162

- Ikram, A., Khalid, W., Wajeeha Zafar, K., Ali, A., Afzal, M. F., Aziz, A., ... Koraqi, H. (2023). Nutritional, biochemical, and clinical applications of carob: A review. *Food Science & Nutrition*, *11*(7), 3641–3654. doi: 10.1002/fsn3.3367
- Imperial Stout: The Beer Born From the Request of a Russian Czar. (2015, May 1). Retrieved September 18, 2023, from Kegeator.com website: <https://learn.kegeator.com/russian-imperial-stout/>
- Khoddami, A., Wilkes, M. A., & Roberts, T. H. (2013). Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules*, *18*(2), 2328–2375. doi: 10.3390/molecules18022328
- Lamuela-Raventós, R. M. (2018). Folin–Ciocalteu method for the measurement of total phenolic content and antioxidant capacity. In *Measurement of Antioxidant Activity & Capacity* (pp. 107–115). John Wiley & Sons, Ltd. doi: 10.1002/9781119135388.ch6
- Lopes, N. (2021, March 8). Goma de alfarroba: O que é, para que serve e seus benefícios. Retrieved August 9, 2023, from Vitat website: <https://vitat.com.br/goma-de-alfarroba/>
- Marsh, A. J., Hill, C., Ross, R. P., & Cotter, P. D. (2014). Fermented beverages with health-promoting potential: Past and future perspectives. *Trends in Food Science & Technology*, *38*(2), 113–124. doi: 10.1016/j.tifs.2014.05.002
- Martel, F., Monteiro, R., & Calhau, C. (2010). Effect of polyphenols on the intestinal and placental transport of some bioactive compounds. *Nutrition Research Reviews*, *23*(1), 47–64. doi: 10.1017/S0954422410000053
- Nasar-Abbas, S. M., e-Huma, Z., Vu, T.-H., Khan, M. K., Esbenshade, H., & Jayasena, V. (2016). Carob Kibble: A Bioactive-Rich Food Ingredient. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *15*(1), 63–72. doi: 10.1111/1541-4337.12177
- Owen, R. W., Haubner, R., Hull, W. E., Erben, G., Spiegelhalder, B., Bartsch, H., & Haber, B. (2003). Isolation and structure elucidation of the major individual polyphenols in carob fibre. *Food and Chemical Toxicology*, *41*(12), 1727–1738. doi: 10.1016/S0278-6915(03)00200-X

- Özbek, Ç. (2023). Bitterness masking effects of carob syrup in bitter orange (*Citrus aurantium*) jam production. *Journal of Food Measurement and Characterization*. doi: 10.1007/s11694-023-01989-3
- Petit, M. D., & Pinilla, J. M. (1995). Production and purification of a sugar syrup from carob pods. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 145–152. doi: 10.1016/S0023-6438(95)80027-1
- RAMÓN-LACA, L., & MABBERLEY, D. J. (2004). The ecological status of the carob-tree (*Ceratonia siliqua*, Leguminosae) in the Mediterranean. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 144(4), 431–436. doi: 10.1111/j.1095-8339.2003.00254.x
- Rodríguez-Solana, R., Romano, A., & Moreno-Rojas, J. M. (2021). Carob Pulp: A Nutritional and Functional By-Product Worldwide Spread in the Formulation of Different Food Products and Beverages. A Review. *Processes*, 9(7), 1146. doi: 10.3390/pr9071146
- Shopska, V., Badova, M., Vassilev, S., Iliev, V., Kaneva, M., & Kostov, G. (2014). Biotechnology & Biotechnological Equipment Encapsulation of brewing yeast in alginate/chitosan matrix: Lab-scale optimization of lager beer fermentation. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 28, 277–284. doi: 10.1080/13102818.2014.910373
- Standard Reference Method. (2021). In *Wikipedia*. Retrieved from https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Standard_Reference_Method&oldid=1015615503
- Stavrou, I. J., Christou, A., & Kapnissi-Christodoulou, C. P. (2018). Polyphenols in carobs: A review on their composition, antioxidant capacity and cytotoxic effects, and health impact. *Food Chemistry*, 269, 355–374. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.06.152
- Toufeili, I., Itani, M., Zeidan, M., Al Yamani, O., & Kharroubi, S. (2022). Nutritional and Functional Potential of Carob Syrup Versus Date and Maple Syrups. *Food Technology and Biotechnology*, 60(2), 266–278. doi: 10.17113/ftb.60.02.22.7419
- Tsatsaragkou, K., Gounaropoulos, G., & Mandala, I. (2014). Development of gluten free bread containing carob flour and resistant starch. *LWT - Food Science and Technology*, 58(1), 124–129. doi: 10.1016/j.lwt.2014.02.043

- Tzatzani, T.-T., & Ouzounidou, G. (2023). Carob as an Agrifood Chain Product of Cultural, Agricultural and Economic Importance in the Mediterranean Region. *Journal of Innovation Economics & Management, Prépublication(0)*, 1140-21. doi: 10.3917/jie.pr1.0140
- Vekiari, S. A., Ouzounidou, G., Ozturk, M., & Görk, G. (2011). Variation of quality characteristics in Greek and Turkish carob pods during fruit development. *Procedia - Social and Behavioral Sciences, 19*, 750–755. doi: 10.1016/j.sbspro.2011.05.194
- Vitali, M., Gandía, M., Garcia-Llatas, G., Tamayo-Ramos, J. A., Cilla, A., & Gamero, A. (2023). Exploring the Potential of Rice, Tiger Nut and Carob for the Development of Fermented Beverages in Spain: A Comprehensive Review on the Production Methodologies Worldwide. *Beverages, 9(2)*, 47. doi: 10.3390/beverages9020047
- Volder, L. D. (2011). *Carob tree blossoms*. [Photo]. Retrieved from <https://www.flickr.com/photos/lindadevolder/6895470551/>
- votaniki. (2018, March 29). *Ceratonia siliqua*. Retrieved August 9, 2023, from Βοτανική website: <http://votaniki.gr/xlorida/eidi/ksilodi-eidi-tis-elladas/ceratonia-siliqua/>
- Walker, G. M., & Stewart, G. G. (2016). *Saccharomyces cerevisiae* in the Production of Fermented Beverages. *Beverages, 2(4)*, 30. doi: 10.3390/beverages2040030
- Zunft, H., Lüder, W., Harde, A., Haber, B., Graubaum, H., & Gruenwald, J. (2001). Carob pulp preparation for treatment of hypercholesterolemia. *Advances in Therapy, 18*, 230–236. doi: 10.1007/BF02853169
- Ελληνική Ένωση Ζυθοποιών. (n.d.). Retrieved September 17, 2023, from Ελληνική Ένωση Ζυθοποιών website: <https://www.ellinikienosizithopoion.gr/>
- Κοτζεκίδου - Ρούκα, Π. (2009). *Μικροβιολογία Τροφίμων & Μικροβιολογική Ανάλυση Τροφίμων*. Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις Γιαχούδη.
- Μπρατάκος, Μ. Σ. (2021). *Ενόργανη χημική ανάλυση εφαρμογές σε τρόφιμα και ποτά*. Αθήνα: Εκδόσεις Παπαζήση.

Νερατζής, Η., Ταταρίδης, Π., & Κεχαγιά, Δ. (2014). *Τεχνολογίες Βύνης και Ζύθου*. Αθήνα: Βιβλιοθήκη του Ζύθου.

Σπηλιώτης, Δρ. Β., & Μπατρίνου, Δρ. Α. (2014). *Βιομηχανική μικροβιολογία*. Εκδόσεις Δίσιγμα.

Στατιστικά Στοιχεία εκτάσεων και παραγωγής φυτικών προϊόντων. (n.d.). Retrieved August 10, 2023, from <https://www.minagric.gr/the-ministry-2/statistik-es-tekmhrioshs/8510-statistika-ekt-parag-fytikonproionton>

Σφλώμος, Κ. (2019). *Βιολειτουργικά Τρόφιμα, Πρόσθετα & Συμπληρώματα Διατροφής* (2η Έκδοση). Αθήνα: Εκδόσεις Τσότρας.

Σφλώμος, Κ., & Βαρζάκης, Θ. (2019). *Εισαγωγή στην επιστήμη και την Τεχνολογία τροφίμων* (2η Έκδοση). Αθήνα: Τσότρας.

Χαρουπιά (Ξυλοκερατιά). (n.d.). Retrieved August 9, 2023, from Fytopromitheyтики.gr website: <https://www.fytopromitheyтики.gr/charoupia-xylokeratia>