



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

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Σύγκριση μεθόδων ανάλυσης Σακχάρων στα γλεύκη οίνων και μύρας»

ΝΙΚΑ ΧΡΙΣΤΙΝΑ

ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ

ΑΜ: 18685057

ΑΜ: 18685014

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: ΑΡΧΟΝΤΟΥΛΑ ΧΑΤΖΗΛΑΖΑΡΟΥ

Αθήνα 2023



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

BACHELOR THESIS

Comparison of sugar analysis methods in wine and beer must.

Nika Chsrстина

Papadopoulou Konstantina

Registration Number:

18685057

18685014

Supervisor name and surname: Archontoula Chatzilazarou

Athens, 2023



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

Οι υπογράφοντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη διπλωματική εργασία με
τίτλο:

«Σύγκριση μεθόδων ανάλυσης Σακχάρων στα γλεύκη οίνων και μπύρας»

και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

Ψηφιακή Υπογραφή

Επιβλέποντα Καθηγητή

(1ου Μέλους Επιτροπής)

Ψηφιακή Υπογραφή

Καθηγητή

(2ου Μέλους Επιτροπής)

Ψηφιακή Υπογραφή

Καθηγητή

(3ου Μέλους Επιτροπής)

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η κάτωθι υπογράφουσα Νίκα Χριστίνα και η κάτωθι υπογράφουσα Παπαδοπούλου Κωνσταντίνα, με αριθμό μητρώου 18685057 και 18685014 φοιτήτριες του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμες Οίνου, Αμπέλου και Ποτών, δηλώνω υπεύθυνα ότι: «Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου». Επιθυμώ την απαγόρευση πρόσβασης στο πλήρες κείμενο της εργασίας μου μέχρι και έπειτα από αίτηση μου στη Βιβλιοθήκη και έγκριση του επιβλέποντα καθηγητή*

Η Δηλούσα



* Νίκα Χριστίνα

Η Δηλούσα



Παπαδοπούλου Κωνσταντίνα

Ψηφιακή Υπογραφή

* Σε εξαιρετικές περιπτώσεις και μετά από αιτιολόγηση και έγκριση του επιβλέποντα, προβλέπεται χρονικός περιορισμός πρόσβασης (embargo) 6-12 μήνες. Στην περίπτωση αυτή θα πρέπει να υπογράψει ψηφιακά ο/η επιβλέπων/ουσα καθηγητής/τρια, για να γνωστοποιεί ότι είναι ενημερωμένος/η και συναινεί. Οι λόγοι χρονικού αποκλεισμού πρόσβασης περιγράφονται αναλυτικά στις πολιτικές του Ι.Α. (σελ. 6)

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	
ABSTRACT.....	
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	
ΓΛΕΥΚΟΣ	
1. 1 Γενικά.....	.8
1. 2 Ορισμός του μούστου και κατηγορίες.....	8
1. 3 Διαδικασία παραγωγής γλεύκους.....	.9
1. 4 Η σύσταση του μούστου.....	.9
1. 4. 1 Σάκχαρα.....	.13
1. 4. 2 Οξέα.....	.14
1. 4. 5 Φαινολικές Ενώσεις.....	.15
1.4.5 Ενώσεις αζώτου.....	16
1. 4. 6 Λιπίδια και κηρώδεις ενώσεις.....	17
1. 4. 7 Μέταλλα και βιταμίνες.....	18
1. 4. 8 Ισοπρενοειδή.....	18
1.4.9 Αδιάλυτα υλικά.....	19
1. 5 . Παράγοντες που επιδρούν στη συγκέντρωση των σακχάρων στον μούστο.....	.20
1. 5. 1 Αμετάβλητοι Παράγοντες.....	...20
1. 5. 2 Κλιματικοί Παράγοντες.....	.. 22
1. 5. 3 Μεταβλητοί Παράγοντες.....	...22
1. 5. 4 Τυχαίοι Παράγοντες.....	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	

ΓΛΕΥΚΟΣ ΜΠΥΡΑΣ

2.1 Γενικά.....	25
2.2 Ορισμός και ποικιλίες.....	28
2.3 Παραγωγή Γλεύκου.....	30
2.3.1 Άλεση βύνης.....	30
2.3.2 Άλεση με ρύθμιση.....	32
2.3.3 Υγρή άλεση.....	32
2.3.4 Πολτοποίηση.....	33
2.3.5 Αποικοδόμηση αμύλου.....	33
2.3.6 Μέθοδοι Πολτοποίησης.....	35
2.3.7 Διαχωρισμός μούστου (Λευτράρισμα).....	36
2.3.8 Διαχωρισμός με Lauter Tun.....	37
2.3.9 Διαχωρισμός μούστου με φίλτρο.....	38
2.3.10 Βρασμός ζυθογλεύκου.....	39
2.3.11 Διαύγαση γλεύκου.....	41
2.4 Σύσταση ζυθογλεύκου.....	41
2.4.1 Σάκχαρα.....	44
2.4.2 Ενώσεις αζώτου.....	47
2.4.3 Λιπίδια.....	49
2.4.4 Βιταμίνες και ανόργανα ιόντα.....	49
2.5 Η σχέση της σύνθεσης του γλεύκου με την ποιότητα της μπίρας...	50

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΣΑΚΧΑΡΑ

3.1 Γενικά.....	51
-----------------	----

3. 2 Κατηγορίες Σακχάρων.....	52
3. 2. 1 Μονοσακχαρίτες.....	53
3. 2. 2 Ολιγοσακχαρίτες.....	55
3. 2. 3 Πολυσακχαρίτες.....	56
3. 3 Ο ρόλος των σακχάρων.....	59
3. 4 Ανάγοντα σάκχαρα.....	59
3. 4. 1 Γλυκόζη.....	60
3. 4. 2 Φρουκτόζη.....	60
3. 4. 3 Μαλτόζη.....	60
3.5 Μη αναγωγικά σάκχαρα.....	61
3.6 Ιδιότητες των αναγωγικών σακχάρων.....	61
3.7 Τα σάκχαρα στα γλεύκη.....	62
3. 8 Σάκχαρα ζυθογλεύκους.....	64

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 Γενικά.....	67
4. 2 Η προετοιμασία των δειγμάτων.....	67
4. 2. 1 Εκχύλιση και κλασματοποίηση.....	68
4. 2. 2. Διήθηση.....	68
4. 2. 3 Παραδοσιακές μέθοδοι εκχύλισης (LLE, SPE).....	68
4. 2. 4 Υπερκρίσιμη εκχύλιση (SFE).....	68
4. 2. 5 Εκχύλιση υγρού υπό πίεση (PLE).....	69
4. 2. 6 Κλασματοποίηση ροής πεδίου (FFF).....	69
4. 2. 7 Μέθοδοι που βασίζονται στη χρωματογραφία.....	70

4. 2. 8 Μεμβράνες και άλλες τεχνικές	70
4. 3 Μέθοδος Lane-Eynon	71
4. 4 Μέθοδος Munson και Walker	71
4. 5 Μέθοδος Anthrone	71
4. 6 Μέθοδος Φαινόλη - Θεικό οξύ	72
4. 7 Μέθοδος Luff - Schrool.	72
4. 8 Μέθοδος Kolthoff	72
4. 9 Μέθοδος Fehling	73
4. 10 Μέθοδος Munson και Walker	73
4. 11 Μέθοδος Bertrand	74
4. 12 Μέθοδος του ιωσιτιούτου του Βερολίνου	74
4. 13 Μέθοδος των Knight και Allen.	74
4. 14 Μέθοδος Barfoed	74
4. 15 Μέθοδος Molisch	75
4. 16 Μέθοδος Δινιτροσαλικυλικού οξέος για μέτρηση Γλυκόζης	75
4. 17 Μέθοδος Benedict	75
4. 18 Μέθοδος Tollens	76
4. 19 Ενζυμικές Μέθοδοι.	76
4. 20 Φυσικές Μέθοδοι	76
4. 21 Μέθοδος Nelson - Somogyi	77
4. 22 Αέρια Χρωματογραφία	77
4. 23 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)	78
4. 24 Χωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας (TLC)	80
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	82

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παραγωγή οίνων και μύρας προέρχεται από την εμφάνιση του πολιτισμού. Με το πέρασμα των ετών νέες τεχνολογίες και τεχνικές βελτίωσαν τα χαρακτηριστικά αυτών καθώς και εξελίχθηκαν σε νέα προϊόντα. Στην παρούσα εργασία πραγματοποιείται η ανάλυση και η αξιολόγηση των μεθόδων που εφαρμόστηκαν και εφαρμόζονται για τον προσδιορισμό των σακχάρων σε γλεύκη.

Στο πρώτο κεφάλαιο αναλύεται το γλεύκος των οίνων. Αρχικά παρουσιάζονται οι κατηγορίες και η διαδικασία παραγωγής, η σύσταση του γλεύκους καθώς και οι παράγοντες που επιδρούν στη συγκέντρωση των σακχάρων στο γλεύκος.

Στο επόμενο κεφάλαιο περιγράφεται η διαδικασία παραγωγής του ζυθογλεύκους, η σύσταση και η σχέση των συστατικών της με την ποιότητα της μύρας.

Στο τρίτο κεφάλαιο ακολουθεί η περιγραφή και η ανάλυση των σακχάρων γενικά καθώς και αυτών που περιέχονται στα γλεύκη.

Στο τέταρτο κεφάλαιο περιγράφονται οι διαδικασίες προετοιμασίας των δειγμάτων καθώς και οι μέθοδοι που εφαρμόζονται για τον προσδιορισμό των σακχάρων στα γλεύκη.

Τέλος, ακολουθούν τα Συμπεράσματα και η Βιβλιογραφία.

ABSTRACT

The production of wine and beer comes from the emergence of civilization. Over the years new technologies and techniques have improved these features as well as produced higher-quality ones. In this work, the analysis and evaluation of the methods applied to must for the determination of sugars is carried out.

In the first chapter the must of the wines is analyzed. First, the categories and the production process, the composition of the must as well as the factors affecting the concentration of sugars in the must are presented.

The next chapter describes the production process of the wort, its composition and the relationship of its components with the quality of the beer. In the third chapter follows the description and analysis of sugars in general as well as those contained in musts.

The fourth chapter describes the sample preparation procedures as well as the methods applied for the determination of sugars in musts.

Finally, the Conclusions and Bibliography follow.

ΣΚΟΠΟΣ

Η σύσταση των γλευκών του οίνου και ζύθου σε χημικές ενώσεις είναι πολύπλοκη. Κάποιες από τις σημαντικότερες χημικές ενώσεις που περιέχονται είναι τα σάκχαρα, που ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός τους σε διάφορα στάδια της οινοποίησης και ζυθοποίησης είναι σημαντικός. Έχουν αναπτυχθεί πολλοί και διαφορετικοί μέθοδοι ανάλυσης σακχάρων σε γλεύκη οίνων και ποτών που διαφέρουν μεταξύ τους ανάλογα με τις ιδιότητες και τη φύση κάθε σακχάρου. Ανάλογα με τον εξοπλισμό, τη τεχνογνωσία, και τη σύσταση γλεύκους, μπορούμε να επιλέξουμε την καταλληλότερη μέθοδο ανάλυσης, γι'αυτό και ο σκοπός της εργασίας αυτής είναι η επεξήγηση της κάθε μεθόδου και κατηγοριοποίηση τους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΓΛΕΥΚΟΣ

1. 1 Γενικά

Είναι γεγονός ότι η ποιότητα των σταφυλιών επιδρά σημαντικά στην ποιότητα του μούστου, διότι επιδρούν σημαντικά στον καθορισμό της γεύσης, του αρώματος, της περιεκτικότητας του αλκοόλ καθώς και άλλων χαρακτηριστικών στο κρασί. Η σύσταση και η συγκέντρωση των σακχάρων του σταφυλιού διαφοροποιούνται κατά την ωρίμανση του και μπορεί να επηρεαστεί από πολλούς παράγοντες, όπως η διαχείριση των συνθηκών του περιβάλλοντος του αγροκτήματος και των καλλιεργητικών φροντίδων (Jordão et al., 2015).

1. 2 Ορισμός του μούστου και κατηγορίες

Ως μούστος ορίζεται το υγρό προϊόν που λαμβάνεται από νωπά σταφύλια μέσω διαφόρων διεργασιών, όπως η σύνθλιψη, η αφαίρεση των μίσχων ή των στέμφυλων, η στράγγιση και το πάτημα. Σύμφωνα με τον διεθνή οργανισμό αμπέλου και οίνου το 2022, ο μούστος κατηγοριοποιείται στις ακόλουθες κατηγορίες (OIV, 2022):

- Διατηρημένος μούστος σταφυλιού (16/70 και 5/88): Φρέσκος μούστος σταφυλιών, όπου αποτρέπεται η αλκοολική ζύμωση με μία από τις ακόλουθες οινολογικές διαδικασίες, δηλαδή με θείωση, με προσθήκη διοξειδίου του άνθρακα, που είναι γνωστή και ως ανθρακοποίηση του γλεύκος, και με προσθήκη σορβικού οξέος. Η μέγιστη ανεκτή περιεκτικότητα ενδογενούς αιθανόλης είναι 1 % vol.
- Συμπυκνωμένος μούστος ή Πετιμέζι (18/73): Είναι προϊόν που δεν έχει υποστεί ζύμωση ούτε καραμελοποίηση και λαμβάνεται μέσω της μερικής αφυδάτωσης του γλεύκος σταφυλιών ή του διατηρημένου γλεύκος αυτών σύμφωνα με διαδικασίες οι οποίες είναι αποδεκτές από τον OIV. Η ελάχιστη τιμή της πυκνότητας στους 20 °C είναι 1,24 g/ml. Γενικά χαρακτηρίζεται ως ένα σκουρόχρωμο, ουδέτερο και πολύ σταθερό προϊόν με συγκέντρωση 65 Brix.
- Καραμελωμένος μούστος (18/73): Είναι ένα μη ζυμωμένο προϊόν, το οποίο λαμβάνεται με μερική αφυδάτωση μέσω της άμεσης θερμότητας που υπόκειται το γλεύκος των σταφυλιών ή το διατηρούμενο γλεύκος σταφυλιών σύμφωνα με τις αποδεκτές διαδικασίες από το OIV. Και σε αυτή την κατηγορία η ελάχιστη τιμή της πυκνότητας είναι 1,3 g/ml στους 20 °C.

1.3 Διαδικασία παραγωγής γλεύκος

Αρχικά θα πρέπει να ολοκληρωθεί η καλλιεργητική περίοδος της αμπέλου, δηλαδή να ολοκληρωθεί ο βιολογικός κύκλος, όπου σημαίνει η ωρίμανση των σταφυλιών. Ακολουθεί η συγκομιδή αυτών, όπου η ημερομηνία διαφοροποιείται ανάλογα με την ποικιλία της αμπέλου, τις καιρικές συνθήκες που επικρατούν την περίοδο της συγκομιδής, τον τύπο του οίνου που θέλουν να παράγουν και την υγεία αυτού.

Η επιλογή της ημερομηνίας συγκομιδής θα πρέπει να μην βασίζεται εμπειρικά δηλαδή μόνο στην εμφάνιση του σταφυλιού και στα χαρακτηριστικά του, όπως στη σφριγηλότητά, την οξύτητά του και στο χρώμα των ξυλωδών μερών. Θα πρέπει να πραγματοποιείται βάσει της

παρακολούθηση της διαδικασίας ωρίμανσης με την μέτρησης συγκεκριμένων συστατικών του σταφυλιού. Οι δύο βασικοί τρόποι σύμφωνα με τους οποίους δύναται να καθοριστεί η ημερομηνία συγκομιδής είναι η μακροπρόθεσμη μέθοδος, η οποία βασίζεται στη διάρκεια του κύκλου ανάπτυξης, και η δεύτερη είναι η παρακολούθηση του σταδίου της ωρίμανσης σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα (Moreno and Peinado, 2012).

Επιπλέον, στην μακροπρόθεσμη πρόβλεψη ο χρόνος συγκομιδής βασίζεται στον κύκλο ανάπτυξης του αμπελιού και λαμβάνει υπόψη τις περιόδους μεταξύ της ανθοφορίας και της ωρίμανσης. Η διάρκεια του κύκλου ανάπτυξης ποικίλλει ανάλογα με το αμπέλι και την περιοχή καλλιέργειας και οι προβλέψεις βασίζονται στην εμπειρία που αποκτήθηκε στον συγκεκριμένο αμπελώνα, μέσω των παρατηρήσεων του τρέχοντος έτους σε σχέση με εκείνες των προηγούμενων ετών. Σε σύγκριση με την ποικιλία Chasselas, τα σταφύλια ταξινομούνται ως ποικιλίες πρώτης, δεύτερης ή τρίτης φάσης, ανάλογα με το αν ωριμάζουν ταυτόχρονα, 12 έως 15 ημέρες αργότερα ή 24 έως 30 ημέρες αργότερα από τα σταφύλια Chasselas που καλλιεργήθηκαν υπό τις ίδιες συνθήκες (Moreno and Peinado, 2012).

Η κατά προσέγγιση ημερομηνία συγκομιδής μπορεί να καθοριστεί έως και 3 μήνες πριν, διότι τα δύο φαινόμενα έχουν περίπου 100 μέρες απόσταση μεταξύ τους. Εάν η πρόβλεψη γίνει από το μέσο του Veraison, θα προστεθούν κατά μέσο όρο 40 έως 50 ημέρες ανάλογα με τα χαρακτηριστικά του έτους και τη διάρκεια της περιόδου ωρίμανσης, όπως παρατηρήθηκε τα προηγούμενα έτη στην ίδια ποικιλία και στην ίδια περιοχή καλλιέργειας. Αυτές οι προβλέψεις είναι περισσότερο ακριβείς σε θερμές περιοχές και υπάρχει μικρή πιθανότητα ξαφνικών μετεωρολογικών αλλαγών. Ο γενικός κανόνας είναι να καθυστερήσει η συγκομιδή όσο το δυνατόν περισσότερο για να είναι όσο το δυνατόν πιο κοντά στη βέλτιστη ωρίμανση και η συγκομιδή να πραγματοποιηθεί όσο το δυνατόν γρηγορότερα.

Τα σταφύλια όπου προορίζονται για παραγωγή μούστου θα πρέπει να συλλέγονται με τον ίδιο τρόπο και για αυτό τον σκοπό έχουν κατασκευαστεί μηχανήματα τα οποία παρουσιάζουν τόσο πλεονεκτήματα όσο και μειονεκτήματά. Σε γενικές γραμμές, τα αποτελέσματα που λαμβάνονται για μια δεδομένη μεταβλητή εξαρτώνται από τον τύπο της συσκευής, με εξαίρεση τη περιεκτικότητα των σακχάρων, η οποία είναι ανεξάρτητη από το μηχάνημα που χρησιμοποιείται. Οι μέθοδοι περιλαμβάνουν την ομογενοποίηση του υλικού με αποτέλεσμα την απελευθέρωση τανινών και ανθοκυανών με την προϋπόθεση τα μηχανήματα να λειτουργούν παρόμοια, όμως να προκαλούν σημαντική μείωση της ογκομετρούμενης οξύτητας και αύξηση του pH.

Η μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον σχηματισμό γλεύκους θα πρέπει να επιλέγεται σύμφωνα με τη μεταβλητή που παρακολουθείται. Για την παραδοσιακή παρακολούθηση της ωρίμανσης, δηλαδή σάκχαρα ή/και οξύτητα, τα παραδοσιακά πιεστήρια αποφέρουν καλά αποτελέσματα. Εάν ο στόχος είναι η ανάλυση φαινολικών ενώσεων, η φυγοκέντριση του σταφυλιού και έπειτα η συλλογή του φλοιού του καρπού, το καθάρισμα και η ξήρανση είναι μια καλή επιλογή. Η μέθοδος της εκχύλισης θεωρείται καλή με το σφάλμα είναι μικρότερο του 5 % αν και είναι απαραίτητη η εφαρμογή παραδοσιακής πρέσας για να ληφθούν οι αντιπροσωπευτικές τιμές της οξύτητας και του pH (Moreno and Peinado, 2012).

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται είναι (Jackson R.S. , 2014).

Αποβοστρύχωση: Κατά την διαδικασία διαχωρίζονται απο τον καρπό τα βόστρυχα πριν απο την σύνθλιψη για την αποφυγή ανεπιθύμητων οσμών, όπως σηπτικών τανινών. Συνήθως χρησιμοποιείται το ίδιο μηχάνημα τόσο για την αποβοστρύχωση όσο και για την σύνθλιψη. Η συσκευή γνωστή και ως αποβοστρυχωτής περιλαμβάνει έναν διάτρητο κύλινδρο απο τον οποίο εξέρχονται μόνο οι ράγες και όχι τα βόστρυχα.



Εικόνα 1.1. Αποβοστρυχωτής (Jackson, 2014)

Σύνθλιψη: Στην παραπάνω μέθοδο δεν πραγματοποιείται επιτυχώς σε όλες τις ράγες το σπάσιμο οπότε παρατηρείται οξειδωτική αμαύρωση. Συνεπώς, είτε ταυτόχρονα είτε ακολούθως εφαρμόζεται η σύνθλιψη, δηλαδή οι ράγες πιέζονται στην επιφάνεια του διάτρητου περιβλήματος ή απο ενός ζεύγους κυλίνδρων, οι οποίοι φέρουν σπειροειδής ραβδώσεις και η περιστρέφονται με αντίθετη φορά. Αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι η αποφυγή επιμόλυνσης του γλεύκους με γιγατέλαιο.



Εικόνα 1.2. Η πρέσα σύνθλιψης (Jackson , 2014)

Πνευματικά πιεστήρια: Είναι συσκευές, οι οποίες έχουν ένα επιμήκες άνοιγμα στη πάνω πλευρά, ενώ δύναται να περιστρέφονται για την εκροή του υγρού. Η αρχή της μεθόδου είναι ότι εισέρχεται συμπιεσμένο αέριο στην περιοχή που βρίσκεται ανάμεσα στην πλαστική κύστη και στην εξωτερική πλευρά του κυλίνδρου. Επομένως, πραγματοποιούνται διαδοχικές πιέσεις των σταφυλιών μέσω της περιστροφής του κυλίνδρου στην επιφάνεια διάτρητων πλακών που είναι τοποθετημένες κατά μήκος της κεντρικής κοιλότητας του πιεστήριου.



Εικόνα 1.3. Πνευματικά πιεστήρια (Jackson, 2014)

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1.1) παρουσιάζονται οι μέθοδοι που εφαρμόζονται για την παραγωγή μούστου.

Πίνακας 1. 1. Οι μέθοδοι που εφαρμόζονται για την παραγωγή γλεύκους και πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα αυτών (Jackson, 2014).

Μέθοδος	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Αποβοστρύχωση	<ul style="list-style-type: none"> • 15-30% μικρότερος αναγκαίος χώρος • βελτίωση της γεύσης • μεγαλύτερος αλκοολικός τίτλος • βελτίωση της ένταση χρώματος των οίνων 	<ul style="list-style-type: none"> • επιδρά αρνητικά στη αλκοολικής ζύμωσης, λόγω του αζώτου που παράγεται • Η διαδικασία της αποβοστρύχωσης δυσκολεύει το σπάσιμο της ρώγας • Επιδρά στην αύξηση της οξείδωσης λόγω του αερισμού
Σύνθλιψη	<ul style="list-style-type: none"> • πραγματοποιείται με μεγαλύτερη ευκολία η μεταφορά της μάζας των σταφυλιών μέσω αντλιών • Αύξηση της επιφάνειας επαφής υγρού και στερεών συστατικών • Επιτυγχάνεται ομοιομορφία του θειώδη ανυδρίτη • εξοικονόμηση χώρου έως 20%. • μικρότερα πιεστήρια 	<ul style="list-style-type: none"> • υψηλά επίπεδα οινολάσπης • αύξηση της οξείδωση • πολύ υψηλή αύξηση της θερμοκρασίας ιδίως τις ζεστές περιόδους • αύξηση του αριθμού των γιγάρτων στο γλεύκος
Πνευματικά Πιεστήρια	<ul style="list-style-type: none"> • γλεύκος υψηλής ποιότητας • μη διάρρηξη των γιγλαρτων με αποτέλεσμα τον περιορισμό της εκχύλισης των τανινών 	

1. 4 Η σύσταση του μούστου

Είναι σαφές ότι ο μούστος εμπεριέχει πλήθος διαφόρων συστατικών με τις συγκεντρώσεις αυτών να μην είναι σταθερές, αλλά να διαφέρουν. Τα κύρια συστατικά του μούστου είναι το νερό, τα σάκχαρα, οι υδατάνθρακες, τα οξέα, οι αλκοόλες, οι φαινολικές ενώσεις, οι αζωτούχες ενώσεις όπως πρωτεΐνες, τα αμινοξέα, τα άλατα αμμωνίου καθώς και οι ανόργανες ουσίες, όπως μέταλλα και ανιόντα. Η σύσταση αυτή είναι αποτέλεσμα πολλαπλών προαγόντων, όπως η ποικιλία του αμπελιού, οι περιβαλλοντικές συνθήκες που περιλαμβάνουν το κλίμα και το έδαφος, γνωστά και ως «terroir», η αμπελουργική διαχείριση και οι καλλιεργητικές πρακτικές, γνωστά και ως «vintage» καθώς και οι διαφορετικές πρακτικές οινοποίησης (Camin and Bontempo, 2020).

Η περιεκτικότητα των σακχάρων στα σταφύλια στα κυμαίνεται μεταξύ 18 – 25 % w/w, με την τυπική απόκλιση μεταξύ των ραγών σε έναν αμπελώνα ακόμη και σε ένα τσαμπί να είναι διαφοροποιείται συχνά ± 2 % w/w, εξαιτίας της περιόδου ανθοφορίας και καρπόδεσης. Αυτή η διαφοροποίηση είναι δυνατόν να παρατηρείται ακόμη και σε μία μόνο ράγα. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι δεν έχουν όλες οι ράγες τον ίδιο βαθμό ωρίμανσης. Παρόμοιες διαφοροποιήσεις έχουν καταγραφεί και σε άλλα χαρακτηριστικά όπως το χρώμα και το άρωμα. Επιπλέον, οι ενώσεις έχουν καταγραφεί ότι ποικίλλουν κατά 10 φορές μέσα σε έναν αμπελώνα και κατά συνέπεια στο μούστο (Pagay, and Cheng, 2010).

1.4. 1 Σάκχαρα

Τα σάκχαρα εντοπίζονται, με τη μορφή της φρουκτόζης και της γλυκόζης. Συνήθως βρίσκονται σε ισομοριακές ποσότητες, διότι προκύπτουν από την υδρόλυση του δισακχαρίτη και της σακχαρόζης. Πέρα από αυτές τις κύριες ενώσεις ανιχνεύονται και μικρές ποσότητες πεντόζων και άλλων σακχάρων με τις συγκεντρώσεις αυτών να είναι πολύ χαμηλές, όμως δύναται να φτάσουν το 25 % w/w ή και σε ορισμένες περιπτώσεις παραπάνω (Meyers, and Vanden Heuvel, 2014).

Η συγκέντρωση των σακχάρων είναι η περισσότερο ευρέως χρησιμοποιούμενη παράμετρος για την αξιολόγηση της σύστασης και της ωριμότητας του σταφυλιού, διότι καθορίζει την ποσότητα των σακχάτων στον μούστο. Ένας περιοριστικός παράγοντας για την επαρκή περιεκτικότητα σακχάρων στον μούστο είναι οι θερμοκρασίες που επικρατούν κατά τη

διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου και ως εκ τούτου σε περιοχές με χαμηλές θερμοκρασίες η συγκέντρωση των σακχάρων είναι μικρή (McIntyre, et al., 1987).

Επιπρόσθετα, οι πολυσακχαρίτες είναι πολυμερή τα οποία εμπεριέχουν υδατάνθρακες που προέρχονται από τα κυτταρικά τοιχώματα του φλοιού του σταφυλιού. Παρότι οι πηκτίνες και οι δομικοί πολυσακχαρίτες προσδιορίζονται κοντά στο 1 % στην ποικιλία *V. labruscana*, γενικά οι τιμές τους κυμαίνονται από 0,1 έως 2 % στον μούστο. Για την επίτευξη της υδρόλυσης ορισμένων πολυσακχαριτών και την αύξηση αυτών στο γλεύκος πραγματοποιείται προσθήκη ενζύμων. Οι κοινές πηκτινάσες θα δώσουν έως και 1 g/L γαλακτουρονικού οξέος από την υδρόλυση της πηκτίνης, η οποία είναι μη ζυμώσιμη και μπορεί να παραμείνει στο τελικό προϊόν (Ducasse, et al., 2010).

1. 4. 2 Οξέα

Τα σταφύλια και κατ' επέκταση ο μούστος περιέχουν σημαντικές ποσότητες οργανικών οξέων οι οποίες υπολογίζονται τουλάχιστον 10 γραμμάρια ανά κιλό και σε μεγάλο ποσοστό παραμένουν στο κρασί. Η παρουσία οργανικών οξέων θεωρείται σημαντική, διότι επιδρά στη γεύση του οίνου και στη διατήρηση της χαμηλής τιμής του pH με αποτέλεσμα την αποτροπή πολλών αλλοιώσεων και παθογόνων οργανισμών. Συνήθως, το τρυγικό οξύ είναι αυτό που βρίσκεται στις μεγαλύτερη συγκέντρωση και θεωρείται βασικός δείκτης για τον μούστο. Όσον αφορά το μηλικό οξύ θεωρείται ότι και αυτό συμβάλει στην οξύτητα.

Σε μικρότερες ποσότητες έχουν προσδιοριστεί το κιτρικό και το ασκορβικό οξύ, με το πρώτο να σχηματίζεται επίσης μέσω του μεταβολισμού της ζύμης καθώς και ίχνη άλλων οξέων.

Στο μηλικό και το κιτρικό οξύ δύναται να επιδράσουν βακτήρια του γαλακτικού οξέος κατά την οινοποίηση, όπως στη μηλογαλακτική ζύμωση. Το μηλικό και το τρυγικό οξύ αρχικά έχουν υψηλές συγκεντρώσεις, οι οποίες μειώνονται κατά τη συσσώρευση σακχάρων κυρίως λόγω της αναπνοής και της απώλειας μηλικού οξέος καθώς και λόγω της διαστολής των σταφυλιών. Επιπρόσθετα, ο ρυθμός αποικοδόμησης του μηλικού οξέος είναι ανάλογος της αύξησης της θερμοκρασίας. Συνεπώς τα προϊόντα παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα οξύτητας στο μούστο. Απο τα παραπάνω γίνεται αντιληπτός ο λόγος για τον οποίο προστίθενται οξέα σε θερμές περιοχές, ενώ τα επίπεδα οξύτητας συχνά δύναται να μειωθούν έπειτα κατά τη χρήση σταφυλιών, τα οποία προέρχονται από ψυχρότερες περιοχές (Mattivi, et al., 2006).

1. 4. 5 Φαινολικές Ενώσεις

Γενικά, οι φαινολικές ενώσεις βρίσκονται σε μεγάλο βαθμό στη σάρκα και στα γίγαρτα, όμως δύναται να εξαχθεί και από τα άλλα μέρη του τσαμιού στην περίπτωση που πραγματοποιηθεί στο σύνολο ζύμωση. Έχει παρατηρηθεί σημαντική διαφοροποίηση της συγκέντρωσης μεταξύ των ποικιλιών, ενώ μελέτες αναφέρουν ότι τα κόκκινα σταφύλια έχει ολική περιεκτικότητα σε φαινολικές 5,6 g/kg, με το ένα τρίτο, δηλαδή 1,9 g/kg να περιέχεται στη σάρκα, τα δύο τρίτα, δηλαδή 3,5 g/kg να περιέχονται στα γίγαρτα και λιγότερο από 5% στον πολτό και στο μούστο. Η σύσταση των λευκών σταφυλιών είναι μικρότερη του 1 g/kg στη σάρκα λόγω της μη ύπαρξης των ανθοκυάνων, περίπου 2,8 g/kg στα γίγαρτα, ενώ ανάλογη είναι η ποσότητα στον πολτό και στον μούστο (Ducasse et al., 2010).

Οι φαινολικές ενώσεις αποτελούνται από τέσσερις κύριες κατηγορίες και πολλές δευτερεύουσες (Mattivi et al., 2006).

- Η σάρκα των σταφυλιών περιέχει φλαβονόλες, με τη συγκέντρωση να κυμαίνεται από 1 έως 80 mg/kg.
- Η σάρκα των ραγών του κόκκινου σταφυλιού χρωματίζεται από την παρουσία ανθοκυανινών, οι οποίες ποικίλλουν από την υποκατάσταση του δακτυλίου B, τη γλυκοζυλίωση και την περαιτέρω ακυλίωση του τμήματος της γλυκόζης. Στις ερυθρές ποικιλίες οι ανθοκυανίνες κυμαίνονται μεταξύ 200 και 6000 mg/kg, με τα σκουρόχρωμα σταφύλια να παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα.

Τα μονομερή φλαβαν-3-όλης και τα πολυμερή τους θεωρούνται σημαντικά φαινολικά συστατικά. Αυτά βρίσκονται τόσο στη σάρκα όσο και στους σπόρους, ενώ αποτελούν περίπου το ήμισυ των φαινολικών ενώσεων στον καρπό. Κατά την ωρίμανση, οι εκχυλίσιμες τανίνες των γιγάρτων μειώνονται ως αποτέλεσμα οξειδωτικών αντιδράσεων και εκδηλώνεται με την αλλαγή στο χρώμα του σπόρου από πράσινο σε καφέ.

Οι υδροξυκινναμικές ενώσεις είναι οι κύριες φαινολικές ενώσεις στον πολτό και το χυμό του σταφυλιού και είναι τα κυρίαρχα φαινολικά στον μούστο και στο κρασί του λευκού σταφυλιού, με τη συγκεντρωσή τους να κυμαίνεται από 85 έως 400 mg/kg (Travaglia, et al., 2011).

1.4.5 Ενώσεις αζώτου

Τα αμινοξέα και τα άλατα αμμωνίου είναι οι κύριες αζωτούχες ενώσεις οι οποίες εντοπίζονται στα σταφύλια με τις συγκεντρώσεις αυτών να διαφέρουν σημαντικά και να κυμαίνονται από 300 έως 5000 mg/L. Παίζουν ουσιώδη ρόλο στον μεταβολισμό του αζώτου από τους ζυμομύκητες, όπως και στη σύνθεση πρωτεϊνών και μακρομορίων. Ωστόσο, περίπου μόνο το 50 % είναι α-αμινοξέα, όπου μπορούν να μεταβολιστούν κατά τη ζύμωση και το υπόλοιπο είναι προλίνη. Τα είδη των αμινοξέων επηρεάζονται από διάφορους παράγοντες, όπως η ποικιλία, το κλίμα, ενώ υπάρχει η δυνατότητα στο γλεύκος να παρατηρείται με άζωτο, συνήθως ως φωσφορικό διαμμώνιο, έχοντας πολύ μικρή συγκέντρωση για την επίτευξη της ζύμωσης (Negri, et al., 2008).

Οι αναλύσεις των σταφυλιών εντοπίζουν πλήθος διαφορετικών ενζύμων και πρωτεϊνών, με τις συγκεντρώσεις να είναι <50 mg/kg. Αρκετές πρωτεΐνες των σταφυλιών έχουν ενζυματική δράση, όπως οι οξειδάσες οι οποίες θα επιδράσουν στο μαύρισμα του χυμού κατά τη σύνθλιψη του σταφυλιού. Το ίδιο παρατηρείται στις χιτινάσες, εστεράσες, γλυκοσιδάσες, πηκτινάσες και γλυκανάσες. Όμοια η θαυματίνη και οι χιτινάσες σχηματίζονται ως απόκριση στην επίδραση των μυκήτων με αποτέλεσμα να είναι οι κύριες πρωτεΐνες που υπάρχουν με τη συγκέντρωση αυτών να προσδιορίζεται στα 300 mg/kg νωπού βάρους σταφυλιών. Οι πρωτεΐνες αυτές δύναται να επιφέρουν θολότητα στο λευκό κρασί και να ενωθούν με τις τανίνες και έτσι να επιδράσουν αρνητικά στην ικανότητα εκχύλισης. Επιπλέον, δύναται να προσδιοριστούν ολιγοπεπτίδια καθώς και γλουταθειόνη, η οποία θεωρείται ένα βασικό αντιοξειδωτικό λόγω της ομάδας της θειόλης (Vincenzi, et al., 2012).

Τέλος, δύναται να περιέχονται μικρές ποσότητες βιογενών αμινών, συμπεριλαμβανομένων της ισοπεντυλαμίνης, της αιθυλαμίνης, της αγματίνης, της διαμινοπροπίνης, της σπερμιδίνης και της σπερμίνης, σε συγκέντρωση που κυμαίνεται από 3 έως 5 mg/kg (Smit, et al., 2014).

1. 4. 6 Λιπίδια και κηρώδεις ενώσεις

Τα λιπίδια βρίσκονται σε υψηλό ποσοστό στα γίγαρτα του σταφυλιού, ενώ σε μικρότερο στη σάρκα και στο μούστο. Η συγκέντρωσή τους κυμαίνεται από 1,5 έως 2,5 g/kg FW στο γλεύκος. Στο Cabernet Sauvignon προσδιορίζονται κυρίως τα γλυκολιπίδια και τα φωσφολιπίδια στα οποία βρίσκονται το παλμιτικό, στεατικό, λινολεϊκό και λινολενικό οξύ. Επιπρόσθετα,

αναλύσεις έχουν προσδιορίσει 20 διαφορετικά λιπαρά οξέα στα ουδέτερα και στα πολικά λιπίδια. Παρότι εκχυλίζονται ελάχιστα τα ακόρεστα λιπαρά οξέα, όπως το ελαϊκό, το λινολενικό και τα λινολεϊκά οξέα θεωρούνται σημαντικά, διότι έχουν τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν ως υποστρώματα για το σχηματισμό των C₆ αλκοολών και αλδεϋδών και είναι σημαντικές για την κυτταρική μεμβράνη του ζυμομύκητα και συνεπώς στην ανάπτυξη ζύμης.

Επιπρόσθετα, λόγω του ότι η εξωτερική επιφάνεια του φλοιού του σταφυλιού καλύπτεται με μια κηρώδη επιδερμίδα, η οποία είναι ένα προστατευτικό φράγμα υδρατμών πάχους πολλών μμ που αποτελείται από τριτερπενοειδή. Δεν θεωρείται απλό και περιέχει σε μεγάλο ποσοστό ολεανολικό οξύ καθώς και παραπλίσσιες ενώσεις όπως το ουρσολικό οξύ, η α-αμυρίνη κ. α.. Επιπλέον, οι κηρώδεις περιέχουν αλκοόλες μακράς αλυσίδας, εστέρες, αλδεϋδες, υδρογονάνθρακες και άλλες ουσίες. Η ποσότητα του των κηρωδών ενώσεων στο σταφυλιού είναι αρκετά υψηλή και κυμαίνεται από 1 έως 2 g/kg στα φρέσκα φρούτα, όμως εξαιτίας της υδρόφοβης ιδιότητας αυτές οι ενώσεις είναι ασθενώς διαλυτές στο κρασί και μόνο χαμηλές ποσότητες εκχυλίζονται (Pensec, et al., 2014).

1. 4. 7 Μέταλλα και βιταμίνες

Ο κύριος ρόλος αυτών των συστατικών είναι ότι λειτουργούν ως ιόντα αντιστάθμισης των αποπρωτονιωμένων οξέων.

Το κάλιο κατέχει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση, η οποία κυμαίνεται από 1 έως 2 g/kg, ενώ ακολουθούν το ασβέστιο, το μαγνήσιο, το νάτριο και ο σίδηρος) με αντίστοιχες συγκεντρώσεις 100 mg/kg, 70 mg/kg, 20 mg/kg και 3 mg/kg (US Department of Agriculture, 2014).

Επιπλέον, έχει προσδιοριστεί ότι περιέχουν επίσης πολλά ανιόντα με τα φωσφορικά να είναι 200 mg/L, τα θειικά στα 260 mg/L ως K₂SO₄ και τα χλωριούχα στα 232 mg/L ως NaCl) καθώς και μικρές ποσότητες νιτρικών. Τα μέταλλα μπορεί να διαφέρουν πάνω από 10 φορές με τις συγκεντρώσεις των NaCl να φτάνει έως και τα 1800 mg/L και των K₂SO₄ να υπολογίζονται έως και 1200 mg/L κυρίως όταν τα εδάφη έχουν χαρακτηριστεί ως αλατούχα.

Επιπρόσθετα έχει βρεθεί ότι περιέχουν πλήθος βιταμινών, οι περισσότερες από τις οποίες χρησιμοποιούνται από τη ζύμωση, αλλά στη συνέχεια σχηματίζονται στο κρασί με τις συγκεντρώσεις τους να βρίσκονται στα ίδια σχεδόν επίπεδα. Οι συγκεντρώσεις των βιταμινών σύμφωνα με την ανάλυση του USDA έχει βρεθεί ότι το ασκορβικό οξύ έχει συγκέντρωση 32

mg/kg, η νιασίνη 1,8 mg/kg, η Β₆ βρίσκεται στα 0,86 mg/kg, η ριβοφλαβίνη στα 0,7 mg/kg, η θειαμίνη στα 0,69 mg/kg, το φυλλικό οξύ στα 20 μg/kg και η βιταμίνη Α στα 30 μg/kg [28 η βιοτίνη να αναφέρεται ότι κυμαίνεται από 1 έως 3 μg/L και το παντοθενικό οξύ στα 0,5 mg/L (Hagen, et al., 2008).

1. 4. 8 Ισοπρενοειδή

Τα καροτενοειδή προσδιορίζονται σε μικρές συγκεντρώσεις στα σταφύλια . Παρουσιάζουν ενδιαφέρον λόγω του ότι θεωρούνται οι πρόδρομες ενώσεις C₁₃-νορισοπρενοειδών αρωματικών ενώσεων . Γενικά περιέχουν πέντε κύρια καροτενοειδή και κατά την ωρίμανση έχουν συνολικά επίπεδα καροτενοειδών που κυμαίνονται από 0,4 έως 2,5 mg/kg (Ryona, and Sacks, 2013).

Τα ισοπρενοειδή θεωρούνται μία κατηγορία με πολυάριθμων ουσιών, όπου εμπεριέχουν μονοτερπενοειδή, σесκιτερπενοειδή και C₁₃- νορισοπρενοειδή, και πολλά από αυτά συμβάλλουν σημαντικά στο άρωμα του κρασιού. Η συσσώρευση C₁₃-νορισοπρενοειδών λίγο μετά την ολοκλήρωση της αποικοδόμησης των καροτενοειδών και κορυφώνεται μέσα σε λίγες εβδομάδες. Πολλά ισοπρενοειδή, κυρίως τα C₁₃ - νορισοπρενοειδή υπάρχουν ως μη πτητικές γλυκοσίδες, που είναι ένα κλάσμα μονοτερπενοειδών και βρίσκεται σε ελεύθερη μορφή και ευθύνεται για το χαρακτηριστικό άρωμα των λουλουδιών των σταφυλιών της ποικιλίας Μοσχάτου (Hjelmeland, and Ebeler, 2015). Οι συγκεντρώσεις επηρεάζονται από την ποικιλία των σταφυλιών. Για παράδειγμα, στην ποικιλία Μοσχάτου παρατηρούνται μεγάλες συγκεντρώσεις των δεσμευμένων και ελεύθερων μονοτερπενοειδών οι τιμές των οποίων κυμαίνονται από 1 έως 6 mg/kg, (Mateo and Jimenez, 2000).

1.4.9 Αδιάλυτα υλικά

Είναι οι μη διαλυμένοι ιστοί σταφυλιού, όπως ο φλοιός και τα σπόρια. Κατά μέσο όρο, οι σπόροι αποτελούν περίπου το 4% του βάρους του σταφυλιού και η σάρκα περίπου το 11%. Μια συνολική ανάλυση των της σάρκας των σταφυλιών έδειξε ότι βάση του ξηρού βάρους το 22,6 % αυτού ήταν αδιάλυτο σε ισχυρό θεικό οξύ. Έπειτα από παρατήρηση στο NMR στερεάς φάσης προσδιορίστηκε ότι εμπεριέχει κυτταρίνη και κηρώδες υλικό, ενώ δεν εντοπίστηκε

λιγνίνη. Άλλες μελέτες έχουν αποδώσει παρόμοια αποτελέσματα, όπου παρατηρείται ότι τα διαλυτά σάκχαρα αποτελούν ένα μεγάλο κλάσμα της μάζας, σε ποσοστό περίπου 50 %. Σε ποσοστό σχεδόν 50% της μάζας των σπόρων εμπεριέχει πολυσακχαρίτες, οι οποίες είναι ουδέτερες απορρυπαντικές ίνες (NDF). Επιπρόσθετα, αποτελούνται από 12% ακατέργαστη πρωτεΐνη και λίπος, ενώ 5 % είναι τέφρας και ανόργανα άλατα, όπως κάλιο, ασβέστιο, φωσφορικά, θειικά και μαγνήσιο (Deng, et al., 2011).

1. 5. Παράγοντες που επιδρούν στη συγκέντρωση των σακχάρων στον μούστο

1. 5. 1 Αμετάβλητοι Παράγοντες

Αυτή η κατηγορία παραγόντων είναι σχεδόν μη μεταβλητή, ενώ η όποια διαφοροποίηση δεν εντοπίζεται σε μικρό χρονικό διάστημα, π.χ. δύο διαδοχικά έτη. Απο τους αμετάβλητους παράγοντες οι σημαντικότεροι είναι οι ακόλουθοι (Jordão et al., 2015):

- **Ποικιλία:** Οι ποικιλίες σταφυλιού συμπεριφέρονται διαφορετικά κατά το στάδιο της ωρίμανσης με αποτέλεσμα και τα γλεύκη που λαμβάνονται μπορεί να έχουν έντονες διαφορές στη σύνθεση τους. Συνεπώς, παρατηρούνται ποικιλίες των οποίων οι συγκεντρώσεις των αρωματικών ουσών στη σάρκα είναι σε υψηλά επίπεδα και ως εκ τούτου ο οίνος έχει ένα χαρακτηριστικό άρωμα. Ωστόσο, από οινολογική άποψη, η οξύτητα και ιδίως η συγκέντρωση μηλικού οξέος ποικίλλει περισσότερο από μία ποικιλία σε μία άλλη.
- **Υποκείμενο:** Θεωρείται καθοριστικός ο ρόλος του τόσο κατά την ωρίμανση όσο και στον τελικό βαθμό ωρίμανσης. Είναι δεδομένο ότι τα πιο ζωντανά φυτά καθυστερούν να παρουσιάσουν το στάδιο της ωρίμανσης, με αποτέλεσμα τα σταφύλια να έχουν λιγότερα σάκχαρα και υψηλότερη οξύτητα. Η επιλογή του υποκειμένου επηρεάζεται από περιοχή εγκατάστασης και τις επικρατούσες κλιματικές συνθήκες. Τα ανθεκτικά υποκείμενα για παράδειγμα θεωρούνται ακατάλληλα σε ψυχρά κλίματα, καθώς ωριμάζουν αργά και παράγουν σταφύλια υψηλής οξύτητας .
- **Η ηλικία του φυτού:** Επιδρά σημαντικά στο σφρίγος του καθώς και κατά την ωρίμανση. Τα αμπέλια μεγαλύτερης ηλικίας παρουσιάζουν μικρότερη απόδοση, αλλά προιμίζουν. Αυτές οι ποικιλίες παρουσιάζουν ευκολία προσαρμοστικότητας στο έδαφος, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη ενός υγιούς ριζικού συστήματος και παρουσιάζουν υψηλή ανθεκτικότητα σε ακραία καιρικά φαινόμενα, όπως η ξηρασία και οι απότομες

διακυμάνσεις της θερμοκρασίας. Παρατηρείται πρωίμιση της παραγωγής έχοντας μεγαλύτερη συγκέντρωση σε σάκχαρα, χαμηλότερη οξύτητα, βαθύτερο χρώμα και ισχυρότερο άρωμα.

- **Κλίμα:** Αυτός ο παράγοντας σχετίζεται περισσότερο με το γεωγραφικό πλάτος. Σε ψυχρά κλίματα, αναζητούνται ποικιλίες που ωριμάζουν γρήγορα πριν από το κρύο του φθινοπώρου και έχουν μικρότερες απαιτήσεις στο ζεστό καιρό από την αρχή της δραστηριότητας του φυτού μέχρι την ωρίμανση και άρα παράγει σταφύλια με χαμηλή οξύτητα. Συνεπώς, παρατηρείται μικρή συγκέντρωση σε σάκχαρα. Οπότε επιλέγονται λευκές ποικιλίες εξαιτίας της ευκολότερης σύνθεσης των ανθοκυανών και των τανινών. Σε περιοχές με ζεστά κλίματα, χρησιμοποιούνται αμπέλια που ωριμάζουν αργότερα τρίτη ή τέταρτη φάση και δύναται να μπορούν να παράγουν σταφύλια υψηλών αποδόσεων όσον αφορά την περιεκτικότητα σε σάκχαρα ή το βάρος της καλλιέργειας. Σε εύκρατα κλίματα, επιλέγονται ποικιλίες πρώτης ή δεύτερης φάσης.

1. 5. 2 Κλιματικοί Παράγοντες

Η θερμοκρασία, το ηλιακό φως και η υγρασία θεωρούνται οι κυριότεροι εξωτερικοί παράγοντες που επιδρούν στην ωρίμανση και επομένως με το κλίμα σε ένα δεδομένο έτος. Επιπλέον, παρατηρείται ποικιλομορφία με αποτέλεσμα να είναι αδύνατη η διατήρηση ίδιου καιρού σε οποιαδήποτε δύο χρόνια, οπότε οι τρύγοι διαφοροποιούνται ανάλογα. Για την μέγιστη ωρίμανση σε μία περιοχή είναι απαραίτητα τα κύρια στοιχεία των καιρικών παραγόντων, όπως θερμοκρασία, φως και υγρασία για ένα χρονικό διάστημα. Η σύγκριση των πάνω στοιχείων με την ποιότητα των προϊόντων απο περιοχές που καλλιεργούσαν επι χρόνια αμπέλια επέδρασε θετικά στον προσδιορισμό των κύριων προϋποθέσεων, οι οποίες ήταν αναγκαίες για την καλή ωρίμανση των σταφυλιών.

Στην περιοχή του Μπορντό, για παράδειγμα, πιστεύεται ότι υπάρχουν οι ακόλουθες συνθήκες που είναι απαραίτητες (Moreno and Peinado, 2012):

- Σωρευτική θερμοκρασία από τον Απρίλιο έως τον Σεπτέμβριο, συμπεριλαμβανομένου, τουλάχιστον 3100 °C, αφού δεν έχουν επιτευχθεί καλές αποδόσεις κάτω από αυτό το επίπεδο .
- Σε χρονική περίοδο όχι μικρότερη των 15 ημερών όπου η ελάχιστη θερμοκρασία είναι οι 30 °C .

- Η ποσότητα της βροχής βρίσκεται στα επίπεδα απο 250 και 300 mm .
- Οι ελάχιστες ώρες του ηλιακού φωτός είναι 1250.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι ελάχιστες τιμές θα πρέπει να πραγματοποιούνται την επιθυμητή χρονική στιγμή. Τα χαρακτηριστικά του τρύγου επηρεάζονται απο το μικροκλίμα της περιοχής καλλιέργειας. Αυτό συνδέεται με τη γαλλική έννοια του cru, όπου εμπεριέχεται η γεωγραφική θέση, το έδαφος και το κλίμα (Moreno and Peinado, 2012).

1. 5. 3 Μεταβλητοί Παράγοντες

Οι μεταβλητοί παράγοντες περιλαμβάνουν εκείνους που συνδέονται με τη συντήρηση του αμπελιού και με το παροχή λιπασμάτων. Το κλάδεμα επιδρά στο σχήμα και την απόδοση του πρέμνου. Αυτή η καλλιεργητική φροντίδα είναι απαραίτητη όταν έχει ολοκληρωθεί η φυλλόπτωση. Η τεχνική που εφαρμόζεται επηρεάζει την παραγωγικότητα της αμπέλου στην επόμενη καλλιεργητική περίοδο.

Η επικάλυψη βλαστών περιλαμβάνει αφαίρεση των άκρων των αναπτυσσόμενων κλαδιών με αποτέλεσμα να οδηγούνται στον καρπό που ωριμάζει περισσότερα συστατικά. Μέσα από ερευνητικές εργασίες έχει παρατηρηθεί ότι οι μέγιστες διαφορές εντοπίζονται όταν υπάρχει επικάλυψη βλαστών και σε αυτά που δεν έχει σχετίζονται με την περιεκτικότητα του μηλικού οξέος. Οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις μηλικού οξέος παρατηρούνται στα σταφύλια από αμπέλια που δεν έχουν ξεπεραστεί και οφείλεται στη μεγαλύτερη αναπνευστική δραστηριότητα του φυλλώματος. Τα φύλλα απομακρύνονται κάποιες φορές κατά το στάδιο της ωρίμανσης με στόχο την αποφυγή εμφάνισης μυκητιάσεων και σήψης. Συνέπεια των παραπάνω είναι η μείωση της παραγωγής και της ποιότητας εξαιτίας της μειωμένης φωτοσύνθεσης. Συνιστάται η απομάκρυνση των φύλλων μόνο λίγες μέρες προτού ξεκινήσει η συγκομιδή και πραγματοποιείται μόνο στα φύλλα της βάσης του πρέμνου, τα οποία είναι ηλικιακά μεγαλύτερα και οι λειτουργίες που επιτελούν είναι ελάχιστες. Η διαδικασία είναι αναγκαία, διότι σκοπεύει στην πρόληψη της σήψης μέσω της εύκολης κυκλοφορίας του αέρα περίξ των συστάδων των σταφυλιών. Με αυτό τον τρόπο βοηθάτε η ωρίμανση λόγω της μεγάλης έκθεσης των σταφυλιών στον ήλιο, ενώ διευκολύνεται και η συγκομιδή. Η λίπανση επιδρά σημαντικά τόσο στην απόδοση, όσο και στην ποιότητα των καρπών. Η αμπελοκαλλιέργεια θεωρείται μία απαιτητική καλλιέργεια σε θρεπτικά στοιχεία, οπότε θα πρέπει ότι ποσότητα των στοιχείων απομακρύνεται να αναπληρώνεται για να διατηρηθεί η

επαρκής παραγωγή του αμπελιού. Η υπερβολική ή η ανεπαρκής συγκέντρωση των στοιχείων προκαλεί προβλήματα, τα οποία μπορεί να επηρεάσουν τις συστάδες των σταφυλιών και επομένως τον μούστο και το κρασί. Η εντατική λίπανση επιδρά σημαντικά στο χρώμα των ερυθρών οίνων. Οι οίνοι που προέρχονται από εδάφη γόνιμα παρουσιάζουν μικρότερη περιεκτικότητα σε τανίνες και σε σώμα (Moreno and Peinado, 2012).

1. 5. 4 Τυχαίοι Παράγοντες

Η ποιότητα και η ωρίμανση του σταφυλιού μπορεί επίσης να επηρεαστεί από ασθένειες ή καιρικά φαινόμενα. Το ωίδιο μπορεί να επηρεάσει τις συστάδες των σταφυλιών σε διάφορα σημεία κατά την ανάπτυξή τους. Στην περίπτωση που η προσβολή γίνει κατά την ανθοφορία και την καρπόδεση, τότε υπάρχει καρπόροια. Όταν η προσβολή γίνει πιο μετά τότε, παρατηρείται οψίμιση με μείωση της συγκέντρωσης των σακχάρων και αύξηση της οξύτητας των σταφυλιών. Τέλος, όταν η μόλυνση είναι στο μίσχο, τότε υπάρχει κίνδυνος να μην ολοκληρωθεί η ωρίμανση. Το ωίδιο συνήθως προσβάλλει το φλοιό του σταφυλιού με αποτέλεσμα να γίνεται καφέ-γκρι, σταματώντας την ανάπτυξή του και προκαλώντας διόγκωση του σταφυλιού, με αποτέλεσμα την παραμόρφωση αυτού, το σκάσιμο, το άνοιγμα και μερικές φορές οι σπόροι είναι ορατοί.

Ωστόσο, η ωρίμανση εξακολουθεί να συμβαίνει και τα σταφύλια που προσβάλλονται από το ωίδιο είναι λιγότερο ζουμερά και μπορεί να έχουν υψηλότερη περιεκτικότητα σε σάκχαρα, αλλά συχνά έχουν και υψηλότερη από την κανονική οξύτητα.

Επιπλέον, η σήψη μπορεί να είναι αποτέλεσμα μυκήτων και μούχλας κατά την ωρίμανση ή λίγο πριν εξαιτίας του *B. cinerea*. Η ασθένεια εξαπλώνεται εύκολα προκαλώντας ρήξη του δέρματος με αποτέλεσμα να οδηγήσει στην ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών όπως τα όξινα βακτήρια. Στην περίπτωση όπου εκτός από *B. cinerea* παρατηρούνται ταυτόχρονα και άλλοι μύκητες όπως το *Penicillium*, το *Aspergillus* ή το *Mucor* τότε τα αποτελέσματα είναι χειρότερα. Αποτέλεσμα είναι ο μη χρωματισμός τόσο των σταφυλιών όσο και των οίνων ενώ παρατηρείται και οξειδωτική κατακρήμνιση (Moreno and Peinado, 2012).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΓΛΕΥΚΟΣ ΜΠΥΡΑΣ

2.1 Γενικά

Η μύρα θεωρείται ένα από τα παλαιότερα και τα δημοφιλέστερα αλκοολούχα ποτά παγκοσμίως. Η πρώτη μύρα παρασκευάστηκε από δημητριακά, νερό και η ζύμωση πραγματοποιήθηκε πριν εφευρεθεί το ψωμί (Campbell, 2017).

Η Μέση Ανατολή και η Αίγυπτος ήταν η γενέτειρα της μύρας, όπου η διαδικασία της ζυθοποιίας χρονολογείται περίπου στο 5000 π.χ. και έχει συνεισφέρει σημαντικά στη διατροφή. Στην αρχαιότητα η παραγωγή μύρας είχε συνδεθεί με το ψήσιμο του ψωμιού λόγω του ότι και τα δύο υλικά παράγονται με δημητριακά, νερό και μαγιά. Στη συνέχεια οι Έλληνες και οι Ρωμαίοι έμαθαν από τους Αιγύπτιους την τέχνη της ζυθοποιίας αλλά όταν του κρασιού και αργότερα έγινε γνωστή και βόρειες περιοχές. Κατά τη διάρκεια των μεσαιωνικών χρόνων η μύρα ήταν κάτι σαν ένα χορταστικό και ζεστό αναψυκτικό καθώς η καθαρότητα του νερού ήταν αβέβαιη, ενώ ακόμη ο καφές και το τσάι ήταν άγνωστα στην κοινωνία. Κατά τον πέμπτο αιώνα η διαδικασία του βρασμού, οι αντιβακτηριδιακές ιδιότητες του αλκοόλ και η προσθήκη του λυκίσκου απομάκρυναν τους κύριους κινδύνους της επιμόλυνσης (Sánchez, 2017).

Η ζυθοποιία είναι μια πολύπλοκη διαδικασία κατά την οποία το νερό, οι κόκκοι δημητριακών και ο λυκίσκος μέσω της μαγιάς παράγουν το προϊόν. Το μεγάλο εύρος των ποικιλιών της μύρας οφείλεται στις διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας, στα είδη κόκκων, στην ποιότητα του νερού κ.λπ. (Sánchez, 2017). Η μύρα αποτελείται κυρίως από το κριθάρι και ειδικότερα από τη βύνη κριθαριού. Επιπλέον, δύναται αντί της βύνης να χρησιμοποιηθούν υλικά πλούσια σε άμυλο όπως ρύζι, καλαμπόκι ή σιτάρι. Όταν η βύνη κριθαριού και το νερό θερμανθούν στους 60 °C, τότε οι αμυλάσες και πρωτεάσες, συνεισφέρουν σημαντικά στην αποσύνθεση του άμυλου και των πρωτεϊνών με αποτέλεσμα της δημιουργίας μείγματος σακχάρων και πεπτιδίων ή αμινοξέων. Συνεπώς, στο κριθάρι είναι απαραίτητη η ελεγχόμενη βλάστηση, κατά την οποία τα παραπάνω ένζυμα σχηματίζονται στον κόκκο του κριθαριού πριν από την διαδικασία της βυνοποίησης (Keukeleire, 2000).

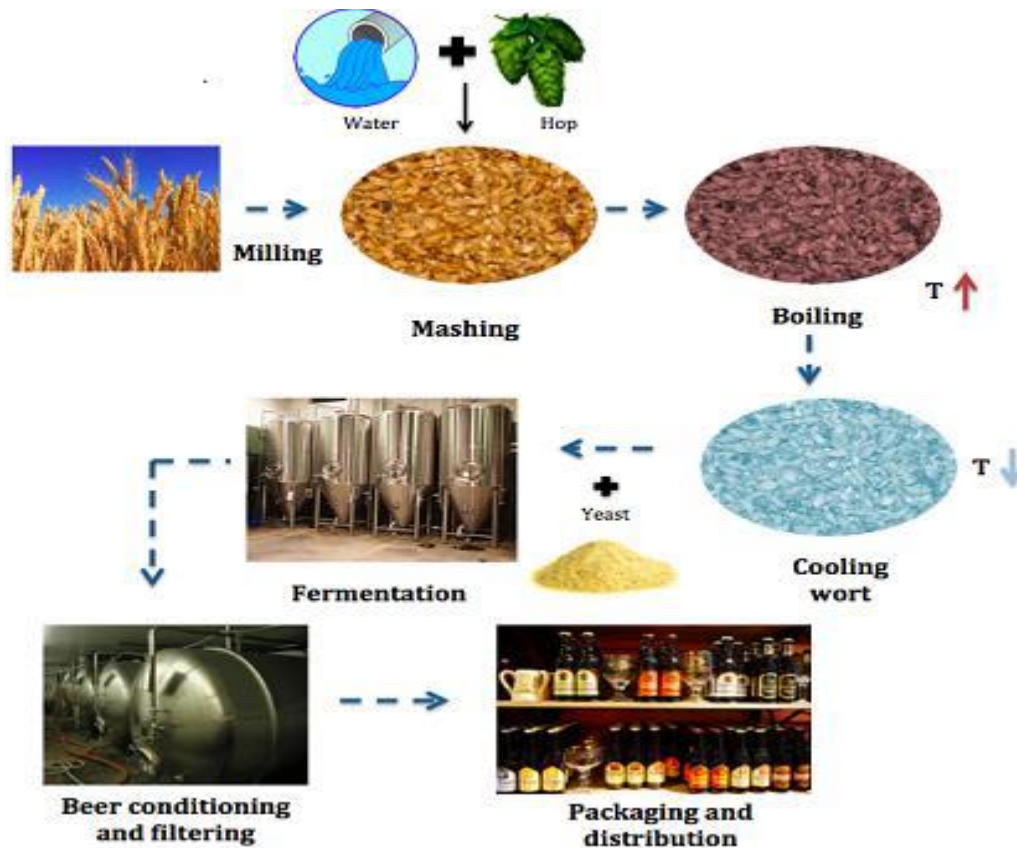
Η μετατροπή του άμυλου σε σάκχαρα διακόπτεται με τη θέρμανση. Ανάλογα με τον χρόνο και τη θερμοκρασία, οι βύνες παρουσιάζουν μεταβολές στο χρώμα και ως εκ τούτου χαρακτηρίζονται ως ανοιχτόχρωμες, κεχριμπαρένιες και σκούρες. Αυτή η μεταβολή του χρώματος οφείλεται στην καραμελοποίηση των σακχάρων. Όσον αφορά το χρώμα της μύρας

επηρεάζεται από το χρώμα της βύνης η οποία θα χρησιμοποιηθεί. Επιπλέον, θα πρέπει να ληφθεί ότι οι χρωματιστές βύνες παρουσιάζουν μια ιδιαίτερη γεύση, η οποία είναι χαρακτηριστική σε συγκεκριμένες μαύρες μύρες. Μετά το φιλτράρισμα, το διάλυμα των σακχάρων που ονομάζεται γλεύκος μεταφέρεται στον βραστήρα, όπου ακολουθεί η διαδικασία του βρασμού για τουλάχιστον μία ώρα με την προσθήκη μικρής ποσότητας λυκίσκου (*Humulus lupulus L.*). Εκτός από το σχηματισμό αδιάλυτων συμπλεγμάτων με πρωτεΐνες και πολυπεπίδια, τα οποία επιδρούν θετικά στη σταθερότητα της μύρας, ο λυκίσκος αποστειρώνει το διάλυμα του γλεύκους. Η πιο σημαντική επίδραση του λυκίσκου στη μύρα είναι η πικρή γεύση που χαρακτηρίζει τις ξανθές μύρες, αλλά και η σταθεροποίηση του αφρού της (Keukeleire, 2000).

Όταν το υλικό έρθει σε θερμοκρασία δωματίου ο λυκίσκος απομακρύνεται και ακολουθείται η τοποθέτηση του υγρού στα δοχεία ζύμωσης και η τοποθέτηση μαγιάς η οποία θα ενεργοποιηθεί σε αερόβιες συνθήκες. Στην αναερόβια φάση ο ζυμομύκητας παράγει από τα σάκχαρα αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα. Τα στελέχη μαγιάς, τα οποία είναι κατάλληλα για μύρες που έχουν υποστεί ζύμωση στο κάτω μέρος της δεξαμενής είναι οι *Saccharomyces carlsbergensis*, οι οποίοι είναι ενεργοί κάτω από τους 5 °C και καθιζάνουν στον πυθμένα της δεξαμενής έπειτα από την παραγωγή περίπου 5 % αιθανόλης. Αντίθετα, οι ζύμες που είναι χαρακτηριστικές για την παραγωγή μύρας υψηλής ζύμωσης είναι οι *Saccharomyces cerevisiae*, οι οποίοι είναι ενεργοί σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και παρουσιάζουν καλύτερη απόδοση σε υψηλότερες συγκεντρώσεις αιθανόλης με το ποσοστό της να φτάνει έως και 12 %. Μετά το πέρας της ζύμωσης η μαγιά βρίσκεται στην κορυφή με τη μορφή πυκνού αφρού (Keukeleire, 2000).

Μια τυπική διαδικασία ζύμωσης διαρκεί περίπου μία εβδομάδα, σχηματίζοντας τη «νεαρή μύρα» που δεν είναι πόσιμη, καθώς κατά τη ζύμωση σχηματίζονται ενώσεις, οι οποίες προσδίδουν άσχημη γεύση και οσμή. Από τα παραπάνω προκύπτει ότι είναι αναγκαία η ωρίμανση εβδομάδων σε θερμοκρασία 0 °C, όπου τα ανεπιθύμητα συστατικά αποδομούνται με αργό ρυθμό. Μόνο όταν το περιεχόμενο αυτών έχει μειωθεί κάτω από τις κρίσιμες τιμές μπορεί η μύρα να συσκευαστεί. Για τη διατήρηση της μύρας μεγαλύτερου χρονικού διαστήματος, ακολουθείται η παστερίωση. Στις ειδικές μύρες συχνά είναι απαραίτητη μία δεύτερη ζύμωση, που πραγματοποιείται αργά για αρκετούς μήνες συνήθως σε δρύινα βαρέλια, με σκοπό τον σχηματισμό ξινών γεύσεων (Keukeleire, 2000).

Στην παρακάτω Εικόνα 2.1 περιγράφεται ένα τυπικό διάγραμμα παραγωγής μύρας:



Εικόνα 2.1. Τυπικό διάγραμμα παραγωγής μύρας (Sanchez, 2017).

Συνοπτικά τα στάδια της παραγωγής της μύρας είναι τα παρακάτω:

Στάδιο 1. Βυνοποίηση κριθαριού

Στάδιο 2. Ζυθοποίηση

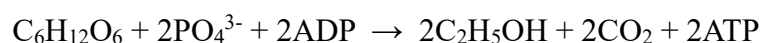
Στάδιο 3. Ζύμωση

Στάδιο 4. Ωρίμανση

Στάδιο 5. Φιλτράρισμα

Στάδιο 6. Συσκευασία

Στη βιομηχανία η μύρα παράγεται με ελεγχόμενη ζύμωση του γλεύκους το οποίο έχει υψηλά επίπεδα σε σάκχαρα, αζωτούχες και θειούχες ενώσεις και ιχνοστοιχείων τα οποία προέρχονται από το βυνοποιημένο κριθάρι. Η ζύμωση είναι η διαδικασία με την οποία η γλυκόζη μετατρέπεται σε αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα όπως φαίνεται στην παρακάτω αντίδραση (Bokulichn και Bamforth, 2013):



Η παραπάνω απλοποιημένη χημική αντίδραση εμπεριέχει μια σειρά από πολύπλοκες βιοχημικές αντιδράσεις, οι οποίες ονομάζονται «γλυκολυτική οδός» ή «οδός Embden-Myerhof-Parnas» και εμπεριέχουν ένζυμα και αναερόβιες αντιδράσεις στα κύτταρα της ζύμης (Campbell, 2017). Η εμπορική ζύμωση είναι συνεχής και η μύρα αναδεύεται σε δοχεία για χρονική διάρκεια 40 έως 120 ωρών. Έπειτα από την παραγωγή της αιθανόλης, η μύρα τοποθετείται στα δοχεία ωρίμανσης με τη γεύση της να χαρακτηρίζεται ως ιδιαίτερη. Ακολουθεί η δημιουργία ποικιλιών διαφορετικών εμπορικών σημάτων (Campbell, 2017).

2. 2 Ορισμός και ποικιλίες

Η μύρα ορίζεται ως ένα αλκοολούχο ποτό που σχηματίζεται μέσω της ζυθοποίησης και της ζύμωσης έχοντας πρώτες ύλες τα δημητριακά και κυρίως το βυνοποιημένο κριθάρι, αρωματισμένο με λυκίσκο και άλλα παρόμοια υλικά για την επίτευξη μίας ελαφριάς πικρής γεύσης (Ore, Mironov and Shootov, 2018).

Το βυνοποιημένο κριθάρι είναι το κύριο συστατικό όπου όταν αλεθεί και θερμανθεί σε νερό τότε δημιουργείται θρεπτικό διάλυμα έχοντας υψηλή συγκέντρωση σακχάρων και πρωτεϊνών γνωστό ως γλεύκος. Το υλικό αυτό θεωρείται ως το καλύτερο μέσο στο οποίο η μαγιά δύναται να ενεργοποιηθεί και να ζυμωθεί. Η προσθήκη λυκίσκου στο βραστό μούστο πραγματοποιείται καθώς ανακαλύφθηκε ότι ο λυκίσκος παρουσιάζει αντιβακτηριδιακές ιδιότητες όπου συντηρούν το γλεύκος και τη ζυμωμένη μύρα, δίνοντας στην μύρα μια δροσερή πικρή γεύση (Campbell, 2017).

Παλαιότερα η ζύμωση της μύρας πραγματοποιούνταν με αργούς ρυθμούς σε δοχείο ζύμωσης έχοντας κύρια μειονεκτήματα σε οικονομικό και ποιοτικό επίπεδο. Οι αργοί χρόνοι ζύμωσης απαιτούσαν έναν μεγάλο αριθμό δεξαμενών για να στεγαστούν όλες οι παρτίδες ζύμωσης οπότε υπήρχε αύξηση του κόστους λόγω των πολλών δεξαμενών, αλλά και της διατήρησης αυτών στις απαιτούμενες θερμοκρασίες και δοκιμή της ποιότητας της εκάστοτε παρτίδας. Επιπρόσθετα, δεν μπορούσε να εγγυηθεί κάποιος την σταθερότητα της γεύσης της μύρας. Τα τελευταία χρόνια πραγματοποιείται μία συνεχής ζύμωση όπου ανακυκλώνεται μέρος του ζυμωμένου υλικού επιστρέφοντας το γλεύκος στην αρχή της διαδικασίας ζύμωσης με αποτέλεσμα τη συνεχή παραγωγή μύρας. Η συνεχής ζύμωση χρησιμοποιεί ένα σύστημα αποθήκευσης ψυχρού μούστου, όπου ο βρασμένος μούστος ψύχεται στους 0°C με το γλεύκος να μην παγώνει σε αυτή τη θερμοκρασία λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς του σε σάκχαρα και διατηρείται σε δεξαμενές αποθήκευσης με το πρωτεϊνικό υλικό που προκαλούσε θόλωση

της μύρας να κατακρημνίζεται. Το γλεύκος παραμένει στο δοχείο αποθήκευσης μέχρι να είναι αναγκαία η εισαγωγή του στη ζύμωση. Η δεξαμενή αποθήκευσης του γλεύκους τροφοδοτείται συνεχώς στη ζύμωση για πλήθος ημερών (Campbell, 2017).

Η γεύση και το άρωμα της μύρας επηρεάζεται σημαντικά από το στέλεχος της μαγιάς και από τα συστατικά του γλεύκους. Επιπλέον, ιδιότητες της ζύμης, όπως η κροκιδωση, η ικανότητα ζύμωσης όπου εμπεριέχει τη πρόσληψη των σακχάρων του γλεύκους, το ποσοστό των αμινοξέων, των μικρών πεπτιδίων και των ιόντων αμμωνίου, η ωσμωτική πίεση και η αιθανόλη επιδρούν σημαντικά στην απόδοση της ζύμωσης (Stewart, 2001).

Μέσω της δυνατότητας του χειρισμού των ζυμομυκήτων και του σχηματισμού πλήθος ποικιλιακών στελεχών οδήγησε στον σχηματισμό διαφορετικών τύπων μύρας, όπως αναφέρονται παρακάτω οι κυριότερες (Campbell, 2017):

- **Lager:** Σχηματίζεται με μαγιά από *Saccharomyces carlsbergensis*, η οποία επικάθεται στον πάτο του δοχείου μαζί με τα υπόλοιπα υλικά και ως εκ τούτου να παράγεται μία καθαρή μύρα.
- **Pilsner:** Είναι μία άχρωμη μύρα lager η οποία παρασκευάστηκε αρχικά στην πόλη Pilsen. Το νερό που χρησιμοποιείται χαρακτηρίζεται ως «σκληρό», έχοντας υψηλότερη περιεκτικότητα σε κατιόντα και κυρίως σε ασβέστιο και μαγνήσιο από το νερό που χρησιμοποιείται για τη lager.
- **Ale:** Σχηματίζεται με μαγιά από *Saccharomyces cerevisiae*, η οποία επιπέει στην επιφάνεια της δεξαμενής παρασκευής και ως εκ τούτου παράγεται μία πιο θολή μύρα. Αυτός ο τύπος μύρας έχει μία υψηλότερη περιεκτικότητα σε αλκοόλ από τη lager.
- **Porter:** Έντονου σκούρου χρώματος. Το χρώμα και η ιδιαίτερη γεύση προέρχονται από το ψήσιμο της βύνης πριν την παρασκευή της με αποτέλεσμα μια περισσότερο δυνατή γεύση και υψηλότερη περιεκτικότητα σε αλκοόλ.
- **Stout:** Θεωρείται σχεδόν μαύρη μύρα. Το χρώμα και η γεύση είναι το αποτέλεσμα του ψητού κριθαριού και/ή της ψητής βύνης.

2. 3 Παραγωγή Γλεύκους

Ως ζυθογλεύκος θεωρείται ένα υδατικό διάλυμα εκχυλίσματος προερχόμενο από δημητριακά με σκοπό τη ζύμωση και την παραγωγή μύρας. Για τα περισσότερα είδη μύρας, το έτοιμο γλεύκος που προστίθεται στο δοχείο ζύμωσης περιέχει νερό κατά βάρος που κυμαίνεται από 80 % έως και 90 %. Η τεχνολογία ζυθοποιίας κατά την οποία πραγματοποιείται η παραγωγή αυτού δύναται να ταξινομηθεί σε έξι διαδικασίες (Stewart, 2016):

- ✓ άλεση βύνης και πρόσθετων
- ✓ πολτοποίηση
- ✓ διήθηση γλεύκους
- ✓ βρασμός γλεύκους
- ✓ διαύγαση γλεύκους και ψύξη
- ✓ αερισμός μούστου.

2. 3. 1 Άλεση βύνης

Με την άλεση της βύνης, το αμυλούχο ενδοσπέρμιο θα αυξήσει την ειδική του επιφάνεια με αποτέλεσμα την δράση των ένζυμων και την βελτίωση της εκχύλισης. Η μέθοδος που θα εφαρμοστεί επηρεάζεται από τις εφαρμοζόμενες μεθόδους πολτοποίησης και διαχωρισμού που χρησιμοποιούνται. Η άλεση πραγματοποιείται σε συνθήκες όπου διατηρείται η δομή του φλοιού όπου όταν χρησιμοποιηθεί στο βαρέλι πολτοποίησης (lauter), είναι απαραίτητοι για τη δημιουργία της κλίνης διήθησης. Οι φλοιοί είναι περισσότερο ελαστικοί με αποτέλεσμα κατά την άλεση να είναι μικρό το ποσοστό καταστροφής αυτών ιδίως όταν περιέχουν υγρασία. Επομένως, πριν την άλεση η βύνη υγραίνεται. Επιπρόσθετα, τόσο η ξηρή όσο και η υγρή άλεση πραγματοποιείται σε κυλινδρόμυλο. Όταν χρησιμοποιούνται σύγχρονα φίλτρα λεπτής κλίνης δεν χρειάζεται οι φλοιοί να παραμείνουν άθικτοι, οπότε η βύνη αλέθεται σε πολύ μικρά τεμαχίδια με τη χρήση σφυρόμυλου. Πλέον, η άλεση γίνεται με την παρουσία απαερωμένου νερού με στόχο την αποφυγή πρόσληψης οξυγόνου, εφαρμόζοντας δίσκο ή σύστημα rotor – stator (N.N. 2004).

Η ξηρή άλεση είναι η γνωστότερη τεχνική άλεσης. Ο βαθμός τροποποίησης της βύνης, η θέση και ο τύπος της επιφάνειας του κυλίνδρου, δηλαδή ομαλή ή αυλακωτή είναι οι παράγοντες που καθορίζουν την κατανομή των σωματιδίων. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν κυλινδρόμυλοι και

σφυρόμυλοι για ξηρή άλεση όπου η βύνη εισέρχεται μέσα από το στενό διάκενο των περιστρεφόμενων κυλίνδρων και σχηματίζεται λεπτό υλικό, το οποίο δεν χρειάζεται περαιτέρω άλεσμα και το φλοιοί δεν πρέπει να διαχωριστούν για περαιτέρω άλεση. Οι πιο απλοί τύποι μύλων είναι με 2 κυλίνδρους, ενώ μπορεί να διαθέτουν 4, 6 κ.λ.π (De Brackeleire , 2000).



Εικόνα 2 .2. Μύλος άλεσης (<https://www.zythopedia.eu>)

Τα ταλαντευόμενα κόσκινα συχνότητας 6 – 12 Hz εκτελούν τα στάδια διαχωρισμού. Τα κόσκινα αποτελούνται από πλήθος μπαλών υλικού καουτσούκ ή άλλα καθαριστικά κόσκινων. Ο μύλος με 6 κυλίνδρους χρησιμοποιείται συχνότερα λόγω των καλύτερων αποτελεσμάτων. Σε ένα σφυρόμυλο, η βύνη αποκτά μικρότερο μέγεθος και με αποτέλεσμα να σχηματίζεται ένα λεπτό άλεσμα. Ένα μεγάλο περιστρεφόμενο τύμπανο στο οποίο βρίσκονται μικρά σφυριά, ωθούν τα ξηρά δημητριακά σε μια πλάκα. Ο λεπτός κόκκος κοσκινίζεται στη βάση του τυμπάνου. Το μήκος και ο αριθμός των σφυριών, το μέγεθος διάτρησης και η ταχύτητα περιστροφής επιδρούν στο μέγεθος των σωματιδίων, τη χωρητικότητα και την κατανάλωση ενέργειας καθώς και στην παραγωγή θερμότητας (N.N. 2004).

2. 3. 2 Άλεση με ρύθμιση

Η βύνη ενυδατώνεται με κρύο ή ζεστό νερό ή ατμό. Οι υγροί φλοιοί είναι περισσότερο εύκαμπτοι και θα καταστραφούν σε μικρότερο ποσοστό σε α κυλινδρόμυλους. Η θερμοκρασία στο εσωτερικό του πυρήνα δεν μπορεί να υπερβεί τους 40 °C , διότι σε αντίθετη περίπτωση θα υπάρξει σημαντικό πρόβλημα με τα ένζυμα. Η συγκέντρωση του νερού είναι σχεδόν 0,7 %

μεγαλύτερη, οπότε μεγαλώνει και η συγκέντρωση του στο φλοιών σε ποσοστό 1,5 – 1,7 % και 0,3 – 0,5 % στο ενδοσπέρμιο. Η προετοιμασία του σπόρου αυξάνει το όγκο του φλοιού κατά περίπου 10- 20 %, είναι ευκολότερος ο διαχωρισμός του κλάσματος κόκκων και φλοιών, αυξάνεται ο ρυθμός φιλτραρίσματος σε ένα lauter tun, αυξημένη απόδοση και ταχύτερη αποικοδόμηση αμύλου. Η προετοιμασία δύναται να γίνει με την εφαρμογή βαλβίδας ρύθμισης κατά την οποία η βύνη διαβρέχεται κατά την είσοδο της σε ένα βιδωτό μεταφορέα (N.N. 2004).

2. 3. 3 Υγρή άλεση

Η συγκέντρωση του νερού των φλοιών δύναται να είναι μεγαλύτερη κατά 20 % με το ενδοσπέρμιο να μην είναι υγρό σε μύλο ζεστού νερού. Σε αυτή την περίπτωση, το ενδοσπέρμιο συμπιέζεται και ξεφλουδίζεται απο ένα μόνο ζευγάρι κυλίνδρων. Μετά το άλεσμα ακολουθεί η άμεσα διαβρέχονται ανάλογα με την ποιότητα της βύνης. Στη διαδικασία «steep conditioning», η περιεκτικότητα του νερού παρατηρείται σε πολύ υψηλά επίπεδα όπου πλέον συμμετέχει στην διαδικασίας της πολτοποίησης η οποία κυμαίνεται από 10 έως 30 λεπτά και η θερμοκρασία απο 30 και 50 °C. Η θερμοκρασία και η διάρκεια επηρεάζονται από την τροποποίηση και την περιεκτικότητα σε υγρασία της χρησιμοποιούμενης βύνης. Η υγρασία της αγγίζει τις τιμές 25-30 %, με τον συνολικός χρόνος άλεσης και πολτοποίησης να βρίσκεται μεταξύ 30 – 45 λεπτά (Willaer , 2006).

2. 3. 4 Πολτοποίηση

Η πολτοποίηση ξεκινά με την ανάμειξη του αλεσμένου υλικού και νερού, ενώ η ενυδάτωση επιτρέπει στα ένζυμα της βύνης να γίνουν ενεργά. Πλέον η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται κατά την άλεση. Παλιά η διαδικασία γινόταν μέσω ενός «προκατασκευαστή» (ή «grist hydrator») ανακάτευε το άλεσμα και το νερό στο δοχείο πολτοποίησης. Το απαερωμένο νερό εφαρμόζεται με στόχο την ελαχιστοποίηση της πρόσληψης οξυγόνου. Απαιτούνται 2 – 4 L νερού για ποσότητα 100 κιλών βύνης, σύμφωνα με την μέθοδο παρασκευής και την πυκνότητα της σχηματιζόμενης μύρας.

Στην πολτοποίηση, η συγκέντρωση της βύνης γίνεται μικρότερη μέσω ενζύμων της βύνης όπου λαμβάνεται εκχύλισμα. Διαφοροποιώντας τη θερμοκρασία και τη διάρκειας των περιόδων ξεκούρασης σε συγκεκριμένες θερμοκρασίες επιφέρει τη διαφοροποίηση της σύστασης και της απόδοσης εξαγωγής της βύνης. Η διάρκεια των περιόδων ξεκούρασης σε συγκεκριμένες

θερμοκρασίες επιδρούν στη σύνθεση και την αποτελεσματικότητα με την οποία εξάγεται η βύνη. Η διαδικασία της πολτοποίησης επιδρά στην περιεκτικότητα σε αλκοόλ, στη συγκέντρωση των μη ζυμοθέντων σακχάρων στην μύρα, στο προφίλ πεπτιδίων και αμινοξέων του γλεύκους, τη συγκέντρωση θρεπτικών συστατικών ζύμης, το ρυθμιστικό διάλυμα και το pH του γλεύκους και της μύρας, την περιεκτικότητα και τις φυσικές ιδιότητες αφρός, χρώμα και διαύγεια (Willaer, 2006).

2.3.5 Αποικοδόμηση αμύλου

Η διαδικασία αυτή επιτυγχάνεται από την α - και β -αμυλάση, την οριακή δεξτρινάση, τη μαλτάση και τη σακχαράση. Το ζελατινοποιημένο άμυλο θεωρείται απαραίτητο για τη β -αμυλάση σκοπεύοντας την αποικοδόμηση του αμύλου. Το άμυλο κριθαριού ζελατινοποιείται παρουσία αμυλασών στους 60 °C. Το άμυλο ρυζιού ζελατινοποιείται στους 80 - 85 °C με αποτέλεσμα να είναι αναγκαία η ζελατινοποίηση πριν την προσθήκη του στον πολτό. Η δράση των α -αμυλασών θα επιφέρει την μείωση του ιξώδους του ζελατινοποιημένου αμύλου. Η πλήρης αποικοδόμηση του αμύλου σε μαλτόζη και δεξτρίνες ονομάζεται σακχαροποίηση. Η διάσπαση του αμύλου απαιτεί παρακολούθηση, διότι τα υπολείμματα αμύλου και δεξτρινών προκαλούν θολώσεις στην μύρα. Η αποικοδόμηση του αμύλου δύναται να παρακολουθείται ελέγχοντας το χρώμα δείγματος πολτού και διαλύματος ιωδίου. Η α -αμυλάση είναι ενεργή κατά τη βυνοποίηση όμως η δραστηριότητα της είναι υψηλότερη σε ζελατινοποιημένο άμυλο. Η ιοντική μορφή του Ca^{+2} έχει τον ρόλο του συ παράγοντα όπου δεν σχηματίζει μαλτόζη κατά την αποσύνθεση. Η β -αμυλάση είναι παρούσα κατά τη διάρκεια της βυνοποίησης, ανενεργεί. Παράγει μαλτόζη, β -δεξτρίνες, γλυκόζη και μαλτοτριόζη από αμυλόζη και αμυλοπηκτίνη. Η οριακή δεξτρινάση σπάει το 1,6-δεσμό σε μικρές, διακλαδισμένες δεξτρίνες όπου η παρουσία του στη βύνη να είναι μικρή. Η μαλτάση υδρολύει τη μαλτόζη σε μόρια γλυκόζης. Ωστόσο, δεν είναι ενεργό πάνω από 40 °C.

Η σύνθεση των κυτταρικών τοιχωμάτων είναι β -γλυκάνη και ημικυτταρίνη. Η διάρρηξη του κυτταρικού τοιχώματος παρατηρείται στη βυνοποίηση και στην πολτοποίηση με τις ενδο- β -γλυκανάσες, διαλυτάση, β -γλυκάνη και ενδο-ξυλανάση. Μια ανεπαρκής αποδόμηση των μορίων της β -γλυκάνης υψηλού μοριακού βάρους έχει ως αποτέλεσμα το υψηλό ιξώδες, το οποίο υπάρχει περίπτωση να επιφέρει προβλήματα κατά τη διήθηση του γλεύκους και της μύρας. Το πρόβλημα αυτό δύναται να ελαχιστοποιηθεί μέσω την τροποποίηση της βύνης ή την προσθήκη εμπορικών παρασκευασμάτων β -γλυκανάσης. Η ημιτελής αποικοδόμηση της

πεντοζάνης δύναται να επιφέρει θολότητα. Οι πεντοζάνες αποδομούνται σε αραβινόζη και ξυλόζη (N.N. 2004).

Τα προϊόντα της αποικοδόμησης των πρωτεϊνών επηρεάζουν το γλεύκος και τα χαρακτηριστικά της μύρας, όπως γεύση, χρώμα και αφρό. Η πολύ εκτεταμένη πρωτεόλυση επιδρά αρνητικά δημιουργώντας κακό αφρό, πολύ σκούρο χρώμα, αλλά καλή κολλοειδή σταθερότητα. Κατά τη βυνοποίηση και την πολτοποίηση, το 35 – 40 % του συνόλου της συγκέντρωσης σε πρωτεΐνη αποσυντίθεται. Κατά τη βυνοποίηση σχηματίζεται 60 % των αμινοξέων, ενώ τα υπόλοιπα κατά την πολτοποίηση. Οι καρβοξυπεπτιδάσες θεωρούνται απαραίτητες στην παραγωγή αμινοξέων, εξαιτίας των επιπέδων του pH και της θερμοκρασίας. Η ενζυματική διάσπαση τους επιτυγχάνεται στους 45 – 55⁰C, χωρίς να διακόπτεται σε μεγαλύτερες τιμές της θερμοκρασίας. Όταν η περίοδο ξεκούρασης είναι σε θερμοκρασία 45⁰C, παράγονται κυρίως προϊόντα χαμηλού μοριακού βάρους.

Θεωρείται απαραίτητη η προσθήκη στη ζύμη με επαρκή α-αμινοξέα για την ανάπτυξη του και τον μεταβολισμό. Η ελάχιστη συγκέντρωση του α-αμινο αζώτου είναι 20 mg/100 ml στο γλεύκος. Τα γλεύκη από επεξεργασμένες βύνες έχουν τις αναγκαίες συγκεντρώσεις σε α-αμινοξέα. Σε θερμοκρασία 55⁰C, σχηματίζονται επι τω πλείστον ενώσεις υψηλού μοριακού βάρους. Κατά την πολτοποίηση με καλά επεξεργασμένες βύνες, η πρωτεόλυση είναι μικρότερη από της βυνοποίησης. Όταν η ανάπαυση είναι μεγάλης διάρκειας σε θερμοκρασία 50⁰C τότε δημιουργείται μικρή ποσότητα αφρού (Willaer, 2006).

2. 3. 6 Μέθοδοι Πολτοποίησης.

Η πολτοποίηση πραγματοποιείται στην αντίστοιχη δεξαμενή γνωστή ως mashing tun, mash mixer ή mash converter. Το υλικό της δεξαμενής είναι από ανοξείδωτο χάλυβα και θερμαίνεται με ατμό μέσω ημικυκλικών σωλήνων οι οποίοι είναι τοποθετημένοι στο κάτω μέρος και στο σώμα της δεξαμενής. Ο αναδευτήρας εφαρμόζεται για την επίτευξη ομοιογενής ανάμειξη στη πολτοποίηση. Πιθανές περίοδοι ανάπαυσης που είναι σύμφωνα με τη βέλτιστη θερμοκρασία των ενζύμων, είναι στις ακόλουθες θερμοκρασίες (Willaer , 2006):

- ✓ 45 – 50⁰C για πρωτεόλυση και αποικοδόμηση της β-γλυκάνης.
- ✓ 62 – 65⁰C για παραγωγή μαλτόζης (β-αμυλάση)
- ✓ 70 – 75⁰C για σακχαροποίηση (α-αμυλάση) και

- ✓ 78⁰C ως η τελική θερμοκρασία πολτοποίησης για την απενεργοποίηση των ενζύμων υδατανθράκων και τη διόρθωση της ποσότητας των ζυμώσιμων σακχάρων.



Εικόνα 2.3. Δεξαμενή πολτοποίησης (Willaer, 2006).

Οι μέθοδοι πολτοποίησης κατηγοριοποιούνται σε διεργασίες έγχυσης και αφεψήματος. Στις διεργασίες έγχυσης, ο πολτός θερμαίνεται εφαρμόζοντας περιόδους ανάπαυσης όπου είναι απαραίτητο μέχρι την τελική θερμοκρασία πολτοποίησης. Οι μέθοδοι έγχυσης διακρίνονται στη γερμανική μέθοδος, όπου παρατηρείται αύξηση της θερμοκρασίας και στην Αγγλική μέθοδος με μείωση της θερμοκρασίας. Η κλασική γερμανική μέθοδος έγχυσης αρχίζει με περίοδο ξεκούρασης 30 λεπτών σε θερμοκρασία 45 – 50⁰C, όπου πρωτελούνονται. Ακολουθεί η αύξηση της θερμοκρασίας στους 62 – 65⁰C και έπειτα διατηρείται στη θερμοκρασία για 30 – 45⁰C. Η επόμενη περίοδος ξεκούρασης παρατηρείται στους 70 – 75⁰C έως την σακχαροποίηση με την ολοκλήρωση της στους 78⁰C. Στην αγγλική μέθοδο, η θερμοκρασία αρχικά η θερμοκρασία αυξάνεται με την προσθήκη ζεστού νερού στον πολτό. Σε αυτή τη μέθοδο είναι αναγκαία η βύνη που βρίσκεται διάσπαρτη να παρουσιάζει ομοιομορφία, γιατί ποσοστό των ενεργών ενζύμων καταστρέφεται όταν προστεθεί ζεστό νερό. Μια άλλη εναλλακτική αγγλική μέθοδος είναι η «ισοθερμική πολτοποίηση» όπου η διαδικασία πραγματοποιείται σε ενιαία θερμοκρασία που κυμαίνεται από 63 – 65⁰C. Η διαδικασία υπερτερεί διότι δύναται να αυτοματοποιηθεί και να είναι ελεγχόμενη, ενώ παρατηρείται και μείωση της κατανάλωσης ενέργειας 20 – 30% από ό,τι με τη διαδικασία αφεψήματος.

Κατά τη διεργασία αφεψήματος, η θερμοκρασία αυξάνεται με κινούμενο μέρος του πολτού να οδηγείται στη δεξαμενή όπου ακολουθεί βρασμός με περιόδους ανάπαυσης. Αντλώντας το πίσω στον υπόλοιπο πολτό, η θερμοκρασία του συνολικού πολτού αυξάνεται στην επόμενη υψηλότερη θερμοκρασία ξεκούρασης. Η μέθοδος εφαρμόζεται στη Γερμανία για την παραγωγή της lager μύρας. Ανάλογα με τον αριθμό των βρασμένων πολτών οι μέθοδοι

αφεψήματος ταξινομούνται μονής, δύο και τριών πολτοποιήσεων (Willaert and Baron, 2005)

2. 3. 7 Διαχωρισμός μούστου (Λευτράρισμα)

Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας καθαρισμού γνωστός και ως «διαχωρισμός μούστου» οι αδιάλυτες ουσίες διαχωρίζονται από το ζυθογλεύκος. Το αδιάλυτο μέρος αποτελείται από φλοιούς, βλαστίδιο και άλλο αδιάλυτο υλικό. Ο διαχωρισμός του ζυθογλεύκους πραγματοποιείται με διήθηση. Η απόδοση εκχύλισης προσδιορίζεται ως «απόδοση εκχυλίσματος» και ορίζεται ως ο λόγος της μάζας του εκχυλίσματος στη μάζα βύνης και του πρόσθετου. Η διήθηση μπορεί να πραγματοποιηθεί σε lauter tun ή με φίλτρα πλακών (Willaert and Baron, 2005).

2. 3. 8 Διαχωρισμός με Lauter Tun.

Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται με τα lauter tuns που είναι δεξαμενές με έναν ψευδοπυθμένα διαμέτρου 10-20mm, οποίες αποτελείται από σίτες. Υλικό κατασκευής είναι ο χάλυβας χρωμίου - νικελίου και είναι θερμομονωμένα. Αρχικά η δεξαμενή γεμίζει με ζεστό νερό θερμοκρασίας 78 – 80 °C και ο πολτός τροφοδοτείται στη συνέχεια από το κάτω μέρος για να διατηρήσει τα επίπεδα οξυγόνου σε χαμηλά επίπεδα. Η τροφοδότηση επηρεάζεται από την ποιότητα πρώτης ύλης, όπου στην περίπτωση της ρυθμισμένης άλεσης είναι 170 – 210 kg/m² και στην περίπτωση της απότομης άλεσης είναι 200 – 280 kg/m² (Narziss 2005). Το κάτω μέρος της δεξαμενής περιέχει θυρίδες απορροής για τη συλλογή του ζυθογλεύκους από τον πολτό.

Μετά την πλήρωση του δοχείου, ακολουθεί καθίζηση για 20-30 λεπτά και σχηματισμός στρώματος διήθησης με ύψος 30 – 40cm και 60 – 70cm στην υγρή άλεση. Το υλικό που αποτελείται από σωματίδια, συγκεντρώνεται μεταξύ του σωλήνα του πυθμένα και τον ψευδοπυθμένα και το θολό ζυθογλεύκος επεξεργάζεται μέχρι τη διαύγαση του. Το πρώτος ζυθογλεύκος διαπερνά μέσα από τους διασπαρμένους κόκκους με αποτέλεσμα να φιλτράρεται. Επιπρόσθετα, στον πυθμένα υπάρχει αναδευτήρας με σκοπό τη διατήρηση της διαφοράς πίεσης σε χαμηλά επίπεδα. Η διαδικασία ακολουθείται μέχρι να πραγματοποιηθεί η διαύγαση. Έπειτα, μεγάλη ποσότητα νερού θερμοκρασίας 75 – 78°C χρησιμοποιείται για το πλύσιμο του ζυθογλεύκους και για τη κίνηση του προς τα κάτω. Όταν ολοκληρωθεί η διαδικασία το

υπόλοιπο νερό αποστραγγίζεται και οι χρησιμοποιημένοι κόκκοι απορρίπτονται (Kenechukwu, 2019).



Εικόνα 2.4. Δεξαμενή με αναδευτήρα (Kenechukwu A., 2019)

2. 3.9 Διαχωρισμός μούστου με φίλτρο.

Το φίλτρο πραγματοποιεί τον διαχωρισμό του ζυθογλεύκους με τη διαδικασία της λεπτής κλίνης πάχους 6 – 7cm. Ένα σύγχρονο φίλτρο που χρησιμοποιείται είναι το Meura 2001 (N.N. 2005b). Το φίλτρο αποτελείται από ένα σταθερό ακραίο πλαίσιο και ένα κιβώτιο, όπου σε συνδυασμό με τις πλευρικές δοκούς στήριξης αποτελούν το κύριο μηχάνημα. Στο εσωτερικό του πλαισίου είναι τοποθετημένο ένα υδραυλικό έμβολο που προκαλεί κίνηση και δύναται να ανοίγει και να κλείνει. Όταν είναι κλειστό τότε συμπιέζεται ένα σύνολο από πλάκες πολυπροπυλενίου που είναι εναλλάξ τοποθετημένες μέσω των οποίων μπορεί να διαπερνά το ζυθογλεύκος. Αυτές συνδέονται σε μια κύρια κεφαλή πεπιεσμένου αέρα πάνω από το μηχάνημα. Το πλήθος των πλακών που τοποθετούνται και το μήκος του φίλτρου καθορίζονται προσδιορίζονται από τη αναγκαία χωρητικότητα των πρώτων υλών. Το φίλτρο έχει τρεις φάσεις λειτουργίας (N.N. 2005 b):

- ✓ Γέμισμα – φιλτράρισμα.
- ✓ Προσυμπίεση – σπάσιμο. και
- ✓ Συμπίεσης

Αρχικά το ζυθογλεύκος εισέρχεται στο φίλτρο από κάτω και κατανέμεται προς τα πάνω μέσα από διάφορους θαλάμους. Όταν το φίλτρο γεμίσει τότε το γλεύκος θα κινείται διαυγές. Όταν ολοκληρωθεί η μεταφορά του ζυθογλεύκους τότε πραγματοποιείται καθαρισμός και τα φίλτρα προ συμπιέζονται. Μετά τη διήθηση, το 80% και παραπάνω των διαλυτών σακχάρων μπορούν

να ανακτηθούν. Η προ-συμπίεση των κλινών φίλτρου, πριν από το σπάσιμο, συμμετέχει στην ανασύνθεση της κλίνης, ενώ δύναται να ανακτηθεί μεγαλύτερο μέρος του εκχυλίσματος του ζυθογλεύκου. Στην τελική φάση, η αφυδάτωση πραγματοποιείται μέσω της μηχανικής συμπίεσης.

2. 3. 10 Βρασμός ζυθογλεύκου

Η διαδικασία αυτή δεν είναι απλή και πολλές χημικές, φυσικοχημικές, φυσικές και βιοχημικές αντιδράσεις εκτελούνται. Επιπλέον, αυτό το στάδιο θεωρείται το πιο ενεργοβόρο. Στα ζυθοποιεία που με παλιά τεχνολογία η απαιτούμενη ενέργεια για την θέρμανση του γλεύκου είναι πάρα πολύ μεγάλη και η διαδικασία βρασμού διαρκεί μεγάλο χρονικό διάστημα. Εναλλακτικές τεχνολογίες βρασμού ζυθογλεύκου, όπως η χαμηλή πίεση βρασμού και υψηλής θερμοκρασίας, έχουν εφαρμοστεί κατά κόρον τις τελευταίες δεκαετίες, με στόχο τη μείωση της κατανάλωσης της πρωτογενούς ενέργειας. Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί νέα συστήματα βρασμού τα οποία προκαλούν επιπλέον μείωση στην κατανάλωση ενέργειας και όλα προκαλούν χαμηλή θερμική καταπόνηση στο γλεύκος κατά τη διάρκεια του βρασμού. Ένα χαμηλό θερμικό φορτίο επηρεάζει με θετικό τρόπο τα χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος και τα χαρακτηριστικά του αφρού της μύρας που σχηματίστηκε. Το θερμικό στρες μπορεί να εκτιμηθεί ποσοτικά είτε με τη μέτρηση του χρώματος του θειοβαρβιτουρικού αριθμού είτε με τη συγκέντρωση των δεικτών υψηλής θερμοκρασίας (Manger 2000). Το θερμικό φορτίο μπορεί να μειωθεί με συνδυασμό των ακόλουθων μέτρων (Willaert and Baron, 2005):

- Εφαρμογή της μεθόδου πολτοποίησης με έγχυση
- Μείωση του χρόνου θέρμανσης του γλεύκου πριν από τον βρασμό
- Μείωση του χρόνου βρασμού
- Μείωση της θερμοκρασίας κατά τις περιόδους βρασμού και διατήρηση των υψηλών τιμών
- Μείωση του χρόνου πλήρωσης και ξεκούρασης
- Μείωση του χρόνου ψύξης του μούστου

Το γλεύκος είναι αναγκαίο να βράσει πριν τον αερισμό του και χρησιμοποιείται ως θρεπτικός ζυμός για την αλκοολική ζύμωση από τα κύτταρα της ζύμης. Η διαδικασία βρασμού στοχεύει σε διάφορους στόχους , όπως (Willaert and Baron, 2005):

- Εκχύλιση α- οξέος
- Ισομερισμός α-οξέος

- Πήξη πρωτεϊνών
- Αποστείρωση γλεύκους και αδρανοποίηση ενζύμων για τη σταθεροποίηση της σύνθεσης του γλεύκους
- Σχηματισμός αναγωγικών και αρωματικών ενώσεων (αντίδραση Maillard)
- Σχηματισμός χρωστικών ουσιών
- Απομάκρυνση ανεπιθύμητων πτητικών αρωματικών ενώσεων
- Οξίνιση του γλεύκους
- Εξάτμιση νερού

Επιπρόσθετα θα πρέπει να αναφερθεί ότι είναι αναγκαία η υψηλή θερμοκρασία για ορισμένο χρόνο με στόχο την υψηλή απόδοση ισομερισμού των α-οξέων. Η απόδοση αυτή εξαρτάται από (Willaert and Baron, 2005):

- Η φύση της ισοχουμουλόνης
- Τη διάρκεια του βρασμού
- Το pH, όπου οι υψηλές τιμές αυτού επιφέρουν αύξηση της απόδοσης, όμως παρουσιάζει μία πικρή γεύση. Σε χαμηλές τιμές pH είναι περισσότερο ισορροπημένο και λεπτότερο οπότε προτιμότερο
- Τη συγκέντρωση της χουμουλόνης, όπου αύξηση της τιμής προκαλεί μείωση της απόδοσης
- Την Καθίζηση ισοχουμουλόνης με το θερμό διάλειμμα
- Η χρήση αποτελεσματικότερων διαδικασιών εκχύλισης
- Μέγεθος των τεμαχιδίων του λυκίσκου, όπου το ποσοστό εκχύλισης είναι υψηλότερο στους αλεσμένους κώνους

Για την αποστείρωση του ζυθογλεύκους και την αδρανοποίηση των ενζύμων απαιτείται βρασμός σε σύντομο χρονικό διάστημα. Η μικροχλωρίδα της βύνης, του λυκίσκου και των άλλων πρόσθετων είναι ευαίσθητη με αποτέλεσμα να καταστρέφεται εύκολα. Η αδρανοποίηση των υπολειμματικών ενζύμων, θεωρείται αναγκαία για τη σταθεροποίηση της σύστασης του ζυθογλεύκους. Έχει εντοπιστεί μόνο μια υπολειμματική δραστηριότητα της πολυφαινολοοξειδάσης και των α-αμυλασών στο γλεύκος πριν από το βρασμό, οπότε το μικρό χρονικό διάστημα είναι επαρκές για τη μετουσιώσει αυτά τα ένζυμα.

Κατά το βρασμό, το γλεύκος γίνεται ελαφρώς όξινο συνήθως μεταβάλλεται κατά 0,1–0,3 μονάδες το pH στην κλασική διαδικασία βρασμού, λόγω του σχηματισμού μελανοειδινών, της προσθήκης οξέων από τον λυκίσκο, της καθίζησης αλκαλικών φωσφορικών αλάτων και της

όξινης δράσης των ιόντων Ca^{+2} και Mg^{+2} με φωσφορικά άλατα. Η χρήση σκούρων βύνων θα προκαλέσει μεγαλύτερη μείωση του pH σε σύγκριση με τις ωχρές βύνες.

Ο βρασμός του ζυθογλεύκους προκαλεί την εξάτμιση του νερού καθώς και των πτητικών οργανικών συστατικών και επηρεάζει τη συγκέντρωση του, όπου εξατμίζεται το 8 – 12% του αρχικού όγκου του. Έχει αποδειχθεί ότι η μείωση της εξάτμισης σε μόλις 2% μπορεί να επιτευχθεί χωρίς αρνητικές επιπτώσεις στη γεύση ή σε άλλες ιδιότητες και χαρακτηριστικά της μύρας, όπως η πικρία, το ολικό άζωτο και το χρώμα (Willaert and Baron, 2005).

2. 3. 11 Διαύγαση γλεύκους

Μετά τον βρασμό είναι απαραίτητο να απομακρυνθούν τα υπολείμματα του λυκίσκου και της βύνης καθώς και των πρόσθετων για τη διασφάλιση της γεύσης και τη κολλοειδή σταθερότητα της μύρας. Εάν δεν αφαιρεθούν τα σωματίδια των καυτών φυτών τότε θα βρωμίσουν το κυτταρικό τοίχωμα της ζύμης και θα επιφέρουν την καθίζηση της ζύμης κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και ως εκ τούτου θα ληφθεί ένας μειωμένος βαθμός ζύμωσης. Αυτού του είδους τα σωματίδια όταν η θερμοκρασιά τους είναι υψηλή τότε κάνουν την μύρα σκουρότερη, τραχιά γεύση και παρατηρείται αστάθεια του αφρού (Willaert and Baron, 2005).

2. 4 Σύσταση ζυθογλεύκους

Επηρεάζεται άμεσα από τη σύσταση των δημητριακών, τη διαδικασία πολτοποίησης, την ποσότητα του νερού και τον λυκίσκο. Η μέση σύσταση της βύνης είναι 12% μονοσακχαρίτες, 5% σακχαρόζη, 47% μαλτόζη, 15% μαλτοτριόζη και 25% ανώτερους σακχαρίτες, όπως δεξτρίνες. Το μεγαλύτερο μέρος των σακχάρων του γλεύκους σχηματίζονται στη δεξαμενή πολτοποίησης, όπου τα ένζυμα μετατρέπουν το άμυλο σε σάκχαρα. Η θερμοκρασία και το πάχος του πολτού επιφέρουν σημαντικές επιπτώσεις στο προφίλ των σακχάρων του γλεύκους και αυτό επηρεάζει την ικανότητα ζύμωσης του γλεύκους. Σε κάποιες ποικιλίες μύρας απαιτείται η προσθήκη σακχάρων στο γλεύκος για να δώσουν στη μύρα επιπλέον γεύση ή/και να αυξήσουν την περιεκτικότητα σε αλκοόλ χωρίς να δημιουργηθεί κάποιο πρόβλημα. Πέρα των υδατανθράκων, η σύνθεση του γλεύκους αποτελείται από αζωτούχες ενώσεις κυρίως πρωτεΐνες, άλατα και μέταλλα, οξέα, φαινόλες, πικρές ουσίες λυκίσκο, αιθέρια έλαια λυκίσκου και λιπίδια.

Όσον αφορά την ποιότητα της μύρας βασίζεται κυρίως στη γεύση της και στο προφίλ του αρώματος που προκύπτει από ένα ευρύ φάσμα γευστικών ενεργών ενώσεων, των οποίων η παραγωγή επηρεάζεται από την αλυσίδα εφοδιασμού βύνης (Verstrepen, K. et al., 2003).

Τα σημαντικότερα πτητικά προϊόντα του μεταβολισμού της ζύμης είναι η αιθανόλη, η γλυκερίνη και το διοξείδιο του άνθρακα, το οποίο επηρεάζει τη γεύση της μύρας. Οι αρωματικές ενώσεις συμμετέχουν στην ποιότητα και τη γευστικότητα της μύρας, όπως εστέρες, ανώτερες αλκοόλες, θειούχες ενώσεις, οργανικά οξέα και καρβονυλικές ενώσεις, προέρχονται από το μεταβολισμό της ζύμης κατά τη διάρκεια της πρωτογενούς ζύμωσης. Από όλους τους δευτερογενείς μεταβολίτες υπεύθυνη για την κύρια γεύση του τελικού προϊόντος είναι οι ανώτερες αλκοόλες και οι εστέρες που θεωρούνται μια πολύ σημαντική ομάδα των γευστικών μεταβολιτών και του βιοχημικού σχηματισμού τους τα οποία είναι γνωστά. Οι εστέρες είναι ενώσεις που επιδρούν στη γεύση και χαρακτηρίζονται γενικά από τα φρουτώδη-λουλουδάτα αρώματά τους στην μύρα. Ενώ οι πτητικοί εστέρες συνήθως προσδιορίζονται σε ίχνη στην μύρα, μπορούν να παρουσιάσουν συνεργική δράση με άλλες ενώσεις που επηρεάζουν τη γεύση (He Y. et al., 2014).

Οι εστέρες σχηματίζονται ενδοκυτταρικά από μια καταλύομενη ενζυμική αντίδραση μεταξύ ενός ενεργού συνενζύμου ακυλίου A και μιας ανώτερης αλκοόλης. Οι αλκοολικές ακετυλοτρανσφεράσες (AATase) είναι ένζυμα που θεωρούνται υπεύθυνα για το σχηματισμό οξικών εστέρων και τη συνολική δραστηριότητα της AATase που προέρχονται από την έκφραση των γονιδίων ATF1 και ATF2, που κωδικοποιεί την AATase I και II, αντίστοιχα. Επιπρόσθετα, η μεταγραφική δραστηριότητα των γονιδίων ATF στη μαγιά μύρας είναι η περιοριστική παράμετρος για τη σύνθεση του οξικού εστέρα. Τα EHT1 και EEB1 κωδικοποιούν δύο O-ακυλοτρανσφεράσες αιθανόλης ακυλο-CoA (AATase) ένζυμα, τα οποία έχουν σημαντικό ρόλο τόσο στην σύνθεση των αιθυλεστέρων όσο και στη δράση της υδρόλυσης των εστέρων. Η υδρολυτική εστεράση που ορίζεται ως IAH1 είναι επίσης σημαντική για τον ρυθμό συσσώρευσης εστέρα (Saerens, et al., 2006).

Οι ανώτερες αλκοόλες επιδρούν στη γεύση της μύρας ενισχύοντας την αλκοολική αντίληψη και προσδίδοντας μια ζεστή αίσθηση στο στόμα. Μεγάλος αριθμός γονιδίων παίρνει μέρος στη βιοσύνθεση αυτών των ενώσεων. Η βιοσύνθεση ανώτερων αλκοολών έχει σχέση με τον μεταβολισμό των αμινοξέων μέσω της οδού Ehrlich. Περιοριστικός παράγοντας σε αυτή τη διαδικασία είναι η πρόσληψη τριών διακλαδισμένων αλυσίδων αμινοξέων από ένα αμινοξύ

διακλαδισμένης αλυσίδας που κωδικοποιείται από BAP2-κωδικοποιημένο αμινοξύ διακλαδισμένης αλυσίδας περμεάσης (Procopio, et. al., 2011).

Δύο διακλαδισμένες αλυσίδες αμινοξέων, Bat1 και Bat2, μεσολαβούν στη μεταφορά αμινομάδων από αμινοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας σε α-κετοοξέα, τα οποία είναι πρόδρομοι για τη σύνθεση ανώτερων αλκοολών. Σε αντίθεση με τις ανώτερες αλκοόλες και τους εστέρες, που είναι επιθυμητές πτητικές ενώσεις, οι δικετόνες (VDKs) θεωρούνται ότι προσδίδουν δυσάρεστη γεύση για την πλειοψηφία των ποικιλιών μύρας. Σύμφωνα με τον Meilgaard, τα VDK έχουν το άρωμα της καραμέλας βουτύρου, που είναι το έμμεσο αποτέλεσμα του μεταβολισμού της ζύμης. Όλα τα γευστικά ενεργά συστατικά της μύρας πρέπει να ελέγχονται εντός συγκεκριμένων ορίων. Η σχετική συγκέντρωσή τους μπορεί να συνεισφέρει επιθυμητά ή ανεπιθύμητα γευστικά χαρακτηριστικά ακόμη και ασήμαντα. Η μεταβολή των συγκεντρώσεών τους μπορεί να οδηγήσει σε εντελώς διαφορετική γεύση για την μύρα (He, 2014).

Το ζυθογλεύκος είναι μια σύνθετη ανάπτυξη ζύμης και μέσο ζύμωσης το οποίο αποτελείται από υδατάνθρακες, δηλαδή γλυκόζη, φρουκτόζη, σακχαρόζη, μαλτόζη, μαλτοτριόζη και μη ζυμώσιμα δεξτρίνες, αζωτούχα, όπως αμινοξέα, πεπτίδια, αμμωνία, πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα, βιταμίνες, μέταλλα, ανόργανα ιόντα, λιπαρά οξέα, ιχνοστοιχεία καθώς και άλλα συστατικά. Οι ζυμώσεις στη ζυθοποιία απαιτούν μια ισορροπημένη παροχή θρεπτικών συστατικών, παρέχοντας έτσι επαρκείς ποσότητες για την επίτευξη της ανάπτυξης ζύμης, ενώ ταυτόχρονα ενεργούν και ως ένα μέσο ζύμωσης για τον σχηματισμό σταθερών συγκεντρώσεων αιθανόλης, διοξειδίου του άνθρακα και δευτερογενών παραπροϊόντων που δρουν στη γεύση. Επομένως είναι αντιληπτό ότι οποιαδήποτε μεταβολή στα θρεπτικά συστατικά θα επιδράσει αρνητικά στις παραμέτρους της ζύμωσης όπου θα πραγματοποιηθούν αποκρίσεις απο διαφορετική μαγιά, με αποτέλεσμα να επιδράσει αρνητικά στην ποιότητα του τελικού προϊόντος (Stewart, et al., 2013).

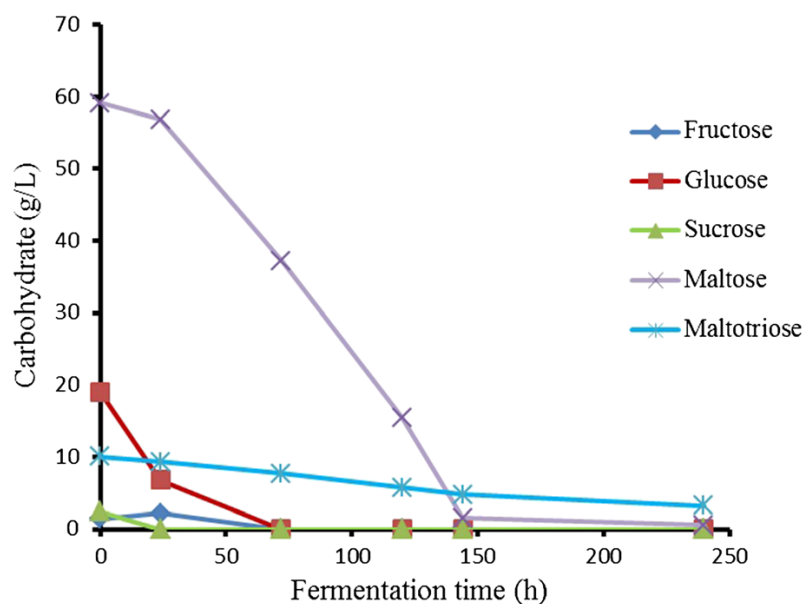
Απο τα παραπάνω προκύπτει ότι ο έλεγχος των πρώτων υλών και η προετοιμασία των υλών ακολουθούμενη από τις συνθήκες για κατάλληλη ζύμωση, θα εξασφαλίσουν την ποιότητα την μύρας και άρα το γευστικό προφίλ θα παραμείνει σταθερό. Προκειμένου να επιτευχθεί περισσότερος έλεγχος στον σχηματισμό της γεύσης, έχει πραγματοποιηθεί σημαντική έρευνα για την αποσαφήνιση των παραγόντων που επηρεάζουν τον σχηματισμό γεύσης. Τέλος, το διαφορετικό ειδικό βάρος γλεύκους, οι υδατάνθρακες, το άζωτο, το προφίλ λιπιδίων, ορισμένες βιταμίνες και ανόργανα ιόντα δύναται να προκαλέσουν διαφοροποίηση στην απόδοση της

ζύμωσης και ως εκ τούτου να επιδράσει και τα επίπεδα των εστέρων και των ανώτερων αλκοολών που σχηματίζονται (He, 2014).

Η αντίληψη της επίδρασης κάποιων ενώσεων του γλεύκους στον σχηματισμό της γεύσης μπορεί να οδηγήσει σε βελτίωση αυτής κατά τη διάρκεια των ζυμώσεων στη ζυθοποιία.

2. 4. 1 Σάκχαρα

Ένα τυπικό ζυθογλεύκος περιέχει περίπου 90 % υδατάνθρακες, οι οποίοι περιλαμβάνουν σακχαρόζη, φρουκτόζη, γλυκόζη, μαλτόζη μαζί με δεξτρίνη. Το προφίλ των σακχάρων στο μούστο εξαρτάται από τις πρώτες ύλες και κυρίως από τη βύνη κριθαριού και από τις διαδικασίες προετοιμασίας του ζυθογλεύκους καθώς και από τον τύπο και την ποσότητα των πρόσθετων που χρησιμοποιούνται. Όταν πραγματοποιείται εμβολιασμός η μαγιά χρησιμοποιεί τα κύρια σάκχαρα του γλεύκους σε μία διαδοχική σειρά, όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.4.



Εικόνα 2. 4. Η ζύμωση κατά τον σχηματισμό της lager TT-21 (He, 2014).

Η μαλτόζη και η μαλτοτριόζη είναι τα σάκχαρα με τα υψηλότερα ποσοστά και συνήθως απορροφώνται μόνο μετά την σημαντική μείωση των μονοσακχαριτών λόγω της καταστολή του άνθρακα των μεταβολικών οδών που εμπλέκονται στην πρόσληψη και χρήση εναλλακτικών σακχάρων. Παρότι η ζύμωση θεωρείται μια διαδικασία κατά την οποία οι υδατάνθρακες χρησιμοποιούνται από τη μαγιά για τον πολλαπλασιασμό και τη διατήρησή του,

μέσω της παρεχόμενης ενέργειας από τη μετατροπή των σακχάρων σε αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα, περισσότερες ενώσεις σχηματίζονται ταυτόχρονα κατά τη διαδικασία συμπεριλαμβανομένων των εστέρων και των ανώτερων αλκοολών.

Η σύνθεση του γλεύκους σε υδατάνθρακες καθώς και ο τρόπος εμβολιασμού που εφαρμόζεται παρουσιάζει άμεση επίδραση στην αποτελεσματικότητα της ζύμωσης και στον μεταβολισμό της ζύμης, καθώς και στο οργανοληπτικό προφίλ του τελικού προϊόντος. Μελέτες έχουν αποδείξει ότι παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στα προφίλ σχηματίστηκαν όταν διαφορετικοί υδατάνθρακες ζυμώθηκαν ξεχωριστά (He, 2014).

Μη ζυμώσιμες δεξτρίνες, οι οποίες δεν μπορούν να μεταβολιστούν από τη ζύμη lager καθώς και τα περισσότερα στελέχη μαγιάς ale, είναι επίσης υδατάνθρακες του γλεύκους οπότε παραμένουν στο τελικό προϊόν συμβάλλοντας στην γεύση της μπύρας. Σε συγκεκριμένη τιμή της συγκέντρωσης της μαλτόζης και ιδίως της μαλτοτριόζης εντοπίζεται όταν ολοκληρωθεί η πρωτογενής ζύμωση. Συνεπώς, μειώνεται η αποτελεσματικότητα της διαδικασίας και δυνητικά επιδρά στην ποιότητα της μπύρας μέσω της παραγωγή γευστικών υποπροϊόντων. Μεγάλος σχηματισμός ανώτερων αλκοολών επιφέρουν υψηλά επίπεδα σακχαρόζης στο γλεύκος σύμφωνα με τους Jenard και Denreux. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές στα επίπεδα εστέρων και ανώτερων αλκοολών που παράγονται κατά τη ζύμωση, όταν η γλυκόζη ή η φρουκτόζη μεταβολίζονται ως η μοναδική πηγή υδατανθράκων από τα στελέχη της ζύμης ale και lager. Όμως, ο μεταβολισμός της μαλτόζης είχε ως αποτέλεσμα μικρές συγκεντρώσεις εστέρων και ανώτερων αλκοολών συγκριτικά με την ευκολότερα αφομοιώσιμη γλυκόζη και φρουκτόζη. Εκτός από τους διαφορετικούς υδατάνθρακες που επηρεάζουν τη συγκέντρωση των γευστικών ενώσεων, η διαφορετική αναλογία βύνης-πρόσθετου στο γλεύκος συμβάλουν στο σχηματισμό πλήθους γευστικών συστατικών. Επηρεάζονται διαφορετικές γευστικές ενώσεις με διάφορους τρόπους όταν μέρος του γλεύκους αντικαθίσταται από ένα διάλυμα υδρογονανθράκων, με τη φρουκτόζη να σχηματίζει ανώτερες αλκοόλες σε υψηλά επίπεδα συγκριτικά με άλλα σάκχαρα, εκτός της n-προπανόλης. Συνεπώς, όταν οι μπύρες σχηματίζονται με την προσθήκη σιροπιού, θα πρέπει να ληφθούν υπόψη τα συστατικά αυτού για τη διατήρηση της τελικής γεύσης της μπύρας σε σύγκριση με ένα τυπικό γλεύκος. Σύμφωνα με τους Younis και Stewart όταν ενίσχυσαν τις ζυμώσεις με σιρόπια υψηλής περιεκτικότητας σε μαλτόζη, παρατήρησαν ότι επέφερε σημαντικές μειώσεις στην παραγωγή οξικών εστέρων, ιδιαίτερα με γλεύκη υψηλού μοριακού βάρους. Ακόμη δεν έχει γίνει σαφές γιατί ο μεταβολισμός ενός μέσου που περιέχει γλυκόζη ή μαλτόζη παράγει διαφορετικά επίπεδα πτητικών. Υπάρχει η άποψη ότι πιθανότατα η ζύμωση της μαλτόζης να αναστέλλει τη

μεταφορά πτητικών εκτός του κυττάρου, ενδεχομένως εξαιτίας της αλλαγής της δομής της μεμβράνης. Πρότειναν ότι η μεταφορά πτητικών είναι απίθανη υπό το φως των κυττάρων που αναπτύσσονται στη μαλτόζη. Υπάρχει η περίπτωση ο μεταβολισμός της μαλτόζης να σχηματίζει μικρότερα επίπεδα ακετυλο-CoA, που είναι το βασικό υπόστρωμα για τη σύνθεση οξικού εστέρα, με αποτέλεσμα λιγότερους εστέρες λόγω της έλλειψης αυτού του ενδιάμεσου μεταβολίτη (Stewart,2006).

Επιπλέον, οι Verstrepen et al. παρατήρησαν ότι η υψηλή συγκέντρωση της γλυκόζης προκαλεί σημαντική αύξηση στην παραγωγή αρωματοδραστικών εστέρων μέσω ενεργοποίησης του Ras/cAMP/PKA. Συνεπώς, οδηγεί σε ισχυρότερη έκφραση του γονιδίου της συνθετάσης του εστέρα ATF1. Έτσι δραστηριότητες σύνθεσης εστέρα θα μπορούσε να προκληθεί γρήγορα με την προσθήκη γλυκόζης (Verstrepen, et al., 2004).

2. 4. 2 Ενώσεις αζώτου

Οι αζωτούχες ενώσεις (FAN), που διατίθενται για κατανάλωση από τη μαγιά είναι γνωστές ως αφομοιώσιμο άζωτο ή ελεύθερο όπου που μπορεί να οριστεί ως το άθροισμα του μεμονωμένου ζυθογλεύκους των αμινοξέων, των αμμωνιακών ιόντων και μικρών πεπτιδίων. Οι συγκεντρώσεις των παραπάνω συστατικών μπορεί να είναι διαφορετικές εξαιτίας των διαφορών που παρουσιάζουν οι διαδικασίες βυνοποίησης και πολτοποίησης και/ή στις πρώτες ύλες. Υπάρχουν επίσης διαφορές μεταξύ των στελεχών ζύμης lager και ale όσον αφορά τα χαρακτηριστικά πρόσληψης αφομοιώσιμου αζώτου του γλεύκους. Το FAN, ως γενικό μέτρο των θρεπτικών συστατικών της μαγιάς, θεωρείται ένας σημαντικός δείκτης για την πρόβλεψη της ζύμωσης της ζύμης και την ποιότητα της μύρας (Hashimoto, et al., 2012). Εφαρμόζεται και για τη βιοσύνθεση παραπροϊόντων ζύμωσης, τα οποία επιδρούν στη γεύση και τη σταθερότητα της μύρας. Όταν οι συγκεντρώσεις των αζωτούχων ενώσεων είναι 12,0°P με 115, 160 και 230 mg/L, είχαν ως αποτέλεσμα αύξηση του ρυθμού παραγωγής και της συγκέντρωσης του οξικού ισοαμυλεστέρα. Επιπρόσθετα η επεξεργασία του γλεύκους με πρωτεάσες επέφερε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις FAN, και στις συγκεντρώσεις των ανώτερων αλκοολών και εστέρων lager (Lei, et al., 2013). Τέλος η σύσταση του γλεύκους σε αζωτούχες ενώσεις επιδρά στη μεταγραφή και των γονιδίων ATF1 και BAT1, όπου παρουσιάζουν υψηλό συσχετισμό με τον εστέρα και την σύνθεση ανώτερων αλκοολών αντίστοιχα. Συνεπώς, η προσαρμογή των αζωτούχων ενώσεων δύναται να επηρεάσει τη γεύση της μύρας (Saerens, et al., 2008).

Πέρα από τη συγκέντρωση του αφομοιώσιμου αζώτου το οποίο επιδρά στο άρωμα της μπίρας, όμοια και το είδος του αμινοξέος έχει ως αποτέλεσμα διαφορετικές αντιδράσεις από τη μαγιά και ως εκ τούτου μεταβολή του αρωματικού προφίλ της μπίρας. Η πρόσληψη των αμινοξέων πραγματοποιείται σύμφωνα με τη διακριτή σειρά όπου ανόμοια αμινοξέα κινούνται σε διάφορα σημεία του κύκλου ζύμωσης. Η σύσταση των αμινοξέων του γλεύκος είναι μεγάλης σημασίας διότι ρυθμίζει τη βιοσύνθεση των γευστικών δραστικών ενώσεων που σχηματίζονται από τη μαγιά. Επομένως, η περιεκτικότητα σε αμινοξέα στο γλεύκος και η χρήση τους από τη μαγιά κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του ζυθοποιού επηρεάζει τόσο την απόδοση της ζύμωσης όσο και το γευστικό προφίλ του τελικού προϊόντος (Saerens, et al., 2008).

Η προσθήκη αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας, όπως η βαλίνη, λευκίνη και ισολευκίνη, στο ζυμωτικό μούστο επιφέρει αύξηση της σύζευξης των αντίστοιχων ανώτερων αλκοολών, όπως ισοβουτανόλη, ισοαμυλική αλκοόλη και αμυλική αλκοόλη. Η συστατική έκφραση του γονιδίου BAP_2 , το οποίο κωδικοποιεί μια διακλαδισμένη αλυσίδα αμινοξική περμεάση στη μαγιά μπίρας, είχε ως αποτέλεσμα την βελτίωση των ποσοστών αφομοίωσης της λευκίνης, βαλίνης και ισολευκίνης. Πρόσφατα, μια μελέτη αναφέρει την ιστιδίνη ως βασικό αμινοξύ για τα στελέχη της ζύμης lager κατά την παρασκευή. Η περαιτέρω προσθήκη ιστιδίνης επιδρά σημαντικά στη γεύση αυξάνοντας τον σχηματισμό ανώτερων αλκοολών και εστέρων (Lei et al., 2013).

Η παραγωγή οξικού ισοαμυλεστέρα στη μπίρα επηρεάζεται από την ποσότητα της λευκίνης στο γλεύκος. Η προσθήκη λευκίνης επέφερε γρηγορότερο ρυθμό παραγωγής και αύξηση στην τελική συγκέντρωση οξικού ισοαμυλεστέρα, ενώ η υψηλή συγκέντρωση βαλίνης καθυστέρησε την πρόσληψη λευκίνης και μείωσε την παραγωγή του οξικού ισοαμυλεστέρα. Η προλίνη έχει υψηλές συγκεντρώσεις στο γλεύκος, αλλά δεν επιδρά κατά τη διάρκεια μιας τυπικής ζύμωσης και συχνά ταξινομείται ως μη προτιμώμενο αμινοξύ. Η προλίνη δεν επιδρά στη ζύμωση, καθώς η παρουσία της στο γλεύκος θεωρείται ασήμαντη για την απόδοση της ζύμης. Παρόλα αυτά, πλήθος μελετών έχουν διαπιστώσει ότι η προλίνη προσλαμβάνεται από τη ζύμη κατά τη φάση ανάπτυξης και απεκκρίνεται στο τέλος της ζύμωσης (Gibson, et al., 2009).

Οι Procopio et al. (Procopio, et al., 2013) παρατήρησαν ότι κατά τη χρήση υψηλών συγκεντρώσεων προλίνης σε συνθετικό μέσο αυξήθηκε η παραγωγή οξικού άλας αιθυλίου οπότε η προλίνη είναι δυναμικά σημαντική μεταβλητή ως προς την διαφοροποίηση του αρωματικού προφίλ κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Δεδομένου ότι η προλίνη δεν μπορεί να μετατραπεί σε ανώτερη αλκοόλη μέσω της Ehrlich, η σημασία του στο σχηματισμό αρώματος

θα μπορούσε να εξηγηθεί από τη παρασκευή του γλουταμικού από προλίνη. Αν και η ποιότητα και η σταθερότητα της μύρας σχετίζεται με την επίπεδα ορισμένων αμινοξέων που υπάρχουν στο γλεύκος, μείωση στην απόδοση της ζύμωσης μπορεί να μην προκαλείται από την έλλειψη οποιαδήποτε συγκεκριμένης ομάδας αμινοξέων, αλλά από την αποτελεσματικότητα της χρήσης των νιτρογονιδίων. Τέλος, όσον αφορά τα ολιγοπεπτίδια στο γλεύκος, μερικά από αυτά μπορεί να αφομοιωθούν από τη μαγιά, ενώ άλλα παραμένουν στο τελικό προϊόν, συμβάλλοντας στη γεύση και στη σταθερότητά του.

2. 4. 3 Λιπίδια

Η περιεκτικότητα σε λιπίδια του γλεύκους μπορεί να επηρεάσει τη συγκέντρωση του εστέρα στο τελικό προϊόν. Παρατηρήθηκε ότι η προσθήκη αυξημένων επιπέδων ακόρεστων λιπαρών οξέων (UFAs) στο γλεύκος, δηλαδή ελαϊκό, λινολεϊκό και λινολενικό οξύ, μειώνουν τον σχηματισμό του εστέρα . Αυτό οφείλεται στην άμεση επίδραση στο συνθετικό ένζυμο, όπου η έκφραση των ATF1 και ATF2 αναστέλλεται άμεσα από την προσθήκη UFA . Επιπλέον οι οξικοί εστέρες, παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα UFA στο μέσο της ζύμωσης με αποτέλεσμα να παρατηρείται μείωση της σύνθεσης του αιθυλίου (He, 2014).

2. 4. 4 Βιταμίνες και ανόργανα ιόντα

Θεωρούνται απαραίτητα για την επίτευξη του πολλαπλασιασμού και την απόδοση της ζύμωσης. Ο σημαντικότερος ρόλος τους στον μούστο είναι να επιτρέπουν και τα ένζυμα και τα συνένζυμα στη ζύμη για να λειτουργούν σωστά.

Η απουσία αυτών των συστατικών έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση εμποδίων λόγω δυσλειτουργιών στις μεταβολικές δραστηριότητες της ζύμης. Οι αλλαγές στα επίπεδα αυτών των ενώσεων έχουν ως αποτέλεσμα διαφορετικά προφίλ ανάπτυξης ζυμομύκητα και μεταβολισμού.

Άρα το ποσοστό αυτής της κατηγορίας στο γλεύκος δύναται να επιδράσει στην τελική γεύση της μύρας διαφοροποιώντας τις μεταβολικές τους δραστηριότητες (Walker, 2000).

2. 5 Η σχέση της σύνθεσης του γλεύκους με την ποιότητα της μύρας

Το γλεύκος δύναται να επιδράσει στην ποιότητα της μύρας με παρακάτω τρόπους:

- μέσω της επίδρασής του στη μαγιά και
- άμεσα, όσον αφορά τα υλικά που παραμένουν στην μύρα χωρίς να επηρεάζονται από την μαγιά.

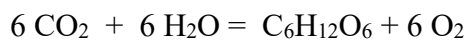
Λαμβάνοντας το δεύτερο παράγοντα υπόψη παρατηρείται ότι περισσότερες παράγοντες της ποιότητας της μύρας είναι άμεση συνέπεια του γλεύκους παρά μέσω αυτού που «τροποποιούνται» από μαγιά (Hammond, 2000).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΣΑΚΧΑΡΑ

3.1 Γενικά

Τα σάκχαρα γνωστά και ως υδατάνθρακες είναι μία κατηγορία φυσικών οργανικών ενώσεων άνθρακα, υδρογόνου και οξυγόνου που σχηματίζονται κυρίως από τα φυτά, όπου περιλαμβάνουν έως και 80 % του ξηρού βάρους. Στους φυτικούς οργανισμούς οι υδατάνθρακες παράγονται μέσω της διαδικασίας της φωτοσύνθεσης, όπως παρουσιάζεται στην παρακάτω αντίδραση:



Γενικά, ως υδατάνθρακες θεωρούνται οι πολυυδροξυαλδεΐδες ή κετόνες ή ουσίες που σχηματίζουν τέτοιες ενώσεις κατά την υδρόλυση και έχουν εμπειρικό τύπο $(\text{CH}_2\text{O})_n$.

Οι υδατάνθρακες αποτελούν τη βασική πηγή ενέργειας στην ανθρώπινη διατροφή και οι προσλήψεις κυμαίνονται από 40 έως 80% των συνολικών ενεργειακών απαιτήσεων (Muir et al. 2009). Οι υδατάνθρακες αποτελούν την κύρια πηγή ενέργειας για όλες τις λειτουργίες του σώματος, ιδιαίτερα τις λειτουργίες του εγκεφάλου, και είναι απαραίτητες για την μεταβολισμό άλλων θρεπτικών συστατικών. Άλλες σημαντικές επιδράσεις των υδατανθράκων στην ανθρώπινη φυσιολογία αποτελούν ο κορεσμός και η γαστρική κένωση, ο έλεγχος της γλυκόζης στο αίμα, ο μεταβολισμός της ινσουλίνης και η χοληστερόλη και τέλος επιδρούν στη μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου και στις γαστρεντερικές διεργασίες (Muir et al. 2009).

Οι γενικές, φυσικές και βιολογικές ιδιότητες των υδατανθράκων είναι οι ακόλουθες (Vaclavik and Christian 2014):

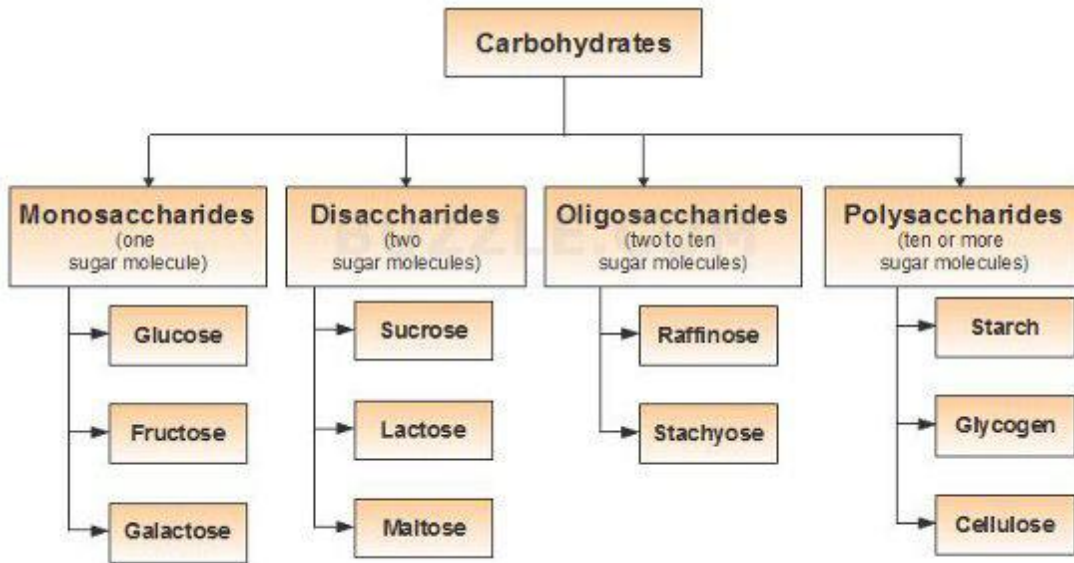
- ✓ Λειτουργούν ως αποθέματα ενέργειας, αποθηκεύουν την ενέργει την οποία μεταβολίζουν ενδιάμεσα.
- ✓ Τα σάκχαρα της ριβόζης και της δεοξυριβόζης αποτελούν τη δομή του RNA και του DNA.
- ✓ Οι πολυσακχαρίτες π.χ. η κυτταρίνη αποτελούν τα δομικά συστατικά των κυτταρικών τοιχωμάτων των βακτηρίων και των φυτών.
- ✓ Οι υδατάνθρακες συνδέονται με πρωτεΐνες και λιπίδια και ως εκ τούτου επιδρούν σημαντικά στις κυτταρικές αλληλεπιδράσεις.
- ✓ Περιέχουν πολλές υδροξυλομάδες.

- ✓ Παρουσιάζουν στεροϊσομερία, έχοντας την ίδια δομική φόρμουλα αλλά διαφέρουν στη χωρική διαμόρφωση.
- ✓ Οπτική Δραστηριότητα, όπου η περιστροφή του επίπεδου πολωμένου φωτός που σχηματίζει (+) γλυκόζη και (-) γλυκόζη.
- ✓ Διαστερεοϊσομερή, όπου διαφοροποιείται η διαμόρφωση σε σχέση με τα C2, C3 ή C4 σε γλυκόζη, π.χ. γαλακτόζη.
- ✓ Ανομερισμός, όπου θεωρείται η χωρική διαμόρφωση σε σχέση με το πρώτο άτομο άνθρακα στις αλδόσες και δεύτερο άτομα άνθρακα στις κετόζες.
- ✓ Αποτελούν την κύρια πηγή ενέργειας, ενώ σε πολλά ζώα είναι η άμεσο πηγή ενέργειας. Η γλυκόζη διασπάται με γλυκόλυση/κύκλο kreb για να αποδοθεί ATP.
- ✓ Η γλυκόζη αποτελεί την πηγή αποθήκευσης ενέργειας, όπου αποθηκεύεται ως γλυκογόνο στα ζώα και ως άμυλο στα φυτά.
- ✓ Οι αποθηκευμένοι υδατάνθρακες λειτουργούν ως πηγή ενέργειας.
- ✓ Είναι το ενδιάμεσο προϊόν στη βιοσύνθεση λιπών και πρωτεϊνών.
- ✓ Συνεισφέρουν στη ρύθμιση του νευρικού ιστού και είναι η πηγή ενέργειας για τον εγκέφαλος.
- ✓ Συνδέονται με λιπίδια και πρωτεΐνες για τον σχηματισμό στην επιφάνεια αντιγόνων, μόρια υποδοχέων, βιταμίνες και αντιβιοτικά.
- ✓ Παράγουν δομικά και προστατευτικά συστατικά, όπως στο κυτταρικό τοίχωμα των φυτών και μικροοργανισμών.
- ✓ Στα ζώα αποτελούν σημαντικό συστατικό των συνδετικών ιστών.
- ✓ Ρυθμίζουν το ανοσοποιητικό σύστημα.

3. 2 Κατηγορίες Σακχάρων

Οι υδατάνθρακες κατηγοριοποιούνται σύμφωνα με τη χημική τους δομή σε τρεις ομάδες: μονο- και δισακχαρίτες μικρού μοριακού βάρους, ολιγосακχαρίτες ενδιάμεσου μοριακού βάρους και μεγάλου μοριακού βάρους πολυσακχαρίτες.

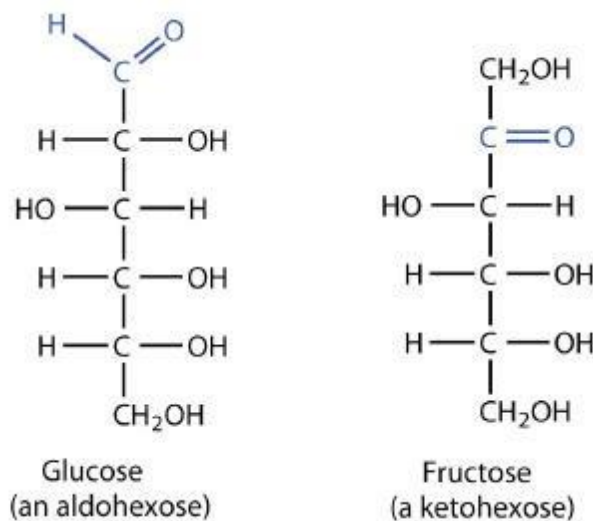
Σε άλλη κατηγοριοποίηση ομαδοποιούνται σε απλούς και σύνθετους υδατάνθρακες. Απλοί υδατάνθρακες χαρακτηρίζονται οι μονοσακχαρίτες και δισακχαρίτες ενώ σύνθετοι αυτοί που εμπεριέχουν πλήθος μονοσακχαριτών όπως άμυλο και φυτικές ίνες.



Εικόνα 3.1. Η ταξινόμηση των σακχάρων (Gibson et al. 2007).

3. 2. 1 Μονοσακχαρίτες

Είναι η πιο απλή μορφή υδατανθράκων, δεν υδρολύονται σε μικρότερα μόρια, όπως φρουκτόζη και γλυκόζη. Περιέχουν τρία έως δέκα άτομα άνθρακα, τουλάχιστον δύο υδροξύλια και μία αλδευδομάδα ή μία κετονό ομάδα. Στην περίπτωση που περιέχουν αλδεΐδη ή κετο ομάδα, ονομάζονται αλδόζες ή κετόζες αντίστοιχα. Για παράδειγμα, ένας μονοσακχαρίτης άνθρακα που έχει ομάδα αλδεΐδης ονομάζεται αλδοπεντόζη, ενώ όταν περιέχει έξι άνθρακες και μια κετο ομάδα ονομάζεται κετοεξόζη.



Εικόνα 3.2. Η δομή της γλυκόζης και της φρουκτόζης (Gibson et al. 2007).

Οι μονοσακχαρίτες είναι άχρωμοι, κρυσταλλικοί, υδατοδιαλυτοί, έχουν γλυκιά γεύση, είναι οπτικά ενεργοί, με μορφή «d» Δεξιοστροφική και μορφή «l» Αριστοστροφική και παρουσιάζουν μεταλλαγή, δηλαδή αλλαγή στην ειδική περιστροφή μιας οπτικά ενεργής ένωσης γνωστή και ως μεταλλαξίωση (+1120, +52,50, +190, α-D-γλυκόζη β-D-γλυκόζη).

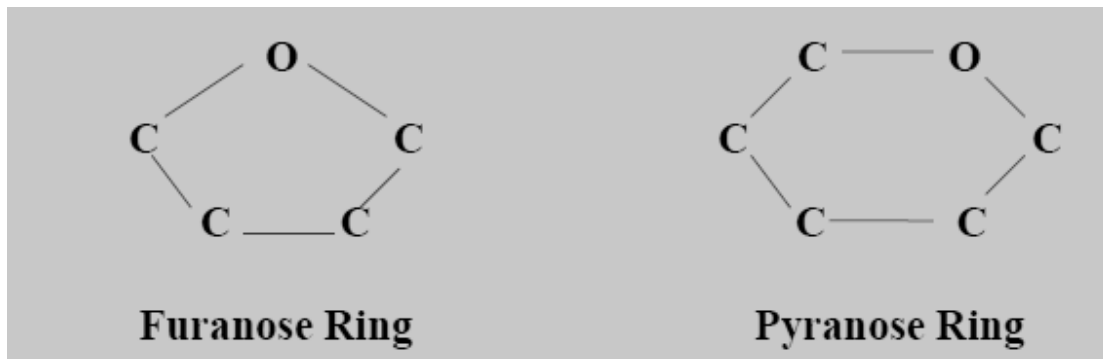
Η Δομή των μονοσακχαριτών είναι ίσιας ή ανοιχτής αλυσίδας όπου είναι διατεταγμένα σε ευθεία γραμμή. Ή αλλιώς δομή ανοιχτής αλυσίδας εξαιτίας των δύο άκρων που δεν συνδέονται. Η δομή της ανοιχτής αλυσίδας είναι δύο τύπων (Σπηλιόπουλος Ι. (2008). Βασική Οργανική Χημεία. Αθήνα: Εκδόσεις Αθ. Σταμούλης):

- ✓ Δομή που προτάθηκε από τους Fittig και Baeyer
- ✓ Δομή που προτείνεται από τον Fischer, γνωστή ως α προβολής Fischer

Η σύνηθες δομή των μονοσακχαριτών είναι κατα Fischer, όπου είτε η αλδεϋδομάδα (CHO) είτε η κετονομάδα (C=O) γράφονται προς τα πάνω, η θέση των OH και H δεν αλλάζει και παραλείπονται οι άνθρακες με εξαίρεση αυτών που συμμετέχουν στην ομάδα CH₂OH.

Ο άλλος τύπος δομής είναι δαχτυλίδι ή κυκλική δομή γνωστή και ως Haworth. Σε αυτή την περίπτωση οι μονοσακχαρίτες οι οποίοι αποτελούνται από πέντε ή έξι άτομα άνθρακα δύναται να έχουν και κυκλική, λόγω της ταυτόχρονης παρουσίας στο μόριο τους αλδεϋδομάδας ή κετονομάδας και υδροξυλίων.

Επιπλέον, οι αλδεΐδες και οι κετόνες αντιδρούν με αλκοόλες σχηματίζοντας ημιακετάλες, όπου σε έναν άνθρακα συνδέονται ταυτόχρονα μία ομάδα OR και ένα υδροξύλιο OH. Συνεπώς, οι μονοσακχαρίτες είναι ταυτόχρονα αλδεΐδες ή κετόνες και αλκοόλες, με αποτέλεσμα να δημιουργείται ημιακετάλη από την ενδομοριακή αντίδραση της αλδεϋδομάδας ή της κετονομάδας με ένα OH, οπότε σχηματίζεται κυκλική δομή. Στην περίπτωση που ο δακτύλιος αποτελείται από 5 μέλη τότε σχηματίζεται Φουρανόζη, ενώ αν αποτελείται από 6 τότε σχηματίζεται η πυρανόζη.



Εικόνα 3.3. Κυκλική δομή της Φουρανόζης και της πυρανόζης (Gibson et al. 2007).

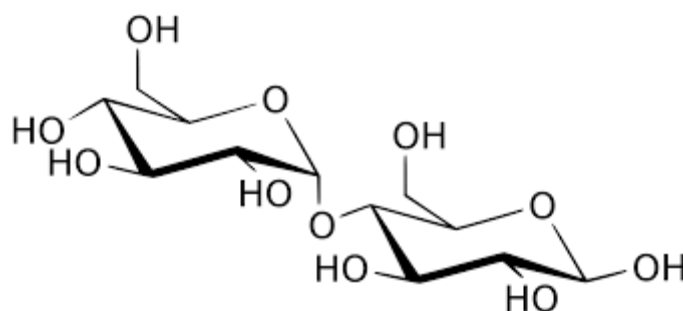
Οι μονοσακχαρίτες παρουσιάζουν τη δυνατότητα να απορροφηθούν απευθείας από το αίμα. (Hounsome et al. 2008). Οι κύριοι υδατάνθρακες είναι η γλυκόζη, η φρουκτόζη και η γαλακτόζη οι οποίοι έχουν την υψηλότερη διατροφική αξία. Η φρουκτόζη, αποτελεί βασικό συστατικό των φρούτων, των χυμών φρούτων κ.λ.π (Gibson et al. 2007).

3. 2. 2 Ολιγοσακχαρίτες

Είναι οι υδατάνθρακες που μπορούν να υδρολυθούν σε ορισμένο αριθμό μορίων μονοσακχαρίτη. Σύμφωνα με τον αριθμό των μονοσακχαριτών κατά την υδρόλυση, χαρακτηρίζονται ως δι-, τρι- ή τετρασακχαρίτες.

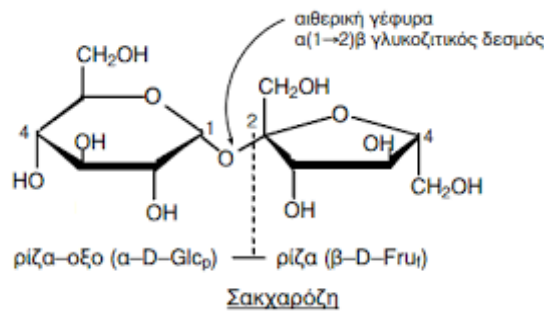
Οι δισακχαρίτες είναι δύο σάκχαρα τα οποία ενώνονται με έναν Ο-γλυκοσιδικό δεσμό. Άλλοι δισακχαρίτες είναι η ισομαλτόζη, η κελλοβιόζη και η τρεαλόζη. Οι δισακχαρίτες μπορούν να ταξινομηθούν σε ομοδισακχαρίτες και ετεροδισακχαρίτες. Αντιπροσωπευτικοί δισακχαρίτες είναι η σακχαρόζη, η λακτόζη και η μαλτόζη.

Η μαλτόζη παράγεται από δύο μόρια D-γλυκόζης με γλυκοζιτικό δεσμό από τη συμπύκνωση του ημιακεταλικού ΟΗ, ενός μορίου α-D-γλυκόζης και του ΟΗ του C4 του δεύτερου μορίου D-γλυκόζης.



Εικόνα 3.4. Δομή Μαλτόζης (Gibson et al. 2007)

Η σακχαρόζη είναι η κοινή ζάχαρη και σχηματίζεται από ένα μόριο α-D-γλυκόζης και ένα μόριο β-D-φρουκτόζης. Ο δεσμός της χαρακτηρίζεται ως α,β-1,2 γλυκοζιτικός δεσμός, λόγω του ότι το ημιακεταλικό OH στη γλυκόζη είχε θέση α και άνηκε στον C1, ενώ το ημιακεταλικό OH της φρουκτόζης είχε θέση β και άνηκε στον C2 (Gibson et al. 2007)

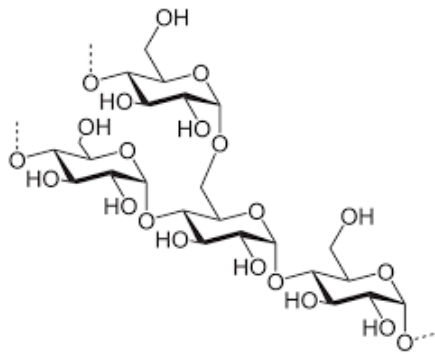


Εικόνα 3 . 5. Δομή Σουκρόζης (Gibson et al. 2007)

3. 2. 3 Πολυσακχαρίτες

Οι πολυσακχαρίτες είναι πολυμερή υδατανθράκων τα οποία αποτελούνται με περισσότερα περισσότερες από 20 μονάδες μονοσακχαριτών και μερικοί έχουν εκατοντάδες ή χιλιάδες μονάδες, για παράδειγμα το άμυλο. Οι πολυσακχαρίτες διακρίνονται σε δύο τύπους με βάση τη λειτουργία και τη σύνθεσή τους. Βάσει της λειτουργίας διακρίνεται σε Αποθηκευτικός πολυσακχαρίτης, το άμυλο και δομικό πολυσακχαρίτης, τη κυτταρίνη.

Το άμυλο χαρακτηρίζεται ως ένα πολυμερές το οποίο εμπεριέχει μονάδες D-γλυκόζης. Δεν διαλύονται στο νερό εξαιτίας του μεγάλου μοριακού βάρους, αλλά δύναται να δημιουργήσουν κολλοειδή εναιωρήματα με νερό μικρής ρευστότητας. Γενικά, το άμυλο συσσωρεύεται στα φυτά και η σύσταση του εμπεριέχει μονάδες γλυκόζης. Θεωρείται ένας ομοπολυσακχαρίτης, ο οποίος αποτελείται από δύο συστατικά την αμυλόζη και την αμυλοπηκτίνη. Η αμυλόζη προσδιορίζεται σε τιμές που κυμαίνονται από 10 έως 30% και αμυλοπηκτίνη από 70 έως 90%. Η δομή της αμυλόζης είναι ευθείας αλυσίδας η οποία παράγεται από 1,4 γλυκοσιδικούς δεσμούς μεταξύ των μορίων α-D-γλυκόζης. Η αλυσίδα της αμυλόζης δημιουργεί μια έλικα, η οποία διαφοροποιεί το μπλε χρώμα όταν αντιδρά με το ιώδιο. Η αμυλόζη είναι σχεδόν αδιαλυτή στο νερό και σχηματίζει μικκυλιακά εναιωρήματα.



Εικόνα 3.6. Δομή του άμυλου (Preedy, 2012).

Η Αμυλοπηκτίνη είναι ένα πολυμερές γλυκόζης με το μεγαλύτερο ποσοστό της να είναι α - (1→4) δεσμοί και κλάδους οι οποίοι δημιουργούνται από α -(1→6) δεσμούς. Η αμυλοπηκτίνη διαφοροποιεί το κόκκινου-ιώδους στην επαφή με το ιώδιο. Αυτή η διαφοροποίηση δεν φαίνεται λόγω της αντίδρασης της αμυλόζης σε ιώδιο (Preedy 2012).

Το γλυκογόνο είναι ένας πολυσακχαρίτης ο οποίος εντοπίζεται σε ζώα.

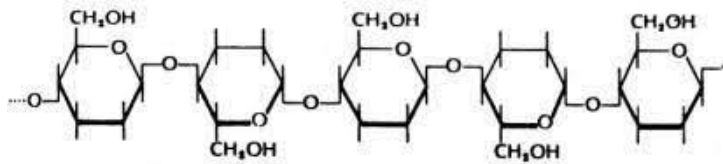
Αποτελεί έως και το 10% της ηπατικής μάζας και το 1-2% της μυϊκής μάζας. Θεωρείται μία αποθηκευμένη ενέργεια για τον οργανισμό και έχει παρόμοια δομή με την αμυλοπηκτίνη. Όπως και η αμυλοπηκτίνη, το γλυκογόνο προσδίδει ένα κόκκινο-ιώδες χρώμα με το ιώδιο.

Η Κυτταρίνη προκύπτει από την ένωση των μορίων της β -γλυκόζης η οποία πραγματοποιείται με συμπύκνωση, δηλαδή με την αφαίρεση νερού, σχηματίζοντας β -(1,4) γλυκοσιδικούς δεσμούς. Τα μόρια της γλυκόζης συνδέονται σε ευθείες αλυσίδες μήκους 100-1000 μονάδων η καθεμία, ενώ σχηματίζονται αδύναμοι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των παράλληλων αλυσίδων που τους συνδέουν μικροϊνίδια κυτταρίνης. Τα μικροϊνίδια κυτταρίνης διατάσσονται σε παχύτερες δέσμες που ονομάζονται μικροϊνίδια, τα οποία αναφέρονται συχνά ως ίνες. Οι ίνες κυτταρίνης συνήθως «κολλούνται» μεταξύ τους από άλλες ενώσεις όπως π.χ ημικυτταρίνες και πηκτικό ασβέστιο για να σχηματίσουν πολύπλοκες δομές όπως τα φυτικά κυτταρικά τοιχώματα. Εξαιτίας των β -δεσμών, η κυτταρίνη έχει διαφορετικό συνολικό σχήμα από την αμυλόζη, με αποτέλεσμα να σχηματίζονται εκτεταμένες ευθείες αλυσίδες που συνδέονται με δεσμό υδρογόνου, με αποτέλεσμα μια πολύ άκαμπτη δομή.

Η κυτταρίνη θεωρείται ένας σημαντικός δομικός πολυσακχαρίτης και είναι ο μοναδικός που βρίσκεται εν αφθονία με οργανική ένωση στη γη. Είναι το υλικό στα τοιχώματα των φυτικών κυττάρων που παρέχει αντοχή και ακαμψία. Το ξύλο είναι 50% κυτταρίνη. Μερικά ζώα, όπως οι αγελάδες, τα πρόβατα και τα άλογα, δύναται να επεξεργαστούν κυτταρίνη μέσω της χρήσης

αποικιών βακτηρίων στο πεπτικό σύστημα που είναι ικανό να διασπάσει την κυτταρίνη σε γλυκόζη. Είναι σημαντική και στον τομέα της βιομηχανίας, από την παρουσία της στο ξύλο, στο χαρτί, στο βαμβάκι, στο σελοφάν, το λινό, την νιτροκυτταρίνη (guncotton), τις φωτογραφικές ταινίες (οξική κυτταρίνη) κ.λπ.

Η κυτταρίνη, που αποτελείται από 8.000 - 12.000 επαναλαμβανόμενα μόρια γλυκόζης έχοντας μοριακό βάρος περίπου 1-2.000.000. Συναντάται στα φυτά και αποτελεί δομικό συστατικό τους. Τα ένζυμα που διασπούν την κυτταρίνη ονομάζονται κυτταρινάσες και είναι διαδεδομένες στους μικροοργανισμούς που αποτελούν την μικροχλωρίδα του στομάχου των μηρυκαστικών και αποτελούν τον λόγο που τα μηρυκαστικά πέμπουν την κυτταρίνη (Σπηλιόπουλος, 2008).



Εικόνα 3.7. Η κυτταρίνη (Σπηλιόπουλος, 2008)

3.3 Ο ρόλος των σακχάρων

Ο κύριος ρόλος των σακχάρων στο σύνολο των ζώντων οργανισμών είναι ότι πραγματοποιούν την παραγωγή ενέργειας μέσω της καύσης των υδατανθράκων με αργό ρυθμό. Κατά την διαδικασία της κυτταρικής αναπνοής υπολογίζεται ότι η ενέργεια που παράγεται από 1g υδατάνθρακα αντιστοιχεί σε 4 Kcal .

Περίπου οι μισές θερμίδες που παράγει ο ανθρώπινος οργανισμός είναι από την καύση των υδατανθράκων με την γλυκόζη να είναι ο κύριος εκπρόσωπος της. Πέρα από πηγή ενέργειας του εγκεφάλου και του νευρικού συστήματος αποτελούν την κύρια ύλη για τη βιοσύνθεση βιομορίων υψίστης βιολογικής σημασίας π.χ. αμινοξέα, νουκλεικά οξέα καθώς και των σακχάρων ριβόζη και δεοξυριβόζη , τα οποία είναι τα δομικά συστατικά του DNA και του RNA. Επιπλέον, σε κανονικά επίπεδα αποτελεί ρυθμιστή των λειτουργιών του οργανισμού, με τη μεταφορά ουσιών, την ρύθμιση της ωσμωτικής πίεσης, στη λειτουργία του παχέος εντέρου με την ενεργοποίηση της αποβολής των κοπράνων. Στην περίπτωση όπου βρίσκονται σε υψηλά επίπεδα στον οργανισμό, τότε αποθηκεύονται ως γλυκογόνο στο κυρίως ήπαρ και στους μυς.

3. 4 Ανάγοντα σάκχαρα

Ως ανάγοντα σάκχαρα χαρακτηρίζονται αυτά που δύναται να οξειδωθούν. Άλλο χαρακτηριστικό είναι στην περίπτωση που είτε ο ανωμερής άνθρακας συνδέεται με υδροξυλομάδα είτε στο ο ανωμερικό άκρο της κυκλικής δομής του σακχάρου βρίσκεται ένα υδροξύλιο απευθείας συνδεδεμένο. Στην κατηγορία των αναγωγικών σακχάρων ανήκει το σύνολο των μονοσακχαριτών και ένα μικρό ποσοστό των ολιγοσακχαριτών. Τους περισσότερους διαδεδομένους μονοσακχαρίτες αποτελούν η γλυκόζη και η φρουκτόζη, ενώ στους ολιγοσακχαρίτες η λακτόζη και η μαλτόζη. Σε αυτές παρατηρείται ότι έχουν ένα μόνο ένα αναγωγικό άκρο, διότι η μεταξύ τους ένωση είναι με γλυκοσιδικό δεσμό, όπου περιλαμβάνουν έναν ανωμερή άνθρακα. Αυτός ο ανωμερής άνθρακας με μία ομάδα αλδεύδης η δομή του μετατρέπεται σε ανοιχτής αλυσίδας (Σπηλιόπουλος 2008).

3. 4. 1 Γλυκόζη

Θεωρείται ο σπουδαιότερος μονοσακχαρίτης, διότι αποτελεί την κύρια πηγή ενέργειας σχεδόν στο σύνολο των οργανισμών μέσω της αναπνοής, και της ζύμωσης. Είναι μια αλδοεξόζη, η οποία περιλαμβάνει έξι άτομα άνθρακα και μια αλδεϋδομάδα και δεν δύναται να υδρολυθεί περαιτέρω. Επιπρόσθετα, εμπεριέχεται και στους δισακχαρίτες, στους ολιγοσακχαρίτες και στους πολυσακχαρίτες π.χ. Παράγεται όπως έχει αναφερθεί παραπάνω μέσω της διαδικασίας της φωτοσύνθεσης όπου το διοξείδιο του άνθρακα και το νερό με την επίδραση της ηλιακής ακτινοβολίας, μετατρέπεται σε γλυκόζη. Στη φύση επικρατεί D-γλυκόζη από τον όρο "δεξιόστροφη γλυκόζη", ενώ η L-γλυκόζη από τον όρο «αριστερόστροφη γλυκόζη» σπανιότερα. Απαντάται τόσο στο γλεύκος του σταφυλιού όσο και της μύρας αποτελώντας το σημαντικότερο σάκχαρο που απαιτεί η μαγιά για τον σχηματισμό της αλκοόλης και του διοξειδίου του άνθρακα (Σουφλερός, 2004).

3. 4. 2 Φρουκτόζη

Η φρουκτόζη είναι ένα άλλο σημαντικό σάκχαρο μετά την γλυκόζη. Προσδιορίζεται σε υψηλά επίπεδα στο μέλι και στο σύνολο των ώριμων φρούτων και σχηματίζεται μέσω της υδρόλυσης

της ζάχαρης και του αμύλου. Η διαδικασία συνήθως επιτελείται ενζυμικά, και ως εκ τούτου παράγονται αμυλοσιρόπια υψηλής περιεκτικότητας σε φρουκτόζη.

Η φρουκτόζη απορροφάται από το ήπαρ με αργό ρυθμό και ομοιόμορφο ρυθμό με αποτέλεσμα να παραμένει διαθέσιμη περισσότερο και μετά την απορροφήσή της ακολουθεί η παραγωγή ενέργειας στον οργανισμό.

3. 4. 3 Μαλτόζη

Είναι ένας ολιγοσακχαρίτης που περιέχει δυο μόρια γλυκόζης ενωμένα με έναν α(1→4) γλυκοζιτικό δεσμό. Στην περίπτωση της προσθήκης ενός επιπλέον δακτυλίου γλυκόζης παράγεται η μαλτοτριόζη. Στην προσθήκη επιπλέον μορίων γλυκόζης σχηματίζονται οι δεξτρίνες οι οποίες ανήκουν στα πρόσθετα των τροφίμων.

Κατά την πέψη αμυλούχων τροφών, διασπάται από τη μαλτάση σε δύο μόρια γλυκόζης. Έχει προσδιοριστεί σε υψηλά επίπεδα σε βλαστημένους καρπούς δημητριακών, όπου το άμυλο διασπάται. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, η μαλτόζη από το γλεύκος μεταφέρεται στα κύτταρα του ζυμομύκητα και διασπάται στα συστατικά αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα.

3.5 Μη αναγωγικά σάκχαρα

Το πιο γνωστό μη αναγωγικό σάκχαρο είναι η σακχαρόζη. Χαρακτηρίζεται ως ένας δισακχαρίτης μη αναγωγικός, ο οποίος περιέχει ένα μόριο γλυκόζης και ένα φρουκτόζης. Σχηματίζεται κατά τη διαδικασία της φωτοσύνθεσης της φυλλικής επιφάνειας των φυτών και στα σταφύλια έχει υπολογιστεί ότι κυμαίνεται από 2 μέχρι 5 γραμμάρια στο λίτρο. Δεν είναι ζυμώσιμη, όμως κατά την αλκοολική ζύμωση, υδρολύεται, με τη βοήθεια του ενζύμου ιμπερτάση, σε D-γλυκόζη και D-φρουκτόζη, οπότε δεν εντοπίζεται στους οίνους σακχαρόζη σε ποσότητες ικανές να προσδιοριστούν παρά μόνο αν έχει προστεθεί μεταγενέστερα οπότε και αποτελεί νοθεία.

Στο σταφύλι, εκτός από τη σακχαρόζη, περιέχονται επίσης και άλλα δύο μη αναγωγικά και μη ζυμώσιμα σάκχαρα που είναι η σταχυόζη, η οποία φέρει δύο μόρια γαλακτόζης και ένα σακχαρόζης, η ραφινόζη, με ένα μόριο γαλακτόζης και ένα μόριο σακχαρόζης, η επτόζη και η οκτόζη, που φέρουν 7 και 8 άνθρακες αντίστοιχα, η μελιβιόζη, με ένα μόριο γλυκόζης και ένα γαλακτόζης, η λακτόζη με ένα μόριο γλυκόζης και ένα μόριο γαλακτόζης και η μαλτόζη με ένα

μόριο γλυκόζης και ένα μόριο γαλακτόζης. Η περιεκτικότητά τους στους οίνους αναφέρεται σε ίχνη και η συνήθη χρήση τους είναι για την ταυτοποίηση και ταξινόμηση ορισμένων ζυμών (Σουφλερός, 2004).

3.6 Ιδιότητες των αναγωγικών σακχάρων

Οι ιδιότητες των αναγωγικών σακχάρων είναι οι ακόλουθες (Σουφλερός, 2004):

- ✓ Ανάγουν το φελίγγειο υγρό, οπότε χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό αλδευδών και κετονών ομάδων.
- ✓ Είναι βιολογικά ασταθή και σχηματίζουν γαλακτικό οξύ με αποτέλεσμα τη διακοπή της αλκοολικής ζύμωσης.
- ✓ Δεσμεύουν το θειώδη ανυδρίτηλόγω των αλδευδικών και κετονικών ομάδων χάνοντας τις αντισηπτικές του ιδιότητες.
- ✓ Αντιδρούν με φαινυλδραζίνη με αποτέλεσμα να σχηματίζονται ουσίες που παρουσιάζουν συγκεκριμένα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά.
- ✓ Συμμετέχουν σε αντιδράσεις μεθυλίωσης και ακετυλίωσης με αποτέλεσμα τον σχηματισμό πτητικών ενώσεων.

3.7 Τα σάκχαρα στα γλεύκη

Από τις αλδόζες που συμμετέχουν στη διαδικασία της οινοποίησης, η D-γλυκόζη έχει προσδιοριστεί σε συγκεντρώσεις πολλών γραμμαρίων ανά λίτρο στα γλεύκη καθώς και η D-γαλακτόζη η οποία έχει προσδιοριστεί στα 100 mg/L σε κρασί παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον.

Στην περίπτωση της C₆-κετόζης, η φρουκτόζη είναι το μόνο σάκχαρο που θεωρείται απαραίτητο. Μαζί με τη γλυκόζη, η οποία είναι πιο σημαντική εξόζη βρίσκεται στα σταφύλια. Οι συγκεντρώσεις της πεντόζης στον μούστο και στο κρασί κυμαίνονται μεταξύ 0,3 και 2 g/L. Τα κύρια σάκχαρα αυτής της ομάδας είναι η D-ξυλόζη και η L-αραβινόζη, των οποίων οι συγκεντρώσεις εντοπίζονται σε αρκετές εκατοντάδες χιλιοστόγραμμα ανά λίτρο. Αντίθετα η D-ριβόζη και L-ραμνόζη οι οποίες είναι μεθυλοπεντόζες δεν υπερβαίνουν τα επίπεδα των 100 mg/L. Η γλυκόζη, η φρουκτόζη και η μαννόζη, που ανήκουν όλα στη σειρά D, είναι τα πιο

απλές εξόζες και εύκολα δύναται να τροποποιηθούν εξαιτίας του keto-enol ταυτομερισμούς τους. Όπως είναι γνωστό η γλυκόζη που βρίσκεται στα σταφύλια είναι δεξιόστροφική, οπότε αναφέρεται και ως δεξτρόζη. Ομοίως, η φρουκτόζη, η οποία είναι αριστερόστροφη, είναι γνωστή και με το όνομα λεβουλόζη.

Η σύνθεση των κυτταρικών τοιχωμάτων στον πολτό και στη φλούδα των σταφυλιών δεν έχει μελετηθεί ευρέως, παρότι σε γενικές γραμμές, η ποιοτική τους σύνθεση είναι παρόμοια με αυτή άλλων φυτών. Συνεπώς, βεβαιώνεται ότι τα κύτταρα του πολτού και της σάρκας προστατεύονται από πρωτεύοντα τοιχώματα, τα οποία είναι χαρακτηριστικό στους νεαρούς αναπτυσσόμενους ιστούς και ότι πάνω από το 90% αυτής της δομής του τοιχώματος είναι που σχηματίζεται από δομικούς πολυσακχαρίτες, οι σημαντικότεροι από τους οποίους είναι (Enological Chemistry., 2012):

- ✓ Κυτταρίνη: είναι ένα πολυμερές b-(1/4)-D-γλυκόζης που σχηματίζει ινίδια.
- ✓ Ημικυτταρίνες, ξυλογλυκάνες και αραβινοξυλάνες: σχηματίζουν ένα κάλυμμα στα ινίδια και στη γαλακτομαννάνη
- ✓ Πηκτίνες: είναι οι πιο πολύπλοκοι πολυσακχαρίτες που βρίσκονται στα πρωτεύοντα τοιχώματα όλων των φυτών. Τα τρία κύρια συστατικά που έχουν είναι η ομογαλακτουρονάνη και η ραμνογαλακτουρονάνη I και II. Σε μικρότερες ποσότητες βρίσκονται τα συστατικά ιδιαίτερου ενδιαφέροντος που είναι οι ξυλογαλακτουρονάνες και απιογαλακτουρονάνες.
- ✓ Δομικές γλυκοπρωτεΐνες: είναι πλούσιες σε αμινοξύ υδροξυπρολίνη .
- ✓ Άλλα συστατικά ειδικά για κάθε φυτό.

Η λιγνίνωση είναι μια βασική διαδικασία για τη μετατροπή των πρωτογενών τοιχωμάτων σε δευτερεύοντες. Όταν ξεκινήσει η διαδικασία, η ανάπτυξη των ιστών σταματά, με αποτέλεσμα την πάχυνση των κυτταρικών τοιχωμάτων λόγω της συσσώρευσης λιγνίνης και πολυσακχαριτών όπου τελικά οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο.

Οι πηκτικοί πολυσακχαρίτες στα τοιχώματα εστεροποιούνται από φαινολικά οξέα, φερουλικά οξέα ή π-κουμαρικά οξέα, προσθέτοντας περαιτέρω αντοχή στη δομή. Τα κυτταρικά τοιχώματα του φλοιού του σταφυλιού είναι πολύ παχύτερα από αυτά του πολτού, γεγονός που καθιστά πιο δύσκολο τα συστατικά να απελευθερωθούν. Παρόλα αυτά σχετικά σημαντική πηγή πολυσακχαριτών, που εξηγεί γιατί οι οίνοι που έχουν υποστεί ζύμωση σε σάρκα σταφυλιών έχουν πλουσιότερη περιεκτικότητα σε πολυσακχαρίτες. Η περιεκτικότητα σε πολυσακχαρίτες

των κυτταρικών τοιχωμάτων του φλοιών του κόκκινου και του λευκού σταφυλιού είναι σχεδόν ίδια, με μόνη διαφορά την παρουσία ανθοκυανινών στη σάρκα των κόκκινων σταφυλιών .

Οι γλυκοσίδες που ενδιαφέρουν την οινοποίηση είναι αυτοί που σχηματίζονται από ορισμένα σάκχαρα και φαινολικά ή τερπενικές ενώσεις και κυρίως τις μονοτερπενικές αλκοόλες . Θεωρείται σημαντικό να υπάρχει γνώση αν οι ενώσεις έχουν δεσμούς α ή β προκειμένου να γίνει η σωστή επιλογή ενζύμων για να καταλύσουν την υδρόλυση και να απελευθερώσουν τις αγλυκόνες που ενδιαφέρουν.

3. 8 Σάκχαρα ζυθογλεύκου

Τα σάκχαρα αποτελούν το 90 % του εκχυλίσματος του ζυθογλεύκου, όπου το 64-77% αυτών πραγματοποιεί ζύμωση με μαγιά. Η σύσταση του επηρεάζεται από την πολυτοποίηση και τις συνθήκες αυτής. Τα κυριότερα σάκχαρα είναι οι δεξτρίνες οι οποίες παράγονται από γλυκόζη, η οποία παρατηρείται και στο d-γλυκοκυρανοσυλίου που συνδέονται με (1,4) δεσμούς ή (1,6) δεσμούς δεξτρινών. Η μαλτόζη και η μαλτοτριόζη είναι οι κύρια σάκχαρα στο ζυθοποιείο . Άλλα σάκχαρα που εντοπίζονται, ανιχνεύονται σε πολύ μικρές ποσότητες, όπως παρατηρείται και στον Πίνακας 3.1. Η συγκέντρωση της μαλτόζης είναι 50 έως 60% του ζυμώσιμου σακχάρου στο ζυθογλεύκος (Briggs et al., 2004).

Πίνακας 3. 1 .Κύρια και δευτερεύοντα σάκχαρα ζυθογλεύκου (Briggs et al., 2004).

Κύρια σάκχαρα στο ζυθογλεύκος	Περιεχόμενο (g/l)	Δευτερεύοντα σάκχαρα στο ζυθογλεύκος	Περιεχόμενο (mg/l)
Φρουκτόζη γλυκόζη	9–12	Ξιλόζη	15
Μαλτόζη	56–59	Αραβινόζη Ριβόζη	14
Σακχαρόζη	4–5	ισομαλτόζης	
Μαλτοτριόζη	14–17	Panose	Ίχνη
Maltotetraose	6–7	ισοπανόζης	Ίχνη
Δεξτρίνες γλυκάνες	22–26	Nigerose	Ίχνη
πεντοζάνες		Μαλτουλόζης	Ίχνη

Η ζυμωσιμότητα του ζυθογλεύκου καθορίζεται από την αξιολόγηση των «ζυμώσιμων σακχάρων» και των «δεξτρινών» με τα αποτελέσματα να δείχνουν ότι ένα ποσοστό των ζυμώσιμων υδατανθράκων εντοπίζεται στο σύνολο των υδατανθράκων. Οι υδατάνθρακες διαφοροποιούνται κατά τον βρασμό όπου εμπεριέχει αντιδράσεις αμαύρωσης, οι οποίες πραγματοποιούνται στα αναγωγικά σάκχαρα και στις πρωτογενείς αμίνες. Συνήθως περιλαμβάνουν αντιδράσεις συμπύκνωσης μεταξύ απλών σακχάρων, όπως γλυκόζη με πρωτοταγείς αμίνες όπου σχηματίζονται οι αλδοσιλαμίνες. Αυτές οι ασταθείς ενώσεις μπορούν να υποστούν αναδιάταξη Amadori οπότε σχηματίζονται οι κετοζαμίνες, οι οποίες ακολούθως συμπυκνώνονται με ένα άλλο μόριο αλδόζης και σχηματίζουν δικετοζαμίνες και δύναται να υποστούν περαιτέρω αντιδράσεις συμπύκνωσης με πρόσθετες αμίνες (Hughes and Baxter , 2001).

Τα στελέχη της ζύμης στη ζυθοποιία (στελέχη ale και lager) χρησιμοποιούν με τη σειρά σακχαρόζη, γλυκόζη, φρουκτόζη, μαλτόζη και μαλτοτριόζη, ενώ τα υψηλότερα ολιγομερή παραμένουν αδιάλυτα. Άρα η μύρας εμπεριέχει ζυμώσιμα σάκχαρα και μία μη σταθερή συγκέντρωση ανώτερων δεξτρινών (Castellari et al., 2001). Επιπλέον, άλλα σάκχαρα που εντοπίζονται στην μύρα συμπεριλαμβανομένων των μονοσακχαριτών D-ριβόζης, L-αραβινόζης, D-ξυλόζης, D-μαννόζης και D-γαλακτόζης και -γλυκοβιόζης και οι τρισακχαρίτες πανόζης (Bamforth, 2005). Στον πίνακα 3.2 παρουσιάζονται τα είδη στην μύρα. Οι υδατανθράκες που εντοπίζονται στην μύρα δύναται να εκτιμηθούν φασματοφωτομετρικά και παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.3 .

Πίνακας 3. 2. Είδη σακχάρων στην μύρα (Castellari et al., 2001).

Μονοσακχαρίτες	Δισακχαρίτες	Τρισακχαρίτες	Ολιγοσακχαρίτες
L-Arabinose	Cellobiose	Maltotriose	4—Isomaltosyl D-maltose
Φρουκτόζη	Ισομαλτόζη	Ισοπανόζη	Μαλτοτετραόζη
Γλυκόζη	Μαλτόζη	Πανόζη	Μαλτοπεντόζη
D-Γαλακτόζη	Σακχαρόζη	Ξυλοτριόζη	Μαλτοεξόζη
D-Manose	Kojibiose	Cellotriose	Maltoheptose
Pentose	Xylobiose	Raffi μύτη	Malto-octose
D-Ribose	Trehalose	Gentianose	Maltononanose
D-Xylose	Melibiose	Isokestose	Stachyose
	Turanose	Kestose	

	Μαλτουλόζη	Μελιζιτόζη	
--	------------	------------	--

Πίνακας 3. 3. Περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες της μύρας (g/l) (Castellari et al., 2001).

Τύπος μύρας	Σύνολο	Σάκχαρα(συμπεριλαμβανομένων μαλτοτριόζη)	Δεξτρίνες
Οι μέσες τιμές της μύρας είναι	2,8–61	1,3–22	7–39
Pilsenerb	30	3,65	24
Lagers γ	10–30	1–7	10–20
Ales και stouts	15–60	5–10	10–40
Ασταρωμένες μύρες	20–70	13–36	10–40
Μύρες “Lite”	2–9	1–6	1–3

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ ΣΑΚΧΑΡΩΝ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΟΥΣ

4.1 Γενικά

Τα τελευταία χρόνια έχει αναπτυχθεί ένας μεγάλο εύρος αναλυτικών τεχνικών για τη μέτρηση της συγκέντρωσης των υδατανθράκων. Το ποσοστό των σακχάρων μπορεί να υπολογιστεί μέσω του προσδιορισμού του ποσοστού που απομένει μετά τον υπολογισμό όλων των συστατικών, σύμφωνα με τον ακόλουθο τύπο:

$$\% \text{υδατάνθρακες} = 100 - \% \text{υγρασίας} - \% \text{πρωτεϊνών} - \% \text{λιπιδίων} - \% \text{ιόντων}$$

Αυτός ο τρόπος μπορεί να δώσει λάθος αποτελέσματα λόγω των σφαλμάτων των μεθόδων. Επομένως, πραγματοποιείται η απευθείας μέτρηση της περιεκτικότητας σε υδατάνθρακες για ακριβείς μετρήσεις.

4.2 Η προετοιμασία των δειγμάτων

Η ποσότητα που απαιτείται για την προετοιμασία ενός δείγματος με σκοπό την μέτρηση και των προσδιορισμό των υδατανθράκων εξαρτάται από τη φύση του τροφίμου που αναλύεται. Τα υδατικά διαλύματα, όπως οι χυμοί φρούτων, ο οίνος και η μύρα δεν πραγματοποιείται προετοιμασία των δειγμάτων προτού μετρηθούν. Η ακριβής μέθοδος απομόνωσης υδατανθράκων εξαρτάται από τον τύπο του υδατάνθρακα και τον σκοπό που πρόκειται να αναλυθεί, όμως υπάρχουν ορισμένες διαδικασίες οι οποίες είναι κοινές. Για παράδειγμα, οι μονοσακχαρίτες και οι ολιγοσακχαρίτες είναι διαλυτοί σε αλκοολούχα διαλύματα, ενώ οι πρωτεΐνες και οι πολυσακχαρίτες είναι αδιάλυτες. Συνεπώς, τα διαλυτά συστατικά διαχωρίζονται από τα αδιάλυτα μέσω της διήθησης του διαλύματος και συλλογή τόσο του διηθήματος, όσο και του υλικού που συγκρατείται στο φίλτρο. Επιπλέον, στους μονοσακχαρίτες και ολιγοσακχαρίτες δύναται να παρατηρηθούν άλλα μικρά μόρια στο αλκοολούχο εκχύλισμα, τα οποία είναι δυνατόν να επηρεάσουν την ανάλυση που πρόκειται να πραγματοποιηθεί π.χ. αμινοξέα. Συνήθως αυτά τα συστατικά απομακρύνονται πριν από τη διεξαγωγή της (Kamada et al. 2002).

ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ ΣΑΚΧΑΡΩΝ

4. 2. 1 Εκχύλιση και κλασματοποίηση

Ο διαχωρισμός των υδατανθράκων επιτυγχάνεται μέσω της εκχύλισης ή του καθαρισμού προτού μετρηθούν. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις το δείγμα που λαμβάνεται δεν δύναται να αναλυθεί οπότε είναι αναγκαίο το στάδιο της κλασματοποίησης για τη λήψη ενός συγκεκριμένου κλάσματος υδατανθράκων. Παρακάτω περιγράφονται οι μέθοδοι που πρόκειται να εφαρμοστούν για την εκχύλιση και την κλασματοποίηση των σακχάρων.

4. 2. 2. Διήθηση

Η απλή διήθηση και η αραίωση είναι οι ενδεδειγμένες για την προετοιμασία του δείγματος. Αυτό συμβαίνει στους οίνους και στην μύρα. Ακόμη και η υπερδιήθηση και η διήθηση που εφαρμόζουν μεμβράνες τις χρησιμοποιούν για τον προσδιορισμό των υδατανθράκων. Στην περίπτωση όμως που η αρχική ύλη είναι πολύπλοκη ή οι κατηγορίες υδατανθράκων είναι πολύ διαφορετικές, τότε είναι αναγκαία η προετοιμασία του δείγματος (Megherbi at al. 2008).

4. 2. 3 Παραδοσιακές μέθοδοι εκχύλισης (LLE, SPE).

Οι κλασικές τεχνικές εκχύλισης, όπως η υγρή-υγρή εκχύλιση (LLE) και η εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση των υδατανθράκων από το αρχικό υλικό. Το SPE χρησιμοποιείται ευρέως για την εξαγωγή υδατανθράκων από κρασί (Castellari et al. 2000), μύρα (Lehtonen at al. 1994) καθώς και άλλων προϊόντων όπως μέλι. Τα φίλτρα C₁₈ χρησιμοποιούνται ευρέως, καθώς και το C₈ που έχει ενεργό άνθρακα ή ακόμα και φίλτρα που στηρίζονται σε ισχυρή κατιόν-ανταλλαγή (Kitahara at al. 2004).

4. 2. 4 Υπερκρίσιμη εκχύλιση (SFE)

Το SFE βασίζεται στη χρήση υγρών πάνω από την κρίσιμη τιμή της πίεσης και της θερμοκρασία τους. Όταν επικρατούν συγκεκριμένες συνθήκες τα υπερκρίσιμα ρευστά παρουσιάζουν ιδιότητες μεταξύ υγρών και αέριων. Το CO₂ είναι το συχνότερο χρησιμοποιούμενο υγρό, χάρη

στη μέτρια κρίσιμη θερμοκρασία και πίεση που παρουσιάζει, στην ευκολία για τροποποίηση της επιλεκτικότητας της εξαγωγής ρυθμίζοντας την πίεση λειτουργίας, τη δυνατότητα να ληφθεί κλάσμα εαπο διαφορετικά στάδια αποσυμπίεσης και την επίτευξη ενός εκχυλίσματος χωρίς διαλύτη, διότι το CO₂ απελευθερώνεται ως αέριο όταν η πίεση μειώνεται σε συνθήκες περιβάλλοντος. Ωστόσο, δεν χρησιμοποιείται στην ανάλυση υδατανθράκων λόγω της μικρής πολικότητας, με αποτέλεσμα να καθίσταται δύσκολη η διαλυτοποίηση αυτών των ενώσεων (Montañés et al. 2006).

Το SFE έχει εφαρμοστεί σε περιπτώσεις που αφορούν την κλασματοποίηση διαφορετικών υδατανθράκων τα οποία δύναται να χρησιμοποιηθούν στη βιομηχανία τροφίμων (Montañés et al. 2006).

4. 2. 5 Εκχύλιση υγρού υπό πίεση (PLE)

Αυτή η μέθοδος στηρίζεται στη χρήση διαλυτών σε υψηλές θερμοκρασίες και πιέσεις με στόχο να παραμείνουν στην υγρή τους κατάσταση κατά την εκχύλιση. Πλεονεκτήματα είναι ότι οι διαδικασίες εκχύλισης είναι γρηγορότερες, παρουσιάζουν υψηλότερες αποδόσεις και καταναλώνουν λιγότερες ποσότητες διαλυτών σε σύγκριση με τις κλασικές τεχνικές εκχύλισης. Λόγω των παραπάνω η PLE εφαρμόζεται σε μεγάλη κλίμακα για την εξαγωγή συστατικών δειγμάτων από τρόφιμα και φυσικά προϊόντα (Mendiola et al. 2007).

4. 2. 6 Κλασματοποίηση ροής πεδίου (FFF).

Αυτή η τεχνική βασίζεται στον διαχωρισμό των συστατικών του δείγματος που αντλούνται από ένα υλικό που έχει στρωτή ροή μέσα σε ένα ανοιχτό κανάλι στο οποίο εφαρμόζεται ένα ηλεκτρικό ή θερμικό ή μαγνητικό ή βαρυτικό πεδίο. Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται με τις διαφορές στην κινητικότητα των συστατικών. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται συχνά για την κλασματοποίηση μεγάλων πολυσακχαριτών οι οποίοι δεν μπορούσα να κλασματοθούν διαφορετικά όπως για παράδειγμα η κυτταρίνη και το άμυλο.

4. 2. 7 Μέθοδοι που βασίζονται στη χρωματογραφία.

Έχουν εφαρμοστεί πλήθος τεχνικών οι οποίες πραγματοποιούνται σύμφωνα με την εφαρμογή χρωματογραφικών διαδικασιών έχοντας ως στόχο την κλασματοποίηση και τον διαχωρισμό των υδατανθράκων. Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους (SEC) θεωρείται οι περισσότερο εφαρμοζόμενη τεχνική με στόχο τον προσδιορισμό των κατανομών της μοριακής μάζας σχετικά μεγάλων υδατάνθρακες. Λόγω αυτών των χαρακτηριστικών, χρησιμοποιείται για την κλασματοποίηση και τον διαχωρισμό ολιγο- και πολυσακχαριτών στο ρύζι (Ward et al. 2006) και στο σιτάρι ((Hernandez et al. 2009).

Μια άλλη τεχνική που βασίζεται στη χρωματογραφία και εφαρμόζεται ευρέως σε υδατάνθρακες είναι το Ιοντο-Χρωματογραφία ανταλλαγής (IEC). Η IEC χρησιμοποιείται σε ολιγο- και μονοσακχαρίτες. (Geisser at al. 2005).

4. 2. 8 Μεμβράνες και άλλες τεχνικές

Η χρήση μεμβρανών είναι αρκετά παλιά μέθοδος για την προετοιμασία δειγμάτων με σκοπό τον προσδιορισμό των υδατανθράκων. (Godshall et al. 2001).

Άλλη μέθοδος είναι η κλασματοποίηση άνθρακα. Αυτή η τεχνική εφαρμόζεται πολλά χρόνια, όπου πραγματοποιείται η προσρόφηση υδατανθράκων σε στήλη ενεργού άνθρακα και ακολουθή έκλουση με διαφορετικές αναλογίες αιθανόλης, δηλαδή 1% για μονοσακχαρίτες, 5% για δισακχαρίτες και 50% για ολιγοσακχαρίτες σύμφωνα με βαθμό πολυμερισμού τους. Η κλασματοποίηση με ενεργό άνθρακα θεωρείται ιδιαίτερα χρήσιμη για τη λήψη μονοσακχαριτών από πολύ σύνθετα δείγματα. Γίνεται να εφαρμοστεί συνδυαστικά με άλλη προετοιμασία δειγμάτων διεργασίες ή βήματα κλασματοποίησης. Παράδειγμα η PLE χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό των υδατανθράκων (Ruiz-Matute et al. 2008).

Άλλες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στην παρασκευή δείγματος υδατανθράκων περιλαμβάνουν τη χρήση μοριακών αποτυπωμένα πολυμερή (MIPs). Θεωρούνται χρήσιμα για την αναγνώριση διαφορετικών σακχαριτών (Morales et al. 2006) .

ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΣΑΚΧΑΡΩΝ

Ογκομετρικές Μέθοδοι

4.3 Μέθοδος Lane-Eynon

Η μέθοδος αυτή ανήκει στις ογκομετρικές μεθόδους, όπου πραγματοποιείται ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των αναγωγικών σακχάρων σε ένα δείγμα. Απαιτείται μία προχοΐδα για την τοποθέτηση του δείγματος σε μια ογκομετρική φιάλη στην οποία υπάρχει γνωστή ποσότητα θειικού χαλκού καθώς και δείκτη κυανού του μεθυλενίου. Τα αναγωγικά σάκχαρα στο διάλυμα αντιδρούν με το θειικό χαλκό. Όταν ολοκληρωθεί η αντίδραση όλου του θειικού χαλκού στο διάλυμα, οποιαδήποτε επιπλέον προσθήκη αναγωγικών σακχάρων επιφέρει την αλλαγή του χρώματος του δείκτη από μπλε σε λευκό. Έπειτα αναγράφεται ο όγκος του διαλύματος που απαιτείται για την εξουδετέρωση. Η αντίδραση δεν θεωρείται στοιχειομετρική, οπότε πρέπει να σχηματιστεί μια καμπύλη βαθμονόμηση μέσα από μια σειρά διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης υδατανθράκων (Hartmann et al. 2005).

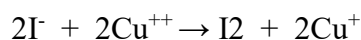
Τα μειονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι (Hartmann et al. 2005):

- τα αποτελέσματα επηρεάζονται από τους χρόνους αντίδρασης, τη θερμοκρασία και τις συγκεντρώσεις του αντιδραστηρίου που εφαρμόζεται.
- Δεν μπορούν να εντοπιστούν άλλοι τύπων αναγωγικών σακχάρων.
- Είναι αδύνατη η μέτρηση της άμεσης συγκέντρωσης των μη αναγωγικών σακχάρων.
- Δύναται να επηρεαστεί από άλλους τύπους μορίων οι οποίοι δρουν ως αναγωγικοί παράγοντες.

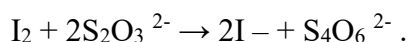
4.4 Μέθοδος Luff - Schrool

Η μέθοδος αυτή όπως και η Lane-Eynon προσδιορίζει την περιεκτικότητα των αναγόντων σακχάρων σε αλκαλικό διάλυμα θειικού χαλκού και βασίζεται στην αναγωγή των ιόντων χαλκού (II) από τα σάκχαρα και την ογκομέτρηση με θειοθειικό νάτριο. Πραγματοποιείται η αντίδραση με γνωστή περιεκτικότητα αλκαλικού διαλύματος χαλκού. Τα ιόντα Cu^{++} που ήταν

σε περίσσεια προσδιορίζονται ιωδομετρικά. Η μετατροπή των ιόντων Cu^{+} πραγματοποιείται με προσθήκη ΚΙ όπου σε όξινο περιβάλλον σχηματίζεται I_2 σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση (Ibañez, E., Cifuentes, A. 2003):



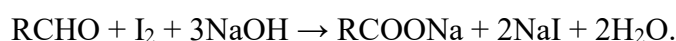
Το I_2 που σχηματίζεται προσδιορίζεται με τιτλοδοτημένο διάλυμα θειοθειϊκού νατρίου όπως φαίνεται στην ακόλουθη αντίδραση:



Το άμυλο με το I_2 σχηματίζει σύμπλοκο κυανού χρώματος το οποίο όταν αποχρωματιστεί σημαίνει ότι η αντίδραση ολοκληρώθηκε. Η προσθήκη του δείκτη πραγματοποιείται όταν το μεγαλύτερο ποσοστό του I_2 έχει αναχθεί για να είναι πιο σαφής η αλλαγή του χρώματος (Ibañez and Cifuentes, 2003).

4. 5 Μέθοδος Kolthoff

Η μέθοδος αυτή προσδιορίζει τις αλδόζες όπου σύμφωνα με την διαδικασία διάλυμα σακχάρων κατεργάζεται με περίσσεια διαλύματος ιωδίου σε αλκαλικό περιβάλλον και ακολουθεί η οξίνιση με υδροχλώριο ή θειικό οξύ. Το I_2 που περισσεύει ογκομετρείται με θειοθειϊκό νάτριο, όπως φαίνεται στην παρακάτω αντίδραση:



Οι αλδόζες οξειδώνονται και σχηματίζουν αλδονικά οξέα, ενώ οι κετόζες δεν οξειδώνονται . Συνεπώς, δύναται να προσδιοριστούν οι αλδοζες με παρουσία των κετοζών. Τα μη ανάγοντα σάκχαρα, προσδιορίζονται από την διαφορά που προκύπτει από το σακχαρούχο διάλυμα στην αναγωγική ικανότητα πριν και μετά την υδρόλυση των σακχάρων (Ibañez and Cifuentes, 2003).

4. 7 Μέθοδος του ιωσπιτούτου του Βερολίνου

Με τη μέθοδο αυτή προσδιορίζονται τα αναγόντα σάκχαρα, τα οποία εκφράζονται σε ιμπερτοσάκχαρο στην ημίλευκη ζάχαρη. Βασίζεται στην αναγωγή ενός διαλύματος χαλκού με ένα διάλυμα αναγόντων σακχάρων. Το οξείδιο του χαλκού οξειδώνεται με διάλυμα ιωδίου

όπου η περίσσεια του μετράται με επανογκομέτρηση τιτλοδοτημένου διαλύματος θειοθειικού νατρίου. Για την εφαρμογή της μεθόδου είναι αναγκαία τα διαλύματα χαλκού και οξικού οξέος (Murphy, and Johnson, 2003).

4. 8 Μέθοδος τών Knight και Allen

Η μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε ιμβερτοσάκχαροτης ζάχαρης ή της λευκής ζάχαρης της υπέρλευκης ζάχαρης. Αντιδραστήριο που περιέχει χαλκό (II) προστίθεται σε περίσσεια στο διάλυμα για ανάλυση οπότε πραγματοποιείται η αναγωγή του χαλκού. Η ποσότητα που δεν ανάγεται πανογκομετρείται με την βοήθεια διαλύματος EDTA (Hartmann et al. 2005).

Βαρυμετρικές Μέθοδοι

4. 9 Μέθοδος Munson και Walker

Η μέθοδος αυτή ανήκει στις βαρυμετρικές μεθόδους όπου πραγματοποιούν τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των αναγωγικών σακχάρων. Χαρακτηρίζεται ως αναγωγική μέθοδος, διότι και εδώ χρησιμοποιείται διάλυμα Fehling, με σκοπό την οξειδωση των σακχάρων και παράλληλα την αναγωγή του χαλκού σε δισθενή ιόντα χαλκού Cu^{2+} . Το ίζημα του Cu_2O που σχηματίζεται πρώτα θα πλυθεί με νερό, έπειτα με αλκοόλη και τέλος με αιθέρα. Έπειτα ξηραίνεται και ζυγίζεται με τον τελικός προσδιορισμό των σακχάρων να πραγματοποιείται μέσω του πίνακα των Munson και Walker βάση του βάρους σε χιλιοστόγραμμα (mg) (Murphy, and Johnson, 2003).

Χρωματομετρικές Μέθοδοι

4. 10 Μέθοδος Anthrone

Η μέθοδος αυτή ανήκει στις χρωματομετρικές μεθόδους προσδιορισμού της συγκέντρωσης των ολικών σακχάρων σε ένα δείγμα. Τα σάκχαρα αντιδρούν με το αντιδραστήριο anthrone υπό όξινες συνθήκες δίνοντας ένα μπλε-πράσινο χρώμα . Το δείγμα αναμιγνύεται με θειικό οξύ και το αντιδραστήριο. Στη συνέχεια ακολουθεί ο βρασμός ώσπου να πραγματοποιηθεί η ολοκλήρωση της αντίδρασης. Το διάλυμα στη συνέχεια αφήνεται να ψυχθεί και μετράται η απορρόφησή του στα 620 nm. Η απορρόφηση σχετίζεται γραμμικά με την ποσότητα των σακχάρων του αρχικού δείγματος .

Αυτή η μέθοδος προσδιορίζει τόσο τα αναγωγικά όσο και τα μη αναγωγικά σάκχαρα λόγω της παρουσίας του ισχυρού οξειδωτικού θειικού οξέος. Όπως και οι άλλες μέθοδοι, είναι μη στοιχειομετρική με αποτέλεσμα να απαιτείται η δημιουργία μιας καμπύλης βαθμονόμησης χρησιμοποιώντας μια σειρά προτύπων υδατανθράκων γνωστής συγκέντρωσης (Hartmann et al. 2005).

4. 11 Μέθοδος Φαινόλη - Θειικό οξύ

Ανήκει στις χρωματομετρικές μεθόδους που χρησιμοποιούνται ευρέως για τον προσδιορισμό της ολικής συγκέντρωσης σακχάρων. Κατά τη μέθοδο αυτή ένα διαυγές υδατικό διάλυμα τοποθετείται σε δοκιμαστικό σωλήνα και στη συνέχεια προστίθενται φαινόλη και θειικό οξύ . Το διάλυμα αποκτά κίτρινο-πορτοκαλί χρώμα ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης μεταξύ των υδατανθράκων και της φαινόλης.

Η απορρόφηση πραγματοποιείται στα 420 nm και είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση των σακχάρων στο αρχικό δείγμα. Η προσθήκη του θειικού οξέος προκαλεί τη μετατροπή όλων των μη αναγωγικών σακχάρων σε αναγωγικά οπότε επιτυγχάνεται ο προσδιορισμός των ολικών σακχάρων που υπάρχουν στο δείγμα.

Αυτή η μέθοδος είναι μη στοιχειομετρική επομένως όπως και παραπάνω θα πρέπει να δημιουργηθεί μια καμπύλη βαθμονόμησης χρησιμοποιώντας μια σειρά προτύπων γνωστής συγκέντρωσης σακχάρων (Ibañez, E., Cifuentes, A. 2003).

4. 12 Μέθοδος Fehling

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην οξείδωση των αναγόντων σακχάρων με φελίγγειο υγρό. Η αντίδραση είναι εξώθερμη, με τις αλδεϋδομάδες των σακχάρων να οξειδώνονται σε οξύ

σχηματίζοντας κόκκινο ίζημα, οξείδιο του χαλκού εντοπίζοντας την παρουσία αναγωγικών σακχάρων. Συνεπώς, με τη μέθοδο προσδιορίζονται οι μονοσακχαρίτες και ειδικότερα των αλδοζών και των κετοζών. Στην περίπτωση που το εξεταζόμενο δείγμα δεν περιέχει αναγωγικά σάκχαρα παραμένει μπλε (Murphy and Johnson, 2003).

4. 13 Μέθοδος Barfoed

Ανήκει στις χρωματομετρικές μεθόδους και εφαρμόζεται με στόχο τον εντοπισμό των μονοσακχαριτών. Πραγματοποιείται μέσω της αναγωγής του οξικού χαλκού (II) όπου δημιουργείται ένα κεραμοκόκκινο ίζημα, λόγω της οξειδωσης των αλδεϋδομάδων. (Hartmann et al. 2005).

4. 14 Μέθοδος Molisch

Η μέθοδος Molisch είναι χρωματομετρική και χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των σακχάρων. Οι υδατάνθρακες με επίδραση υδροχλωρικού ή θεικού οξέος αναμιγνύονται με αντιδραστήριο Molisch, το οποίο εμπεριέχει α-ναφθόλη και αλκοόλη, και σχηματίζονται δακτύλιοι με χαρακτηριστικό ιώδες χρώμα (Hartmann et al. 2005).

4. 15 Μέθοδος Benedict

Παρατηρείται διαφοροποίηση του χρώματος από πορτοκαλί σε κεραμοκόκκινο, με αναγωγή των σακχάρων απο το αντιδραστήριο Benedict. Το κόκκινο οξείδιο του μονοσθενούς χαλκού δημιουργεί ίζημα όπου όσο μεγαλώνει η συγκέντρωση των αναγόντων σακχάρων τότε η καθίζηση είναι μεγαλύτερη με αποτέλεσμα μεγαλύτερη ένταση του χρώματος σε καφεκόκκινο - κεραμοκόκκινο. Το αντιδραστήριο Benedict αποτελείται από ιόντα κιτρικού νατρίου συμπλοκοποιημένα με ιόντα δισθενή χαλκού (Hartmann et al. 2005).

4. 16 Μέθοδος Tollens

Παρατηρείται ο σχηματισμός ενός "ασημένιου κάτοπτρου", όταν τα ανάγοντα σάκχαρα έρθουν σε επαφή με το αντιδραστήριο Tollens. Αυτή η αντίδραση πραγματοποιείται επειδή το σύμπλοκο διαμίνης αργύρου (I) οξειδώνει την αλδεϋδη, που υπάρχει στα αντίστοιχα

αναγωγικά σάκχαρα, σε οξύ και στη διαδικασία αυτή ανάγεται σε στοιχειακό άργυρο και υδατική αμμωνία. Ο στοιχειακός άργυρος καθιζάνει στην εσωτερική επιφάνεια του δοχείου αντίδρασης, δημιουργώντας αυτό το "ασημένιο κάτοπτρο" (Hartmann et al. 2005).

4. 17 Ενζυμικές Μέθοδοι

Οι αναλυτικές ενζυμικές μέθοδοι βασίζονται στην ικανότητά τους να καταλύουν συγκεκριμένες αντιδράσεις. Πλεονεκτούν διότι είναι γρήγορες, ειδικές και ευαίσθητες σε χαμηλές συγκεντρώσεις και η προετοιμασία δείγματος είναι εύκολη και γρήγορη. Όσον αφορά τα προϊόντα που είναι υγρά δύναται να ελεγχθούν απευθείας, ενώ στην περίπτωση των στερεών θα πρέπει αρχικά να διαλυθούν σε νερό.

Υπάρχουν πολλά κιτ ενζυμικής ανάλυσης στο εμπόριο για τη διεξαγωγή ανάλυσης για συγκεκριμένα σάκχαρα. Τα κιτ διαθέτουν αναλυτικές οδηγίες για τον τρόπο διεξαγωγής της ανάλυσης. Οι δύο μέθοδοι που χρησιμοποιούνται κατά κόρον είναι (Murphy, and Johnson, 2003):

- η ολοκλήρωση της αντίδρασης και η μέτρηση της συγκέντρωσης του προϊόντος, που είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος.
- μέτρηση του αρχικού ρυθμού της αντίδρασης που καταλύεται από το ένζυμο λόγω του ότι ο ρυθμός είναι ανάλογος της συγκέντρωσης του υποστρώματος.

Χαρακτηριστική ενζυμική μέθοδο είναι η D-Γλυκόζη/D-Φρουκτόζη, η οποία χρησιμοποιεί μια σειρά σταδίων για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης τόσο της γλυκόζης όσο και της φρουκτόζης σε ένα δείγμα. Αρχικά, η γλυκόζη μετατρέπεται σε 6-φωσφορική γλυκόζη (G6P) από το ένζυμο εξακινάση και ATP. Στη συνέχεια, ακολουθεί η οξείδωση του G6P με NADP⁺ παρουσία G6P-αφυδρογονάσης (G6P-DH).

Η παραγόμενη συγκέντρωση του NADPH είναι ανάλογη αυτής του G6P στο δείγμα και δύναται να υπολογιστεί φασματοφωτομετρικά στα 340 nm. Η συγκέντρωση της φρουκτόζης προσδιορίζεται μετατρέποντας τη σε γλυκόζη μέσω της χρήσης ενός άλλο ειδικού ενζύμου επαναλαμβάνοντας την ίδια παραπάνω διαδικασία.

Άλλη μέθοδος είναι η Μαλτόζη/Σακχαρόζη, όπου η συγκέντρωση της μαλτόζης και της σακχαρόζης δύναται να προσδιοριστούν εφόσον η συγκέντρωση της γλυκόζης και της φρουκτόζης έχει προσδιοριστεί με την προηγούμενη μέθοδο. Η μαλτόζη και η σακχαρόζη διασπώνται στους μονοσακχαρίτες τους από το ένζυμο α-γλυκοσιδάση και οι συγκεντρώσεις της γλυκόζης και της φρουκτόζης δύναται να προσδιοριστούν με την προηγούμενη μέθοδο.

Το κύριο μειονέκτημα αυτής της μεθόδου αποτελεί το γεγονός ότι υπάρχουν ολιγοσακχαρίτες που μετατρέπονται σε μονοσακχαρίτες από την α-γλυκοσιδάση και ως εκ τούτου δεν είναι εύκολος ο ακριβής εντοπισμός των ολιγοσακχαριτών που υπάρχουν. Συνεπώς, η μέθοδος εφαρμόζεται μόνο όταν κάποιος γνωρίζει τον τύπο των σακχάρων που υπάρχουν και όχι τις συγκεντρώσεις αυτών (Murphy, and Johnson, 2003).

Φωτομετρικές Μεθόδους

4. 18 Μέθοδος Δινιτροσαλικυλικού οξέος για μέτρηση Γλυκόζης

Η μέτρηση αναγωγικών σακχάρων πραγματοποιείται με τη φωτομετρική μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS). Αναγωγικό θεωρείται το σάκχαρο που έχει ελεύθερο το ημιακεταλικό υδροξύλιο. Η μέθοδος βασίζεται στο σχηματισμό συμπλόκου ανάμεσα στο προαναφερθέν υδροξύλιο και το δινιτροσαλικυλικό οξύ κατά τη θέρμανση σε θερμοκρασία πάνω από τους 70 °C. Το σύμπλοκο αυτό, εμφανίζει μέγιστο απορρόφησης στα 540 nm. Η γλυκόζη είναι αναγωγικό σάκχαρο και κατά συνέπεια είναι δυνατό να μετρηθεί με τη μέθοδο αυτή (Hartmann et al. 2005).

4. 19 Μέθοδος Nelson - Somogyi

Είναι μια από τις κλασικές και ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους για τον ποσοτικό προσδιορισμό των αναγωγικών σακχάρων. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιεί τις αναγωγικές ιδιότητες, λόγω της παρουσίας μιας πιθανής αλδεϋδης ή κετο-ομάδων ορισμένων τύπων σακχάρων . Το δείγμα αφού αραιωθεί και προστεθεί το αντιδραστήριο ακολουθεί ο βρασμός και έπειτα η ψύξη του δείγματος. Ο προσδιορισμός των αναγωγικών βασίζεται στην απορρόφηση στα 520 nm ενός έγχρωμου συμπλόκου μεταξύ ενός οξειδωμένου σακχάρου με χαλκό και ενός αρσενομολυβδαινικού. Η αντίδραση δεν είναι στοιχειομετρική και έτσι απαιτείται πρότυπη καμπύλη, όπου για τη βαθμονόμηση χρησιμοποιούνται μια σειρά προτύπων υδατανθράκων γνωστής συγκέντρωσης (Hounsome et al. 2008).

4. 20 Φυσικές Μέθοδοι

Πλήθος μεθόδων αυτής της κατηγορίας έχουν χρησιμοποιηθεί για την μέτρηση της των σακχάρων. Αυτές οι μέθοδοι βασίζονται στη διαφοροποίηση κάποιων φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του προϊόντος που ανάλυεται καθώς η συγκέντρωση των σακχάρων ποικίλλει. Οι συνηθέστερες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται περιλαμβάνουν την πολωσυμετρία, τον δείκτη διάθλασης, το IR και την πυκνότητα.

Σύμφωνα με τη μέθοδο της Πολωσυμετρίας, τα μόρια που διαθέτουν ένα ασύμμετρο άτομο άνθρακα δύναται να περιστρέφουν το επίπεδο πολωμένο φως. Το πολόμετρο είναι μια συσκευή που μετρά τη γωνία που περιστρέφεται στο επίπεδο του πολωμένου φωτός κατά τη διέλευση ενός διαλύματος. Περιλαμβάνει μια πηγή μονοχρωματικού φωτός, έναν πολωτή, ένα δείγμα κυψέλης γνωστού μήκους και έναν αναλυτή για τη μέτρηση της γωνίας περιστροφής. Η έκταση της πόλωσης σχετίζεται με τη συγκέντρωση των οπτικά ενεργών μορίων στο διάλυμα σύμφωνα με την εξίσωση

$$a = [a]lc,$$

όπου

a: γωνία περιστροφής,

[a]: οπτική δραστηριότητα ,

l: μήκος διαδρομής και

c: συγκέντρωση.

Η ολική γωνία περιστροφής εξαρτάται από τη θερμοκρασία και το μήκος κύματος του φωτός που χρησιμοποιείται με αποτέλεσμα αυτές οι παράμετροι τυποποιούνται στους 20°C και στα 589,3 nm. Ακολουθεί η καμπύλη βαθμονόμησης ως προς τη συγκέντρωση με τη χρήση διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης ή αλλιώς η τιμή του [a] λαμβάνεται από τη βιβλιογραφία εάν είναι γνωστός ο τύπος των σακχάρων που υπάρχουν.

Στη συνέχεια προσδιορίζεται η συγκέντρωση των σακχάρων σε ένα άγνωστο δείγμα μετρώντας τη γωνία περιστροφής του και συγκρίνοντάς την με την καμπύλη βαθμονόμησης.

Τα μειονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι η ταυτόχρονη παρουσία πολλών οπτικώς ενεργών ενώσεων, το εξεταζόμενο διάλυμα είναι έγχρωμο και δεν δύναται να προσδιορίσει συστατικά τα οποία έχουν πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις.

Άλλη μέθοδο είναι ο δείκτης διάθλασης (n) ενός υλικού, Συνήθως, η μέτρηση πραγματοποιείται από τον δείκτης διάθλασης των διαλυμάτων σε βάση με τον χαλαζία. Ο δείκτης διάθλασης ενός διαλύματος υδατανθράκων αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης και έτσι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση της ποσότητας σακχάρων που υπάρχουν. Το RI εξαρτάται επίσης από τη θερμοκρασία και το μήκος κύματος.

Αυτή η μέθοδος χαρακτηρίζεται ως γρήγορη και απλή στην εκτέλεση, ενώ έχει τη δυνατότητα να πραγματοποιηθεί με απλά όργανα χειρός. Χρησιμοποιείται τακτικά στη βιομηχανία για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων σακχάρων.

Ακόμη μία μέθοδος είναι ο η πυκνότητα, όπου των υδατικών διαλυμάτων είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των σακχάρων με αποτέλεσμα η συγκέντρωσή τους να μπορεί να προσδιοριστεί με τη μέτρηση της πυκνότητας, χρησιμοποιώντας μπουκάλια πυκνότητας ή υδρόμετρα.

Σύμφωνα με τη μέθοδο των υπέρυθρων ένα υλικό απορροφά το υπέρυθρο εξαιτίας της δόνησης ή της περιστροφής των μοριακών ομάδων. Τα σάκχαρα περιέχουν μοριακές ομάδες που απορροφούν την υπέρυθρη ακτινοβολία σε μήκη κύματος, όπου κανένα από τα άλλα κύρια συστατικά δεν απορροφά. Συνεπώς, η συγκέντρωσή τους μπορεί να προσδιοριστεί μετρώντας την απορρόφηση της υπέρυθρης ακτινοβολίας σε αυτά τα μήκη κύματος. Με την μέτρηση ενός συνόλου αριθμών διαφορετικών ειδικών μηκών κύματος δύναται να πραγματοποιηθεί ο ταυτόχρονος προσδιορισμός της συγκέντρωσης σακχάρων, πρωτεϊνών, υγρασίας και λιπιδίων. Οι μετρήσεις συνήθως γίνονται μετρώντας την ένταση ενός υπέρυθρου κύματος που ανακλάται από την επιφάνεια ενός δείγματος ισχύοντας ότι όσο μεγαλύτερη είναι η απορρόφηση, τόσο μικρότερη είναι η ανάκλαση. Τα αναλυτικά όργανα που βασίζονται στην απορρόφηση υπέρυθρων είναι μη καταστροφικά με αποτέλεσμα να επιτυγχάνονται γρήγορες μετρήσεις και ως εκ τούτου είναι ιδιαίτερα κατάλληλα για on-line ανάλυση ή για χρήση σε εργαστήριο ποιοτικού ελέγχου όπου πολλά δείγματα αναλύονται τακτικά.

4. 22 Αέρια Χρωματογραφία

Η αέρια χρωματογραφία χρησιμοποιείται κατά κόρον στην ανίχνευση των υδατανθράκων. Λαμβάνοντας υπόψη την διαφοροποίηση των σακχάρων από άποψη δομής, μεγέθους,

λειτουργικότητας και χαμηλής πτητικότητας, η μέθοδος αυτή έχει εφαρμοστεί κυρίως για τη μελέτη της σύνθεσης μονο-, δι- και τρι-σακχαριτών. Ωστόσο, οι ολιγοσακχαρίτες με βαθμό πολυμερισμού έως και 7 προσδιορίζονται επιτυχώς εφαρμόζοντας την σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας που φτάνει έως τους μέγιστη θερμοκρασία τους 360°C (Montilla et al. 2006). Τα ακυλιωμένα παράγωγα προτιμώνται για την ανίχνευση των συγγενών ειδών, όπως για παράδειγμα αλδοεξόσες: μαννόζη, γαλακτόζη, γλυκόζη, οι οποίες διαφέρουν μόνο σε μία ή περισσότερες υδροξυλομάδες.

Ο ανιχνευτής ιονισμού φλόγας (FID) είναι ευρέως διαδεδομένος. Το τελευταίο διάστημα, η χρήση φασματομέτρων μάζας ως ανιχνευτές έχει αυξηθεί, παρουσιάζοντας πλήθος πλεονεκτημάτων σε σχέση με τα παραδοσιακά FID, όπως η επίτευξη υψηλότερου βαθμού βεβαιότητας στον προσδιορισμό των υδατανθράκων χάρη στον προσδιορισμό της μοριακής μάζας και στον αναπαραγωγίμο κατακερματισμό. Μια κοινή προσέγγιση συνίσταται στη χρήση των δύο μεθόδου GC-MS σε μία για την αναγνώριση των σακχάρων και ένα GC-FID για την ποσοτικοποίηση (Soria et al. 2009).

Επιπρόσθετα, η χρήση του GC-MS έχει επίσης αποδειχθεί ότι είναι πολύτιμη για τον προσδιορισμό άγνωστων σακχάρων (Ruiz-Matute et al. 2007b).

Δεν μπορεί να εφαρμοστεί ευρέως λόγω των απαιτούμενων σταδίων προετοιμασίας του δείγματος και την εφαρμογή της σε μικρούς υδατάνθρακες. Στην πραγματικότητα, υπάρχει η πιθανότητα απώλειας δείγματος κατά τη διάρκεια όλης της διαδικασίας, κυρίως λόγω των αντιδράσεων της υδρόλυσης που δεν έχουν ολοκληρωθεί πλήρως (Rojas-Escudero et al. 2004).

4. 23 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

Θεωρείται μια από τις σημαντικότερες αναλυτικές τεχνικές που εφαρμόζεται για την ανάλυση των σακχάρων. Σε σχέση με τις άλλες αναλυτικές τεχνικές, η HPLC είναι σε θέση να παρέχει ορισμένα πρόσθετα πλεονεκτήματα. Παρότι είναι λιγότερο ευαίσθητη από την αέρια χρωματογραφία, η HPLC είναι ταχύτερη, δεν απαιτεί απαραίτητα το δείγμα να παραγωγοποιηθεί, επιτρέπει την ανάλυση μεγαλύτερων υδατανθράκων και παρουσιάζει καλύτερη ευελιξία χάρη στους διαφορετικούς μηχανισμούς διαχωρισμού και στους ανιχνευτές που μπορούν να χρησιμοποιηθούν.

Ο μηχανισμός διαχωρισμού στην HPLC είναι ανάλογος του υλικού που θα αναλυθεί, τα συγκεκριμένα σάκχαρα που ενδιαφέρουν και η διαθεσιμότητα των οργάνων. Οι τεχνικές HPLC

για ανάλυση σακχάρων είναι η χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων, η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους και χρωματογραφία κατανομής κανονικής ή ανάστροφης φάσης.

Η χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων μπορεί να εφαρμοστεί χρησιμοποιώντας ανιονικές ή κατιονικές ρητίνες ανταλλαγής. Ειδικότερα, η χρωματογραφία ανταλλαγής ανιόντων υψηλής απόδοσης (HPAEC) θεωρείται υψηλής απόδοσης στην ανάλυση υδατανθράκων. Για την επίτευξη του διαχωρισμού, οι τεταρτοταγής ρητίνες αμμωνίου χρησιμοποιούνται συνήθως κάτω από εξαιρετικά αλκαλικές συνθήκες για να επιτρέψουν τα σάκχαρα ιονισμού, παρότι σήμερα διαφορετικοί τύποι εμπορικών στηλών είναι διαθέσιμοι. Η κινητή φάση πρέπει να επιλεγεί προσεκτικά καθώς θα επηρεάσει έντονα όχι μόνο την επιλεκτικότητα του διαχωρισμού, αλλά και τον συνολικό χρόνο ανάλυσης. Εκτός από μονο- και δισακχαρίτες, οι ολιγοσακχαρίτες δύναται να αναλυθούν από το HPAEC (Cataldi et al. 2000).

Έχουν αναπτυχθεί διαφορετικές μέθοδοι διαχωρισμού ολιγοσακχαριτών ανάλογα με το βαθμό πολυμερισμού τους. Τέλος οι ολιγο- και οι πολυσακχαρίτες μπορούν να αναλυθούν με HPAEC έπειτα από υδρόλυση του δείγματος με στόχο την απλοποίηση του προφίλ των σύνθετων σακχάρων πιο απλό μονο- και σύνθετων δισακχαριτών.

Βασικά ιόντα εφαρμόζονται για τον διαχωρισμό μονο- και ολιγοσακχαριτών. Ο μηχανισμός συγκράτησης είναι σύμφωνα με τον σχηματισμό ασθενών συμπλοκών μεταξύ των μεταλλικών ιόντων και των ομάδων υδροξυλίου των υδατανθράκων. Επιπρόσθετα μπορούν να διαχωριστούν πλήρως οι εναντιομερείς μονοσακχαρίτες, όπως γλυκόζη, μααννόζη κ.λ.π. Ωστόσο, αυτή η τεχνική παρουσιάζει προβλήματα, όπως του ότι οι στήλες δεν είναι πολύ στιβαρές καθώς τα μέταλλα μπορούν να εκλούονται από τις ρητίνες όταν αναλύονται πολύπλοκα δείγματα και η ανάλυση των ολιγοσακχαριτών είναι συχνά φτωχή λόγω της πολύ ασθενούς αλληλεπίδρασης με τα μεταλλικά ιόντα.

Άλλος μηχανισμός που εφαρμόζεται για τον διαχωρισμό των υδατανθράκων των τροφίμων είναι η χρωματογραφία αποκλεισμού (SEC). Αυτή η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται και για την κλασματοποίηση των σακχάρων. Η SEC βασίζεται στην απορρόφηση ουσιών μέσω ρητινών με συγκεκριμένο μέγεθος πόρων και δομή. Οι πολυσακχαρίτες είναι μεγάλα μόρια οπότε δεν μπορούν να διεισδύσουν μέσα στις ρητίνες, και κατά συνέπεια εκλούνται πρώτα. Τα υπόλοιπα συστατικά θα εκλούνται ανάλογα με τη μείωση του μοριακού μεγέθους. Έτσι, οι μονοσακχαρίτες με μικρό μέγεθος, θα αλληλεπιδράσουν περισσότερο με τις ρητίνες με αποτέλεσμα να είναι απαραίτητος περισσότερος χρόνος για την έκλυση (Hartmann et al. 2005).

Οι παράγοντες που πρέπει να ελέγχονται είναι η λειτουργία ανίχνευσης, διότι η επιλογή του θα επιδράσει σε μεγάλο βαθμό στην προετοιμασία του δείγματος που πρόκειται να ελεγχθεί. Στην πραγματικότητα, εάν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί φωτομετρική ανίχνευση (UV-Vis ή φθορισμός), είναι απαραίτητο να υποβληθούν τα σάκχαρα σε στάδιο παραγωγοποίησης για να καταστεί δυνατή η ανίχνευση και αύξηση της ευαισθησίας. Οι αντιδράσεις παραγωγοποίησης κατηγοριοποιούνται σε δύο ομάδες. Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει την εισαγωγή χρωμοφόρων που αντιδρούν με τις υδροξυλικές ομάδες και η δεύτερη περιλαμβάνει την αντίδραση με αμίνες στην καρβονυλ ομάδα. Ένας από τα περισσότερα εφαρμοζόμενα αντιδραστήρια παραγωγοποίησης για την απορρόφηση της υπεριώδους ακτινοβολίας είναι η 1-φαινυλ-3-αιθυλ-5-πυραζολίνη. Αυτή η ένωση μπορεί να αντιδράσει με σάκχαρα κάτω από ήπιες συνθήκες απουσία όξινου καταλύτη, ο οποίος αποφεύγει την αποικοδόμηση και τον ανεπιθύμητο ισομερισμό παρέχοντας μια ευαίσθητη ανίχνευση UV στα 245 nm. Άλλα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται είναι το p-νιτροβενζοϋλοχλωρίδιο που παρουσιάζει απορρόφηση στα 260 nm ή το φαινυλοϊσοκυανικό με ανίχνευση στα 240 nm (Zhang et al. 2003).

Ως παράγοντας παραγοντοποίησης χρησιμοποιήθηκε η βενζαμιδίνη για τον σχηματισμό ενός φθορίζοντος συμπλόκου παρουσία αναγωγικών σακχάρων σε αλκαλικό περιβάλλον μέτριας και υψηλής θερμοκρασίας. Η αντίδραση χρησιμοποιήθηκε με παράλληλο εντοπισμό μονο- και ολιγοσακχαριτών (Kakita et al. 2002). Η ανίχνευση φθορισμού έγινε με την χρήση 288nm μήκος κύματος και 470nm για εκπομπή, με αποτέλεσμα LOD 1,78 και 2,59pmol για την D-γλυκόζη και μαλτοεξαόζη, αντίστοιχα. Οι ανιχνευτές εξατμιστικού σκέδασης φωτός (ELSD) εφαρμόζονται για την καλύτερευση της ευαισθησίας. Θεωρείται ιδανικός για μη πτητικά εξαρτήματα. Επιπλέον, το ELSD επιτρέπει την βαθμιδωτή έκλυση αφού ο διαλύτης εξατμίστηκε πριν τον εντοπισμό. Αυτό το είδος ανιχνευτή έχει χρησιμοποιηθεί μαζί με HPLC και στήλη silica gel για την άμεση ανάλυση των υδατανθράκων. Επιπλέον, το ELSD έχει αποδειχθεί ότι είναι επίσης χρήσιμος ως ανιχνευτής σε συνδυασμό με διαχωρισμούς υδατανθράκων HPAEC (Muir et al. 2009).

4. 24 Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας (TLC)

Η μέθοδος αυτή προσδιορίζει μονοσακχαρίτες και ολιγοσακχαρίτες. Το εξεταζόμενο δείγμα τοποθετείται σε πλάκα TLC από Kieselgel G που είναι διαποτισμένο με βορικό οξύ καθώς και οι κηλίδες των γνωστών διαλυμάτων σακχάρων. Το χρωματογράφημα, είναι αναγκαίο μα

εμπεριέχει διαλύτες. Η εμφάνιση του χρωματογραφήματος πραγματοποιείται σε 40 λεπτά και συνήθως με μίγμα διαλύματος διφαινυλαμίνης 40% v/v σε αιθανόλη / διαλύματος ανιλίνης 40% v/v σε αιθανόλη) / ορθοφωσφορικού οξέος σε αναλογία 10:10:2. Το δείγμα θερμαίνεται, επαναψεκάζεται και αναθέρμαίνεται. Ο εντοπισμός των σακχάρων πραγματοποιείται με βάση το R_f που είναι ο λόγος της απόστασης που διάνυσε κάθε σάκχαρο προς την απόσταση που διάνυσε ο διαλύτης έκλουσης (Wei et al. 2002).

Πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι (Wei et al. 2002):

- Απλή και γρήγορη μέθοδος
- Μικρή απαιτούμενη ποσότητα δείγματος
- Χρησιμοποιούνται πλάκες επιστρωμένες συνήθως με silica ή κυτταρίνη
- Το χρωματογράφημα αναπτύσσεται σε έναν ή περισσότερους διαλύτες ανάλογα με την πολικότητα των συστατικών
- Για την εμφάνιση των κηλίδων χρησιμοποιείται διάλυμα θειικού ή χρωμοθειικού οξέος, φθορίζουσες ενώσεις, κ.α.
- Χρησιμοποιείται για την απευθείας ανίχνευση, και ως ενδιάμεσο παρασκευαστικό στάδιο για την απομόνωση ενώσεων που στη συνέχεια θα προσδιορισθούν με άλλη αναλυτική μέθοδο.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παραγωγή οίνων και μύρας έχει μακρά ιστορία στη ανθρωπότητα και προέρχεται από την αρχαιότητα. Η παραγωγή τους με το πέρασμα των ετών βελτιώθηκε τόσο με την εξέλιξη της τεχνολογίας όσο και με την εξέλιξη των μεθόδων.

Παρόλα αυτά παρατηρούνται πολλές φορές αλλοίωση των χαρακτηριστικών που σχετίζονται με το γλεύκος αυτών. Απο την άλλη τα σάκχαρα είναι φυσικές οργανικές ενώσεις που εμπεριέχονται σε όλα τα τρόφιμα προσδίδοντας ιδιαίτερες ιδιότητες.

Ως πρώτες ύλες στη μύρα είναι το νερό που αποτελεί περισσότερο από 90%, το κριθάρι ως υπόστρωμα το οποίο μετά την υδρόλυσή του θα δώσει τα σάκχαρα, το λυκίσκο, προσδίδοντας γεύση και άρωμα, τις ζύμες που είναι απαραίτητες για την αλκοολική ζύμωση. Στην βυνοποίηση, η βύνη με τα φυσικά ένζυμα μετατρέπει το άμυλο σε σάκχαρα.

Τα σάκχαρα, είναι παραγωγή ενέργειας σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς. Η γλυκόζη είναι ο σημαντικότερος υδατάνθρακας, για τον άνθρωπο η μοναδική πηγή ενέργειας του εγκεφάλου και του κεντρικού νευρικού συστήματος. Όταν καίγεται παράγεται διοξείδιο του άνθρακα και νερό ενώ απελευθερώνονται 4 Kcal/1 g γλυκόζης. Εκτός από πηγή ενέργειας οι υδατάνθρακες έχουν διάφορους ρόλους στον οργανισμό, όπως η γλυκόζη, αλλά και άλλα σάκχαρα είναι ενδιάμεσα προϊόντα μεταβολισμού, και είναι και πρώτη ύλη για τη βιοσύνθεση διάφορων βιομορίων μεγάλης βιολογικής σημασίας. Παράδειγμα είναι τα σάκχαρα δεοξυριβόζη και ριβόζη δομικά συστατικά του DNA και RNA αντίστοιχα.

Τα τελευταία χρόνια οι νέες τεχνολογίες θέτουν ως σκοπό τον εντοπισμό του συνόλου των συστατικών καθώς και των σακχάρων τα οποία βρίσκονται στα γλεύκη και στη μύρα. Από την ανάλυση των μεθόδων προκύπτει ότι οι πρόσφατες μέθοδοι που εφαρμόζονται, όπως η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης, η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, αέρια χρωματογραφία κ.λ.π. παρουσιάζουν υψηλή ακρίβεια, είναι εύκολες στη χρήση, παρουσιάζουν επαναληψιμότητα και δίνουν γρήγορα αποτελέσματα. Το αρνητικό είναι ο ακριβός εξοπλισμός και η υψηλή τεχνολογία που θα πρέπει να έχει ο χειριστής. Όσον αφορά τις μεθόδους που ανήκουν στις ογκομετρικές, τιτλοδότησης, φυσικές μπορεί να είναι μικρότερου κόστους, όμως αυξάνεται η πιθανότητα σφάλματος λόγω του ανθρώπινου παράγοντα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Bokulich, N. A., Bamforth, C. W., and Mills, D. A., 2012. A review of molecular methods for microbial community profiling of beer and wine. *Journal of American Society Brewing Chemists*, 70:150–162.

Briggs, D.E. , Boulton, C.A. , Brookes, P.A. and Roger, S., 2004. *Brewing: Science and Practice*, pp. 1–290. Woodhead Publishing Limited and CRC Press, Cambridge and Boca Raton, FL

Camin F. and Bontempo L., 2020. Wine and must, <https://doi.org/10.32741/fihb.12.wine>

Campbell, S. L., 2017. The continuous brewing of beer. VI-Food-A-Beer:1-8

Castellari, M., Sartini, E. , Spinabelli, U., Riponi, C. and Galassi, S., 2001. *J. Chromatogr. Sci.* 39, 235 – 238.

Cataldi, T. R. I., Angelotti, M., Bufo, S. A. 1999. Method development for the quantitative determination of lactulose in heat-treated milks by HPAEC with pulsed amperometric detection. *Anal. Chem.* 71:4919-4925.

De Brackeleire C, Harmegnies F, Tigel R, Mendes JP. 2000. Fine rindig in water. *Brauwelt Int V*:372– 80.

Deng, Q., Penner, M.H., Zhao, Y., 2011. Chemical composition of dietary fiber and polyphenols of five different varieties of wine grape pomace skins. *Food Research International*, 44 (9), 2712–2720.

Ducasse, M.A., Canal-Llauberes, R.M., de Lumley, M., et al., 2010. Effect of macerating enzyme treatment on the polyphenol and polysaccharide composition of red wines. *Food Chemistry*, 118 (2), 369–376

Enological Chemistry. DOI: 10.1016/B978-0-12-388438-1.00006-6 Copyright 2012 Elsevier Inc. All rights reserved

Geisser, A., Hendrich, T., Boehm, G., Stahl, B. Separation of lactose from human milk oligosaccharides with simulated moving bed chromatography. *J. Chromatogr. A* 1092:17-23.

Gibson, B. R., Boulton, C. A., Box, W. G., Graham, N. S., Lawrence, S. J., Linforth, R. S. T., and Smart, K. A. , 2009. Amino acid uptake and yeast gene transcription during industrial brewery fermentation, *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 67, 157–165

- Gibson, P. R., Newham, E., Barrett, J. S., Shepherd, S. J., Muir, J. G. 2007. Fructose malabsorption and the bigger picture. *Aliment. Pharmaciol. Ther.* 25:349-363.
- Godshall, M. A., Roberts, E. J., Miranda, X. M. 2001. Composition of the soluble, nondyalizable components in raw cane sugar. *J. Food Process. Preservation* 25:323-335.
- Hagen, K.M., Keller, M., Edwards, C.G., 2008. Survey of biotin, pantothenic acid, and assimilable nitrogen in winegrapes from the Pacific Northwest. *American Journal of Enology and Viticulture*, 59 (4), 432–436.
- Hammond, J., 2000. Yeast growth and nutrition. In: *Brewing Yeast Fermentation Performance*, Smart, K. (ed.). Blackwell Science, Oxford, pp. 77–85.
- Hartmann, G., Piber, M., Koehler, P. 2005. Isolation and chemical characterisation of water extractable arabinoxylans from wheat and rye during breadmaking. *Eur. Food Res. Technol.* 221:487-492.
- Hartmann, G., Piber, M., Koehler, P. 2005. Isolation and chemical characterisation of waterextractable arabinoxylans from wheat and rye during breadmaking. *Eur. Food Res. Technol.* 221:487-492.
- Hashimoto, T., Maruhashi, T., Yamaguchi, Y., Hida, Y., and Oka, K., 2012. The effect on fermentation by-products of the amino acids in wort, in *Proceedings of the World Brewing Congress*, Portland, OR
- He Y., Dong J., Yin H. et al., , 2014. Wort composition and its impact on the flavour-active higher alcohol and ester formation of beer – a review *Institute of Brewing & Distilling* Received, 2014 Published online in Wiley Online Library, (wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/jib.145
- Hernandez, O., Ruiz-Matute, A. I., Olano, A., Moreno, F. J., Sanz, M. L. 2009. Comparison of fractionation techniques to obtain prebiotic galactooligosaccharides. *Int. Dairy J.* 19:531- 536.
- Hjelmeland, A.K. and Ebeler, S.E., 2015. Glycosidically bound volatile aroma compounds in grapes and wine: a review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 66 (1), 1–11.
- Hounsome, N., Hounsome, B., Tomos, D., Edwards-Jones, G. 2008. Plant metabolites and nutritional quality of vegetables. *J. Food Sci.* 73:R48-R65.

Hounsome, N., Hounsome, B., Tomos, D., Edwards-Jones, G. 2008. Plant metabolites and nutritional quality of vegetables. *J. Food Sci.* 73:R48-R65.

Hughes, P.S. and Baxter, E.D., 2001. *Beer: Quality, Safety and Nutritional Aspects*, pp. 1–13 and 98–105. Royal Society of Chemistry, Cambridge

Ibañez, E., Cifuentes, A. 2003. New analytical techniques in food science. *Crit. Rev. Food Sci.* 41:413-450.

Jackson R.S., 2014. “*Wine Science – Principles & Applications*”, 4th Edition, Elsevier.

Jordão A. M., Vilela A. and Cosme F. , 2015 . From Sugar of Grape to Alcohol of Wine: Sensorial Impact of Alcohol in Wine Beverages 2015, 1, 292-310; doi:10.3390/beverages1040292 .

Kakita, H., Kamishima, H., Komiya, K., Kato, Y. 2002. Simultaneous analysis of monosaccharides and oligosaccharides by high-performance liquid chromatography with postcolumn fluorescence derivatization. *J. Chromatogr. A* 961:77-82.

Kamada, T., Nakajima, M., Nabetani, H., Iwamoto, S. 2002. Pilot-scale study of the purification and concentration of non-digestible saccharides from Yacon Rootstock using membrane technology. *Food Sci. Technol. Res.* 8:172–177.

Kenechukwu A., 2019. Review: Beer Production Article in SSRN , Electronic Journal, January 2019 DOI: 10.2139/ssrn.3458983

Keukeleire, D., 2000. Fundamentals of beer and hop chemistry. *QUÍMICA NOVA*, 23(1):108-112.

Kitahara, K., Copeland. L. 2004. A simple method for fractionating debranched starch using a solid reversed-phase cartridge. *J. Cereal Sci.* 39:91-98.

Lei, H., Li, H., Mo, F., Zheng, L., Zhao, H., and Zhao, M. ,2013. Effects of Lys and His supplementations on the regulation of nitrogen metabolism in lager yeast, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 8913–8921

Lei, H., Zheng, L., Wang, C., Zhao, H., and Zhao, M. , 2013. Effects of worts treated with proteases on the assimilation of free amino acids and fermentation performance of lager yeast, *Int. J. Food Microbiol.* 161, 76–83

Manger H-J. 2000. Geschmacksstabilität und Sensorik: Einflussmöglichkeiten im Sudhaus. Brauerei Forum 9:255– 8.

Mateo, J.J. and Jimenez, M. , 2000. Monoterpenes in grape juice and wines. Journal of Chromatography A, 881 (1–2), 557–567.

Mattivi, F., Guzzon, R., Vrhovsek, U., et al., 2006. Metabolite profiling of grape: flavonols and anthocyanins. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54 (20), 7692–7702

McIntyre, G.N., Kliewer, W.M., Lider, L.A., 1987. Some limitations of the degree day system as used in viticulture in California. American Journal of Enology and Viticulture, 38 (2), 128–132

Megherbi, M., Herbretau, B., Dessalces, G., Grenier-Loustalot, M. F. 2008. Solid phase extraction of oligo- and polysaccharides; application to malodextrins and honey qualitative analysis. J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol. 31:1033-1046.

Meyers, J.M. and Vanden Heuvel, J.E. , 2014. Use of normalized difference vegetation index images to optimize vineyard sampling protocols. American Journal of Enology and Viticulture, 65 (2), 250–253.

Montañes, F., Fornari, T., Martin-Alvarez, P. J., Corzo, N., Olano, A., Ibañez, E. 2006. Selective recovery of tagatose from mixtures with galactose by direct extraction with supercritical CO₂ and different cosolvents. J. Agric. Food Chem. 54:8340-8345.

Montañes, F., Fornari, T., Martin-Alvarez, P. J., et al. 2007. Selective fractionation of disaccharide mixtures by supercritical CO₂ with ethanol as co-solvent. J. Supercrit. Fluids 41:61–67.

Montilla, A., van de Langemaat, J., Olano, A., del Castillo, M. D. 2006. Determination of oligosaccharides by conventional high resolution gas chromatography. Chromatographia 63:453-458.

Morales, V., Sanz, M. L., Olano, A., Corzo, N. 2006. Rapid separation on activated charcoal of high oligosaccharides in honey. Chromatographia 64:233-238.

Moreno J., Peinado R., 2012. “Enological Chemistry”, Elsevier, ISBN 978-0-12-388438-1, Copyright © 2012 Elsevier Inc. All rights reserved DOI <https://doi.org/10.1016/C2011-0-69661-9>

- Muir, J. G., Rose, R., Rosella, O. et al. 2009. Measurement of short-chain carbohydrates in common Australian vegetables and fruits by high-performance liquid chromatography (HPLC). *J. Agric. Food Chem.* 57:554-565.
- Muir, J. G., Shepherd, S. J., Rosella, O., Rose, R., Barrett, J. S., Gibson, P. R. 2007. Fructan and free fructose content of common Australian vegetables and fruit. *J. Agric. Food Chem.* 55:6619-6627.
- Murphy, S. P., Johnson, R. 2003. The scientific basis of recent US guidance on sugars intake. *Am. J. Clin. Nutr.* 78:827S-833S
- Murphy, S. P., Johnson, R. 2003. The scientific basis of recent US guidance on sugars intake. *Am. J. Clin. Nutr.* 78:827S-833S.
- N.N. 2004. The Ziemann Dispax: a new dimension in fine milling. Company brochure Ziemann.
- N.N. 2005b. The mash filter Meura-2001. Company brochure Meura.
- Negri, A.S., Prinsi, B., Scienza, A., et al., 2008. Analysis of grape berry cell wall proteome: a comparative evaluation of extraction methods. *Journal of Plant Physiology*, 165 (13), 1379–1389
- OIV (INTERNATIONAL ORGANISATION OF VINE AND WINE), 2022. International Code of Oenological Practices, ISBN : 978-2-85038-059-4 .
- Pagay, V. and Cheng, L. , 2010. Variability in berry maturation of Concord and Cabernet franc in a cool climate. *American Journal of Enology and Viticulture*, 61 (1), 61–67
- Pensec, F., Paczkowski, C., Grabarczyk, M., et al., 2014. Changes in the triterpenoid content of cuticular waxes during fruit ripening of eight grape (*Vitis vinifera*) cultivars grown in the Upper Rhine Valley. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62 (32), 7998–8007 .
- Preedy VR: Dietary sugars: Chemistry, analysis, function and effects. Royal Society of Chemistry; 2012.
- Procopio, S., Krause, D., Hofmann, T., and Becker, T. (2013) Significant amino acids in aroma compound profiling during yeast fermentation analyzed by PLS regression, *LWT – Food Sci. Technol.* 51, 423–432

Procopio, S., Qian, F., and Becker, T. ,2011. Function and regulation of yeast genes involved in higher alcohol and ester metabolism during beverage fermentation, *Eur. Food. Res. Technol.* 233, 721–729.

Ruiz-Matute, A. I., Ramos, L., Martinez-Castro, I., Sanz, M. L. 2008. Fractionation of honey carbohydrates using pressurized liquid extraction with activated charcoal. *J. Agric. Food Chem.* 56:8309-8313.

Ruiz-Matute, A. I., Sanz, M. L., Corzo, N., et al. 2007. Purification of lactulose from mixtures with lactose using pressurized liquid extraction with ethanol-water at different temperatures. *J. Agric. Food Chem.* 55:3346-3350

Ryona, I. and Sacks, G.L., 2013. Behavior of glycosylated monoterpenes, C13-norisoprenoids, and benzenoids in *Vitis vinifera* cv. Riesling during ripening and following hedging, in Carotenoid cleavage products, American Chemical Society, pp. 109–124.

Saerens, S. M. G., Verbelen, P. J., Vanbeneden, N., Thevelein, J. M., and Delvaux, F. R., 2008. Monitoring the influence of high-gravity brewing and fermentation temperature on flavour formation by analysis of gene expression levels in brewing yeast, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80, 1039–1051

Saerens, S. M., Verstrepen, K. J., Van Laere, S. D., Voet, A. R., Van Dijck, P., Delvaux, F. R., and Thevelein, J. M. ,2006. The *Saccharomyces cerevisiae* EHT1 and EEB1 genes encode novel enzymes with medium-chain fatty acid ethyl ester synthesis and hydrolysis capacity, *J. Biol. Chem.* 281, 4446–4456

Sánchez, H. C., 2017. The mathematics of brewing. Available @ <http://chalkdustmagazine.com/blog/themathematics-of-brewing/>. Accessed on 18/ 09/ 2018.

Smit, I., Pflieginger, M., Binner, A., et al. , 2014. Nitrogen fertilisation increases biogenic amines and amino acid concentrations in *Vitis vinifera* var. Riesling musts and wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94 (10), 2064–2072.

Soria, A. C., Sanz, M. L., Villamiel, M. 2009. Determination of minor carbohydrates in carrot (*Daucus carota* L.) by GC-MS. *Food Chem.* 114:758-762.

Stewart GG. 2001. Fermentation of high gravity worts – its influence on yeast metabolism and morphology. *Proceedings European Brewery Convention Congress*. Chapter 36

Stewart, G. G. ,2006. Studies on the uptake and metabolism of wort sugars during brewing fermentations, *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* 43, 265–269

Stewart, G. G., Hill, A. E., and Russell, I., 2013. 125th Anniversary Review: Developments in brewing and distilling yeast strains, *J. Inst. Brew.* 119, 202–220

Travaglia, F., Bordiga, M., Locatelli, M., et al. , 2011. Polymeric proanthocyanidins in skins and seeds of 37 *Vitis vinifera* L. cultivars: a methodological comparative study. *Journal of Food Science*, 76 (5), C742–C749

US Department of Agriculture, 2014. A.R.S. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 27, <http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl>.

Vaclavik VA, Christian EW: Sugars, Sweeteners, and Confections. In *Essentials of Food Science*. Springer; 2014: 279-295

Verstrepen, K. J., Derdelinckx, G., Dufour, J. P., Winderickx, J., Thevelein, J. M., Pretorius, I. S., and Delvaux, F. R. ,2003. Flavouractive esters: Adding fruitiness to beer, *J. Biosci. Bioeng.* 96, 110–118

Verstrepen, K. J., Iserentant, D., Malcorps, P., Derdelinckx, G., Van Dijck, P., Winderickx, J., Pretorius, I. S., Thevelein, J. M., and Delvaux, F. R. , 2004. Glucose and sucrose: Hazardous fast-food for industrial yeast?, *Trends Biotechnol.* 22, 531–537

Vincenzi, S., Tolin, S., Cocolin, L., et al., 2012. Proteins and enzymatic activities in Erbaluce grape berries with different response to the withering process. *Analytica Chimica Acta*, 732, 130–136.

Walker, G. M., 2000. Role of metal ions in brewing yeast fermentation performance, in *Brewing Yeast Fermentation Performance*, pp. 86–91, Blackwell Science, Oxford

Ward, R. M., Gao, Q., de Bruyn, H., Gilbert, R. G., Fitzgerald, M. A. 2006. Improved methods for the structural analysis of the amylase-rich fraction from rice flour. *Biomacromolecules* 7:866-876.

Wei, Y., Ding, M. Y. 2002. Ethanolamine as modifier for analysis of carbohydrates in foods by HPLC and evaporative light scattering detection. *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 25:1769-1778.

Willaert R, Nedovic V. 2006. Primary beer fermentation by immobilised yeast – a review on flavour formation and control strategies. *J Chem Technol Biotechnol*, in press.

Willaert RG, Baron GV. 2005. Applying sustainable technology for saving primary energy in the Q20:22 brewhouse during beer brewing. *Clean Technol Environ Policy* 7:15– 32.

Zhang, L., Xu, J., Zhang, L., Zhang, W., Zhang, Y. 2003. Determination of 1-phenyl-3- methyl-5-pyrazolone-labeled carbohydrates by liquid chromatography and micellar electrokinetic chromatography. *J. Chromatogr. B* 793:159-165.

Σουφλερός, 2004. ΟΙΝΟΛΟΓΙΑ Επιστήμη & Τεχνογνωσία

Σπηλιόπουλος Ι. (2008). Βασική Οργανική Χημεία. Αθήνα: Εκδόσεις Αθ. Σταμούλης