



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

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

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

**Διερεύνηση του ρόλου των πεπτιδίων στην μύρα και τα
παραπροϊόντα ζυθοποίησης**

**Της
Σαμανίδου Κλεονίκης**

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

Επιβλέπουσα: Ευαγγέλου Αλεξάνδρα

ΑΘΗΝΑ, 2023



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

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

Master Thesis

Unraveling the role of peptides in beer and brewing by-products

**By
Samanidou Kleoniki**

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

Supervisor: Evangelou Alexandra

Athens, 2023

ΔΗΛΩΣΗ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Οι υπογράφοντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία (master thesis) με τίτλο «**Διεύρυνση του ρόλου των πεπτιδίων στη μύρα και τα παραπροϊόντα ζυθοποίησης**» που παρουσιάστηκε από την ΣΑΜΑΝΙΔΟΥ ΚΛΕΟΝΙΚΗ με Α.Μ. 154997166 και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

The signatories declare that we have examined the postgraduate diploma thesis “Unraveling the role of peptides in beer and brewing by-products” presented by SAMANIDOY KLEONIKI and affirm that it is accepted.

**Όνοματεπώνυμο & Υπογραφή 1ου Μέλους Επιτροπής
(Name and Signature of 1st Commission Member):**

ΕΥΑΓΓΕΛΟΥ ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ.....

**Όνοματεπώνυμο & Υπογραφή 2^{ου} Μέλους Επιτροπής
(Name and Signature of 2nd Commission Member):**

ΤΑΤΑΡΙΔΗΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ.....

**Όνοματεπώνυμο & Υπογραφή 3^{ου} Μέλους Επιτροπής
(Name and Signature of 3rd Commission Member):**

ΚΕΧΑΓΙΑ ΔΕΣΠΟΙΝΑ.....

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

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

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

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

ΣΑΜΑΝΙΔΟΥ ΚΛΕΟΝΙΚΗ.....



Πνευματική ιδιοκτησία © 2023 Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

Όλα τα δικαιώματα διατηρούνται

Copyright © 2023 University of West Attica

All rights reserved

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο ζύθος αποτελεί ένα από τα παλαιότερα γνωστά αλκοολούχα ποτά και ενώ χρονολογείται 6000-8000 χρόνια πριν, αποτελεί ακόμα ένα πολύπλοκο προϊόν και η παραγωγή του όλο και αυξάνεται. Καθώς η βιομηχανία του ζύθου με τα χρόνια έχει εξελιχθεί και οι μικροζυθοποιίες έχουν γίνει πιο δημοφιλείς, τα χαρακτηριστικά της μύρας έχουν επίσης αλλάξει και οι απαιτήσεις των καταναλωτών αυξάνονται. Η λεπτομερής γνώση των συστατικών της μύρας και του ρόλου που καθένα από αυτά διαδραματίζει, μπορεί να συμβάλει στην παραγωγή ποιοτικότερων προϊόντων. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν, έπειτα από βιβλιογραφική αναζήτηση, η διερεύνηση του ρόλου των πεπτιδίων που υπάρχουν στην μύρα καθώς και στα παραπροϊόντα ζυθοποίησης. Στόχος ήταν η συλλογή δεδομένων για το ποια πεπτίδια έχουν εντοπιστεί/ταυτοποιηθεί ότι συμμετέχουν κατά την παραγωγή του ζύθου, των μεθόδων που έχουν χρησιμοποιηθεί, του ρόλου που έχουν τα πεπτίδια στα φυσικοχημικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος, καθώς και για τη βιοδραστικότητα που εμφανίζουν πεπτίδια από παραπροϊόντα ζυθοποίησης.

Η μύρα αποτελείται από περισσότερες από 400 περίπου διαφορετικές ενώσεις που προέρχονται από την πρώτη ύλη ή έχουν σχηματιστεί ως προϊόντα του μεταβολισμού της ζύμης ή βιοχημικών μετατροπών κατά τη βυνοποίηση, τη ζύμωση και την ωρίμανση. Όσον αφορά τα πολυπεπτίδια, στην μύρα περιέχονται 0,2-0,6 g/100mL, τα οποία προέρχονται κυρίως από τις πρωτεΐνες του κριθαριού, ενώ ένα μικρότερο ποσοστό προέρχεται και από τη ζύμη. Μέχρι πρότινος, ο διαχωρισμός μικρών πεπτιδίων από μεγάλη περίσσεια αμινοξέων παρουσίαζε διάφορες δυσκολίες. Επομένως, παρόλο που ήταν ήδη γνωστό ότι αφομοιώνεται μεγάλη ποσότητα πεπτιδίων κατά τη ζύμωση, σχετικά λίγα πράγματα ήταν γνωστά για τα πεπτίδια. Πλέον, είναι γνωστό ότι τα πολυπεπτίδια παίζουν σημαντικό ρόλο στον αφρισμό της μύρας, αλλά και στην αίσθηση του στόματος.

Πρόσφατα, βρέθηκαν βιοενεργά πεπτίδια στη μύρα, ενώ πεπτίδια με πλήθος βιοδραστικών ιδιοτήτων, όπως αντιυπερτασικές, αντιοξειδωτικές κ.ά., παράγονται από παραπροϊόντα ζυθοποίησης, που προέρχονται από το κριθάρι [BSG (Brewer's Spent Grain)], τον λυκίσκο [BSH (Brewer's Spent Hops)] και τις ζύμες [BSY (Brewer's Spent Yeast)]. Οι τρεις αυτές κατηγορίες παραπροϊόντων είναι πλούσιες σε πρωτεΐνες που μπορούν να υδρολυθούν και να παράγουν βιοδραστικά πεπτίδια. Μελλοντικά, στηριζόμενοι και στις ολοένα και πιο εξελιγμένες και εξειδικευμένες ενόργανες αναλυτικές τεχνικές, θα είχε ερευνητικό ενδιαφέρον ο περαιτέρω έλεγχος των πολυπεπτιδίων που σχετίζονται με την εμφάνιση θολωμάτων στην μύρα και την εύρεση τρόπων αποφυγής τους, η εύρεση περισσότερων πεπτιδικών αλληλουχιών που ενισχύουν την ποιότητα του αφρού και πώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή ποιοτικότερων ζύθων. Τέλος, η απομόνωση βιοδραστικών πεπτιδίων από παραπροϊόντα ζυθοποίησης θα μπορούσε να έχει εφαρμογή στην παραγωγή βιολειτουργικών τροφίμων ή φαρμακευτικών σκευασμάτων.

Λέξεις κλειδιά: μύρα, πρωτεΐνες, πεπτίδια, φυσικοχημικές ιδιότητες, οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, βιοενεργά πεπτίδια, παραπροϊόντα ζυθοποίησης

ABSTRACT

“Unraveling the role of peptides in beer and brewing by-products”

Samanidou Kleoniki

Department of Wine, Vine & Beverage Sciences

University of West Attica, 2023

Beer is one of the most well-known alcoholic beverages and while it dates back 6000-8000 years, it is still a complex product, and its production is increasing. As the beer industry has evolved over the years and microbreweries have become more popular, the characteristics of beer have also changed, and consumer demands have increased. A detailed knowledge of the ingredients of beer and their role can contribute to the production of better-quality products. After an extensive literature search, this work aimed to investigate the role of peptides present in beer and brewing by-products, a class of compounds that has not been sufficiently investigated. Focusing on the literature of the last years, the aim was to collect data on which peptides have been identified as being involved during the production of beer, the methods that have been used, the role that peptides have in the physicochemical and organoleptic characteristics of the final product, as well as and for the bioactivity displayed by peptides from brewing by-products.

Beer consists of more than approximately 400 different compounds derived from the raw material or formed as products of yeast metabolism or biochemical transformations during malting, fermentation, and maturation. Beer contains 0.2-0.6 g of polypeptides/100 mL, which mainly come from barley proteins, while a smaller percentage also comes from yeast. Until recently, separating small peptides from a large excess of amino acids presented various difficulties. Therefore, although it was already known that a large number of peptides are digested during fermentation, very little was known about the peptides. It is now known that polypeptides play an important role in the foaming of beer, but also in the mouthfeel.

Recently, bioactive peptides have been found in beer, while peptides with a number of bioactive properties, such as antihypertensive, antioxidant, etc., are produced from brewing by-products, derived from barley [BSG (Brewer's Spent Grain)], hops [BSH (Brewer's Spent Grain) Hops]) and yeasts [BSY (Brewer's Spent Yeast)]. These three classes of by-products are rich in proteins that can be hydrolyzed and produce bioactive peptides. In the future, it would be of research interest to further investigate the polypeptides associated with the appearance of haziness in beer, to find more peptide sequences that enhance the quality of the foam and how they can be used to produce better quality beers. Finally, the isolation of bioactive peptides from brewing by-products could have applications in the production of biofunctional foods or pharmaceuticals.

Keywords: beer, proteins, peptides, physicochemical properties, organoleptic characteristics, bioactive peptides, by-products

Πίνακας περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	iii
ABSTRACT	iv
Κατάλογος Πινάκων.....	vii
Κατάλογος Εικόνων.....	viii
Συντμήσεις, ακρωνύμια, σύμβολα και ορισμοί	ix
1. Εισαγωγή και σκοπός της Εργασίας	1
1.1 Σκοπός εργασίας.....	1
1.2 Ιστορικά στοιχεία.....	1
1.3 Παραγωγή Ζύθου στην Ευρωπαϊκή Ένωση – Στατιστικά στοιχεία.....	5
2. Παραγωγή μύρας	9
2.1 Τα βασικά στάδια παραγωγής μύρας	9
Βυνοποίηση	10
Ζυθοποίηση	10
2.2 Πρώτες ύλες για την παρασκευή μύρας	11
Το νερό.....	11
Ο λυκίσκος	12
Η βύνη.....	14
Η ζύμη	16
3. Σύσταση Μύρας	21
Πρωτεΐνες - πολυπεπτίδια.....	21
Άλλα συστατικά της μύρας.....	23
4. Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά μύρας	25
Άρωμα-γεύση (flavour).....	26
Εμφάνιση: διαύγεια, χρώμα, αφρός	27
Χρώμα	27
Διαύγεια.....	28
Αφρός.....	28
5. Πεπτίδια και μύρα	31
5.1 Πεπτίδια – ορισμός.....	31
5.2 Πεπτίδια στη μύρα	32
5.3 Μέθοδοι διαχωρισμού / προσδιορισμού πεπτιδίων στη μύρα.....	33

6. Ρόλος των πεπτιδίων στην μύρα	38
6.1 Ρόλος πεπτιδίων στη ζύμωση	38
6.2 Ρόλος πεπτιδίων στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της μύρας	41
6.2.1 Ρόλος πεπτιδίων στον αφρισμό.....	41
6.2.2 Ρόλος των πεπτιδίων στην αίσθηση στόματος της μύρας.....	45
6.3 Πεπτίδια με βιολογική δράση	46
7. Ρόλος των πεπτιδίων σε παραπροϊόντα ζυθοποίησης	49
7.1 Βιοδραστικά Πεπτίδια από Υποπροϊόντα Ζύμης / BSY – Brewer’s Spent Yeast.....	51
7.2 Βιοδραστικά Πεπτίδια από Υποπροϊόντα Κριθαριού / BSG – Brewer’s Spent Grain	55
Επίλογος	63
Βιβλιογραφία	65

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1. Το επίπεδο του μη μετουσιωμένου LTP1 («φυσικό») με το μετουσιωμένο LTP1 («αφρός») στη διαδικασία παραγωγής της μύρας.....	45
Πίνακας 2. Αλληλουχίες πεπτιδίων που απομονώθηκαν στην μύρα Tsingtao.	48

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1. Αύξηση της παγκόσμιας παραγωγή της μπίρας από το 1992-2002.	4
Εικόνα 2. Η παραγωγή μπίρας στις Ευρωπαϊκές χώρες.....	4
Εικόνα 3. Οικονομικά στοιχεία για την Ελλάδα (2018).	6
Εικόνα 4. Παγκόσμια παραγωγή μπίρας (2021).	7
Εικόνα 5. Ζυθοποιεία και νομαδικές ζυθοποιίες στην Ελλάδα (2023).	8
Εικόνα 6. Σχηματική απεικόνιση των σταδίων της παραγωγικής διαδικασίας της μπίρας.	9
Εικόνα 7. Τα βασικά συστατικά του ζύθου.	11
Εικόνα 8. Η ισομερίωση των α και β οξέων.	13
Εικόνα 9. Χημικός τύπος μονοτερπένιων.	14
Εικόνα 10. Τα ζυμώσιμα σάκχαρα της βύνης.	16
Εικόνα 11. Καμπύλη ανάπτυξης μικροοργανισμού.	16
Εικόνα 12. Ο μικροοργανισμός <i>S. cerevisiae</i> όπως φαίνεται από το μικροσκόπιο.	19
Εικόνα 13. Άδειασμα ζύθου σε ποτήρι προκαλώντας το σχηματισμό αφρού.	29
Εικόνα 14. Διαφορετικές μπίρες με διαφορετικές ποιότητες αφρού.	29
Εικόνα 15. Οι διαφορετικές ποιότητες αφρού.	30
Εικόνα 16. Παραδείγματα σχηματισμού διπεπτιδίων.	31
Εικόνα 17. Σχηματική απεικόνιση των αναλυτικών μεθόδων που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των διαφόρων συστατικών της μπίρας.....	37
Εικόνα 18. Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας ζυθοποίησης και της εξαγωγής των υποπροϊόντων BSG, BSH και BSY.	50

Συντμήσεις, ακρωνύμια, σύμβολα και ορισμοί

ATP	Τριφωσφορική αδενοσίνη
EMP	Μονοπάτι Embden-Meyerhof-Parnas
G-6P	6-φωσφορική γλυκόζη
GA-3P	3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη
TCA	2,4,6-τριχλωροανισόλη
DEAE	Διαιθυλαμινο-αιθυλοκυτταρίνη
HPLC	High Performance Liquid Chromatography - Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης
MS/MS	Mass Spectrum - Φασματομετρία μάζας
ns-LTP1	Non-specific Lipid Transfer Protein
CE	Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (Capillary Electrophoresis)
ESI	Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό
LC	Liquid Chromatography - Υγρή χρωματογραφία
QTOF	Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
ACE	Angiotensin-Converting Enzyme - Ένζυμο μετατροπής της αγγειοτενσίνης
DPP-IV	Διπεπτιδυλική πεπτιδάση IV
GLP-1	Glucagon-like peptide-1 - πεπτιδική ορμόνη που μοιάζει με τη γλυκαγόνη
BSG	Brewer's Spent Grain – Παραπροϊόντα ζυθοποίησης από κριθάρι
BSH	Brewer's Spent Hops – Παραπροϊόντα ζυθοποίησης από λυκίσκο
BSY	Brewer's Spent Yeast – Παραπροϊόντα ζυθοποίησης από ζύμη

1. Εισαγωγή και σκοπός της Εργασίας

1.1 Σκοπός εργασίας

Καθώς η βιομηχανία του ζύθου με τα χρόνια έχει εξελιχθεί και οι μικροζυθοποιίες έχουν γίνει πιο δημοφιλείς, τα χαρακτηριστικά της μύρας έχουν επίσης αλλάξει και οι απαιτήσεις των καταναλωτών αυξάνονται. Η λεπτομερής γνώση των συστατικών της μύρας και του ρόλου που καθένα από αυτά διαδραματίζει, μπορεί να συμβάλει στην παραγωγή ποιοτικότερων προϊόντων. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν μέσα από βιβλιογραφική αναζήτηση, η διερεύνηση του ρόλου των πεπτιδίων που απαντώνται στην πορεία της ζυθοποίησης, μιας κατηγορίας ενώσεων που δεν έχει εκτενώς ερευνηθεί. Εστιάζοντας στην βιβλιογραφία των τελευταίων ετών, στόχος ήταν η συλλογή δεδομένων για το ποια πεπτίδια έχουν εντοπιστεί/ταυτοποιηθεί ότι συμμετέχουν κατά την παραγωγή του ζύθου και σε ποια στάδια, των μεθόδων που έχουν χρησιμοποιηθεί, του ρόλου που έχουν τα πεπτίδια στα φυσικοχημικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος, καθώς και για τη βιοδραστικότητα που εμφανίζουν σε παραπροϊόντα ζυθοποίησης.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία αρχικά παρουσιάζονται κάποια ιστορικά και στατιστικά στοιχεία ως προς την παραγωγή του ζύθου, έπειτα γίνεται αναφορά στα κύρια συστατικά παρασκευής του ζύθου, με ειδικότερη αναφορά στα πολυπεπτίδια και πώς αυτά έχει βρεθεί ότι επηρεάζουν τόσο φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του ζύθου, όπως είναι ο αφρισμός όσο και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Επισημαίνονται επίσης τεχνικές που αναφέρονται στην βιβλιογραφία να χρησιμοποιούνται για την ανάλυση πεπτιδίων και τέλος γίνεται αναφορά στα παραπροϊόντα ζυθοποίησης και τη βιοδραστικότητα που έχει αποδειχθεί να έχουν πεπτίδια που έχουν απομονωθεί από αυτά.

1.2 Ιστορικά στοιχεία

Ο ζύθος αποτελεί ένα από τα πιο γνωστά αλκοολούχα ποτά και το τρίτο πιο γνωστό ποτό μετά το νερό και το τσάι που καταναλώνεται ευρέως, σε ολόκληρο τον κόσμο. Παρόλο που η ζυθοποιία χρονολογείται πίσω 6000-8000 χρόνια, ο ζύθος είναι τόσο πολύπλοκο

προϊόν που εξακολουθεί να αποτελεί πρόκληση ως προς τον προσδιορισμό των συστατικών του. Ευρήματα ζυμωμένων πολτών σιτηρών υπάρχουν από το 13.000 π.Χ., ενώ από το 7.000 π.Χ στην Κίνα χρησιμοποιούσαν ρύζι, μέλι, σταφύλια και άλλα φρούτα για την παραγωγή ζυμωμένων ποτών. Η παρασκευή της πρώτης υποτυπώδης μορφής μπύρας από σιτηρά πραγματοποιήθηκε το 6.000 π.Χ. από τους κατοίκους της Μεσοποταμίας, ενώ οι Σουμέριοι παρασκεύαζαν ήδη 16 διαφορετικά είδη ζύθου. Το 1.730 π.Χ., οι Βαβυλώνιοι αύξησαν τα είδη σε 20 και εφάρμοσαν αυστηρή νομοθεσία για την παραγωγική διαδικασία με τον Κώδικα Χαμουραμί. Ήταν οι πρώτοι που χρησιμοποίησαν τον λυκίσκο στην παραγωγική διαδικασία. Οι Αιγύπτιοι χρησιμοποιούσαν ψωμί από κριθάρι ή σιτάρι για την παρασκευή του ζύθου.

Παρατηρήθηκε από πολύ νωρίς, ότι η μπύρα ήταν απαλλαγμένη από επικίνδυνα μικρόβια και ότι το νερό, που ήταν συχνά διαθέσιμο σε λιγότερο τέλεια κατάσταση, μπορούσε να καθαριστεί με τη διαδικασία της ζύμωσης και τα φυσικά οξέα που παράγονται (Kunze, 2004). Για πολλούς αιώνες, λοιπόν, η μπύρα, και όχι το νερό, ήταν το ξεδιψαστικό μέσο τόσο για τους άρχοντες όσο και για τον λαό. Στην Ευρώπη η μπύρα αποτελούσε το αγαπημένο ποτό των Γερμανικών φυλών, των Σκυθών και των Κέλτων. Παρασκευαζόταν καθημερινά από τις γυναίκες, αφού στους αρχαίους πολιτισμούς η μαγειρική και η ζυθοποιία ήταν γυναικεία δουλειά.

Η αλλαγή σε βιομηχανία ζυθοποιίας πραγματοποιήθηκε από ζυθοποιίες χριστιανικών ιδρυμάτων (μοναστήρια), όπου η μπύρα παραγόταν για δική τους κατανάλωση, αλλά και άλλων, έναντι πληρωμής. Στην Γερμανία, τον Μεσαίωνα, υπήρχε σημαντική διαφορά ανάμεσα στις συνθήκες παραγωγής της μπύρας στον Βορρά και στον Νότο. Στον Βορρά, η ζυθοποιία ήταν δικαίωμα του πολίτη και εμφανιζόταν στη Βρέμη, το Αμβούργο ή το Άινμπεκ. Στη Νότια Γερμανία, η μετάβαση από την οικιακή ζυθοποιία στη βιομηχανική, έλαβε χώρα σταδιακά τον 14^ο αιώνα. Στις πόλεις, άρχισε να ασκείται επίσημη επιρροή στην ανάπτυξη της βιομηχανίας, αφού το δικαίωμα της παρασκευής της μπύρας παραχωρήθηκε ως προνόμιο ενός πρίγκιπα. Αυτό είναι ιδιαιτέρως σημαντικό αφού στις αρχές του Μεσαίωνα στη Νότια Γερμανία η παρασκευή ζύθου σε βιομηχανικό επίπεδο έγινε πολύ διαδεδομένη. Τον 15^ο αιώνα καθιερώθηκε η εμπορική θέση του ζυθοποιού, αλλά στο νότο λόγω μεγάλου αριθμού κανονισμών παρέμεινε περιορισμένη. Ολόκληρη η οργάνωση του εμπορίου, από την αγορά

των πρώτων υλών μέχρι την παραγωγή του τελικού προϊόντος και την πώλησή του, υπάγονταν στους δημοτικούς νόμους. Αυτοί, περιλάμβαναν διάφορους κανονισμούς για την τιμή και την ποιότητα της μαγιάς, φροντίζοντας τα συμφέροντα των αρτοποιιών που προμηθεύονταν τη μαγιά από τους ζυθοποιούς. Οι ζυθοποιοί είχαν για πολλά χρόνια το μονοπώλιο στην παραγωγή της μαγιάς.

Παράλληλα, ελλείψεις πρώτων υλών, ως αποτέλεσμα κακής συγκομιδής και άλλων συνθηκών, οδήγησαν στη χρήση διαφορετικών υλικών. Έτσι, συχνά ο λυκίσκος αντικαθίσταται από άλλα αρωματικά φυτά, ενώ χρησιμοποιούνταν επίσης δημητριακά παρασκευής ψωμιού ή φθηνότερη βρόμη. Ως αποτέλεσμα παρατηρήθηκαν διάφορες επιπτώσεις στην υγεία. Για την αποφυγή τέτοιων προβλημάτων, ορίστηκε νόμος σύμφωνα με τον οποίο για την παραγωγή της μύρας μπορούσε να χρησιμοποιηθεί μόνο βύνη, λυκίσκος και νερό. Ο βαυαρικός αυτός νόμος περί καθαρότητας, υπογράφηκε το 1516 από τον Γουλιέλμο Δ και τον Λουδοβίκο Χ και από το 1906 απέκτησε απεριόριστη νομική ισχύ σε ολόκληρη τη Γερμανία.

Η πρώτη ατμομηχανή χρησιμοποιήθηκε στην παραγωγή της μύρας το 1846 στο Μόναχο. Ο Γάλλος Louis Pasteur (1860) ήταν αυτός που ανακάλυψε τη σύγχρονη μικροβιολογία και απέδειξε ότι οι διαδικασίες ζύμωσης αποδίδονται στις δραστηριότητες των μικροοργανισμών. Το έργο του Emil Christian Hansen (1883), κατά το οποίο ανέπτυξε τη μέθοδο για τον πολλαπλασιασμό μεμονωμένης ζύμης στο Εργαστήριο Carlsberg, βελτιώθηκε από τον Paul Lindner (1893) και οδήγησε στην παραγωγή ανοιχτόχρωμων ειδών μύρας και αντικατάσταση των σκουρόχρωμων Βαυαρικών. Έτσι, το 1842 στο Pilsen, δημιουργήθηκε η πρώτη μύρα τύπου Pilsner, η οποία εξαπλώθηκε σε ολόκληρη την Ευρώπη και το 1875, συστήθηκε στην αμερικάνικη αγορά ένας παρόμοιος τύπος μύρας, η Budweiser. Παράλληλα, αναπτύχθηκαν οι μύρες lager, οι οποίες αποτελούν μέχρι σήμερα την πλειοψηφία των εμπορικών σημάτων. Ως αποτέλεσμα αυτής της ανάπτυξης, ιδρύθηκε μεγάλος αριθμός βιομηχανικών ζυθοποιείων σε ολόκληρη την Ευρώπη και την Αμερική.

Year	World beer production		Annual change in %
	in Mio. hl	in Mio hl	
1992	1,163		
1993	1,190	27	2.32
1994	1,222	32	2.69
1995	1,248	26	2.12
1996	1,269	21	1.68
1997	1,295	26	2.05
1998	1,313	18	1.39
1999	1,365	52	3.96
2000	1,392	27	1.98
2001	1,424	32	2.30
2002	1,444	22	1.54
on average		28.3	2.18

Εικόνα 1. Αύξηση της παγκόσμιας παραγωγή της μύρας από το 1992-2002.
(Πηγή : Kunze, 2004)

Country	1993	1995	2002
Germany	116.0	117.0	108.3
Russia	24.5	17.7	70.2
Great Britain	54.9	58.8	56.6
Spain	24.3	25.3	27.8
Poland	16.7	15.2	26.0
Netherlands	20.4	23.1	24.8
France	18.3	18.3	18.1
Czech Republic	17.8	17.8	18.1
Belgium	14.2	14.5	15.7
Ukraine	14.0	5.7	14.9
Italy	11.7	12.0	12.6
Rumania	9.1	8.5	11.4
Ireland	6.9	7.4	9.1
Austria	9.8	9.7	8.7
Denmark	9.4	10.0	8.5
Hungary	7.8	7.8	7.4
Turkey	5.4	6.9	7.3
Portugal	6.8	6.9	7.1
Sweden	5.5	5.3	5.0
Yugoslavia	5.0	5.4	4.8
Slovakia	3.9	4.4	4.8
Bulgaria	4.2	4.7	3.9
Greece	4.1	4.1	4.5
Finland	4.4	4.4	4.1
Croatia	2.4	3.2	3.7
Switzerland	3.9	3.7	3.5
Lithuania	1.2	1.6	2.6
Slovenia	2.0	2.1	2.5
Norway	2.1	2.2	2.2
Total	435.9	430.7	504.8

Εικόνα 2. Η παραγωγή μύρας στις Ευρωπαϊκές χώρες. (Πηγή : Kunze, 2004)

1.3 Παραγωγή Ζύθου στην Ευρωπαϊκή Ένωση – Στατιστικά στοιχεία

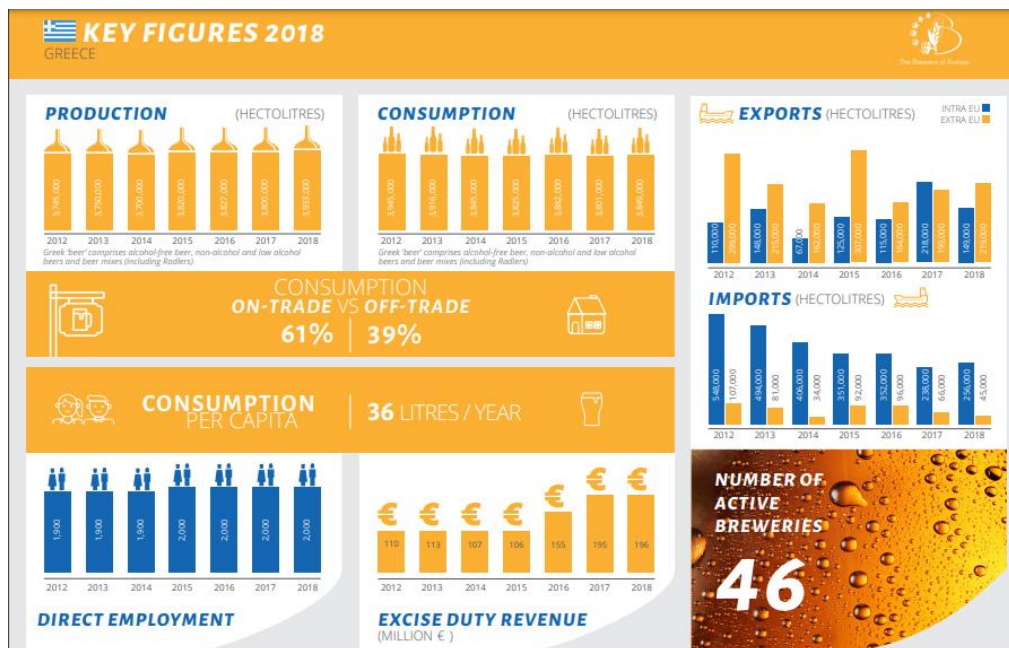
Σύμφωνα με τα στοιχεία της Eurostat, το 2020, η παραγωγή ζύθου στην Ευρωπαϊκή Ένωση (Ε.Ε) ήταν ισοδύναμη με 74 L ανά κάτοικο. Ακολουθεί η Πολωνία, η οποία κατέχει το 12% της συνολικής παραγωγής της Ε.Ε., με 3,8 δισ. λίτρα. Ακολουθούν η Ισπανία με 3,3 δισ. λίτρα ή 10%, η Ολλανδία (2,5 δισ. λίτρα, ή 8%), η Γαλλία (2,1 δισ. λίτρα, ή 7%), η Τσεχία (1,8 δισ. λίτρα, ή 6%) και η Ρουμανία (1,7 δισ. λίτρα ή 5%). Το 2020, ο μεγαλύτερος εξαγωγέας ζύθου στην Ε.Ε. ήταν η Ολλανδία. Οι εξαγωγές της έφτασαν τα 1,9 δισ. λίτρα ζύθου με αλκοόλ, αντιπροσωπεύοντας το 21% των συνολικών εξαγωγών ζύθου της Ε.Ε. (εντός και εκτός Ε.Ε.). Οι κυριότεροι προορισμοί για τις εξαγωγές ζύθου, σε χώρες εκτός Ε.Ε., ήταν οι Ηνωμένες Πολιτείες (895 εκατομμύρια λίτρα ή το 22% των συνολικών εξαγωγών μπύρας εκτός Ε.Ε.) και το Ηνωμένο Βασίλειο (881 εκατομμύρια λίτρα ή 21%).

Ο βρετανικός ζύθος, καταγράφει τις μεγαλύτερες εισαγωγές στην Ε.Ε. (268 εκ. λίτρα ή το 51% όλων των εισαγωγών ζύθου εκτός Ε.Ε.). Δεύτερη σε εισαγωγές έρχεται ο μεξικάνικος ζύθος, με 95 εκ. λίτρα ζύθου ή 18%, αντίστοιχα. Ακολουθεί το Βέλγιο, με 1,7 δισεκ. λίτρα ζύθου (19%), η Γερμανία με 1,5 δισ. λίτρα (17%), η Γαλλία και η Τσεχία (0,5 δισεκ. λίτρα ή 6%). Το 2020, στην Ε.Ε. παρήχθησαν σχεδόν 32 δισεκατομμύρια λίτρα ζύθου με αλκοόλ και 1,4 δισεκατομμύρια λίτρα ζύθου που περιείχαν λιγότερο από 0,5% αλκοόλ ή δεν είχαν καθόλου αλκοόλ. Σε σύγκριση με το 2019, η παραγωγή ζύθου με αλκοόλ μειώθηκε κατά 8%, ενώ η παραγωγή ζύθου χωρίς αλκοόλ παρέμεινε σταθερή.

Σύμφωνα με τη Eurostat, περίπου ένας στους τέσσερις ζύθους με αλκοόλ προέρχονται από τη Γερμανία, γεγονός που την κάνει τον κορυφαίο παραγωγό της Ε.Ε, με 7,5 δισεκατομμύρια λίτρα (24% της συνολικής παραγωγής της Ε.Ε.).

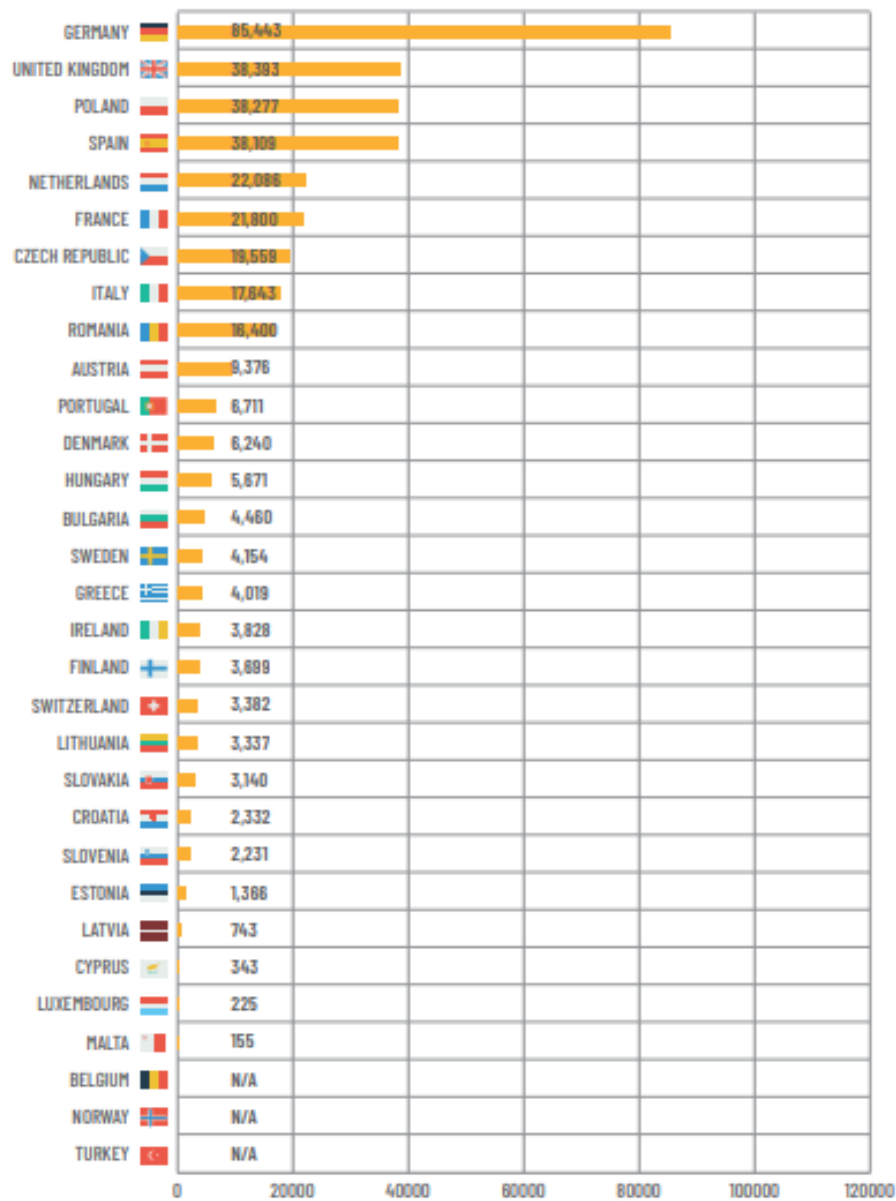
Στην Ελλάδα, οι αναλογίες διάθεσης της μπύρας γίνεται μέσω δύο βασικών καναλιών διανομής: Το λιανικό εμπόριο ή αλλιώς «ζεστή αγορά», δηλαδή σούπερ μάρκετ, κάβες κ.ά. και τα τελικά σημεία κατανάλωσης ή «κρύα αγορά», δηλαδή εστιατόρια, καφετέριες, μπαρ κ.ά. Η «κρύα αγορά» υπερτερεί πλέον ελαφρά της πρώτης (56% κρύα αγορά, 44% ζεστή αγορά), ενώ πριν από λίγα χρόνια υπερτερούσε κατά 15 περίπου μονάδες. Η κατά κεφαλή κατανάλωση στην Ελλάδα (2018) υπολογίζεται σε 36 λίτρα τον χρόνο και παραμένει σε

χαμηλά επίπεδα σε σχέση με την κεντρική Ευρώπη, η οποία καταναλώνει υπερδιπλάσια ποσότητα μύρας (75 λίτρα ετησίως). Οι εισαγωγές μύρας, λόγω των ιδιαίτερων οικονομικών συνθηκών, το 2013 και το 2014 υποχώρησαν αισθητά, κάτι που συνεχίστηκε μέχρι και το 2018.



Εικόνα 3. Οικονομικά στοιχεία για την Ελλάδα (2018).
(Πηγή: Ελληνική Ένωση Ζυθοποιών)

Παρ' όλα αυτά, οι εισαγωγές ζύθου παραμένουν περίπου υπερδιπλάσιες σε σχέση με τις εξαγωγές της Ελληνικής μύρας. Σύμφωνα με στοιχεία της Ευρωπαϊκής Ένωσης Ζυθοποιών, η συνολική κατανάλωση μύρας στην Ελλάδα (εγχώρια παραγωγή και εισαγωγές) υπολογίζεται σε 3.850.000 εκατόλιτρα, δηλαδή μόλις το 1,09% της κατανάλωσης μύρας στην Ευρώπη (352.536.000 εκατόλιτρα).



Εικόνα 4. Παγκόσμια παραγωγή μύρας (2021).
(Πηγή: Ελληνική Ένωση Ζυθοποιών)

Τέλος, το 2015, με τη συγχώνευση της «Μύθος» και της «Ολυμπιακής ζυθοποιίας», η έντονη αναδιανομή μεριδίων στην Ελληνική αγορά έγινε ακόμα πιο αισθητή. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα, δύο μεγάλες εταιρίες που λειτουργούν στην Ελλάδα από ξένους επενδυτές (Heineken, Carlsberg) να συγκεντρώνουν μερίδια που ξεπερνούν το 80% της Ελληνικής αγοράς. Στο συνδικαλιστικό πεδίο υπάρχει σαφής διαχωρισμός μεγάλων και μικρών

ζυθοποιείων. Στην πρώτη κατηγορία, η Ελληνική Ένωση Ζυθοποιών, μέλος της Ευρωπαϊκής Ένωσης Ζυθοποιών, περιλαμβάνει τις δύο πρώτες ζυθοποιίες της Ελληνικής αγοράς (Αθηναϊκή Ζυθοποιία/Heineken και Ολυμπιακή Ζυθοποιία/Calsberg), με σημαντική όμως προοπτική να ενταχθούν και ορισμένες επιχειρήσεις από τις Μικροζυθοποιίες, όπως η Septem. Οι υπόλοιπες Μικροζυθοποιίες, συμμετέχουν στον ΣΜΑΖΕ (Σύνδεσμος Μικρών Ανεξάρτητων Ζυθοποιών Ελλάδος).



Εικόνα 5. Ζυθοποιεία και νομαδικές ζυθοποιίες στην Ελλάδα (2023).
(Πηγή: <https://www.beerologio.gr/p/greek-breweries.html>)

2. Παραγωγή μύρας

2.1 Τα βασικά στάδια παραγωγής μύρας

Η διαδικασία παραγωγής της μύρας αποτελείται από τα εξής στάδια : βυνοποίηση, άλεση, πολτοποιήση-διήθηση, βρασμό, ζύμωση και ωρίμανση. Συνδέεται μάλιστα με τρεις διαδοχικές βιοχημικές διεργασίες: τον σχηματισμό ενζύμων, τη διάσπαση του αμύλου και τη ζύμωση των σακχάρων σε διοξείδιο του άνθρακα και αλκοόλη. Ο κύριος σκοπός του αμύλου, είναι να δώσει τα σάκχαρα ώστε να αναπτυχθούν οι ζύμες και να δώσουν αλκοόλ και αρωματικές ενώσεις, ενώ παράλληλα παράγονται πρωτεΐνες και πεπτίδια, που εξυπηρετούν πολλές ιδιότητες του ζύθου.



Εικόνα 6. Σχηματική απεικόνιση των σταδίων της παραγωγικής διαδικασίας της μύρας.

(Πηγή: <https://blogs.sch.gr/gymneapo/2022/02/10/pos-ginetai-i-mpyra-toy-gianni-christoylia-v-taxi/>)

Βυνοποίηση

Πρόκειται για τη διαδικασία παραγωγής της βύνης. Κύριος στόχος της, είναι ο σχηματισμός ενζύμων (α και β-αμυλάση, πρωτεάσες κ.ά.) στους σπόρους των δημητριακών. Τα στάδια παρασκευής της βύνης είναι τα εξής:

1. Παραλαβή και διαλογή της πρώτης ύλης.
2. Ακολουθεί το στάδιο της διαβροχής.
3. Η φάση της εκβλάστησης αφορά την ενεργοποίηση και τον σχηματισμό ενζύμων (αμυλάσες, πρωτεάσες, γλυκανάσες, πεντοζανάσες, φωσφατάσες κ.ά.) στο σπόρο, με τη μικρότερη δυνατή απώλεια αποθησαυριστικών ουσιών.
4. Το τελικό στάδιο είναι η ξήρανση και η αποθήκευση της βύνης.

Ζυθοποίηση

Σε αυτή τη φάση, υπάρχουν αρκετές διαφοροποιήσεις, ανάλογα με τον τύπο του παραγόμενου ζύθου και τις παραδοσιακές τεχνικές μιας χώρας. Τα βασικά στάδια είναι τα εξής:

1. Άλεση των κόκκων, με σκοπό να αυξηθεί η ειδική επιφάνεια αυτών, να δράσουν τα ένζυμα και να αυξηθεί ο βαθμός εκχυλισιμότητας των ουσιών.
2. Πολτοποίηση, όπου τα ένζυμα αποικοδομούν το άμυλο και τις πρωτεΐνες και τα μετατρέπουν σε ζυμώσιμα συστατικά.
3. Ακολουθεί η εκχύλιση ή διαύγαση, κατά την οποία απομακρύνονται τα στερεά υπολείμματα της βύνης. Επιπλέον, προστίθεται κατάλληλη ποσότητα νερού, ώστε να παραληφθεί βυνογλεύκος με την επιθυμητή συγκέντρωση σακχάρων.
4. Το βυνογλεύκος στη συνέχεια εισέρχεται για βρασμό, με ταυτόχρονη προσθήκη λυκίσκου. Όταν ολοκληρωθεί ο βρασμός, τα υπολείμματα του λυκίσκου και οι πρωτεΐνες, απομακρύνονται από το βρασμένο ζυθογλεύκος μέσω φυγοκέντρησης (Fix, 1999).
5. Ψύξη του ζυθογλεύκου σε θερμοκρασία εμβολιασμού, προσθήκη οξυγόνου και μερική απομάκρυνση του ψυχρού θολώματος.

6. Εμβολιασμός του ψυχρού γλεύκους, σε ασηπτικές συνθήκες, με κατάλληλη ποσότητα ζύμης.
7. Ακολουθεί η ζύμωση, ωρίμανση, η σταθεροποίηση, το φιλτράρισμα και τέλος η εμφιάλωση.

2.2 Πρώτες ύλες για την παρασκευή μπίρας

Τα κύρια συστατικά που απαιτούνται για την παρασκευή του ζύθου είναι το νερό, ο λυκίσκος, η πηγή αμύλου και η ζύμη (Εικόνα 7). Η ποιότητα αυτών των τεσσάρων πρώτων υλών επηρεάζουν την ποιότητα του τελικού προϊόντος. Η γνώση των ιδιοτήτων των πρώτων υλών και η επίδρασή τους στην διαδικασία παραγωγής και στο τελικό προϊόν, αποτελεί τη βάση για την επεξεργασία τους.



Εικόνα 7. Τα βασικά συστατικά του ζύθου: νερό, λυκίσκος, πηγή αμύλου και ζύμη.
(Πηγή: Beeroskopio.com)

Το νερό

Ποσοτικά, η πιο σημαντική πρώτη ύλη είναι το νερό, καθώς αποτελεί το 90% του όγκου του ζύθου. Αυτό, επηρεάζει τον χαρακτήρα και την ποιότητα της μπίρας, σε διάφορα στάδια επεξεργασίας, λόγω του pH, της αλκαλικότητας, των ιόντων, του μικροβιακού φορτίου και ενδεχομένως κάποιων παραπροϊόντων απολύμανσης. Ορισμένες μπίρες έχουν χαρακτηριστική γεύση λόγω του νερού της περιοχής που χρησιμοποιούν, π.χ. Guinness-σκληρό νερό (Δουβλίνο, Ιρλανδία) και Pilsner Urquell-μαλακό νερό (Πίλσεν, Τσεχία). Επιπλέον, το νερό χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό και την απολύμανση, καθώς και σε πολλές άλλες διεργασίες στη ζυθοποιία.

Τα βασικά συστατικά του νερού που σχετίζονται με την παραγωγή της μύρας είναι τα ιόντα ασβεστίου, μαγνησίου, θειικά, χλωριώντα, νατρίου και το όξινο ανθρακικό. Η περιεκτικότητα του νερού στα ιόντα ασβεστίου, μαγνησίου, καθορίζει και την σκληρότητα του. Τα ιόντα αυτά, επηρεάζουν και το pH του γλεύκος και μπορούν να δώσουν διαφορετικά στοιχεία στη γεύση του ζύθου, ανάλογα με τη συγκέντρωσή τους.

Από τα παραπάνω, τα ιόντα που σχετίζονται με το pH είναι αυτά του μαγνησίου, ασβεστίου και τα όξινα ανθρακικά. Τα δυο πρώτα, προκαλούν τη μείωση του pH, καθώς αντιδρούν με όξινο φωσφορικό ανιόν και παράγονται ιόντα υδρογόνου, ενώ το όξινο ανθρακικό ιόν, κατά τη διάρκεια του βρασμού, αντιδρά με υδρογονοκατιόντα και σχηματίζει ανθρακικό οξύ το οποίο εκλύεται ως διοξείδιο του άνθρακα, που έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του pH.

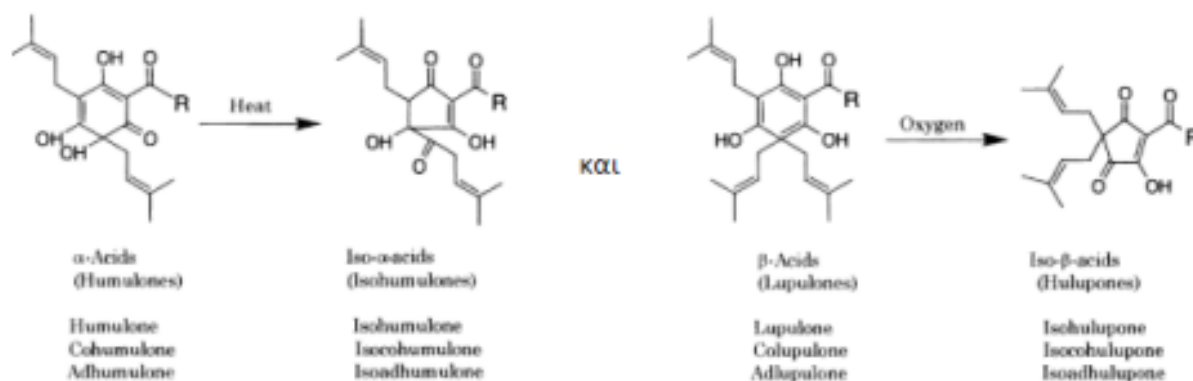
Η τιμή του pH στο γλεύκος είναι ιδιαίτερα σημαντική, γιατί επηρεάζει τη δράση των ενζύμων που μετατρέπουν το άμυλο σε ζυμώσιμα σάκχαρα. Επίσης, το pH του νερού επηρεάζει την εκχυλισιμότητα των ταννικών και φαινολικών ουσιών από το φλοιό της βύνης. Ένα ακόμη στάδιο της ζυθοποίησης το οποίο εξαρτάται από το pH είναι ο βρασμός. Οι υψηλές τιμές pH ευνοούν τις αντιδράσεις που πραγματοποιούνται κατά τη διάρκειά του βρασμού και καθορίζουν το χρώμα, τα αρωματικά στοιχεία καθώς και την ενσωμάτωση του λυκίσκου. Τα υπόλοιπα ιόντα σχετίζονται με το σώμα, τη γεύση και την ξηρότητα της μύρας. Όσον αφορά τη γεύση, τα ιόντα αυτά ανάλογα με τη συγκέντρωσή τους, μπορούν να προσδώσουν γλυκιά, αλμυρή, ξινή ή ακόμη και πικρή αίσθηση (Lewis, 2006).

Ο λυκίσκος

Πρόκειται για το πιο ευρέως μελετημένο συστατικό και θεωρείται ένα από τα βασικότερα αρωματικά και γευστικά συστατικά της μύρας. Ταυτόχρονα, έχει εξαιρετική δράση ως αντιμικροβιακός παράγοντας, δηλαδή δρα και ως συντηρητικό στην μύρα (Schönberger et al., 2011). Υπάρχουν δύο κατηγορίες λυκίσκου που χρησιμοποιούνται στη ζυθοποιία: ο αρωματικός και ο πικρικός λυκίσκος. Και οι δύο αυτοί τύποι, μπορούν να προστεθούν στη μύρα κατά την παραγωγική διαδικασία είτε στον βρασμό ή και μετά τη

ζύμωση. Η ποιότητα του λυκίσκου που θα χρησιμοποιηθεί είναι πολύ σημαντική και για τον λόγο αυτό χρησιμοποιούνται, ως επί το πλείστον, επεξεργασμένα προϊόντα σε μορφή σφαιριδίων ή εκχυλίσματος. Το πλεονέκτημα αυτών των σκευασμάτων, είναι η ανθεκτικότητα στην οξείδωση και η συμπαγή μορφή τους. Επιπλέον, μπορούν να αποθηκευτούν και είναι πιο τυποποιημένα ως προς τη σύστασή τους (Lewis et al., 2006). Η βασική πικράδα που προσδίδεται στην μύρα προέρχεται από τα α- και β-οξέα (Schönberger et al., 2011). Τα α-οξέα είναι ελάχιστα διαλυτά σε κρύο νερό και κατά τη διάρκεια του βρασμού του γλεύκους ισομεριώνονται σε ισο-α-οξέα. Αυτή η θερμική μετατροπή, είναι απαραίτητη για την αύξηση της διαλυτότητας και για την ενεργοποίηση της πικράδας του λυκίσκου. Αυτό συμβαίνει καθώς τα ισο-α-οξέα είναι εννιά φορές πιο πικρά από τα α-οξέα (Lewis et al., 2006).

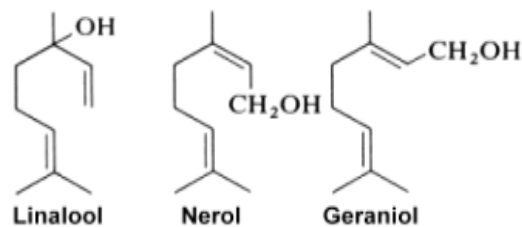
Τα α και β-οξέα, είναι αυτά που προσδίδουν την πιο έντονη πικράδα και στα οποία οφείλεται το 67% της πικράδας ενός ζύθου (Michel et al., 2016). Τα ισο-α-οξέα είναι υδρόφοβα μόρια και λόγω αυτού, μεταναστεύουν στις φυσαλίδες του αφρού σχηματίζοντας σύμπλοκα με επιφανειοδραστικές πρωτεΐνες. Αυτό, έχει ως αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση του αφρού (Yonezawa et al., 2002).



Εικόνα 8. Η ισομερίωση των α και β οξέων.

(Πηγή: Lewis et al., 2006)

Όσον αφορά τα αρώματα, προέρχονται από ενώσεις όπως μονοτερπένια καθώς και άλλες πτητικές ουσίες. Οι κυριότερες από αυτές τις ουσίες είναι η λιναλοόλη (5μg/L, άρωμα λεβάντας), η β-κιτρονελλόλη (8μg/L, άρωμα λεμονιού και λάιμ), η γερανιόλη (6μg/L άρωμα τριαντάφυλλου) και η νερόλη (0.5mg/L, άρωμα τριαντάφυλλου και κίτρου) (Michel et al., 2016,b). Οι ζυμομύκητες μπορούν να μετασχηματίσουν αυτές τις ενώσεις και να αλλάξουν τις αναλογίες μεταξύ αυτών των πέντε βασικών μονοτερπενίων, αλλάζοντας έτσι εντελώς το αρωματικό προφίλ της μπίρας (Yonezawa et al., 2002).



Εικόνα 9. Χημικός τύπος μονοτερπενίων.

(Πηγή: Schönberger et al., 2011)

Στον λυκίσκο μπορεί να οφείλεται και ένα δυσάρεστο άρωμα. Σχηματίζεται μετά από οξείδωση των ρητινών το ισοβαλερικό οξύ και αποτελεί και μια από τις χαρακτηριστικές χημικές ενώσεις που παράγει ο βρετανομύκητας (Carr, 2016).

Η βύνη

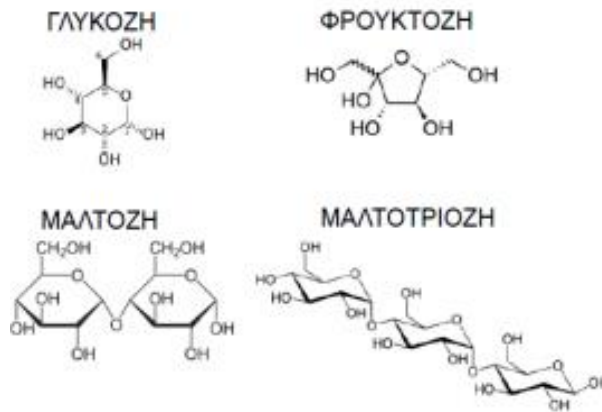
Η βύνη είναι προϊόν που προκύπτει από την κατεργασία του κριθαριού ή άλλων δημητριακών και χρησιμοποιείται για την παραγωγή και άλλων τροφίμων πέρα από τον ζύθο. Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη βύνη είναι από το κριθάρι, το οποίο προσδίδει πρωτεΐνες και βιταμίνες. Οι περισσότερες πρωτεΐνες, πεπτίδια και αμινοξέα που περιέχονται στο ζύθο, προέρχονται από ενώσεις που υπάρχουν στο κριθάρι. Αυτό, έχει υψηλή περιεκτικότητα σε άμυλο και σε ένζυμα σε σχέση με τα υπόλοιπα δημητριακά. Πριν χρησιμοποιηθεί στο

ζυθοποιείο πρέπει να μετατραπεί σε βύνη. Σε αντίθεση με τα φρούτα και το μέλι που έχουν ελεύθερα ζυμώσιμα σάκχαρα, το κριθάρι και άλλα δημητριακά, απαιτούν τη διαδικασία της βυνοποίησης και της πολτοποίησης για την υδρόλυση του αμύλου σε απλά σάκχαρα. Σε ορισμένες χώρες, κάποια μη βυνοποιημένα δημητριακά, όπως ο αραβόσιτος, το ρύζι, το σόργο κ.ά. χρησιμοποιούνται ως συμπληρώματα. Στη Γερμανία, χρησιμοποιείται πολύ και το σιτάρι για την παραγωγή εξαιρετικής ποιότητας ζυμωμένης μύρας τύπου Weiss. Σύμφωνα με τους Lewis et al. (2006), το κριθάρι που χρησιμοποιείται για την παρασκευή βύνης πρέπει να πληροί ορισμένες προϋποθέσεις:

1. χαμηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες (<11% -13%)
2. απαλλαγμένο από ξένα υλικά
3. μεγάλη βιωσιμότητα (υψηλή ενεργότητα των ενζύμων που είναι υπεύθυνα για την εκβλάστηση του σπόρου) (τουλάχιστον 96%)
4. χαμηλό σε υγρασία (12% -14%)

Η βύνη χωρίζεται σε δύο κατηγορίες: τη βύνη βάσης, όπως ονομάζεται το κύριο μέρος της βύνης και τις συμπληρωματικές βύνες. Η βύνη βάσης είναι πλούσια σε ένζυμα, τα οποία μετατρέπουν το άμυλο σε ζυμώσιμα και μη ζυμώσιμα σάκχαρα και σε θρεπτικά για τη ζύμη συστατικά (αμινοξέα, βιταμίνες και μέταλλα). Οι συμπληρωματικές βύνες είναι υπεύθυνες για το χρώμα, τη γεύση, και την υφή της μύρας (Lewis et al., 2006).

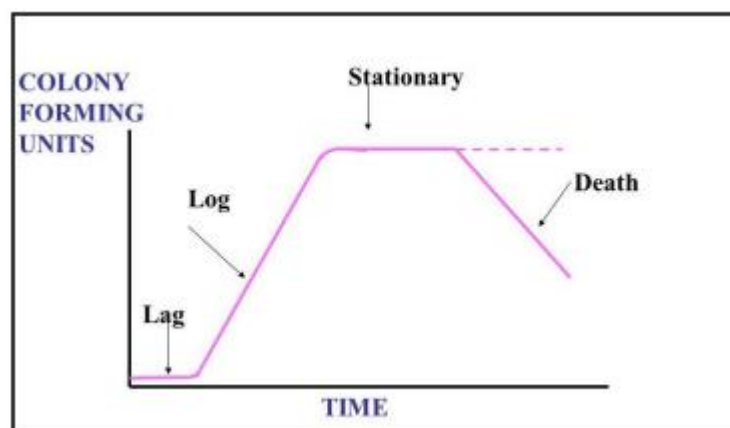
Κατά την ξήρανση της βύνης και κατά την διάρκεια του βρασμού, λαμβάνουν χώρα όλες οι χημικές αντιδράσεις που έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή του χαρακτηριστικού χρώματος και αρώματος της βύνης. Διαφορετικοί συνδυασμοί θερμοκρασίας, χρόνου και pH δημιουργούν αυτό το εύρος αρωμάτων (Mosher, 2006). Η βασικότερη αντίδραση που λαμβάνει χώρα κατά τα στάδια αυτά είναι η αντίδραση μη ενζυμικού μαυρίσματος (αντιδράσεις Maillard). Τέλος, στη βύνη περιέχονται πρωτεϊνικά συστατικά τα οποία σχηματίζουν και διατηρούν τον χαρακτηριστικό αφρό που σχηματίζεται στην μύρα (Lewis et al., 2006).



Εικόνα 10. Τα ζυμώσιμα σάκχαρα της βύνης.

Η ζύμη

Οι ζύμες είναι μονοκύτταροι μύκητες και αναπαράγονται με εκβλάστηση ή σχάση. Χωρίζονται σε ασκομύκητες και βασιδιομύκητες. Υπάρχουν πάνω από 100 γένη τέτοιων μυκήτων, τα οποία περιλαμβάνουν περισσότερα από 700 είδη (Jolly, et al., 2006). Η ανάπτυξη των διαφόρων ειδών ζύμης αποτελείται από τέσσερις φάσεις: τη λανθάνουσα φάση, τη φάση εκθετικής ανάπτυξης, τη στατική φάση και τη φάση θανάτου (Nissen, et al., 2003).



Εικόνα 11. Καμπύλη ανάπτυξης μικροοργανισμού.

Η ζύμη προστίθεται στο βυνογλεύκος και μέσω της ζύμωσης παράγεται ο ζύθος. Οι αλλαγές που καθορίζουν αυτή τη μετατροπή είναι οι εξής:

1. Η ζύμη καταναλώνει τα σάκχαρα και ταυτόχρονα παράγει αιθανόλη. Ως αποτέλεσμα απομακρύνεται η γλυκύτητα του γλεύκους.
2. Οι ζυμομύκητες παράγουν οξέα και προκαλούν τη μείωση του pH.
3. Παράγεται διοξείδιο του άνθρακα και προκαλείται η ενανθράκωση του γλεύκους.
4. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης σχηματίζεται ενός πλήθους μεταβολικών ουσιών, οι οποίες προκύπτουν σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις σε σχέση με τα βασικά παράγωγα της ζύμωσης.

Με τον τρόπο αυτό, τα αρώματα της βύνης και του λυκίσκου, που καθορίζουν το βυνογλεύκος, μετατρέπονται σε ένα πολύ πιο σύνθετο μίγμα ουσιών, χάρη στους ζυμομύκητες.

Οι ζυμομύκητες που χρησιμοποιούνται στη ζυθοποιία ανήκουν στο γένος *Saccharomyces*. Στη ζυθοποιία οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται κάτω από πολύ συγκεκριμένες συνθήκες. Οι συνθήκες αυτές είναι, η σχετικά χαμηλή θερμοκρασία, η απουσία οξυγόνου και οι πρακτικές ανακύκλωσης. Επιπλέον, πολύ σημαντικός παράγοντας είναι τα θρεπτικά συστατικά που προσφέρει η βύνη στους ζυμομύκητες. Δεν αρκεί ένα απλό διάλυμα σακχάρων για να πραγματοποιηθεί η ζύμωση, καθώς η ζύμη χρειάζεται άζωτο για να αναπτυχθεί. Ο ακριβής καθορισμός των συνθηκών αυτών και της ποιότητας των ζυμών, επιτρέπει στους ζυθοποιούς την παραγωγή ενός προϊόντος σταθερής ποιότητας (Lewis et al., 2006). Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, λοιπόν, ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται και πολλαπλασιάζεται καταναλώνοντας τα θρεπτικά συστατικά και τα σάκχαρα του υποστρώματος. Ως αποτέλεσμα, παράγει αιθανόλη, διοξείδιο του άνθρακα και δευτερογενείς μεταβολίτες.

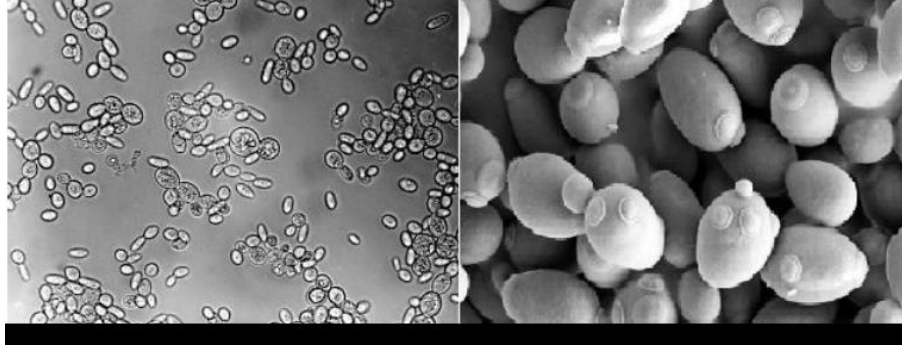
Υπάρχουν αρκετές μέθοδοι για τη μελέτη της ανάπτυξης των μικροοργανισμών, οι οποίες όμως δεν χρησιμοποιούνται κατά τη ζυθοποίηση σε κανονική κλίμακα, λόγω της καταβύθισης των μικροοργανισμών (Lewis et al., 2006). Οι ζυμομύκητες του ζύθου χρησιμοποιούν τα ζυμώσιμα σάκχαρα (γλυκόζη, φρουκτόζη, μαλτόζη και μαλτοτριόζη) σαν πηγή ενέργειας (ATP) για τη γλυκόλυση ή μονοπάτι EMP (Embden-Meyerhof-Parnas) το οποίο οδηγεί στη διάσπαση της γλυκόζης σε δύο μόρια πυροσταφυλικού οξέος. Το πρώτο βήμα της γλυκόλυσης είναι η φωσφορυλίωση της γλυκόζης σε 6-φωσφορική γλυκόζη (G-6P) από το

ένζυμο εξοκινάση. Το μονοπάτι αυτό είναι υπεύθυνο για τα τρία βασικά προϊόντα της ζύμωσης, την αιθανόλη το διοξείδιο του άνθρακα και τη γλυκερόλη (Xiros, et al., 2013). Τα προϊόντα αυτά δεν είναι ενδιάμεσα του μονοπατιού, αντίθετα παράγονται όταν ένας σημαντικός μεταβολίτης το NADH, που σχηματίζεται από την οξείδωση και τη φωσφορυλίωση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (GA-3P) στο έκτο στάδιο της γλυκόλυσης, οξειδώνεται ξανά σε NAD^+ . Χωρίς αυτές τις δύο αντιδράσεις από τις οποίες υπάρχει συνεχής παροχή NAD^+ το μονοπάτι EMP θα σταματούσε (Lewis et al., 2006).

Για τους αναερόβιους ή προαιρετικά αναερόβιους ζυμούκητες, όπως είναι και ο *Saccharomyces*, η κύρια πηγή ATP είναι η γλυκόλυση. Σε αναερόβιες συνθήκες, το πυροσταφυλικό και τα ηλεκτρόνια του NADH παραμένουν στο κυτταροδιάλυμα. Το πυροσταφυλικό μετατρέπεται σε αιθανόλη και αποβάλλεται από το κύτταρο. Η παραγωγή της αιθανόλης είναι απαραίτητη υπό αναερόβιες συνθήκες, ώστε το NADH να αποδώσει τα ηλεκτρόνια του και να μετατραπεί ξανά σε NAD^+ .

Από διαφορετικές μεταβολικές οδούς παράγονται μερικά από τα βασικότερα συστατικά που σχετίζονται με τα αρώματα του ζύθου που οφείλονται στον ζυμομύκητα. Περιλαμβάνουν αλκοόλες, οξέα, εστέρες, αλδεΐδες, κετόνες κλπ. Είναι σημαντικό να σημειωθεί, ότι σε όλες τις περιπτώσεις, το στέλεχος ζύμης αποτελεί καθοριστικό παράγοντα των τελικών προϊόντων του μεταβολισμού που παραμένουν στο προϊόν. Επομένως, η κατάλληλη επιλογή ζύμης είναι πάντα σημαντική και ορίζει ένα βασικό πλαίσιο στο οποίο θα βρίσκονται τα αρωματικά στοιχεία της μπίρας.

Στην ζυθοποιία οι ζύμες που χρησιμοποιούνται ανήκουν στο γένος *Saccharomyces*, ενώ ερευνητικά τα τελευταία χρόνια γίνονται μελέτες για την παραγωγή μπίρας και με non-*Saccharomyces* ζυμομύκητες.



Εικόνα 12. Ο μικροοργανισμός *S. cerevisiae* όπως φαίνεται από το μικροσκόπιο.

(Πηγή: König, et al., 2009)

Ο *Saccharomyces cerevisiae* είναι ένας μονοκύτταρος ευκαρυωτικός μικροοργανισμός ο οποίος χρησιμοποιείται ευρέως στην επιστημονική έρευνα και ανήκει στο είδος των ασκομύκητων (*Phylum Ascomycota*). Το σχήμα των κυττάρων του είναι σχετικά μεγάλο και στρογγυλό. Από τις πρώτες κιόλας προσπάθειες παραγωγής μύρας στην ανθρώπινη ιστορία ο *S. cerevisiae* ήταν η κυρίαρχη ζύμη στις αυθόρμητες ζυμώσεις και έτσι τυχαία συνεχίσθηκε η ζύμωση μύρας με αυτόν τον μικροοργανισμό για αιώνες. Τον 17ο αιώνα άρχισαν οι επιστήμονες να κατανοούν τι πραγματικά συμβαίνει κατά τη ζύμωση και τότε καθιερώθηκε και επίσημα η ζύμη αυτή ως η κυρίαρχη για την παραγωγή μύρας (Basso, et al., 2016). Μετά από χρόνια μελέτης, οι ζυθοποιοί σήμερα έχουν καταφέρει να έχουν απόλυτη γνώση του τρόπου λειτουργίας, των συνθηκών ζύμωσης, του χρόνου ζύμωσης και των μονοπατιών μεταβολισμού των σακχάρων και των αμινοξέων, όσον αφορά τον *S. cerevisiae*. Το γεγονός αυτό, έχει ως αποτέλεσμα, να μπορούν να παράγουν ένα προϊόν σταθερής ποιότητας με τα επιθυμητά χαρακτηριστικά πολύ εύκολα και σε μικρό χρόνο (Michel, et al., 2016,b).

Αφροζύμες και βυθοζύμες

Οι ζύμες ζυθοποίησης ανάλογα με την ιδιότητα της καταβύθισης ή επίπλευσής τους, μετά το τέλος της ζύμωσης χωρίζονται σε αφροζύμες και βυθοζύμες. Αφροζύμες ονομάζονται εκείνα τα στελέχη των σακχαρομυκήτων *S. cerevisiae* που κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης έχουν την τάση να επιπλέουν και να συγκεντρώνονται στην κορυφή του δοχείου

ζύμωσης (top-fermentation). Οι ζύμες αυτές συνήθως χρησιμοποιούνται στην παραγωγή των ales. Οι μύρες αυτές χαρακτηρίζονται από γεμάτη γεύση και φρουτώδες άρωμα. Η τυπική θερμοκρασία ζύμωσης για τις αφροζύμες είναι 15-22°C. Η αφροζύμη είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη ζύμη, σε αντίθεση με τη βυθοζύμη *S. pastorianus* η οποία πριν τον 19^ο αιώνα δεν είχε κριθεί σημαντική. Κάποια από τα είδη της μύρας που χρησιμοποιούν αφροζύμη (top fermented beer) είναι οι weizenbier, Berliner weisse, kolsch (Γερμανία), ale, porter, stout (Μ. Βρετανία) και lambic, gueuze, trappist (Βέλγιο) (Kunze, 2004).

Βυθοζύμες *S. pastorianus* ονομάζονται εκείνα τα στελέχη που έχουν την τάση να συγκεντρώνονται στον πυθμένα του δοχείου ζύμωσης (bottom-fermentation). Οι μύρες που παράγονται με βυθοζύμες ονομάζονται lagers (από το γερμανικό ρήμα lager, δηλαδή αποθηκεύω). Έχουν διαύγεια, απαλό και κομψό χαρακτήρα. Στις μύρες αυτές πραγματοποιείται δευτερογενής ζύμωση, ωρίμανση και αποθήκευση και έτσι με τον όρο lager περιγράφεται η ιδιαίτερη τεχνολογική διεργασία παρασκευής αυτών των προϊόντων. Η τυπική θερμοκρασία ζύμωσης για τις βυθοζύμες είναι 8-12°C (Kunze, 2004).

3. Σύσταση Μπύρας

Η μύρα αποτελείται από πολλές διαφορετικές ενώσεις που προέρχονται από την πρώτη ύλη ή έχουν σχηματιστεί ως προϊόντα του μεταβολισμού της ζύμης ή βιοχημικών μετατροπών κατά τη βυνοποίηση, τη ζύμωση και την ωρίμανση. Τα κυριότερα συστατικά της μύρας είναι τα εξής:

1. Αιθανόλη
2. Σάκχαρα
3. Πικραντικές ύλες του λυκίσκου
4. Πολυφαινόλες
5. Δικετόνες
6. Πρωτεΐνες και πεπτίδια

Από τα παραπάνω συστατικά, θα γίνει ειδικότερη αναφορά στις πρωτεΐνες και τα πολυπεπίδια.

Πρωτεΐνες - πολυπεπίδια

Η μύρα περιέχει περίπου 500 mg/L πρωτεϊνούχες ύλες, που προέρχονται κυρίως από τα δημητριακά (Hejgaard et al., 1983; Sorensen et al., 1978). Οι κυριότερες πρωτεΐνες της μύρας σχετίζονται με την εμφάνιση θολώματος και με την σταθεροποίηση του αφρού, δύο βασικά κριτήρια που καθορίζουν την ποιότητα της μύρας. Οι δύο σημαντικότερες πρωτεΐνες της μύρας είναι η πρωτεΐνη Z (Douma et al., 1997) και η πρωτεΐνη LTP (Sorensen et al., 1993). Ιδιαίτερης σημασίας επίσης είναι και η χορδεΐνη (Bamforth et al., 2004) και ο αναστολέας της α-αμυλάσης.

Πρωτεΐνες LTP (Πρωτεΐνες μεταφοράς λιπιδίων - Lipid Transfer Protein)

Οι πρωτεΐνες LTP είναι μια μεγάλη οικογένεια πρωτεϊνών που απαντώνται στα φυτά. Συνήθως έχουν μικρό μοριακό βάρος (<10kDA), στην ουσία είναι πολυπεπίδια, πλούσια σε κυστεΐνη και έχουν μια υδροφοβική κοιλότητα με την οποία είναι δυνατή η σύνδεση και η μεταφορά των λιπιδίων. Υπάρχουν δυο είδη της οικογένειας πρωτεϊνών μεταφοράς λιπιδίων που εκφράζονται στο κριθάρι: η LTP1 και η LTP2.

Η LTP1 είναι ένα υδρόφοβο πολυπεπτίδιο (9,7 kDa) που συγκεντρώνεται στον αφρό της μύρας (Sorensen et al., 1993; Lusk et al., 1995) και έχει υπολογιστεί ότι αποτελεί έως και το 1% της συνολικής πρωτεΐνης της βύνης (Evans et al., 1999). Εκφράζεται κυρίως στο στρώμα αλευρόνης κόκκων όψιμης ανάπτυξης και στα πρώιμα στάδια της βλάστησης (Mundy et al., 1986). Η LTP1 στην μύρα μετατρέπεται σε επιφανειοδραστική ουσία με τη γλυκοζυλίωση από τις αντιδράσεις Maillard στη βυνοποίηση, την ακυλίωση κατά το mashing και το δομικό "ξεδίπλωμα" κατά τον βρασμό του γλεύκους.

Η LTP2 (7 kDa) εκφράζεται στο στρώμα της αλευρόνης κατά τα αρχικά στάδια ανάπτυξης των σιτηρών. Ωστόσο, δεν έχει ακόμα βρεθεί να υπάρχει σε σημαντικές ποσότητες στη μύρα ή να σχετίζεται με την ποιότητα του αφρού.

Πρωτεΐνη Z

Η πρωτεΐνη Z είναι μια υψηλού μοριακού βάρους πρωτεΐνη (43 kDa), η οποία αποτελεί το 10-25% των μη διαλυτών πρωτεϊνών της μύρας και μπορεί να αναλυθεί σε δύο κυρίως μορφές την Z₄ (80%) και την Z₇ (20%). Αποτελεί το πρώτο είδος πρωτεΐνης που υπέθεσαν οι επιστήμονες ότι βοηθούσε στην σταθερότητα του αφρού. Αποτελεί έως και το 2% της συνολικής πρωτεΐνης και είναι μια πρωτεΐνη τύπου αλβουμίνης (Evans et al., 1999). Η πρωτεΐνη Z είναι στην πραγματικότητα το άθροισμα των επιπέδων των δύο ισόμορφών του, της πρωτεΐνης Z₄ και της πρωτεΐνης Z₇, που εκφράζονται από δύο ξεχωριστές αλλά πολύ σχετικές οικογένειες γονιδίων. Η Z₄ είναι ο κυρίαρχος τύπος πρωτεΐνης αφού αντιπροσωπεύει πάνω από το 80% της συνολικής πρωτεΐνης Z (Evans et al., 1999). Η πρωτεΐνη αυτή βρίσκεται σε όλα τα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας της μύρας και η δομή της αλλοιώνεται και τροποποιείται στο πλούσιο σε πολυσακχαρίτες περίπλοκο περιβάλλον (Han et al., 2015). Η πρωτεΐνη Z φαίνεται να έχει πολύ σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της σταθερότητας του αφρού λόγω του υψηλού επιφανειακού ιξώδους και της ελαστικότητάς της. Αντίθετα, κάποιες άλλες μελέτες υποστηρίζουν ότι η πρωτεΐνη Z δεν επηρεάζει τη σταθερότητα του αφρού της μύρας και συγκεκριμένα δοκιμές που χρησιμοποίησαν ως πρώτη ύλη βύνη κριθαριού με ανεπαρκείς ποσότητες των πρωτεϊνών Z₄ και Z₇, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι δεν υπήρχε κάποια ιδιαίτερη επιρροή στον αφρό συγκριτικά με άλλες πρωτεΐνες (Iimure et al., 2012).

Χορδεΐνες

Οι χορδεΐνες είναι οι κυριότερες πρωτεΐνες του κριθαριού. Επειδή είναι προλαμίνες, είναι αδιάλυτες σε υδατικά διαλύματα και απαιτείται πρωτεολυτική υδρόλυση για να γίνουν υδατοδιαλυτές. Η μελέτη των χορδεϊνών έχει απασχολήσει αρκετά τους ερευνητές σχετικά με την επίδραση τους στην σταθερότητα του αφρού, αλλά η ποικιλομορφία τους σε συνδυασμό με την αλληλεπίδραση με τις πρωτεάσες περιπλέκει πολύ τα δεδομένα. Λόγω της αφθονίας τους, των αισθητηριακών επιδράσεων και των χημικών ιδιοτήτων τους που προσδίδουν στην μύρα, οι χορδεΐνες είναι οι πιο κρίσιμες πρωτεΐνες στην ζυθοποιία (Koller et al.,2022).

Η ποικιλομορφία των ομάδων των χορδεϊνών και η αλληλεπίδρασή τους με τις πρωτεάσες, παράγει αρκετά δυνητικά επιθυμητά χαρακτηριστικά που προάγουν τον αφρό, αλλά ταυτόχρονα δημιουργούνται και ανεπιθύμητα χαρακτηριστικά που προάγουν το θόλωμα. Ερευνητές ισχυρίστηκαν ότι βρέθηκαν είδη χορδεϊνών που σχετίζονται με την βελτίωση της ποιότητας του αφρού. Οι Sheehan et al. (1997), εντόπισαν μια ζώνη χορδεϊνών 23 kDa, με ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα, τα οποία προάγουν την σταθερότητα του αφρού. Μια πρωτεΐνη 17 kDa επίσης βρέθηκε να συμπυκνώνεται στον αφρό της μπίρας. Επιπροσθέτως, αυτή η πρωτεΐνη βρέθηκε να έχει κάποια ομολογία αλληλουχίας με την πρωτεΐνη 23 kDa που προσδιορίστηκε παραπάνω. Σε πειράματα ανάλυσης του αφρού της μπίρας, διαπιστώθηκε ότι η διάρκεια του αφρού συσχετίζεται σημαντικά με τη συνδυασμένη περιεκτικότητα της πρωτεΐνης 17 kDa και της LTP1 για μύρες που ήταν μέτρια ανθρακούχες (CO₂: 5,1-5,2 g/l). Επιπλέον, μια σειρά πειραμάτων που ερευνούν την επίδραση στην σταθερότητα του αφρού σε διάφορα είδη μπίρας από την ομάδα του Bamforth, ήταν διαφωτιστικά ως προς τον υποτιθέμενο ρόλο των χορδεϊνών. Διαπιστώθηκε ότι αυξήθηκε η δύναμη σταθεροποίησης του αφρού μετουσιωμένων κλασμάτων αλβουμίνης κριθαριού, ενώ η περιορισμένη πρωτεόλυση μείωσε την αλβουμίνη αλλά ενίσχυσε τη σταθερότητα του αφρού που οφείλεται στις χορδεΐνες (Evans et. al., 2009).

Άλλα συστατικά της μύρας

- Πτητικά συστατικά: αλκοόλες, αλδεΐδες, οξέα, εστέρες, λακτόνες, κετόνες και υδρογονάνθρακες.

- Άλλες αζωτούχες ενώσεις: αμινοξέα, νουκλεϊκά οξέα, αμίνες και αμίδια.
- Μεταλλικά στοιχεία: κάλιο (220-1100 mg/L), νάτριο (9-200 mg/L), μαγνήσιο (34-250 mg/L), ασβέστιο (3-140 mg/L), σίδηρος (0,02-0,84 mg/L), χαλκός (0,01-0,8 mg/L), ψευδάργυρος (0,01-0,51 mg/L), μόλυβδος (0,06 mg/L).
- Βιταμίνες του συμπλέγματος Β: θειαμίνη (15-181 ppb), νικοτινικό οξύ (4494-8607 ppb), πυριδοξίνη (329-709 ppb), νικοτινικό οξύ(329-709 ppb), παντοθενικό οξύ(1093-1808 ppb), ριβοφλαβίνη (219-575 ppb), βιοτίνη (7-18 ppb), ινσιτόλη, φολικό οξύ, βιταμίνη Β12 (Bekatorou, 2001).

4. Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά μύρας

Τα τελευταία χρόνια αυξάνεται όλο και περισσότερο η ανάγκη για τη δημιουργία ποιοτικών προϊόντων. Σε ολόκληρο τον κόσμο έχει παρατηρηθεί μια μεταβολή στη συμπεριφορά των καταναλωτών ως προς την κατανάλωση της μύρας. Από τις παραδοσιακές «άγευστες», απλά δροσιστικές μύρες, μέχρι την εμφάνιση των craft μυρών, ένα αυξανόμενο τμήμα πληθυσμού προτιμά ένα αναβαθμισμένο προϊόν με πιο πολύπλοκες γεύσεις (Clemons et al., 2006). Για το λόγο αυτό γίνονται συνεχώς αναλύσεις με σκοπό τη βελτίωση της μύρας ώστε να ανταποκρίνεται στα κριτήρια των καταναλωτών. Ωστόσο, η πρώτη οπτική επαφή με τον ζύθο παίζει πάντα πολύ σημαντικό ρόλο για τον καταναλωτή αφού είναι αυτή που θα καθορίσει αν θα τον ελκύσει ή αν θα τον απωθήσει, ώστε να προχωρήσει ή όχι στην κατάποσή του.

Αρχικά, αξίζει να τονιστεί ότι η οργανοληπτική αξιολόγηση του ζύθου αποτελεί μια υποκειμενική πρακτική όπου η επιλογή μπορεί να ποικίλει ανάλογα με την υπό εξέταση ομάδα καταναλωτών. Για παράδειγμα, σύμφωνα με μελέτη στην Νότια Κορέα (Hong et al., 2017) που χώρισε τους καταναλωτές ανάλογα με τις προτιμήσεις τους σε lager ή ale, κάθε γκρουπ είχε διαφορετική σειρά προτεραιότητας ανάμεσα στα διάφορα χαρακτηριστικά της μύρας. Πιο συγκεκριμένα, οι καταναλωτές που προτιμούσαν τις lager έδιναν μεγαλύτερη σημασία στο διοξείδιο του άνθρακα, την πικράδα και την επίγευση, ενώ τα αρώματα δεν είχαν τόσο πρωταρχικό ρόλο για αυτούς. Αντίθετα, οι καταναλωτές που προτιμούσαν τις ale έδιναν μεγαλύτερη σημασία πρώτα στα αρώματα και τελευταία στον αφρό. Επίσης, αξίζει να σημειωθεί ότι κατά την εξέταση των αισθητήριων χαρακτηριστικών της μύρας οι ειδικοί πάντα προσέχουν με περισσότερες λεπτομέρειες π.χ. το χρώμα της μύρας, ενώ οι καταναλωτές δεν εστιάζουν τόσο πολύ (Van Doorn et al., 2019), ενώ σε άλλες μελέτες αποτυπώνεται το αντίθετο.

Οι μύρες μπορούν να περιγραφούν από διάφορα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά ανάλογα με την όψη, τη γεύση, την οσμή και την υφή τους, για τα οποία έχουν δημοσιευτεί πολλές μελέτες (Daems et al., 1997; Meilgaard et al., 1979; Langstaff et al., 1991; Langstaff et al., 1993). Οι μελέτες αυτές καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι οι προτιμήσεις των

καταναλωτών βασίζονται στη γεύση της μπίρας (π.χ. γλυκιά ή πικρή) και στην αίσθηση που αφήνει στο στόμα (αφρισμός ή ενανθράκωση). Σημαντικό ρόλο έχει επίσης και το χρώμα καθώς και το άρωμα της μπίρας. Ανάμεσα σε αυτά τα χαρακτηριστικά, ο σχηματισμός και η σταθερότητα του αφρού είναι εξαιρετικά σημαντικά και έχουν συσχετιστεί με τις οπτικές προτιμήσεις των καταναλωτών και συνεπώς με την ποιότητα της μπίρας (Bamforth et al., 1985).

Άρωμα-γεύση (flavour)

Κάθε ένα από τα συστατικά της μπίρας συνεισφέρουν και αλληλεπιδρούν για να διαμορφώσουν το τελικό αρωματικό προφίλ του παραγόμενου προϊόντος. Το αρωματικό προφίλ του ζύθου διαμορφώνεται από την ξήρανση της βύνης, τον βρασμό του γλεύκους, την σύστασή του νερού και την περιεκτικότητα του λυκίσκου. Η πλειοψηφία των χημικών ενώσεων που σχετίζονται με τα αρώματα του ζύθου εμφανίζονται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις και προκύπτουν ως προϊόντα από μεταβολικές οδούς που οδηγούν στην ανάπτυξη της ζύμης (αναβολισμός). Πολλές από αυτές τις ουσίες είναι κυριολεκτικά τα τελικά προϊόντα του μεταβολισμού και δεν έχουν περαιτέρω χρησιμότητα στη ζύμη (Lewis et al., 2006). Κάποιες από αυτές είναι οι αλκοόλες, τα οξέα, οι εστέρες, κάποιες ανεπιθύμητες οργανικές ενώσεις, θειούχα συστατικά και φαινόλες.

Τέλος, το αρωματικό προφίλ της μπίρας μπορεί να επηρεαστεί και από άλλους εξωτερικούς παράγοντες όπως είναι η μεταφορά, η συσκευασία και η αποθήκευση.

1. Ο θειικός σίδηρος προσδίδει ένα μεταλλικό άρωμα, λόγω της επαφής του προϊόντος με μεταλλικά υλικά κατά την παραγωγή, τη συσκευασία ή και τη μεταφορά του. Ακόμη μπορεί να οφείλεται σε αυξημένη περιεκτικότητα του νερού σε μεταλλικά ιόντα.
2. Η 2,4,6-τριχλωροανισόλη (TCA) δίνει στην μπίρα μια αίσθηση μούχλας. Η παραγωγή TCA συνήθως οφείλεται σε κακή ποιότητα πρώτων υλών (Carr, 2016).
3. Η μερκαπτάνη είναι ένα από τα πιο συνηθισμένα ανεπιθύμητα αρώματα στην μπίρα (μούχλα, θείο). Μπορεί να παραχθεί κατά την έκθεση της μπίρας στον ήλιο, όπου τα α-οξέα διασπώνται και αντιδρούν με το υδρόθειο που παράγει η ζύμη. Μπίρες με

σκούρο χρώμα ή ειδικά επεξεργασμένο λυκίσκο δεν εμφανίζουν αυτό το ανεπιθύμητο άρωμα.

Εμφάνιση: διαύγεια, χρώμα, αφρός

Χρώμα

Πρόκειται για ένα από τα πιο βασικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του ζύθου, καθώς αφορά την πρώτη εντύπωση που δημιουργείται σχετικά με το προϊόν. Το χρώμα καθορίζεται από την επιλογή των πρώτων υλών και κυρίως της βύνης. Η ένταση του χρώματος μπορεί να αυξηθεί κατά τον βρασμό και συγκεκριμένα χάρη σε δύο αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στο στάδιο αυτό: η αντίδραση Maillard και η οξείδωση των πολυφαινολών. Η αντίδραση Maillard είναι μια πολύπλοκη αντίδραση που λαμβάνει χώρα στα τρόφιμα, κατά την οποία αντιδρούν τα σάκχαρα και τα αμινοξέα που υπάρχουν στο γλεύκος και παράγονται μελανοϊδίνες. Ο ρυθμός της αντίδρασης εξαρτάται από τη θερμοκρασία και το pH του τροφίμου. Συγκεκριμένα, η αύξηση αυτών, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του ρυθμού της αντίδρασης. Επίσης, η αντίδραση εξαρτάται από το είδος των σακχάρων που παίρνουν μέρος σε αυτήν, καθώς τα σάκχαρα μεγαλύτερου μοριακού βάρους είναι πιο δραστικά. Τα προϊόντα της αντίδρασης Maillard είναι σκουρόχρωμες σύνθετες ενώσεις, οι οποίες δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν από τις ζύμες ως θρεπτικό υλικό παρόλο που περιέχουν άζωτο (Lewis et al., 2006). Το χαμηλό ποσοστό υγρασίας ευνοεί επίσης παραγωγή των ουσιών αυτών.

Η οξείδωση των πολυφαινολών συνήθως καταλύεται από ένζυμα και συγκεκριμένα από την περοξειδάση. Οι πολυφαινόλες οξειδώνονται προς ο-κινόνες, παρουσία του ενζύμου περοξειδάση, παρά την υψηλή θερμοκρασία που επικρατεί στον βρασμό. Οι ο-κινόνες είναι αρωματικές δικετόνες με χαρακτηριστική οσμή και έντονο κίτρινο ή κόκκινο χρώμα. Ωστόσο, οι ουσίες αυτές είναι δυνατό να μειωθούν κατά τη ζύμωση του γλεύκους, καθώς θα χρησιμοποιηθούν ως πηγή αζώτου από του ζυμομύκητες (Lewis et al., 2006).

Διαύγεια

Ένα ακόμη χαρακτηριστικό του ζύθου είναι το πόσο διαυγής είναι ή αν παρουσιάζει θολώματα. Η πιο κοινή μορφή σχηματισμού θολώματος στη συσκευασμένη μπίρα είναι η συσσωμάτωση πρωτεϊνών και πολυφαινολικών ενώσεων. Πηγή πρωτεϊνών στην μπίρα αποτελεί η βύνη. Ωστόσο, το μεγαλύτερο ποσοστό αυτών, κατά την πολτοποίηση και το βρασμό, μετουσιώνεται. Αντίστοιχα, οι πολυφαινόλες προέρχονται από τη βύνη και τον λυκίσκο. Οι πρωτεΐνες και οι πολυφαινόλες σε συγκεκριμένες συνθήκες, παρουσία οξυγόνου, μπορούν να σχηματίσουν σύμπλοκα. Τα σύμπλοκα αυτά μπορούν να αναπτυχθούν σε κολλοειδές μέγεθος, οδηγώντας έτσι στο θολώμα του ζύθου. Άλλες αιτίες θολώματος είναι τα ανόργανα και άλλα υλικά που προκύπτουν από ανεπαρκείς συνθήκες υγιεινής και τον εξοπλισμό του ζυθοποιείου, από μη επαρκή απομάκρυνση ή καταβύθιση των ζυμών, από τον σχηματισμό κρυστάλλων οξαλικού ασβεστίου, ή ακόμη και από βακτηριακή μόλυνση (Steiner et al., 2010).

Αφρός

Ο τρόπος με τον οποίο φέρεται ο αφρός στο ποτήρι, από την αρχή μέχρι το τέλος, δημιουργεί διάφορα συναισθήματα στον καταναλωτή και συνδέονται άμεσα με τα αρώματά του και τη γεύση του. Ο αφρός αποτελεί την πρώτη είσοδο του καταναλωτή στα αρώματα και τη φρεσκάδα του ζύθου μέσω των οσφρητικών αισθητήρων (Delvaux et al., 1995), ενώ παράλληλα διαμορφώνει και την αίσθηση στο στόμα, ανάλογα με τη δομή (μέγεθος φυσαλίδας), την υφή και τη σταθερότητά του.

Για να χαρακτηριστεί ένας αφρός «καλής ποιότητας» λαμβάνεται υπόψη η ποσότητα, η σταθερότητα, το χρώμα και η υφή του. Αποτελεί ωστόσο, όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, ένα υποκειμενικό χαρακτηριστικό το οποίο διαφέρει αναλόγως το φύλο, την εθνικότητα και τον τόπο διαμονής του εκάστοτε καταναλωτή (Bamforth, 2006; Smythe et al., 2002). Σύμφωνα με τον Bamforth (2006), υπάρχει τεράστια διαφορά μεταξύ των καταναλωτών που προτιμούν σταθερό (αλλά όχι υπερβολικό) αφρό και καθαρό ποτήρι (Εικόνα 16Α) και εκείνων που προτιμούν να βλέπουν στα τοιχώματα του ποτηριού ίχνη αφρού (σχέδιο δαντέλας, Εικόνα 16Γ). Για παράδειγμα, στην Γερμανία και στις περισσότερες Ευρωπαϊκές χώρες, η καλής

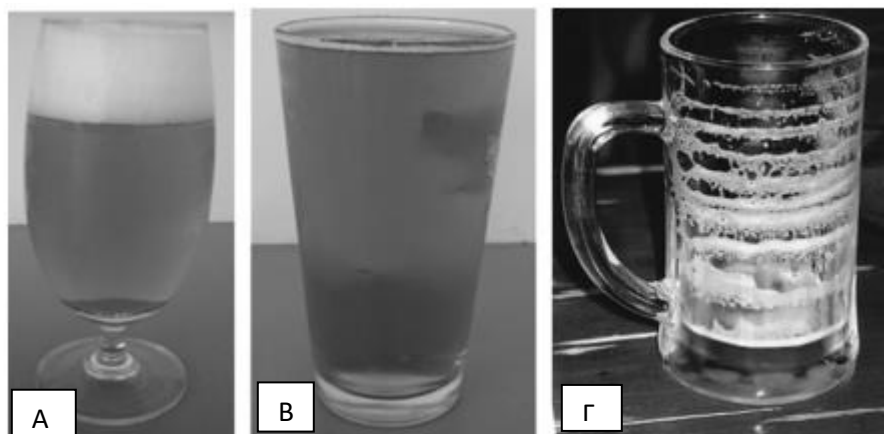
ποιότητας μύρα είναι συνυφασμένη με την μεγάλη ποσότητα σταθερού αφρού. Αντίθετα, στην Αγγλία δεν δίνουν τόση βάση στον αφρό (Kunze, 2004).



Εικόνα 13. Άδειασμα ζύθου σε ποτήρι προκαλώντας το σχηματισμό αφρού.
(Πηγή: Evans et. al., 2009)



Εικόνα 14. Διαφορετικές μύρες με διαφορετικές ποιότητες αφρού.
(Πηγή: Evans et. al., 2009)



Εικόνα 15. Οι διαφορετικές ποιότητες αφρού.
(Πηγή: Evans et. al., 2009)

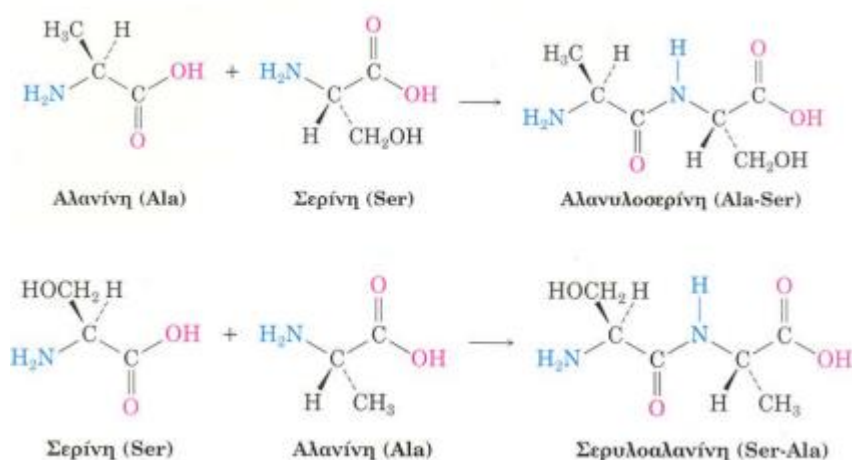
Γενικά, η ποιότητα του αφρού της μπίρας χαρακτηρίζεται από τη σταθερότητα, την προσκόλλησή του στο γυαλί και την υφή του. Η σταθερότητα του αφρού που παρατηρείται στην μπίρα, αντανακλά την ισορροπία μεταξύ των επιπέδων των ουσιών που προάγουν την συγκράτηση και των αναστολέων του αφρού. Έτσι, ακόμη και αν υπάρχουν σημαντικά επίπεδα μορίων που αποσταθεροποιούν τον αφρό, θα είναι λιγότερο ικανά να ασκήσουν την επίδρασή τους, εάν υπάρχει αφθονία ουσιών που αλληλεπιδρούν για να σταθεροποιήσουν τον αφρό (Bamforth, 2023).

Η σταθερότητα του αφρού εξαρτάται κυρίως από ορισμένες επιφανειοδραστικές, υδρόφοβες πρωτεΐνες και οξέα, τα ίσο-α-οξέα και ορισμένα μεταλλικά ιόντα. Οι πρωτεΐνες προέρχονται από τη βύνη και κατά τη ζυθοποίηση μετατρέπονται σε πολυπεπτίδια τα οποία είναι εξαιρετικά υδρόφοβα (Evans et al., 2009). Οι υδρόφοβες αυτές ουσίες έχουν την τάση να εισέρχονται στις φυσαλίδες που δημιουργούν τα αέρια που περιέχονται στην μπίρα (κυρίως διοξείδιο του άνθρακα αλλά και άζωτο) μέσω του φαινομένου της πυρήνωσης.

5. Πεπτίδια και μύρα

5.1 Πεπτίδια – ορισμός

Τα πεπτίδια είναι οργανικές ενώσεις οι οποίες αποτελούνται από δυο ή περισσότερα αμινοξέα, τα οποία ενώνονται μεταξύ τους με πεπτιδικό (αμιδικό) δεσμό (η αμινομάδα του ενός αμινοξέος συνδέεται με την καρβοξυλομάδα του άλλου) (Εικόνα 16). Ανάλογα τον αριθμό των αμινοξέων που ενώθηκαν το πεπτίδιο ονομάζεται διπεπτίδιο (2 αμινοξέα), τριπεπτίδιο (3 αμινοξέα) κ.λπ. ολιγοπεπτίδιο ή πολυπεπτίδιο (>50 αμινοξέα). Τα πεπτίδια αποτελούν δομικό συστατικό των πρωτεϊνών, καθώς η πρωτεΐνη στην ουσία είναι μία μεγάλη πολυπεπτιδική αλυσίδα, με καλά καθορισμένη τρισδιάστατη δομή. Η διάκριση μεταξύ πολυπεπτιδίου και πρωτεΐνης είναι μάλλον ασαφής. Αρκετοί ερευνητές συγγραφείς έχουν υιοθετήσει ως ανώτατο όριο μοριακού βάρους πολυπεπτιδίου τα 10.000 Da (10kDa).



Εικόνα 16. Παραδείγματα σχηματισμού διπεπτιδίων.

(Πηγή: https://www.biology.uoc.gr/courses/BIO6_Organiki_Ximia/documents/Lecture14.pdf)

Ο προσδιορισμός της δομής των πεπτιδίων μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους, όπως με χρήση αναλυτή αμινοξέων, με αποικοδόμηση κατά Edman ή με χρήση ενζύμων, καθώς και με ενόργανες τεχνικές ανάλυσης (φασματοσκοπίας μάζας).

5.2 Πεπτίδια στη μύρα

Κατά μέσο όρο η μύρα περιέχει 0,2-0,6 g πολυπεπτίδια/100mL, τα οποία προέρχονται κυρίως από τις πρωτεΐνες του κριθαριού, ενώ ένα μικρότερο ποσοστό προέρχεται και από τη ζύμη (Cortacero-Ramírez et. al., 2003). Τα πολυπεπτίδια προέρχονται είτε από φυσικές ή από χημικά τροποποιημένες πρωτεΐνες και από προϊόντα υδρόλυσης.

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η βύνη που προέρχεται από το κριθάρι ή και σπανιότερα από άλλα δημητριακά, είναι το βασικό συστατικό για την παραγωγή της μύρας. Μέσα από τις διαδοχικές διαδικασίες βυνοποίησης, πολτοποίησης και ζυθοποίησης, οι ενδογενείς πρωτεΐνάσες υδρολύουν, ολικώς ή μερικώς, τις χορδεΐνες και άλλες πρωτεΐνες αποθήκευσης. Κατά τη βυνοποίηση, ένα σύνθετο πρωτεολυτικό σύστημα, συνεισφέρει στην υδρόλυση των πρωτεϊνών του κριθαριού, παράγοντας πολυπεπτίδια και αμινοξέα. Κατά τη διαδικασία παραγωγής της μύρας, λαμβάνουν χώρα πολλές αλλαγές στις πρωτεΐνες του κριθαριού, συμπεριλαμβάνοντας τη γλυκοζυλίωση από τις αντιδράσεις Maillard στη βυνοποίηση, την ακυλίωση κατά την πολτοποίηση και την δομική αναδιαμόρφωση κατά την ζυθοποίηση (Perrocheau et al., 2006).

Ειδικότερα, τα πολυπεπτίδια που προέρχονται από την χορδεΐνη εμπλέκονται στο σχηματισμό του θολώματος και στην σταθεροποίηση του αφρού (Asano et. al., 1982; Sheehan et al., 1997). Πολλές από τις μεγάλες πρωτεΐνες αποθήκευσης του κριθαριού και ειδικότερα οι χορδεΐνες, που είναι υδρόφοβες και ελάχιστα διαλυτές σε χαμηλής αλκοολικής περιεκτικότητας διάλυμα όπως η μύρα, κατακρημνίζονται και αφαιρούνται κατά τα στάδια της πολτοποίησης και του βρασμού. Αντίθετα, τα περισσότερα αμινοξέα του γλεύκους καταναλώνονται από τη μαγιά κατά τη ζύμωση. Στη μύρα, η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες είναι περίπου 3 φορές μικρότερη από ότι στην ακατέργαστη βύνη. Σε αρκετές προηγούμενες μελέτες, αναφέρθηκε ότι στη μύρα υπάρχουν μεγάλα πρωτεολυτικά θραύσματα χορδεΐνης (Asano et al., 1982; Dostálek et al., 2006; Sheehan et al., 1997). Ωστόσο, τα δεδομένα σχετικά με τις χορδεΐνες και τα μεγάλα πολυπεπτίδια που προέρχονται από αυτές είναι αντικρουόμενα (Sheehan et al., 1997). Οι Perrocheau et al. (2006), χρησιμοποιώντας μια πρωτεομική προσέγγιση και φασματομετρία, βρήκαν σε δείγμα μύρας πολύ χαμηλές ποσότητες ενός δευτερευόντως συστατικού χορδεΐνης. Αντίθετα, μια πιο πρόσφατη μελέτη

εντόπισε πρωτεΐνες στη μύρα, αλλά δεν βρέθηκαν στοιχεία χορδεϊνών (Iimure et al., 2010). Λόγω της πολυπλοκότητάς τους, τα χαμηλού μοριακού βάρους πεπτίδια, δεν έχουν χαρακτηριστεί ακόμα (Picariello et al., 2011).

5.3 Μέθοδοι διαχωρισμού / προσδιορισμού πεπτιδίων στη μύρα

Λόγω του μικρού συνήθως μοριακού βάρους των πεπτιδίων, ο διαχωρισμός τους από ένα σύνθετο μείγμα πολλών ενώσεων είναι συχνά δύσκολη διαδικασία, με απαραίτητη συνήθως κατάλληλη αρχική επεξεργασία του δείγματος (π.χ. υπερδιήθηση προς απομάκρυνση μεγαλομοριακών ενώσεων). Τα τελευταία χρόνια, με την ανάπτυξη και εξέλιξη ενόργανων τεχνικών ανάλυσης (όπως -ομικές τεχνικές / πρωτεομική, πεπτιδομική), ο προσδιορισμός πεπτιδίων φαίνεται να καθίσταται ευκολότερος.

Μέχρι πρότινος, ο διαχωρισμός μικρών πεπτιδίων από μεγάλη περίσσεια αμινοξέων παρουσίαζε διάφορες δυσκολίες. Επομένως, παρόλο που ήταν ήδη γνωστό ότι αφομοιώνεται μεγάλη ποσότητα πεπτιδίων κατά τη ζύμωση, πολύ λίγα πράγματα ήταν γνωστά για τα πεπτίδια. Κάποιες μελέτες για τα πεπτίδια στη μύρα, παρόμοια με αυτά που σχηματίζονται εξωκυτταρικά κατά τη ζύμωση, ενθάρρυναν την περαιτέρω έρευνα των πεπτιδίων στη βύνη και τη μύρα (Clapperton et al, 1970; McWilliam et al., 1969).

Ένας από τους πρώτους τρόπους που χρησιμοποιήθηκε για να μπορούν να διαχωριστούν τα πεπτίδια από τα αμινοξέα είναι η χηλικοποίηση του μίγματος, χρησιμοποιώντας ιόντα χαλκού και επακόλουθη χρωματογραφία αυτών των χηλικών ενώσεων σε διαιθυλαμινο-αιθυλοκυτταρίνη (DEAE). Η απομάκρυνση των αμινοξέων διευκολύνει πολύ την μετέπειτα εξέταση των πεπτιδίων με χρωματογραφία χάρτου και ηλεκτροφόρηση. Τα αμινοξέα και τα πεπτίδια από τη βύνη και την μύρα αρχικά συμπυκνώνονται και διαχωρίζονται από τα σάκχαρα και άλατα, σε μια στήλη ιοντοανταλλακτικής ρητίνης σε όξινη μορφή, από την οποία ανακτώνται με έκλυση με διάλυμα αμμωνίας. Οι συνολικές ανακτήσεις αζώτου βελτιώνονται σημαντικά σε αυτόν τον διαχωρισμό, εάν η βύνη και η μύρα υποβληθούν σε διαπίδυση και μόνο το προϊόν διαπίδυσης περάσει στη ρητίνη. Ωστόσο, η ανάκτηση αμινοξέων και πεπτιδίων, σε αντίθεση με το συνολικό άζωτο είναι η ίδια, όταν η βύνη ή η μύρα διοχετεύεται απευθείας στη ρητίνη

χωρίς να υποστεί διαπίδυση. Η χρωματογραφία ρητίνης επηρεάζει επίσης τον διαχωρισμό αμινοξέων και απλών πεπτιδίων από πολυπεπτίδια. Τα τελευταία, που έχουν χαμηλότερες πυκνότητες φορτίου, δεν συγκρατούνται από τη ρητίνη.

Πεπτίδια επίσης απομονώνονται από την μύρα με εκχύλιση στερεής φάσης, αφού πρώτα το δείγμα απαερωθεί. Η ανάλυση HPLC δείχνει ότι μέρος πεπτιδίων, μικρού μεγέθους, χάνεται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας. Για τον λόγο αυτό, χρησιμοποιείται αποκλειστικά η εκχύλιση στερεής φάσης (Picariello et al., 2011). Η πλειονότητα των πεπτιδίων στη μύρα, προέρχεται από την υδατοδιαλυτή αλβουμίνη του κριθαριού.

Όπως έχει αναφερθεί πολλές φορές, κάποια από τη θρεπτική αξία και σταθερότητα της μύρας προέρχεται από πρωτεΐνες και αμινοξέα, γεγονός που σημαίνει ότι ο πρωτεϊνικός προσδιορισμός κατά τη διάρκεια των διάφορων σταδίων παρασκευής της μύρας μπορεί να είναι χρήσιμος στον ποιοτικό έλεγχο (Cortacero-Ramírez et al., 2003; Gorinstein et al., 1999). Η πρωτεΐνη της μύρας, όπως προαναφέρθηκε, προέρχεται κυρίως από τη βύνη του κριθαριού, η οποία περιέχει 10-12% πρωτεΐνη. Το ένα τρίτο αυτής της πρωτεΐνης εξαγεται κατά την πολτοποίηση και πολλές από τις μεγαλύτερες πρωτεΐνες αφαιρούνται κατά τη διαδικασία του βρασμού, αφήνοντας στη μύρα 0,2-0,6 g/100 mL υλικού που προέρχεται από πρωτεΐνη κυρίως με την μορφή πεπτιδίων και πολυπεπτιδίων (Cortacero-Ramírez et al., 2003). Τα ακριβή ποσά εξαρτώνται από την παρασκευή και το είδος της μύρας (Gorinstein et al., 1999). Τα περισσότερα από τα ελεύθερα αμινοξέα που υπάρχουν στο γλεύκος απορροφώνται από τη μαγιά κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Ωστόσο, η προλίνη δεν μπορεί να αφομοιωθεί από τη μαγιά και παραμένει μέσα στη μύρα σε υψηλότερη συγκέντρωση από άλλα αμινοξέα (Cortacero-Ramírez et al., 2003; Jin et al., 1999) και επομένως μπορεί να επηρεάσει την ποιότητα της μύρας (Gorinstein et al., 1999).

Για την ανάλυση των αμινοξέων, πολυπεπτιδίων και πρωτεϊνών μπορεί να χρησιμοποιηθεί η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC). Δείγματα από διάφορες ινδικές μύρες ρυζιού, αναλύθηκαν μέσω όξινης υδρόλυσης ακολουθούμενη από παραγωγοποίηση, με HPLC με ανιχνευτή μεταβλητού μήκους κύματος (VWD) στα 265 nm. Διαπιστώθηκε ότι ενώ όλα τα δείγματα περιείχαν τα περισσότερα από τα απαραίτητα αμινοξέα, οι συγκεντρώσεις διέφεραν σημαντικά λόγω διαφοροποιήσεων στα συστατικά και

τη διαδικασία παρασκευής. Συμπεράναν λοιπόν ότι η σχετικά υψηλή περιεκτικότητα σε αμινοξέα δείχνει ότι η μύρα ρυζιού μπορεί να είναι μια καλή πηγή ενέργειας και βασικών θρεπτικών συστατικών. Οι Podgorska et al. (2010), χρησιμοποίησαν HPLC “shot-gun” για τον προσδιορισμό της πρωτεϊνικής γλυκοζυλίωσης κατά τη διαδικασία παρασκευής της μύρας, με στόχο την ανίχνευση και τον εντοπισμό μη ενζυματικών γλυκοζυλίωσεων στη βύνη κριθαριού. Η γλυκοζυλίωση είναι η μη ενζυματική αντίδραση μεταξύ των αναγωγικών σακχάρων, όπως η γλυκόζη ή η φρουκτόζη και πρωτεϊνών, λιπιδίων ή νουκλειικών οξέων. Η έκταση της πρωτεϊνικής γλυκοζυλίωσης είναι σημαντική για την ανάλυση της μύρας επειδή επηρεάζει την ποιότητα της βύνης και τις ιδιότητες του αφρού της μύρας. Μετά τον διαχωρισμό με την HPLC, οι Podgorska et al. χρησιμοποίησαν τη διαδοχική φασματομετρία μάζας (MS/MS) για την αναγνώριση των πρωτεϊνών και διαπίστωσαν ότι ορισμένες ήταν ανθεκτικές στη διαδικασία βυνοποίησης και έτσι διατηρήθηκαν στο τελικό προϊόν. Από τις 16 πρωτεΐνες που αναγνωρίστηκαν μόνο στις 5 εμφανίστηκε η γλυκοζυλίωση. Οι δυο από αυτές τις 5 γλυκοζυλιωμένες πρωτεΐνες, η πρωτεΐνη Z και η ns-LTP1 (non-specific lipid transfer protein) είναι ζωτικής σημασίας για την ποιότητα της βύνης και της μύρας, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω. Δεδομένου ότι αυτές οι πρωτεΐνες επέζησαν από τη διαδικασία παρασκευής της μύρας, μπορούν να χρησιμεύσουν ως δείκτες ποιότητας κατά την παρακολούθηση της γλυκοζυλίωσης (Podgorska et al., 2010). Ωστόσο, η προετοιμασία του δείγματος είναι αρκετά χρονοβόρα καθώς οι πρωτεΐνες πρέπει να εκχυλιστούν από το κριθάρι, να επωαστούν για να μειωθούν οι δισουλφιδικές γέφυρες, να αλκυλιωθούν και να διαχωριστούν με την HPLC. Αυτά τα απαραίτητα βήματα καθιστούν την ανάλυση σχετικά δύσκολη.

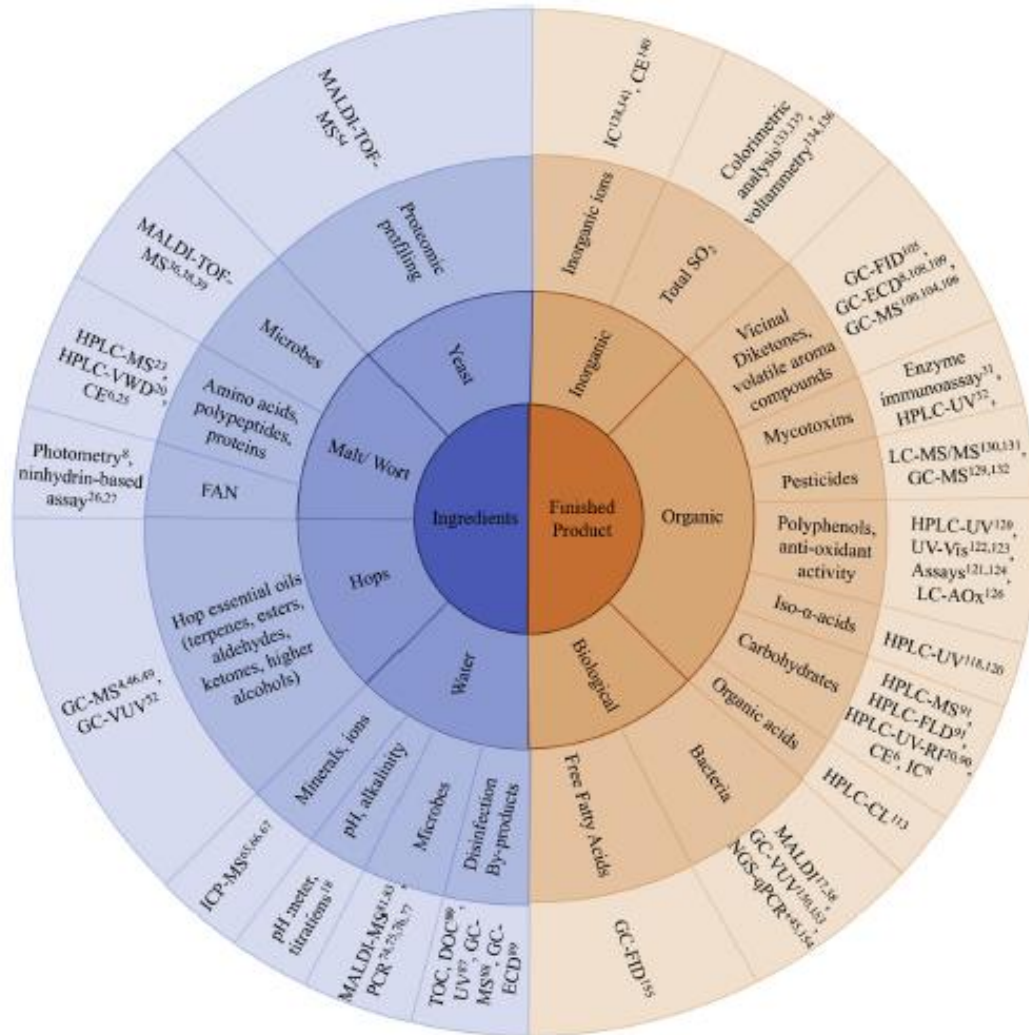
Για την ανάλυση πρωτεϊνών και αμινοξέων μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (Capillary Electrophoresis, CE) (Cortacero-Ramírez et al., 2003). Τέσσερα επισημασμένα με φλουορεσκεΐνη αμινοξέα διαχωρίστηκαν σε λιγότερο από 140 ms με υψηλή απόδοση με την CE. Επισημάνθηκε επίσης πως ορισμένες διαμορφώσεις πρωτεϊνών, ήταν σε θέση να ανιχνευτούν λόγω της ικανότητας διαχωρισμού υψηλής ταχύτητας της CE. Ωστόσο, υπάρχουν ορισμένοι περιορισμοί και εδώ. Οι γρήγοροι χρόνοι διαχωρισμού, αν και πλεονεκτικοί, τείνουν να δημιουργούν μεγαλύτερες απαιτήσεις στο

σύστημα ανίχνευσης και συχνά απαιτούν μικρά όρια ανίχνευσης. Επίσης, η αναπαραγωγιμότητα είναι δύσκολη και οι διαφορές θερμοκρασίας που αναπτύσσονται μέσα στη στήλη μπορεί να προκαλέσουν διάφορα προβλήματα. Η CE, αν και δεν χρησιμοποιείται για ανάλυση ρουτίνας και δεν έχουν όλοι οι ζυθοποιοί πρόσβαση σε αυτή, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταχεία ανάλυση της ποιότητας της μύρας.

Η χρωματογραφία και η ηλεκτροφόρηση υψηλής ανάλυσης, σε συνδυασμό με χρωματογραφία μάζας, έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για την μελέτη πρωτεϊνών και πεπτιδίων για τον εντοπισμό αντιγονικών πεπτιδίων (Picariello et al., 2011).

Μία άλλη τεχνική που αναφέρεται στην βιβλιογραφία να έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση πεπτιδίων είναι η τεχνική LC-ESI-MS/MS. Με την τεχνική αυτή, οι Picariello et al. (2015) ανίχνευσαν σε Weissbier 167 πεπτίδια, τα οποία ανήκαν σε 44 πρωτεΐνες, περιλαμβανομένων των χορδεϊνών, γλοιαδινών και μονάδων υψηλού και χαμηλού μοριακού βάρους γλουτενίνης. Το αρχικό δείγμα μύρας πρώτα πέρασε από σειρά επεξεργασιών: απαέρωση, εκχύλιση πρωτεϊνών/πεπτιδίων με ειδικό διαλύτη, επαναδιαλύτωση, Cys-αλκυλίωση, ενζυμική υδρόλυση κλασμάτων με >6kDa με χρήση θρυψίνης, χρήση C-18 στήλης για απομάκρυνση πεπτιδίων, διαχωρισμό με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού και ανάλυση των πεπτιδίων που προέκυψαν από την υδρόλυση με HPLC-ESI-Q-TOF MS and MS/MS.

Επίσης, σε πρόσφατη μελέτη των Verni et al (2020) χρησιμοποιήθηκε τεχνική nano-LC-ESI-MS/MS προς εντοπισμό 5 πεπτιδίων με 8-10 αμινοξέα, σε δείγματα που προέκυψαν από την ζύμωση παραπροϊόντων ζυθοποίησης (Brewers' spent grain, BSG) με *Lactiplantibacillus plantarum* (*Lactobacillus plantarum*), και τα οποία εμφάνισαν βιοδραστητικότητα.



Εικόνα 17. Σχηματική απεικόνιση των αναλυτικών μεθόδων που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των διαφόρων συστατικών της μπίρας.
(Πηγή : Anderson et al., Analytica Chimica Acta 1085, 2019)

6. Ρόλος των πεπτιδίων στην μύρα

6.1 Ρόλος πεπτιδίων στη ζύμωση

Η χρήση μικρών πεπτιδίων κατά τη ζύμωση δεν είναι πλήρως κατανοητή, παρά την πληθώρα πληροφοριών για τη μεταφορά πεπτιδίων από άλλους μικροοργανισμούς. Σύμφωνα με τους Lekkas et al. (2009), η μέτρηση της εξωκυτταρικής δραστηριότητας της πρωτεάσης, παρέχει στοιχεία για τη ρύθμισή της από τη ζύμη, προκειμένου να διασπάσει τα πολυπεπίδια του γλεύκους σε χρήσιμα αζωτούχα υλικά. Τα επίπεδα ολιγοπεπτιδίων στο γλεύκος βρέθηκαν να κυμαίνονται καθ' όλη τη διάρκεια των ζυμώσεων. Η μέτρηση της εξωκυτταρικής δραστηριότητας της πρωτεάσης, παρέχει στοιχεία ότι οι ζυμομύκητες είναι σε θέση να ρυθμίζουν συνεχώς την παραγωγή της πρωτεάσης, προκειμένου να διασπάσει τα πολυπεπίδια του γλεύκους σε αξιοποιήσιμα αζωτούχα υλικά (Lekkas et al., 2009).

Σύμφωνα με τον αριθμό των αμινοξέων που υπάρχουν στο γλεύκος και τους δυνατούς συνδυασμούς τους, υπολογίζεται ότι περίπου 400 διπεπίδια και 8.000 τριπεπίδια μπορούν να βρεθούν στο γλεύκος (Mcwilliam et al., 1969). Τα μικρά πεπτίδια μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως θρεπτικές πηγές αμινοξέων, ως πηγές άνθρακα ή αζώτου και πρόδρομες ουσίες των πεπτιδίων του κυτταρικού τοιχώματος κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης της ζύμης (Ingledew et al., 1999). Τα πολυπεπίδια μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν ως υπόστρωμα, καθώς οι ζύμες μπορούν να παράγουν πρωτεολυτικά ένζυμα εξωκυτταρικά, για να παρέχουν στα κύτταρα επιπλέον αφομοιώσιμο. Περίπου το 40% των ολιγοπεπτιδίων του γλεύκους απομακρύνεται από τη ζύμη κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, με αποτέλεσμα να θεωρείται πως τα πεπτίδια στη μύρα πιθανόν να διαφέρουν από αυτά στο γλεύκος.

Οι περισσότερες ζύμες που χρησιμοποιούνται στη ζυθοποίηση δεν μεταφέρουν πεπτίδια μεγαλύτερα από τα τριπεπίδια, αν και το όριο αυτό εξαρτάται από τη ζύμη (Marder et al., 1977). Οι Clapperton (1970), αναφέρουν ότι η συγκέντρωση των χαμηλού μοριακού βάρους πεπτιδίων μειώνεται κατά τις ζυμώσεις. Μελετώντας τις ζυμώσεις έχει βρεθεί ότι ανεξαρτήτως από το υψηλό αρχικό ελεύθερο αμινικό άζωτο (FAN), οι ζύμες δεν

χρησιμοποιούν μεγαλύτερα πεπτίδια από τα τριπεπτίδια (Moneton et al., 1986). Αυτό υποδεικνύει ότι υπάρχει όριο στο μέγεθος των πεπτιδίων για τη μεταφορά τους και την είσοδο στα κύτταρα της ζύμης. Έχει επίσης αποδειχθεί ότι κυρίως τα L-αμινοξέα στα δι- και τρι-πεπτίδια είναι προτιμώμενα υποστρώματα, ενώ τα πεπτίδια που αποτελούνται από βασικά αμινοξέα, μεταφέρονται πιο γρήγορα σε σχέση με αυτά που περιέχουν όξινα αμινοξέα (Ingledew et al., 1999).

Μελέτες από τους Ingledew et al. (1999), έχουν δείξει ότι η φάση της ανάπτυξης και η συγκέντρωση του μη πεπτιδικού αζώτου, μπορεί να επηρεάσει τη χρήση των πεπτιδίων. Η μεταφορά διπεπτιδίων στις ζύμες επηρεάζεται από την παρουσία αμινοξέων μικρομοριακών συγκεντρώσεων στο μέσο ανάπτυξης. Κατά τη φάση αυτή, η παρουσία κάποιων αμινοξέων, αυξάνει την ευαισθησία της ζύμης στα μικρά πεπτίδια. Η λευκίνη και η τρυπτοφάνη φάνηκαν να είναι οι πιο αποτελεσματικοί ρυθμιστές πρόσληψης πεπτιδίων, ανεξάρτητα από τη συγκέντρωσή τους. Αντίθετα, η ασπαραγίνη φαίνεται να είναι πιθανός αναστολέας. Υπάρχουν 3 κατηγορίες αμινοξέων που προκαλούν την πρόσληψη των πεπτιδίων: αμινοξέα που παρουσιάζουν ελάχιστη ευαισθησία, αμινοξέα που είναι καλές πηγές αζώτου και περιορίζουν την ευαισθησία της ζύμης στα πεπτίδια και αμινοξέα που θεωρούνται επαγωγείς ή επιταχυντές της ευαισθησίας αυτής. Ενδοκυτταρική μελέτη κυττάρων που αναπτύσσονται σε μέσο που περιέχει αμινοξέα και πεπτίδια, δείχνει αυξημένα επίπεδα πεπτιδικών υπολειμμάτων αμινοξέων, γεγονός που σημαίνει ότι τα συσσωρευμένα υπολείμματα μπορεί να προκαλέσουν αναστολή πρόσληψης αμινοξέων (Lekkas et al., 2009).

Στις ζύμες ζυθοποιίας, η απουσία ανταγωνισμού μεταξύ των μεμονωμένων αμινοξέων και της πρόσληψης απλών πεπτιδίων υποδηλώνει ότι το σύστημα μεταφοράς πεπτιδίων είναι διαφορετικό από το σύστημα για τα αμινοξέα. Επίσης, έχει αποδειχτεί ότι τα δι-και τριπεπτίδια, μοιράζονται το ίδιο σύστημα μεταφοράς (Lekkas et al., 2009). Οι Ingledew et al. (1999), χρησιμοποιώντας ένας συνθετικό μέσο που περιείχε αμινοξέα και πεπτίδια, δεν εντόπισαν δραστηριότητα της εξωκυτταρικής πρωτεϊνάσης, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα μικρά πεπτίδια προσλαμβάνονται από την ζύμη, μέσω ενός συγκεκριμένου συστήματος μεταφοράς πεπτιδίων. Η μεταφορά των πεπτιδίων μεσολαβείται από έναν ειδικό μεταβολικό αισθητήρα που ενεργοποιεί την ταχεία σύνθεση μιας πρόσθετης περμεάσης ή από μια

καταλυτική δραστηριότητα που είναι ικανή να τροποποιεί το υπάρχων σύστημα μεταφοράς πεπτιδίων. Η δραστηριότητα αυτού του μηχανισμού, επηρεάζεται από την ποιότητα των αζωτούχων πηγών και την παρουσία αμινοξέων στο μέσο ανάπτυξης. Με βάση αυτό το κριτήριο, έχει προταθεί ότι το σύστημα μεταφοράς πεπτιδίων της ζύμης εμπίπτει στον ρυθμιστικό έλεγχο του μηχανισμού καταστολής του καταβολίτη αζώτου (Perry et al., 1994).

Οι Moneton et al. (1986), πρότειναν ότι η εξωγενής μεταφορά πεπτιδίων από τη ζύμη, εξαρτάται από τη φύση του πεπτιδίου. Παρατηρήθηκε ότι τα δι-και τριπεπτίδια που αποτελούνται από μεθειονίνη, μεταφέρονται ενεργά στα κύτταρα, ενώ ισάριθμη ποσότητα πεπτιδίων που περιέχουν γλυκίνη δεν προτιμήθηκαν από τη ζύμη. Μελέτες από τους Marger et al. (1977), επιβεβαίωσαν αυτές τις παρατηρήσεις, αναφέροντας ότι οι αποκρίσεις ανάπτυξης για πεπτίδια διαφορετικής αλληλουχίας μπορεί να αντικατοπτρίζουν διακυμάνσεις στο σύστημα μεταφοράς πεπτιδίων. Επιπλέον, οι πλευρικές αλυσίδες ενός πεπτιδίου, μπορεί να καθορίσουν την αποτελεσματικότητά του ως αναστολέας. Τα πεπτίδια μεθειονίνης, είναι πολύ αποτελεσματικοί ανταγωνιστές για τη χρήση άλλων πεπτιδίων. Όταν τα πεπτίδια αυτά χρησιμοποιούνται ως συμπληρώματα με άλλα πεπτίδια, παρατηρούνται αυξημένες φάσεις καθυστέρησης, λόγω ανταγωνισμού στο επίπεδο μεταφοράς. Το ανταγωνιστικό πεπτίδιο προσλαμβάνεται από το κύτταρο και υδρολύεται από ενδογενείς πεπτιδάσες. Όταν η συγκέντρωσή του εξαντληθεί, το πεπτίδιο που περιέχει το ζητούμενο αμινοξύ μπορεί να εισέλθει στο κύτταρο. Αυτά τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι η σύνθεση των πεπτιδίων είναι επίσης ένας σημαντικός παράγοντας στην εξειδίκευση του υποστρώματος του συστήματος πεπτιδικής περμεάσης του στελέχους ζύμης και στους αρχικούς ρυθμούς πρόσληψης πεπτιδίων (Lekkas et al., 2009).

Ωστόσο, τα μεμονωμένα πεπτίδια δεν είναι απαραίτητα τόσο καλή πηγή αζώτου για ανάπτυξη, όσο τα αμινοξέα που τα απαρτίζουν. Επομένως, η ανάπτυξη ενός συγκεκριμένου αμινοξέος δεν θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την πρόβλεψη των χαρακτηριστικών ανάπτυξης στο ομόλογο δι- ή τριπεπτίδιο. Για παράδειγμα, η ενισχυμένη ανάπτυξη κυττάρων ζύμης με συμπλήρωμα αργινίνης δεν επαληθεύεται με τον εμπλουτισμό του μέσου με ένα διπεπτίδιο, ενώ παρατηρήθηκε και κακή κυτταρική διαίρεση.

Η συμπερίληψη μικρών ποσοτήτων αμινοξέων σε μέσο που περιέχει ακινητοποιημένα κύτταρα μπορεί να διευκολύνει τη μεταφορά πεπτιδίων ή να αναστέλλει την χρησιμότητά τους. Άλλες μελέτες έχουν επιβεβαιώσει αυτή τη συμπεριφορά ζύμωσης, όπου η χρήση πεπτιδίων επηρεάζεται από συμπλήρωμα αζώτου του μέσου, από πηγή διαφορετική από μικρά πεπτίδια. Ο βαθμός ενίσχυσης την ανάπτυξης και η διάρκεια της περιόδου πριν από τη χρήση του πεπτιδίου, βρέθηκε ότι εξαρτώνται από τη φύση του αμινοξέος και από την ποιότητα του ολιγοπεπτιδίου. Αν και η ανάπτυξη θα περιοριστεί όταν ο ρυθμός παροχής θρεπτικών πεπτιδίων πέσει κάτω από αυτό που απαιτείται για βέλτιστη πρωτεϊνοσύνθεση, είναι δύσκολο να καταλάβουμε γιατί ο ανταγωνισμός οδηγεί σε ποικίλες περιόδους καθυστέρησης και όχι σε ποικίλους ρυθμούς ανάπτυξης. Τα πεπτίδια καλής ανάπτυξης, πάντα παρουσιάζουν μια μικρή φάση καθυστέρησης (5-7 ώρες), όταν η χρήση τους συγκρίνεται με μεμονωμένα αμινοξέα (Lekkas et al., 2009).

Έχει αναγνωριστεί ότι πολλά αζωτούχα υλικά της ζύμης ελευθερώνονται στο γλεύκος, κατά τη διάρκεια της ζύμωσης (Clapperton et al., 1970). Ένας σημαντικός αριθμός αυτών των υλικών είναι ολιγοπεπτίδια, τα οποία σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Μερικά από αυτά μπορεί να αφομοιωθούν από τη ζύμη, όμως μερικά θα παραμείνουν στο τελικό προϊόν, συμβάλλοντας στην γεύση και τη σταθερότητά του. Τα πεπτίδια που απομένουν στο ζυμωμένο γλεύκος, είναι πολύ μεγάλα και δεν μπορούν να αφομοιωθούν από τη ζύμη, δεδομένης της προτίμησης της ζύμης για πεπτίδια με 3 ή λιγότερα αμινοξέα.

6.2 Ρόλος πεπτιδίων στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της μύρας

6.2.1 Ρόλος πεπτιδίων στον αφρισμό

Είναι γνωστό ότι τα πολυπεπτίδια παίζουν σημαντικό ρόλο στον αφρισμό της μύρας. Υπάρχει η υπόθεση πως τα ίδια ή παρόμοια πολυπεπτίδια συμβάλλουν στο σχηματισμό αφρού κατά τη ζύμωση, καθώς και στο σχηματισμό αφρού και τη σταθερότητα στην τελική μύρα. Ο υπερβολικός αφρισμός κατά τη ζύμωση μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια πολυπεπτιδίων, επηρεάζοντας αρνητικά την τελική ποιότητα μύρας. Πολλοί ερευνητές

προσπάθησαν να προσδιορίσουν τις ιδιότητες των πολυπεπτιδίων που έχουν αντίκτυπο στον αφρισμό της μύρας. Τα πολυπεπτίδια που συναντώνται στην μύρα ποικίλλουν ως προς το μοριακό βάρος και την υδροφοβικότητά τους. Είναι αποδεκτό ότι τα πολυπεπτίδια με ισχυρά υδρόφοβο χαρακτήρα συμβάλλουν στην παράγωγη μύρας με τον πιο σταθερό αφρό. Όμως πιστεύεται ότι και το μοριακό βάρος των πολυπεπτιδίων καθορίζει σημαντικά την επιρροή τους στον αφρισμό. Για παράδειγμα, η πρωτεΐνη Z, μία αλβουμίνη του κριθαριού 43-kDa και η πρωτεΐνη LTP1, με μοριακό βάρος γύρω στα 9.7kDa (μπορεί να οριστεί και ως πολυπεπτίδιο ουσιαστικά) έχουν καθοριστικό ρόλο στον αφρισμό, όπως και επίσης τα πολυπεπτίδια που προέρχονται από τις χορδεΐνες. Τα περισσότερα πολυπεπτίδια της μύρας που επηρεάζουν τον αφρισμό έχουν ως πηγή την βύνη. Ωστόσο, έχουν βρεθεί και πολυπεπτίδια των ζυμών στον αφρό, αν και σε μικρές συγκεντρώσεις (Kordialik-Bogacka et al., 2007).

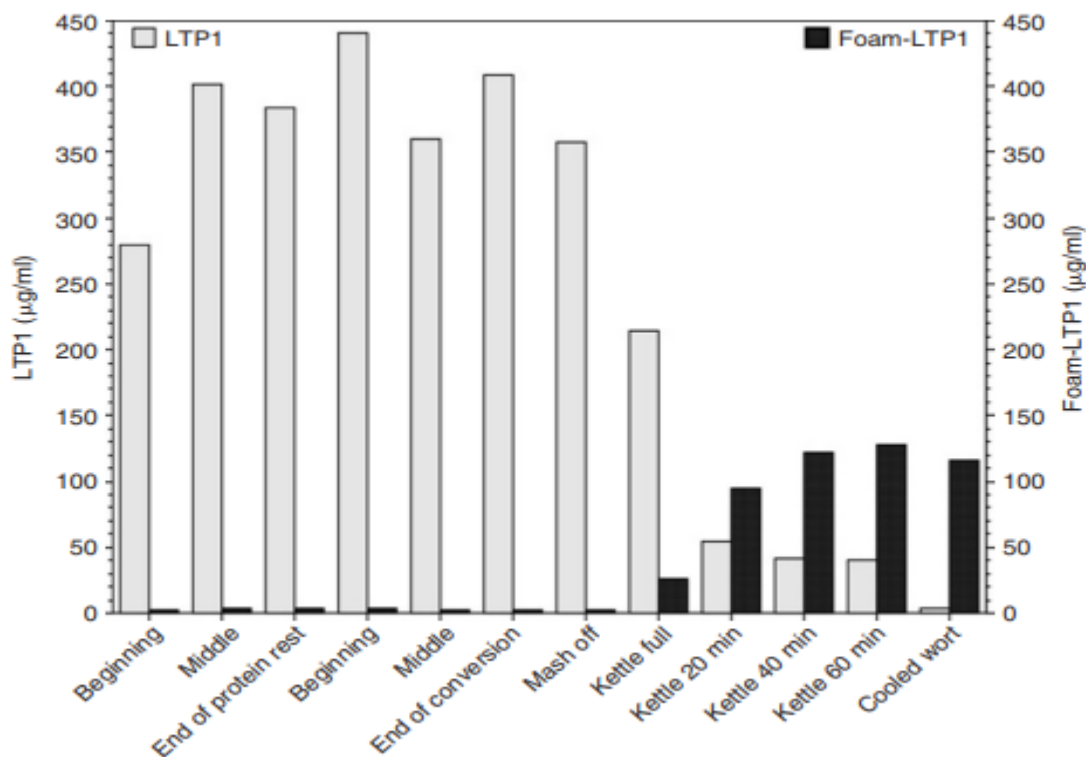
Οι Kordialik-Bogacka et al. (2007) μελέτησαν τις συγκεντρώσεις πολυπεπτιδίων βύνης και πολυπεπτιδίων των ζυμών στον αφρό με στόχο να προσδιορίσουν τον ρόλο τους στον αφρισμό κατά τη ζύμωση. Έγινε λήψη δειγμάτων κάθε 6 ώρες κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, πραγματοποιήθηκε υπερδιήθηση και χρήση μεμβρανών με 30kDa cut-off και ο προσδιορισμός του μοριακού βάρους των πολυπεπτιδίων έγινε με SDS-PAGE. Από τη μελέτη αυτή, ανιχνεύθηκαν υδρόφοβα και μη -υδρόφοβα πολυπεπτίδια, μοριακού βάρους 40-43 kDa και 9-17kDa, ενώ στον αφρό βρέθηκε μεγάλη συγκέντρωση υδρόφοβων πεπτιδίων, σχεδόν διπλάσια σε σχέση με αυτή στο υπό ζύμωση γλεύκος. Με βάση τα αποτελέσματά τους, φαίνεται πως πολυπεπτίδια εκκρίνονται από τα κύτταρα της ζύμης και συσσωρεύονται στον αφρό κατά τη διάρκεια της ζύμωσης της μύρας.

Αν και η πρόσληψη και ο μεταβολισμός μικρών πεπτιδίων επηρεάζει μόνο έμμεσα την παραγωγή αλκοόλ, οι επιπτώσεις τους στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της μύρας δεν μπορούν να αγνοηθούν. Τα πεπτίδια χαμηλού μοριακού βάρους θεωρούνται ότι δρουν ως αρνητικοί παράγοντες αφρού (Dale et al., 1999). Μύρες που περιέχουν απλά πεπτίδια οδήγησαν σε σημαντική μείωση της σταθερότητας του αφρού. Ένας πιθανός μηχανισμός κατά τον οποίο μικρά πεπτίδια αποσταθεροποιούν τον αφρό μύρας είναι ο περιορισμένος αριθμός θέσεων στη διεπαφή αερίου/υγρού μέσα στον αφρό, ο οποίος είναι διαθέσιμος για κατάληψη από τα επιφανειοδραστικά μόρια. Μικρά μόρια πεπτιδίων μπορεί να

καταλαμβάνουν θέσεις, προς αποκλεισμό πολυπεπτιδίων που ενισχύουν τον αφρό, με αποτέλεσμα χαμηλότερο βαθμό σταθερότητας αφρού. Ωστόσο, η προσθήκη τριπεπτιδίων στη μύρα δεν έχουν καθόλου σημαντική επίδραση στη σταθερότητα του αφρού (Dale et al., 1999). Κολλοειδής θολότητα της τελικής μύρας προέρχεται επίσης από το αλληλεπίδραση πεπτιδίων μύρας με πολυφαινόλες (Gorinstein et al., 1999).

Όπως έχει προαναφερθεί, η πρωτεΐνη LTP1, η οποία μπορεί να χαρακτηριστεί και ως πολυπεπτίδιο λόγω μοριακού βάρους, (12kDa) διαδραματίζει ρόλο στον αφρισμό της μύρας. Οι Lusk et al. (1995) συνέκριναν το επίπεδο της μη μετουσιωμένης LTP1 («φυσική») με τη μετουσιωμένη LTP1 («αφρός») και διαπίστωσαν ότι το επίπεδο της LTP1 μειώθηκε στο ψυχθέν γλεύκος στο 25% κατά την πολτοποίηση (Figure 1). Η LTP1 φαίνεται να έχει διαφορετικούς τρόπους δράσης σε σχέση με την ποιότητα του αφρού της μύρας. Πρώτον, μεμονωμένα, η μύρα LTP1 έχει εξαιρετική παραγωγή αφρού αλλά κακές ιδιότητες σταθεροποίησης αφρού. Οι ιδιότητες σταθεροποίησης του αφρού ενισχύονται σημαντικά όταν συνδυάζεται με απομονωμένη ορμόνη/γλουτελίνη LMW ή με ένα κλάσμα αφρού HMW που περιέχει την πρωτεΐνη Z (Sorensen et al., 1993). Αυτή η αποτελεσματικότητα με άλλες πρωτεΐνες για την παροχή σταθερότητας αφρού, παρατηρήθηκε επίσης από τους Douma et al. (1997). Μελέτες διαπίστωσαν ότι η αύξηση της περιεκτικότητας σε LTP1 μύρας είχε ως αποτέλεσμα σε βελτιώσεις στη σταθερότητα του αφρού. Παρομοίως, οι Lusk et al. (1995) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η LTP1 ήταν ένας σημαντικός καθοριστικός παράγοντας της σταθερότητας του αφρού όπως κρίθηκε από τη δοκιμή ανάλυσης σταθερού αφρού. Αντιστρόφως, μικρής κλίμακας (600–800 mL) και πιλοτικές (50 l) δοκιμές που χρησιμοποιούσαν κυρίως τη Rudin διαδικασία ανάλυσης αφρού, βρήκαν μια διφορούμενη σχέση μεταξύ της LTP1 και της σταθερότητας του αφρού που δείχνουν θετική, αρνητική ή καθόλου συσχέτιση (Evans et al., 1999). Εν μέρει η εξήγηση για αυτές τις παρατηρήσεις μπορεί να είναι ότι η ανάλυση Rudin μετρά τη σταθερότητα του αφρού και δεν λαμβάνει υπόψη την ποσότητα του αφρού που σχηματίστηκε. Εναλλακτικά, ο δεύτερος τρόπος δράσης της LTP1, ως πρωτεΐνη που δεσμεύει τα λιπίδια, μπορεί να εξηγήσει τις αποκλίσεις που περιγράφονται παραπάνω. Οι Van Nierop et al. (2004) παρατήρησαν ότι η αυξημένη μετουσίωση της LTP1 μέσω του βρασμού, θα μπορούσε να είναι επιζήμια για τη σταθερότητα

του αφρού λόγω της μειωμένης ικανότητάς της να δεσμεύει τα λιπίδια αποσταθεροποίησης του αφρού. Όταν το επίπεδο των λιπιδίων στην μύρα είναι χαμηλό ή το επίπεδο LTP1 υψηλό, υπάρχει μικρή επίδραση στη σταθερότητα του αφρού μύρας. Αντιστρόφως, όταν το επίπεδο της μύρας της LTP1 είναι χαμηλό και το επίπεδο των λιπιδίων υψηλό, παρατηρήθηκαν σημαντικές μειώσεις στη σταθερότητα του αφρού. Το 1999 τα ερευνητικά εργαστήρια της Carlsberg πήραν την πατέντα για τον χειρισμό της LTP1 με σκοπό τη βελτίωση του αφρού. Ουσιαστικά, η πατέντα καλύπτει όλες τις διαδικασίες παρασκευής ροφημάτων που αυξάνουν τα επίπεδα της LTP1 για τη βελτίωση της ποιότητας του αφρού, με τη χρήση πρόσθετης LTP1 ή ανασυνδυασμένης τεχνολογίας. Οι Evans et al. (2009), κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το εύρος της διακύμανσης για το επίπεδο LTP1 που βρίσκεται στις τρέχουσες ποικιλίες κριθαριού και στους άγριους συγγενείς τους, θεωρείται παλαιά τέχνη. Έτσι, η πρόσβαση στο διαθέσιμο γενετικό υλικό δεν καλύπτεται από την πατέντα, όπως ούτε και οι πρακτικές βελτιστοποίησης του βρασμού (Van Nierop et al., 2004).



Πίνακας 1. Το επίπεδο του μη μετουσιωμένου LTP1 («φυσικό») με το μετουσιωμένο LTP1 («αφρός») στη διαδικασία παραγωγής της μύρας. (Πηγή : Lusk et al., 1995)

6.2.2 Ρόλος των πεπτιδίων στην αίσθηση στόματος της μύρας

Η αίσθηση στο στόμα (mouthfeel) είναι μια σημαντική παράμετρος στο προφίλ της μύρας. Πολλά χημικά συστατικά της έχουν αναφερθεί ότι συμβάλλουν στην αίσθηση του στόματος, όπως τα β-γλυκάνια (γραμμικά πολυμερή της γλυκόζης με β-1,3 ή/και β-1,4 δεσμούς) (Forrest et al, 1977) ή οι ολιγοσακχαρίτες (DP 4-9) (Langstaff et al, 1991). Επίσης, υψηλού μοριακού βάρους πρωτεΐνες, συσσωματώματα πρωτεϊνών καθώς και η ύπαρξη κολλοειδών φαίνεται πως επιδρούν σημαντικά στην γεύση μιας μύρας. Όσον αφορά τα πεπτιδία δεν υπάρχουν στην βιβλιογραφία πολλές μελέτες που αναφέρονται στο πώς αυτά επιδρούν στη γεύση. Οι Ishizuka et al. (2014) ανέφεραν ότι το ποσό των υψηλού μοριακού βάρους πεπτιδίων μπορεί να είναι ένας καλός δείκτης πληρότητας και ποιότητας πικράδας της μύρας. Στην μελέτη τους ανέφεραν ότι πολυπεπτιδία με μοριακό βάρος πάνω από 10kDa

συσχετίστηκαν σημαντικά με την αίσθηση στο στόμα της μπύρας και την πικράδα και μάλιστα περισσότερο από ότι από τα χαμηλού μοριακού βάρους πολυπεπτίδια και ελεύθερα αμινοξέα.

Πρόσφατη μελέτη, έδειξε την παρουσία πεπτιδίων και τον ρόλο τους στην γεύση της μπύρας. Συγκεκριμένα, έδειξαν ότι η αίσθηση στο στόμα της βελτιώνεται με την προσθήκη μαλτοδεξτρινών, αλλά επίσης με την προσθήκη πολυπεπτιδικών κλασμάτων. Υψηλού μοριακού βάρους πολυπεπτίδια (20-40 kDa) αλλά και χαμηλού μοριακού βάρους πολυπεπτίδια (<20 kDa), εμφανίζουν σημαντικά βελτιωμένη απαλότητα και μειωμένη στυπτικότητα.

Συνολικά, αν και προηγούμενες μελέτες έχουν προτείνει ότι οι δεξτρίνες συμβάλλουν σημαντικά στην ένταση της πληρότητας του ουρανίσκου, οι επιδράσεις των πρωτεϊνών και των χαμηλού μοριακού βάρους πεπτιδίων στην αίσθηση του στόματος παραμένουν ασαφείς, λόγω έλλειψης αισθητηριακών ή πειραματικών δεδομένων.

6.3 Πεπτίδια με βιολογική δράση

Τα βιοενεργά πεπτίδια είναι μια σημαντική ομάδα ουσιών που προέρχονται από τρόφιμα. Πρόσφατα κάποια βιοενεργά πεπτίδια βρέθηκαν στη μπύρα καθώς και στο κρασί. Η εξωκυτταρική έκκριση μικροοργανισμών κατά τη ζύμωση και η αυτόλυση των μικροβιακών κυττάρων μετά τη ζύμωση μπορούν να παράγουν πεπτίδια στο τελικό προϊόν μπύρας. Λίγες μελέτες έχουν διερευνήσει τα βιοενεργά πεπτίδια στην μπύρα. Οι Picariello et al. (2011), χρησιμοποίησαν ανοσοχημεία και τεχνολογία φασματομετρίας μάζας (MS) για να αναλύσουν τα πρωτεϊνικά και πεπτιδικά συστατικά δύο ιταλικών ζύθων. Διαπίστωσαν ότι τα περισσότερα πεπτίδια της μπύρας προέρχονταν από το υδατοδιαλυτό μέρος της λευκωματίνης, της πρωτεΐνης κριθαριού.

Τα βιοενεργά πεπτίδια ελέγχονται συμβατικά χρησιμοποιώντας μεθόδους διαχωρισμού, όπως υπερδιήθηση, χρωματογραφία ανιόντων και κατιόντων, χρωματογραφία

στήλης και υγρή χρωματογραφία, σε συνδυασμό με *in vivo* και *in vitro* αξιολόγηση της διαδικασίας διαχωρισμού.

Οι Wenhui et al. (2021) μέσω της υγρής χρωματογραφίας ταυτοποίησαν 50 πεπτίδια στην μύρα Tsingtao, 8 εκ των οποίων ελέγχθηκαν για βιολογική δράση. Απομόνωσαν και προσδιόρισαν ορισμένα πεπτίδια που αναστέλλουν τη δράση της DPP-IV και του ACE, από διαφορετικές πηγές τροφίμων. Η κύρια κλινική θεραπεία για τον διαβήτη σακχαρώδη με υπέρταση, περιλαμβάνει την αναστολή του ACE και δραστηριότητα της DPP-IV. Το ένζυμο μετατροπής της αγγειοτενσίνης (ACE) είναι μια μεταλλοκαρβοξυπεπτιδάση που εμπλέκεται στο σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης (Beatriz et al., 2018). Μπορεί να ελέγξει την αρτηριακή πίεση και την ομοιόσταση των ηλεκτρολυτών, αλλά και τη νεφρική λειτουργία και την αναδιαμόρφωση του μυοκαρδίου. Είναι υπεύθυνο για τη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης και της καρδιαγγειακής θεραπείας και ο κύριος ρόλος του είναι να ρυθμίζει την υπέρταση. Η διπεπτιδυλική πεπτιδάση IV (DPP-IV) είναι μια εξαιρετικά ειδική πρωτεάση σερίνης που είναι υπεύθυνη για τη μεταβολική κοπή ορισμένων ενδογενών πεπτιδίων. Το πεπτίδιο που μοιάζει με γλυκαγόνη (GLP-1), είναι ένα είδος ινσουλίνης, που εύκολα υποβαθμίζεται από DPP-IV. Η αναστολή της δραστηριότητας της DPP-IV, μπορεί να διεγείρει την αναγέννηση του παγκρέατος και να αποτρέψει και να καθυστερήσει την εμφάνιση του διαβήτη. Τα πεπτίδια που βρέθηκαν στη μύρα αναστέλλουν τη δράση αυτών των δυο, με αποτέλεσμα την ρύθμιση του σακχαρώδη διαβήτη.

Number	Peptide	RT (min)	Tag length	Average local confidence (%)	Mass	ppm
1	LAQMEAIR	15.92	8	97	930.4957	1.2
2	PVLLR	18.13	5	96	596.4009	-0.6
3	ADLPGVK	14.35	7	94	698.3962	0.6
4	PPVPHDITD	4.20	8	94	876.3977	1.3
5	ERFQPMFR	17.19	8	94	1109.5439	1.8
6	VVTWQGAFFGA	18.78	11	94	1163.5610	0.8
7	STEWHLID	17.15	7	93	886.3821	1.1
8	PPVPHD	4.44	6	92	660.3231	0.5
9	LDTRVGV	15.19	7	92	758.4286	-0.1
10	SDEPDTVK	4.25	8	92	889.4029	1.6
11	PVALSQVVRQ	17.14	10	92	1095.6399	1.8
12	LAVMQQQQQQ	13.45	10	92	1200.5920	0.8
13	LARLV	15.85	5	91	570.3853	0.1
14	LPGELAK	14.34	7	91	726.4276	0.6
15	LENVLR	14.44	6	91	742.4337	-0.3
16	LVLPGELAK	18.33	9	91	938.5800	0.4
17	VDWPHIE	14.71	7	90	793.3970	0.7
18	TTGGMRPP	11.74	8	90	815.3959	0.9
19	PPVPHDFNME	4.55	10	89	1181.5176	-5.1
20	PPVPHDITD	4.52	8	89	876.3977	1.2
21	ELLL	18.73	4	89	486.3053	-0.5
22	VVTWQQFEGAY	18.93	11	89	1326.6245	0.3
23	LAVMQQQQQQQVQ	15.19	12	89	1427.7190	0.1
24	ADLPGVKK	10.42	8	88	826.4912	-1.1
25	LAVMQQQQ	13.82	8	88	944.4750	0
26	EKLWSMEK	16.13	8	88	1049.5215	0.6
27	LASGALGLGGLSSL	19.07	14	88	1214.6870	-0.5
28	DFLVR	18.35	5	87	648.3595	-0.1
29	LALDTRVIG	16.40	8	87	843.4814	0.4
30	LPEDAKVE	13.08	8	87	899.4600	1.5
31	LLLP	18.79	4	87	454.3155	-0.3
32	HAVSEGTKAVT	4.69	11	87	1098.5669	0.4
33	LAVMQGAQQQQ	13.62	11	87	1200.5920	0.8
34	LGGGDVFKQLQR	17.28	12	87	1316.7200	2
35	RVALVY	16.10	6	86	719.4330	-0.5
36	STGV	2.98	4	86	362.1801	0.2
37	DLPGVKK	10.30	7	86	755.4541	0
38	LNFDPNR	15.80	7	86	874.4297	-0.1
39	TVSGF	15.46	5	86	509.2485	0.5
40	PMAPLPRSGP	16.11	10	86	1021.5378	0.3
41	LPQQQAQFK	13.97	9	86	1086.5823	0.1
42	PMAPLPRSGEP	15.94	11	86	1150.5803	0.9
43	FVLR	16.80	4	85	533.3325	0
44	FPVGRGL	17.05	7	85	744.4282	0.4
45	LEKYSQ	6.56	6	85	766.3861	1.2
46	PVALSQVVR	17.28	9	85	967.5814	2.2
47	VAVARITPVG	14.60	10	85	969.5607	-1.7
48	VVGTVVLLQVP	18.99	10	85	1009.6172	-0.1
49	TPLLP	18.51	5	85	539.3318	0.1
50	QAAVGNWVEK	11.97	11	85	1084.5876	0.9

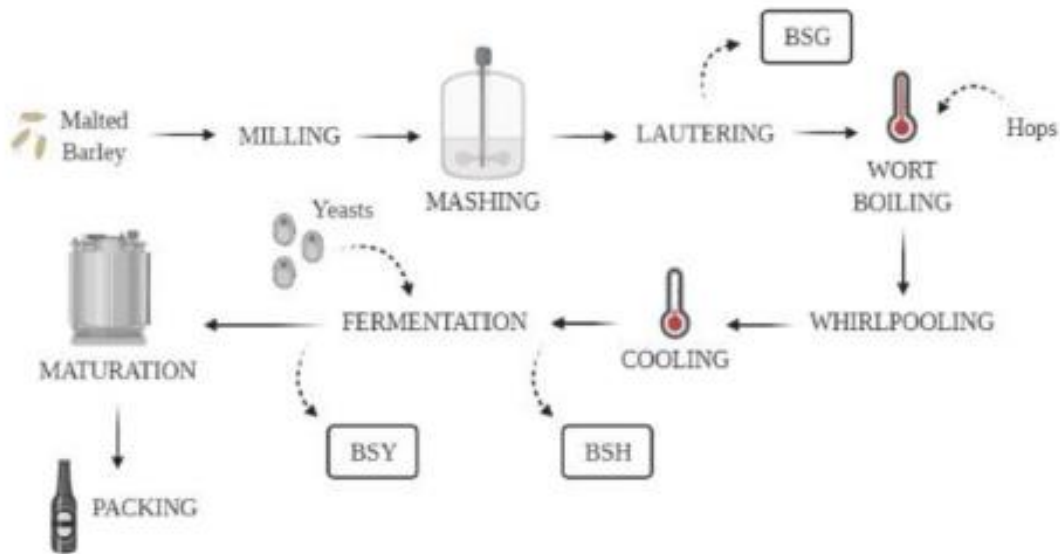
Πίνακας 2. Αλληλουχίες πεπτιδίων που απομονώθηκαν στην μύρα Tsingtao.

(Πηγή: Wenhui et al., 2021)

7. Ρόλος των πεπτιδίων σε παραπροϊόντα ζυθοποίησης

Σημαντικές ποσότητες παραπροϊόντων παράγονται κάθε χρόνο από την βιομηχανία παραγωγής ζύθου, τα οποία δεν έχουν μέχρι στιγμής κατάλληλα εκτιμηθεί (Ribeiro-Oliveira et al, 2021). Η διαχείριση των αποβλήτων αποτελεί ένα σημαντικό οικονομικό και οικολογικό πρόβλημα, ενώ οι περισσότερες Ζυθοποιίες χρησιμοποιούν τα παραπροϊόντα παραγωγής για την παραγωγή ζωοτροφών. Παρόλα αυτά, κατά την παραγωγή της μύρας, τρία κύριες κατηγορίες υποπροϊόντων συλλέγονται: BSG (Brewer's Spent Grain), BSH (Brewer's Spent Hops) και BSY (Brewer's Spent Yeast) (Εικόνα 18), υποπροϊόντα που λαμβάνονται αντίστοιχα από τα σιτηρά, τον λυκίσκο και από τις ζύμες. Ενώσεις των κατηγοριών αυτών έχουν μελετηθεί ως προς την χρήση τους για την παραγωγή προϊόντων με οφέλη στην υγεία του ανθρώπου, καθώς αποτελούν πηγή πρωτεϊνών που μπορούν να υδρολυθούν και να παράγουν βιοδραστικά πεπτίδια.

Όπως φαίνεται στη εικόνα 18, το βυνοποιημένο κριθάρι αφού ξηραθεί, αλεσθεί και πολτοποιηθεί, απελευθερώνει ένα σύνολο ζυμώσιμων υδατανθράκων και πρωτεϊνών/πεπτιδίων/αμινοξέων (Mussatto et al., 2006). Το γλυκό υγρό που παράγεται ονομάζεται γλεύκος και το υπολειμματικό στερεό κλάσμα (το αδιάλυτο μέρος του κόκκου του κριθαριού που περιλαμβάνει κυρίως τα περιβλήματα) διαχωρίζεται και απορρίπτεται, όντας ως αναλωμένος κόκκος ζυθοποιίας (Brewer's Spent Grain, BSG). Έπειτα, το γλεύκος βράζει με την προσθήκη λυκίσκου, που προσδίδει πικράδα και γεύση. Στο τέλος, το υγρό εκχύλισμα διαχωρίζεται από τον αναλωθέντα λυκίσκο (Brewer's Spent Hops, BSH) για να ζυμωθεί. Στο τελικό στάδιο της ζύμωσης, οι περισσότερες ζύμες συλλέγονται και επαναχρησιμοποιούνται πολλές φορές (4–6 φορές). Παραλαμβάνονται από τη μια ζύμωση στην άλλη και τελικά απορρίπτονται ως μαγιά μύρας (Brewer's Spent Yeast, BSY).



Εικόνα 18. Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας ζυθοποίησης και της εξαγωγής των υποπροϊόντων BSG, BSH και BSY.

(Πηγή: Ribeiro-Oliveira et al., 2021)

Το BSG είναι το κύριο υποπροϊόν, που αντιπροσωπεύει περίπου το 85% των συνολικών παραπροϊόντων που λαμβάνονται. Περίπου 20 κιλά φρέσκου BSG παράγονται ανά 100 λίτρα παρασκευασμένη μύρα (Reinold, 1997) και, στην Ευρωπαϊκή Ένωση, η μέση ετήσια παραγωγή BSG υπολογίζεται σε περίπου 3,4 εκατομμύρια τόνους (Stojceska, 2019). Το BSY είναι το δεύτερο σημαντικό υποπροϊόν ζυθοποιίας και αντιπροσωπεύει περίπου το 15% των συνολικών υποπροϊόντων. Κατά τη διαδικασία της ζύμωσης, οι ζύμες αναδύονται πολλές φορές, γεγονός που οδηγεί σε αξιοσημείωτη αύξηση της βιομάζας του ζυμομύκητα (3-6 φορές). Στο τέλος, παράγονται 2–4 kg BSY ανά 100 L μύρας (Europe, 2002). Το BSH αντιπροσωπεύει, μακράν, τη μικρότερη ποσότητα που παράγεται και είναι το λιγότερο αξιοποιημένο υποπροϊόν ζυθοποιίας.

Η χημική σύνθεση των BSG και BSY ποικίλλει ανάλογα με τις συνθήκες παρασκευής και τις πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται (Bokulich et al., 2013; Lynch et al., 2016). Και τα δύο υποπροϊόντα, όπως προαναφέρθηκε, είναι πολύτιμες πηγές πρωτεϊνών, 19–30% (Lynch et al., 2016), 35–60% (Thiago et al., 2014) ξηρού βάρους και πλούσια σε αμινοξέα (Podpora et al., 2015; Vieira et al., 2016). Αυτές οι πρωτεΐνες, εκτός από τους διατροφικές ιδιότητες, παρέχουν επίσης φυσιολογικά ενεργά πεπτίδια, που ονομάζονται βιοενεργά πεπτίδια, τα

οποία μπορούν να προσφέρουν πρόσθετα οφέλη για την υγεία και συγκεκριμένα αντιυπερτασικές, αντιοξειδωτικές και ανοσοτροποποιητικές δραστηριότητες. Τα απομονωμένα πεπτίδια με συγκεκριμένο μοριακό βάρος, μπορούν να κλασματοποιηθούν για να διαχωριστούν τα βιοενεργά από το μείγμα.

Ερευνητικές μελέτες, σχετικά με την αξιοποίηση των υποπροϊόντων ζυθοποιίας ως πρώτες ύλες για την παραγωγή βιοδραστικών πεπτιδίων, εμφανίστηκαν στην αρχή του 21ου αιώνα. Ωστόσο, μόλις πρόσφατα απέκτησε μεγάλη σημασία, λόγω του ενδιαφέροντος για μείωση του περιβαλλοντικού και οικονομικού κόστους, παρέχοντας έναν βιώσιμο και αποτελεσματικό τρόπο διαχείρισης των απορριμμάτων, στο πλαίσιο κυκλικής οικονομίας. Επιπλέον, οι ευεργετικές, για την υγεία, ιδιότητες που έχουν τα βιοενεργά πεπτίδια από τα BSG και BSY, τα καθιστούν άξιους υποψηφίους για την εφαρμογή τους σε διαταραχές του μεταβολικού συνδρόμου όπως η υπέρταση, κοιλιακή παχυσαρκία, δυσλιπιδαιμία, υπερινσουλιναμία και η δυσανεξία στη γλυκόζη, που είναι προγνωστικά για καρδιαγγειακά νοσήματα και σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (Cornier et al., 2008). Αντίθετα με τα BSG και BSY, το BSH δεν έχει μελετηθεί αρκετά.

7.1 Βιοδραστικά Πεπτίδια από Υποπροϊόντα Ζύμης / BSY – Brewer's Spent Yeast

Το BSY αναγνωρίζεται γενικά ως ασφαλές (GRAS) πρώτη ύλη (Vieira, et al., 2016) και μια δυναμικά πλούσια πηγή βιοδραστικών πεπτιδίων. Ωστόσο, το κυτταρικό τοίχωμα των ζυμομυκήτων χρειάζεται να διαταραχθεί και να διασπαστεί για την απελευθέρωση αυτών των κυτοσολικών και μεμβρανικών πρωτεϊνών (Marson et al., 2020). Επιπλέον, η λύση του κυττάρου απελευθερώνει πολυάριθμες πρωτεάσες κενοτόπιων της ζύμης (Hecht, et al., 2014) και μπορεί να προάγει την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών (αυτόλυση) μέσω μιας βιώσιμης διαδικασίας και να παραχθούν έτσι βιοδραστικά πεπτίδια. Η πρώτη μελέτη που αποδίδει τις ευεργετικές βιολογικές ιδιότητες των πεπτιδίων του BSY, είναι από τους Kanauchi et al. (2005). Εκείνη την εποχή, ήταν ένα εκπληκτικά καινοτόμο έργο που αφορούσε την *in vivo* επίδειξη της αντιυπερτασικής δράσης των πρωτεϊνικών υδρολυμάτων BSY και των απομονωμένων πεπτιδίων. Η επόμενη δημοσίευση έγινε το 2011, από τους Jung et al. και παρουσιάζει *in vitro* και *in vivo* μελέτες. Η πρόσφατη τάση επαναχρησιμοποίησης

παραπροϊόντων της βιομηχανίας έχει προκαλέσει νέα έρευνα για τις αντιοξειδωτικές, αντιυπερτασικές, αντιυπεργλυκαιμικές, αντιελκώδεις και αντιπολλαπλασιαστικές ιδιότητες των πεπτιδίων του BSY, οι οποίες παρουσιάζονται στην συνέχεια.

Αντιυπερτασικές ιδιότητες πεπτιδίων από BSY

Οι υπερτασικοί ασθενείς χαρακτηρίζονται από υπερενεργοποίηση του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης-αλδοστερόνης (Catt et al., 1971), ένα σημαντικό σύστημα που εμπλέκεται στη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης, κυρίως μέσω της αγγειοτενσίνης II (Munoz-Durango et al., 2016) που παράγεται από το μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης (ACE, angiotensin converting enzyme). Η αγγειοτενσίνη II αυξάνει την αρτηριακή πίεση μέσω αγγειοσύσπασης και ρύθμισης του νεφρικού ιόντος και του νερού. Όταν η δραστηριότητα του ACE είναι αυξημένη, τα επίπεδα της αγγειοτενσίνης II αυξάνονται, με αποτέλεσμα να προκαλείται αυξημένη σύσπαση του αγγείου και υπερβολικός όγκος αίματος, συμβάλλοντας στην ανάπτυξη και εξέλιξη της υπέρτασης (Forrester et al., 2018). Επομένως, βιοενεργά πεπτίδια που παρουσιάζουν ανασταλτικές δραστηριότητες του ACE είναι σημαντικά ενδιαφέροντα για τον έλεγχο της αυξημένης αρτηριακής πίεσης. Επιπλέον, η υψηλή πίεση στο αίμα σχετίζεται με το οξειδωτικό στρες και με δυσλειτουργικούς ενδογενείς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς (Lassegue et al., 2004), που μπορούν να μειωθούν με τα αντιοξειδωτικά πεπτίδια.

Από την μελέτη των Kanauchi et al. (2005) δύο διπεπτίδια [Ala-Phe (AF) και Ala-Gly (AG)], προϊόντα υδρόλυσης, απομονώθηκαν και ελέγχθηκαν ως προς την *in vivo* δράση τους σε μοντέλα αρουραίων με υπέρταση. Βρέθηκε ότι η αρτηριακή πίεση μειώθηκε σημαντικά με την χρήση αυτών των διπεπτιδίων, τα οποία μάλιστα παρουσίασαν περίπου το 60% της δραστηριότητας του κοινώς χρησιμοποιούμενου φαρμάκου captopril. Επίσης, μελέτη των Viera et al. (2016) σε μικρού μοριακού βάρους (<5kDa) πεπτιδίου προερχόμενο από αυτόλυση ζυμών, έδειξε ότι το εν λόγω πεπτίδιο ενισχύει *in vivo* την αναστολή του ACE και *in vitro* πειράματα φανέρωσαν ότι το πεπτίδιο μπορεί να απορροφηθεί καλά στο γαστρεντερικό σύστημα. Γενικά, η χρήση πεπτιδίων ως βιοδραστικά προϊόντα προς όφελος της υγείας του ανθρώπου περιλαμβάνει κυρίως την λήψη τους εκ του στόματος και για να μπορέσουν να

ασκήσουν την δράση τους σημαντική προϋπόθεση είναι αυτά να μην διασπώνται στο γαστρεντερικό σύστημα και να έχουν καλή απορρόφηση. Άλλες πρόσφατες έρευνες των Amorim et al., (2019) δείχνουν την ACE-ανασταλτική δράση κλασμάτων πεπτιδίων μικρού μοριακού βάρους (<3KDa) από BSY, από τα οποία τα πεπτίδια SPQW, PWW και RYW που ανιχνεύθηκαν είχαν την μεγαλύτερη βιολογική δράση. Με βάση τους συγγραφείς, τα πεπτίδια αυτά λόγω του μικρού τους μοριακού βάρους και την υδροφοβικότητας που παρουσιάζουν στο C-τελικό άκρο, μπορούν να απορροφηθούν και να ασκήσουν τη δράση τους.

Σε πρόσφατη, επίσης, δημοσίευση των Della Rosa et al. (2023), αναφέρεται ότι με υδρόλυση παραπροϊόντων ζύμης (από ζυθοποίηση Pilsen μύρας στις Βραζιλία), δημιουργούνται ολιγοπεπτίδια και συγκεκριμένα δι- και τριπεπίδια, τα οποία ανιχνεύθηκαν με μέθοδο LC-MS/MS και βρέθηκε να έχουν ACE-ανασταλτική δράση.

Αντιοξειδωτικές ιδιότητες πεπτιδίων από BSY

Η αντιοξειδωτική δράση των BSY υδρολυμάτων παρατηρήθηκε αρχικά από τους Jung et al. (2011). Διεξήχθη υδρόλυση με χρήση του ενζύμου Flavourzyme (πεπτιδάση), ακολουθούμενη από υπερδιήθηση, σχηματίζοντας πεπτίδια που παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση *in vitro*. Πιο πρόσφατα, οι Marson et al., (2019) μελέτησαν, *in vitro*, το αντιοξειδωτικό δυναμικό των υδρολυμάτων BSY (*Saccharomyces pastorium*). Συνέκριναν τρεις μεθόδους για τη ρήξη του κυτταρικού τοιχώματος του ζυμομύκητα: αυτόλυση, μηχανική διαταραχή και ποικίλη ενζυματική υδρόλυση. Κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι ενώσεις των εσωτερικών κυττάρων του ζυμομύκητα, απελευθερώνονται αποτελεσματικότερα μετά από ενζυματική υδρόλυση και ιδιαίτερα μετά από διαδοχική υδρόλυση χρησιμοποιώντας Brauzyn και Alcalase, επιδεικνύοντας υψηλότερη πρωτεϊνική ανάκτηση σε σύγκριση με τις άλλες μεθόδους (83% σε σχέση με μη επεξεργασμένη μαγιά). Επιπλέον, η διαδοχική υδρόλυση ήταν η μόνη μέθοδος που βελτίωσε τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες πάνω από 60%, σε σύγκριση με τη μη επεξεργασμένη μαγιά. Αργότερα, μετά από αυτά τα συμπεράσματα, η ίδια ομάδα (Marson et al., 2020) δοκίμασε τις συνθήκες υδρόλυσης πρωτεϊνών, με πολλαπλές *in vitro* αναλύσεις, για τη μεγιστοποίηση της αντιοξειδωτικής δράσης. Το μέγιστο αποτέλεσμα κάθε

δοκιμασίας, ποικίλλει ανάλογα με τον συνδυασμό των ενζύμων που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς διαφορετικοί ενζυμικοί συνδυασμοί οδηγούν στο σχηματισμό διακριτών πεπτιδίων που μπορούν να ασκήσουν τις επιπτώσεις τους με διαφορετικούς μηχανισμούς.

Αντιυπεργλυκαιμικές ιδιότητες πεπτιδίων από BSY

Οι Jung et al. (2011) διερεύνησαν το αντιυπεργλυκαιμικό δυναμικό των BSY πεπτιδίων, ιδιαίτερα, το περιεχόμενο σε κυκλο-His-Pro (CHP), ένα κυκλικό διπεπτίδιο που στους ανθρώπους σχετίζεται με το γλυκαιμικό έλεγχο στο διαβήτη. Εξέτασαν τα υδρολύματα BSY που ελήφθησαν με αρκετά εμπορικά διαθέσιμα ένζυμα και επαλήθευσαν ότι η υψηλότερη περιεκτικότητα σε CHP (674,0 mg/g), λήφθηκε με τη χρήση του Flanouzyme. Ως εκ τούτου, προχώρησαν περαιτέρω σε *in vivo* μελέτες με υδρολύματα Flanouzyme. Τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα ήταν περισσότερο από 100 mg/dl χαμηλότερα στην ομάδα υδρόλυσης ζυμομύκητα, σε σύγκριση με τον έλεγχο για διαβήτη τύπου 1. Μικρότερες, αλλά σημαντικές, διαφορές αναφέρθηκαν επίσης μεταξύ των δύο ομάδων για διαβήτη τύπου 2. Έτσι, και στα δύο μοντέλα, παρατηρήθηκε επίδραση ανοχής γλυκόζης, υποδηλώνοντας τη δυνατότητα των υδρολυμάτων BSY ως αντιδιαβητικό υλικό για την παρασκευή λειτουργικών τροφίμων και συμπληρωμάτων.

Αντιελκώδης δράση πεπτιδίων από BSY

Οι Amorim et al. (2016) διερεύνησαν τον πιθανό προστατευτικό ρόλο των πεπτιδίων BSY στον γαστρικό βλεννογόνο, κατά του έλκους. Μετά την αυτόλυση, την υπερδιήθηση, την υδρόλυση από πρωτεάσες *Cynara cardunculu* και την νανοδιήθηση του BSY, χορηγήθηκαν τα κλάσματα <3 kDa και >3 kDa σε αρουραίους Wistar, ακολουθούμενη από θεραπεία με απόλυτη αιθανόλη ως ελκογόνο μέσο. Το πεπτιδικό κλάσμα <3 kDa μπόρεσε σημαντικά να μειώσει τους γαστρικούς τραυματισμούς, με δοσοεξαρτώμενο τρόπο, έως και 63,4%.

Αντιπολλαπλασιαστική δράση πεπτιδίων από BSY

Οι Amorim et al. (2016), μελέτησαν επίσης την αντιπολλαπλασιαστική δράση σε πολλές κυτταρικές γραμμές ανθρώπινου όγκου (γλοίωμα, μελάνωμα, αδenoκαρκίνωμα μαστού, νεφρό, πνεύμονα, αδenoκαρκίνωμα παχέος εντέρου και λευχαιμία). Τα

αποτελέσματα παρουσιάζουν πολλά υποσχόμενη αντιπολλαπλασιαστική δράση (αναστολή ανάπτυξης κυττάρων μεγαλύτερη από 50%) έναντι των λευχαιμικών κυττάρων, υποδηλώνοντας την πιθανή χρήση αυτών των πεπτιδίων στην πρόληψη και τη θεραπεία αυτής της ασθένειας.

7.2 Βιοδραστικά Πεπτίδια από Υποπροϊόντα Κριθαριού / BSG – Brewer’s Spent Grain

Το κριθάρι χρησιμοποιείται από την αρχαιότητα στη διατροφή του ανθρώπου, ωστόσο, η επαναχρησιμοποίηση του BSG, ως πηγή πρωτεϊνών που μπορεί να υδρολυθεί και να παραχθούν βιοενεργά πεπτίδια, με ποικίλα οφέλη, είναι πρόσφατη. Οι πρώτες μελέτες δημοσιεύτηκαν πριν από μια δεκαετία, το 2013, και έκτοτε, αρκετές βιοδραστικές ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένων των αντιοξειδωτικών, ανοσοτροποποιητικών, αντιυπεργλυκαιμικών, αντιυπερτασικών, αντιθρομβωτικών και η αντιμικροβιακών, έχουν συσχετιστεί με τα BSG υδρολύματα και πεπτίδια. Αν και μόνο μία *in vivo* μελέτη έχει αναφερθεί μέχρι στιγμής, πολυάριθμες *in vitro* μελέτες ενθαρρύνουν τη χρήση των BSG πρωτεϊνών, για τη λήψη βιοδραστικών πεπτιδίων που θα μπορούν να ενσωματωθούν σε τρόφιμα για την ενίσχυση της υγείας (Ribeiro et al., 2021).

Αντιυπερτασικές ιδιότητες πεπτιδίων από BSG

Οι Connolly et al. (2014), μελέτησαν *in vitro* την ανασταλτική δράση του ACE των BSG υδρολυμάτων. Οι συγγραφείς χρησιμοποίησαν τη μέθοδο αλκαλικής εκχύλισης, για να αποκτήσουν ένα κλάσμα πλούσιο σε πρωτεΐνη BSG, και εξέτασαν 11 εμπορικά ένζυμα για υδρόλυση πρωτεΐνης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα υδρολύματα BSG, αύξησαν σημαντικά την αναστολή του ACE, με δοσοεξαρτώμενο τρόπο και το υδρόλυμα που παραλήφθηκε από το Prolgyne® 1000, εμφάνισε την υψηλότερη αναστολή στο ACE.

Περαιτέρω *in vivo* μελέτες από τους Cermeno et al. (2019), αξιολόγησαν ένα προϊόν υδρόλυσης του BSG, χρησιμοποιώντας το μοντέλο SHR, αναφορικά με τις ιδιότητες μείωσης της πίεσης στο αίμα. Η εξαγωγή πρωτεϊνών από το BSG, είναι δύσκολη λόγω της παγίδευσής τους μέσα σε μια σύνθετη δομή υδατανθράκων. Για το λόγο αυτό, οι συγγραφείς

πραγματοποίησαν μια προεπεξεργασία BSG με υδατάνθρακες. Οι πρωτεΐνες υδρολύθηκαν με το εμπορικό ένζυμο Alcalase, ακολουθούμενο από το Flavourzyme και τα προκύπτοντα πεπτίδια χορηγήθηκαν σε αρουραίους. Στη συνέχεια μετρήθηκαν η αρτηριακή πίεση και ο καρδιακός ρυθμός, με τηλεμετρία. Η συστολική, διαστολική, και η μέση αρτηριακή πίεση μειώθηκαν σημαντικά, φθάνοντας στο ελάχιστο επίπεδα 6 ώρες μετά την κατάποση του υδρολύματος. Λόγω του ικανοποιητικού υποτασικού αποτελέσματος, τα υδρολύματα κλασματοποιήθηκαν και τέσσερα πεπτίδια ταυτοποιήθηκαν: τα IPLQP και LPLQP έδειξαν την υψηλότερη ανασταλτική δράση του ACE, ενώ τα IPY και LPY παρουσίασαν την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση. Έτσι, θα μπορούσαμε να συμπεράνουμε ότι τα αντιυπερτασικά αποτελέσματα του BSG υδρολύματος, μπορούν να έχουν τη συμβολή της αναστολής του ACE καθώς και αντιοξειδωτικά πεπτίδια.

Αντιοξειδωτική δράση πεπτιδίων από BSG

Οι Vieira et al. (2017) επέδειξαν και συνέκριναν την αντιοξειδωτική ικανότητα των ληφθέντων υδρολυμάτων πρωτεΐνης BSG, με διαφορετικές ενζυμικές προσεγγίσεις. BSG αλκαλικές πρωτεΐνες υδρολύθηκαν χρησιμοποιώντας ίσες ποσότητες εμπορικών ενζύμων ή πρωτεάσεων που εκχυλίζονται με BSY. Η χρήση των πρωτεολυτικών ενζύμων BSY ενδείκνυται τόσο από οικονομική όσο και από περιβαλλοντική άποψη, λόγω επαναχρησιμοποίησης των δύο βασικών παραπροϊόντων ζυθοποιίας. Στην αρχή φαινόταν ότι τα εμπορικά ένζυμα είναι καλύτερη επιλογή για την παραγωγή αντιοξειδωτικών πεπτιδίων. Ωστόσο, όταν δοκιμάστηκε σε μοντέλα εντερικών και ηπατικών κυτταρικών γραμμών, η χρήση πρωτεασών BSY, αποδείχθηκε ότι είναι η πιο πολλά υποσχόμενη μέθοδος. Η υδρόλυση πρωτεΐνης BSG, χρησιμοποιώντας πρωτεάσες BSY, βελτιστοποιήθηκε από τους Vieira et al. (2016), για να αποκτήσει μέγιστες αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Έτσι, μπορούν να ληφθούν πεπτίδια BSG με βελτιωμένες αντιοξειδωτικές ιδιότητες, χρησιμοποιώντας ένα εκχύλισμα μαγιάς από το BSY, επαναχρησιμοποιώντας και τα δύο αγροτοβιομηχανικά υποπροϊόντα.

Πρόσφατα, εξετάστηκε λεπτομερώς από τους Ikram et al. (2020), η επίδραση της προεπεξεργασίας (υπερηχητικά κύματα ή θερμότητα) στο αντιοξειδωτικό δυναμικό των αλκαλικών εκχυλισμένων υδρολυμάτων πρωτεϊνών, που ελήφθη χρησιμοποιώντας την

πρωτεάση αλκαλάση. Η απελευθέρωση πεπτιδίων με το ισχυρότερο αντιοξειδωτικό δυναμικό, παρατηρήθηκε με υπερήχους στα 50 kHz και ενζυματική υδρόλυση μετά από 4 ώρες. Οι Connolly et al. (2019) συνέκριναν δύο μεθόδους προ-υδρόλυσης για την BSG εκχύλιση πρωτεϊνών: αλκαλικές και υδατανθρακικές. Επιπλέον, δοκιμάστηκαν αρκετοί ενζυματικοί συνδυασμοί και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι αντιοξειδωτικές δράσεις δεν ήταν σημαντικά διαφορετικές μεταξύ των αλκαλικών και υδατανθρακικών υδρολύσεων, αν και το αλκαλικό υδρόλυμα Prolzyme 1000+ Protease P εμφάνιζε το υψηλότερο δυναμικό. Παρόλα αυτά, οι συγγραφείς πιστεύουν ότι αυτά τα αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι η προκατεργασία υδατανθράκων, σε σύγκριση με την εκχύλιση αλκαλικής πρωτεΐνης, είναι εφικτή προσέγγιση για την παραγωγή βιοδραστικών πεπτιδίων. Δείχνει να παρουσιάζει μεγαλύτερο ενδιαφέρον γιατί όταν εφαρμόζεται η πιο πρόσφατη μέθοδος, το τελικό εκχύλισμα περιέχει μεγάλες ποσότητες αλάτων που δεν είναι επιθυμητά σε ένα βιοδραστικό συστατικό.

Οι Ciurko et al. (2021), χρησιμοποίησαν BSG ως υπόστρωμα για τη λήψη πρωτεϊνικών προϊόντων υδρόλυσης με αντιοξειδωτική δράση. Η υδρόλυση διεξήχθη σε καλλιέργεια χρησιμοποιώντας πρωτεολυτικά βακτήρια και ελεγχόταν με μέτρηση της συγκέντρωσης α-αμινο ομάδας και με τη βοήθεια χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγέθους. Σε κάθε καλλιέργεια, υπολογίστηκε ο βαθμός υδρόλυσης και παρατηρήθηκε ότι η πιο αποτελεσματική υδρόλυση πρωτεΐνης ήταν στις καλλιέργειες *Bacillus cereus* (43,06%) και *Bacillus lentus* (41,81%). Τα προϊόντα υδρόλυσης πρωτεϊνών BSG εμφάνισαν υψηλή αντιοξειδωτική δράση.

Αντιυπεργλυκαιμικό δυναμικό πεπτιδίων από BSG

Καθυστερημένη πέψη των υδατανθράκων σε απορροφήσιμη γλυκόζη, με αναστολή της α-αμυλάσης και της εντερικής α-γλυκοσιδάσης, είναι μια θεραπευτική προσέγγιση για τον έλεγχο της μεταγευματικής υπεργλυκαιμίας σε προδιαβήτη και διαβήτη (McDougall et al., 2005). Το ανασταλτικό δυναμικό της α-αμυλάσης και α-γλυκοσιδάσης των υδρολυμάτων BSG διερευνήθηκε αρχικά από τους Connolly et al. (2014). Υδρολύματα, δοκιμάστηκαν για in

in vitro βιοδραστικότητα και αύξησαν σημαντικά την αναστολή της α-γλυκοσιδάσης με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε σημαντική αλλαγή στην αναστολή της α-αμυλάσης.

Η αναστολή της διπεπτιδυλ πεπτιδάσης IV (DPP-IV), είναι μια άλλη στρατηγική για τη διαχείριση του διαβήτη τύπου 2, αφού αυτή η πρωτεάση είναι υπεύθυνη για η αποδόμηση της ινκρετίνης, μιας ορμόνης που ενισχύει την έκκριση ινσουλίνης, με την παρουσία γλυκόζης (Nongonierma et al., 2013). Οι Connolly et al. (2014), διερεύνησαν επίσης το ανασταλτικό DPP-IV δυναμικό των υδρολυμάτων BSG in vitro, και παρατήρησαν αυξημένη αναστολή DPP-IV, με δοσοεξαρτώμενο τρόπο, όπου η πέψη με το εμπορικό ένζυμο Corolase® PP, είχε ως αποτέλεσμα την υψηλότερη αναστολή. Σε άλλη αναφορά, οι Connolly, et al. (2017), εξέτασαν τον αντίκτυπο του SGID και διήθηση στο ανασταλτικό δυναμικό DPP-IV των υδρολυμάτων BSG. Σε συμφωνία με τα προηγούμενα αποτελέσματα, παρατηρήθηκε η υψηλότερη μέση αναστολή DPP-IV για το υδρόλυμα Corolase PP. Ενώ η υπερδιήθηση ευνόησε τα υδρολύματα Corolase PP, το SGID αύξησε την αναστολή των υδρολυμάτων Flavourzyme και Alcalase, αλλά όχι του Corolase PP. Περαιτέρω κλασματοποίηση υδρολυμάτων αλκαλάσης (που είχε δείξει καλύτερη αντιυπερτασική δράση) επέτρεψε την ταυτοποίηση του πεπτιδίου ILLPGAQDGL, που εμφανίζει την υψηλότερη ανασταλτική δράση DPP-IV. Είναι αρκετά ενδιαφέρον το γεγονός ότι αυτό το πεπτίδιο είχε ήδη αποδειχθεί ότι αναστέλλει το ACE (Connolly et al., 2015) και, ως εκ τούτου, παρουσιάζει μια διπλή πολλά υποσχόμενη δραστηριότητα.

Οι Connolly et al. (2019), εκτός από την αντιοξειδωτική ικανότητα, εξέτασαν επίσης το ανασταλτικό δυναμικό DPP-IV των αλκαλικών και υδατανθρακικών υδρολυμάτων. Τα αλκαλικά υδρολύματα έδειξαν υψηλότερο βαθμό αναστολής της DPP-IV, για όλους τους ενζυματικούς συνδυασμούς.

Τέλος, στο αρχικό άρθρο των Cermeno et al. (2019), οι συγγραφείς ανέλυσαν επίσης την *in vitro* ανασταλτική δράση του DPP-IV του υδρολυμένου BSG. Οι ερευνητές παρακολούθησαν πεπτίδια με υψηλή περιεκτικότητα σε υπολείμματα προλίνης, λόγω της σχέσης της καλής ανασταλτικής δράσης του DPP-IV και της αναγνώρισης του πεπτιδίου IPVP που κατέχει το υψηλότερο ανασταλτικό δυναμικό. Απαιτούνται περαιτέρω μελέτες που

διερευνούν τα πεπτίδια BSG με αντιυπεργλυκαιμικά δυναμικά, *in vivo*, για να αποδειχθούν τα ωφέλη του και να αναπτυχθούν τρόφιμα ή συμπληρώματα κατά του διαβήτη.

Ανοσοτροποποιητική δράση πεπτιδίων από BSG

Η ανοσοτροποποίηση αναφέρεται σε τροποποιήσεις στο ανοσοποιητικό σύστημα του σώματος που προκαλείται από παράγοντες που ενεργοποιούν ή καταστέλλουν τη λειτουργία του. Το ανοσοποιητικό σύστημα μπορεί να ξεκινήσει τη φλεγμονώδη διαδικασία ως προστατευτική απάντηση σε επιβλαβή ερεθίσματα. Ωστόσο, μερικές φορές είναι απαραίτητο να ελεγχθεί αυτό το αποτέλεσμα, είτε ενισχύοντας ή μειώνοντάς το. Συγκεκριμένα, η ικανότητα μιας ένωσης να μειώνει την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών, μπορεί να είναι ευεργετική σε οξεία και/ή χρόνια φλεγμονή, που προκλήθηκε από συμβάντα όπως τραυματισμός ιστού, λοιμώξεις ή αυτοάνοσα νοσήματα, όταν η ανεξέλεγκτη φλεγμονή γίνεται ζημιόγόνος.

Οι McCarthy et al. (2013), εκτός από την αντιοξειδωτική δράση, επικεντρώθηκαν επίσης στις πιθανές ανοσοτροποποιητικές επιδράσεις των BSG πρωτεϊνών και υδρολυμάτων. Οι McCarthy et al. (2013b) ανέλυσαν την παραγωγή κυτοκινών και επαλήθευσαν ότι τόσο οι πρωτεΐνες BSG όσο και αρκετά υδρολύματα μείωσαν σημαντικά την παραγωγή ιντερφερόνης- γ (IFN- γ), κατά τουλάχιστον 20%, επιδεικνύοντας έτσι επιλεκτικές ανοσοτροποποιητικές επιδράσεις, που μπορεί να είναι ωφέλιμες στον έλεγχο των φλεγμονωδών ασθενειών. Οι McCarthy et al. (2013) συγκεντρώθηκαν στην παραγωγή IFN- γ και συμπέραναν ότι η αλκαλάση και τα υδρολύματα Protamex εμφανίζουν τη μεγαλύτερη μείωση της παραγωγής IFN- γ . Ακολουθώντας μια παρόμοια προσέγγιση, οι Crowley et al. (2015), ερεύνησαν το αντιφλεγμονώδες δυναμικό των υδρολυμάτων πρωτεΐνης BSG, που ενσωματώνονται σε γάλα με χαμηλά λιπαρά και υποβάλεται σε SGID. Σε αυτή τη μελέτη, αξιολογήθηκαν αρκετές κυτοκίνες και συγκεκριμένα IFN- γ , IL-6, IL-2, IL-1 β και ο παράγοντας νέκρωσης του όγκου (TNF)- α . Τα αποτελέσματα δεν ήταν απολύτως ικανοποιητικά, αφού σημειώθηκε μόνο μια μείωση στην παραγωγή IL-6. Αυτή η μελέτη, υπογραμμίζει την επίδραση της μήτρας των τροφίμων στη βιοδραστικότητα των BSG πεπτιδίων, η οποία θα

πρέπει να λαμβάνεται υπόψη όταν επιδιώκεται η ενσωμάτωση πεπτιδίων σε ένα προϊόν διατροφής.

Πιο πρόσφατα, οι Cian et al. (2020) μελέτησαν τις ανοσορυθμιστικές επιδράσεις των υδρολυμάτων BSG. Μετά από φαινολική εκχύλιση και υδρόλυση υδατανθράκων, BSG υδρολύματα πρωτεΐνης ελήφθησαν χρησιμοποιώντας εμπορικά ένζυμα και αξιολογήθηκε η περιεκτικότητα των κυττάρων σε IL-10, TNF και IFN- γ . Όλα τα κύτταρα παρουσίασαν ένα αντιφλεγμονώδες προφίλ με αναστολή των προφλεγμονωδών μεσολαβητών, TNF και IFN- γ , και επαγωγή της αντιφλεγμονώδους IL-10, αποδεικνύοντας ότι τα υδρολύματα BSG ρυθμίζουν την ανοσολογική απόκριση, μια επίδραση που διατηρείται εν μέρει μετά την SGID.

Αντιθρομβωτική δράση πεπτιδίων από BSG

Οι αντιθρομβωτικοί παράγοντες μειώνουν τον σχηματισμό θρόμβων αίματος και χρησιμοποιούνται θεραπευτικά για την πρόληψη της θρόμβωσης. Πράγματι, όταν ένα αιμοφόρο αγγείο τραυματίζεται, σχηματίζεται θρόμβος αίματος για την πρόληψη απωλειών αίματος. Ωστόσο, αυτή η διαδικασία μπορεί να οδηγήσει σε απόφραξη της ροής του αίματος, η οποία μπορεί να οδηγήσει στο θάνατο. Έτσι, η χρήση ενώσεων που έχουν αντιθρομβωτική δραστηριότητα μπορεί να αποτρέψει μια τέτοια κατάσταση και να είναι επωφελής για την αγγειακή υγεία.

Η αντιθρομβωτική δράση των υδρολυμάτων BSG, αξιολογήθηκε από τους Cian et al. (2018). Όλα τα δείγματα έδειξαν ανασταλτική δραστηριότητα της θρομβίνης και τα πεπτίδια καθυστέρησαν τη θρομβίνη. Έτσι, τα πεπτίδια BSG είναι ικανά να καθυστερήσουν τον χρόνο πήξης και νέες εφαρμογές με αυτό το παραπροϊόν θα πρέπει να αξιοποιηθούν.

Δραστηριότητα μείωσης των λιπιδίων πεπτιδίων από BSG

Οι παράγοντες μείωσης των λιπιδίων χρησιμοποιούνται για την πρόληψη της υπερλιπιδαιμίας, μιας μη φυσιολογικής αύξησης των λιπιδίων στο αίμα, κυρίως των τριγλυκεριδίων και της χοληστερίνης. Αυτός ο τύπος παραγόντων μπορεί να διαχειριστεί την

υπερλιπιδαιμία, που είναι ένας σημαντικός παράγοντας κινδύνου σε καρδιαγγειακά νοσήματα και ως εκ τούτου, συνδέεται με ευεργετική υγεία στο καρδιαγγειακό σύστημα.

Οι Garzon et al. (2020) απομόνωσαν και αναγνώρισαν τα BSG πεπτίδια με καλή δράση μείωσης των λιπιδίων. Τελικά, ταυτοποίησαν τρία σχετικά πεπτίδια. Το πεπτίδιο WNIHMEHQDLTTME παρουσίασε την υψηλότερη αναστολή της εστεράσης της χοληστερόλης. Από την άλλη, τα πεπτίδια DFGIASF και LAAVEALSTNG έδειξαν την υψηλότερη ανασταλτική ικανότητα παγκρεατικής λιπάσης. Αυτά τα τελευταία πεπτίδια έχουν μοριακό μέγεθος εντός του εύρους για αναστολείς παγκρεατικής λιπάσης (700–1500 Da). Μελέτες έδειξαν ότι αυτά τα πεπτίδια είναι ευαίσθητα στην γαστρεντερική πέψη και, επομένως, θα μπορούσαν να υδρολυθούν από τις πεπτικές πρωτεάσες σε νέα πεπτίδια με μεγαλύτερη, ίση ή μικρότερη δραστηριότητα.. Αυτά τα νέα πεπτίδια BSG που μειώνουν τα λιπίδια έχουν τη δυνατότητα βελτίωσης της υπερλιπιδαιμίας.

Αντιμικροβιακή δράση πεπτιδίων από BSG

Το αντιμικροβιακό δυναμικό των υδρολυμάτων BSG αξιολογήθηκε από τους Kotlar et al. (2013). Το BSG υδρολύθηκε χρησιμοποιώντας εξωκυτταρικές πεπτιδάσες *Bacillus cereus* και αξιολογήθηκε η αντιμικροβιακή δράση. Ένας Gram-θετικός δείκτης (*Listeria monocytogenes*) και ένας Gram-αρνητικός δείκτης (*Escherichia coli*), υποβλήθηκαν σε υδρολύματα BSG για 24 ώρες στους 30°C. Τα Gram-θετικά βακτήρια βρέθηκαν ότι είναι ανθεκτικά σε όλα τα υδρολύματα που δοκιμάστηκαν. Από την άλλη πλευρά, οι διάμετροι των ανασταλτικών ζωνών για τα Gram-αρνητικά βακτήρια, αυξήθηκαν με την αύξηση του χρόνου πρωτεολυτικής πέψης, γεγονός που υποδηλώνει ισχυρή αντιμικροβιακή δράση κατά του *Escherichia coli*. Σε άλλη έρευνα, διερεύνησαν τον αντίκτυπο του BSG στην παραγωγή πρωτεάσης και στη διαλυτοποίηση πρωτεΐνης σε καλλιέργειες *B. cereus* PCM 2849 και *B. subtilis* PCM 2850. Υπήρχαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο στελεχών. Το πρώτο εμφάνισε σχεδόν 5 φορές υψηλότερη πρωτεολυτική δραστηριότητα στο BSG μέσο με μέταλλα ($MgSO_4$, KH_2PO_4 , $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $CaCl_2$), σε σχέση με το μέσο χωρίς μέταλλα. Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στην πρωτεολυτική δράση, ενώ καλύτερα αποτελέσματα ελήφθησαν στην καλλιέργεια που διεξήχθη χωρίς μέταλλα.

Οι Ciurko et al. (2021), υδρόλυσαν πρωτεΐνες BSG απευθείας στις βακτηριακές καλλιέργειες, προκειμένου να ληφθούν πρωτεϊνικά υδρολύματα με σημαντική βιολογική δραστηριότητα. Αυτή η απλή διαδικασία, διευκολύνει την αξιοποίηση της συνολικής πρώτης ύλης ως μέσο για την ανάπτυξη βακτηρίων. Σάκχαρα, λιπίδια, βιταμίνες και μέταλλα, που περιλαμβάνονται στη δομή BSG, επιτρέπουν τη σωστή ανάπτυξη καλλιεργειών βακτηρίων. Το μεγάλο πλεονέκτημα αυτής της προσέγγισης, είναι η ικανότητα παράλειψης της διαδικασίας εκχύλισης πρωτεΐνης, λόγω της πολυλειτουργικής φύσης των μικροοργανισμών. Αυτό, συνεπάγεται σχετική μείωση του οικονομικού κόστους και του φόρτου εργασίας.

Επίλογος

Η διαδικασία παραγωγής της μύρας αποτελεί μια σύνθετη διαδικασία, αποτελούμενη από ποικίλα στάδια. Η πολύπλοκη σύνθεσή της μπορεί να αποδοθεί στην παρουσία διαφόρων κατηγοριών ενώσεων, μερικές από τις οποίες προέρχονται από τις πρώτες ύλες, ενώ άλλες αναπτύσσονται μέσω αλληλεπιδράσεων και αντιδράσεων, που λαμβάνουν χώρα κατά τη διαδικασία της παρασκευής. Αυτές οι ενώσεις, επηρεάζουν τη μύρα με πολλούς τρόπους. Αυτοί μπορεί να είναι η γεύση, το άρωμα, η ασφαλής ή μη κατανάλωση, ενώ πολύ σημαντική παράμετρος είναι η ικανότητα αφρισμού, η μορφή και η ποσότητα του αφρού. Ιδιαίτερα σημαντικές ενώσεις στη διαδικασία αυτή και στη διαμόρφωση του τελικού προϊόντος, είναι οι πρωτεΐνες και τα πεπτίδια. Παρόλο όμως, που οι πρωτεΐνες είναι αρκετά μελετημένες, τα πεπτίδια είναι ένα πεδίο που δεν έχει αναλυθεί εκτενώς ακόμα. Τα ολιγοπεπτίδια και πολυπεπτίδια που υπάρχουν στην μύρα είναι δύσκολο να απομονωθούν και να μελετηθούν, καθώς πρόκειται για μικρού μοριακού βάρους συνήθως ενώσεις μέσα σε ένα σύνθετο χημικό σύνολο. Παρόλα αυτά, μελέτες αποδεικνύουν τον ρόλο που έχουν δι- και τρι-πεπτίδια ως πηγή αζώτου για τις ζύμες, ενώ πολυπεπτίδια συμβάλουν στον αφρισμό της μύρας, κυρίως λόγω της υδροφοβικότητάς τους. Επίσης, μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει και η δυνατότητα χρησιμοποίησης παραπροϊόντων ζυθοποίησης ως πηγή πρωτεϊνών, από τα οποία έπειτα από κατάλληλη υδρόλυση είναι δυνατή η παραγωγή πεπτιδίων με ποικίλες βιολογικές δράσεις.

Η ανάγκη παραγωγής ποιοτικών προϊόντων συνεχώς αυξάνεται και η εξοικείωση με κοινές αναλυτικές μεθόδους στη μύρα και η ανάλυση των συστατικών της, μπορεί να βοηθήσει τους ερευνητές στην καλύτερη κατανόηση του ρόλου που έχουν τα πεπτίδια στα διάφορα στάδια παραγωγής της μύρας και κατά συνέπεια τους ζυθοποιούς να παράγουν υψηλότερης ποιότητας μύρες.

Παρόλο, λοιπόν, το γεγονός ότι η μύρα και τα συστατικά της αποτελούν αντικείμενο μελέτης εδώ και πολλά χρόνια, υπάρχει ακόμα χώρος για βελτίωση και εξέλιξη. Με τη βοήθεια των αναπτυσσόμενων αναλυτικών μεθόδων όσο διερευνάται ο ρόλος και ο τρόπος

λειτουργίας συστατικών του ζύθου, τόσο μπορούν να προκύψουν νέοι τρόποι για την παραγωγή ποιοτικότερων προϊόντων.

Μελλοντικά, στηριζόμενοι και στις ολοένα και πιο εξελιγμένες και εξειδικευμένες ενόργανες αναλυτικές τεχνικές, θα είχε ενδεχομένως ερευνητικό ενδιαφέρον ο περαιτέρω έλεγχος των πολυπεπτιδίων που σχετίζονται με την εμφάνιση θολωμάτων στην μύρα και την εύρεση τρόπων αποφυγής τους, η εύρεση περισσότερων πεπτιδικών αλληλουχιών που ενισχύουν την ποιότητα του αφρού και πώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή ποιοτικότερων ζύθων, καθώς και η απομόνωση βιοδραστικών πεπτιδίων από παραπροϊόντα ζυθοποίησης και η χρήση τους είτε στην παραγωγή βιολειτουργικών τροφίμων είτε σε φαρμακευτικά σκευάσματα.

Βιβλιογραφία

Amorim M. M., Pereira J. O., Monteiro K. M., Ruiz A. L., Carvalho J. E., Pinheiro H., **2016**. Antiulcer and antiproliferative properties of spent brewer's yeast peptide extracts for incorporation into foods. *Food Function*, 7, 2331–2337.

Amorim M., Pinheiro H., Pintado M., **2019**. Valorization of spent brewer's yeast: Optimization of hydrolysis process towards the generation of stable ACE-inhibitory peptides. *LWT-Food Science and technology*, 111, 77–84.

Anderson H., Santos I., Hildenbrand Z., Schug K., **2019**. A review of the analytical methods used for beer ingredient and finished product analysis and quality control. *Analytica Chimica Acta*, 28:1085:1-20.

Asano K., Nakamura F., Okamoto K., **1982**. Passive protection of nude mice with lymphocytes from mice infected with *Hymenolepis nana* eggs. *Japanese Journal of Parasitology* 31: 391-400.

Bamforth, C., Milani C., **2004**. The foaming of mixtures of albumin and hordein protein hydrolysates in model systems. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(9), 1001–1004.

Bamforth C., **1985**. The foaming properties of beer. *Journal of the Institute of Brewing*, 91(6), 370–383.

Bamforth C. W., **2006**. *Brewing New technologies*. Woodhead Publishing Limited.

Bamforth C. W., 2023. The physics and chemistry of beer foam: a review. *European Food Research and Technology* 249, pages 3–11.

Basso B., Liu L., Ritchie J.T., **2016**. A comprehensive review of the CERES-wheat, -maize and -rice models' performances. *Adv. Agron.* 1–106.

Beatriz M., Lourdes A., Isidra R., **2018**. Critical review and perspectives on food-derived antihypertensive peptides. *J Agric Food Chem* 66: 9384–9390.

Bekatorou A., Koutinas A. A., Kaliafas A., Kanellaki, M., **2001**. Freeze-dried *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized on gluten pellets for glucose fermentation. *Process Biochemistry*, 36, 549-557.

Bokulich N. A., Bamforth C. W., **2013**. The microbiology of malting and brewing. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(2), 157–172.

Carr N., **2016**. Learn Kegerator. <https://learn.kegerator.com/?s=carr>

Catt K. J., Zimmet P. Z., Cain M. D., Cran E., Best J. B., Coghlan J. P., **1971**. Angiotensin II blood-levels in human hypertension. *The Lancet*, 297(7697), 459–464.

Cermeno M., Connolly A., O’Keeffe M. B., Flynn C., Alashi A. M., Aluko R. E., **2019**. Identification of bioactive peptides from brewers’ spent grain and contribution of Leu/Ile to bioactive potency. *Journal of Functional Foods*, 60, Article 103455.

Cian F., Marconcini M., Ceccato P., **2018**. Normalized Difference Flood Index for rapid flood mapping: taking advantage of EO big data, *Rem. Sens. Environ.* 209.

Cian R. E., Hernandez-Chirlaque C., Gamez-Belmonte R., Drago S. R., Sanchez de Medina F., Martínez-Augustin O., **2020**. Molecular action mechanism of anti-inflammatory hydrolysates obtained from brewers’ spent grain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(7), 2880–2888.

Ciurko D., Laba W., Zarowska B., Janek T., **2021**. Enzymatic hydrolysis using bacterial cultures as a novel method for obtaining antioxidant peptides from brewers' spent grain. *RSC Adv.*, 11, 4688.

Clapperton J. F., **1970**. Simple peptides of wort and beer. Brewing Industry Research Foundation, Nulfield, Surrey

Clemons, E., Gao, G., Hitt, L., **2006**. When online reviews meet hyper differentiation: A study of the craft beer industry. *Journal of Management Information Systems*, 23, 149–171.

Connolly A., Piggott C. O., FitzGerald R. J., **2014**. In vitro α -glucosidase, angiotensin converting enzyme and dipeptidyl peptidase-IV inhibitory properties of brewers’ spent grain protein hydrolysates. *Food Research International*, 56, 100–107.

Connolly A., O’Keeffe M. B., Nongonierma A. B., Piggott C. O., FitzGerald R. J., **2017**. Isolation of peptides from a novel brewers spent grain protein isolate with potential to modulate glycaemic response. *International Journal of Food Science and Technology*, 52(1), 146–153.

Connolly A., Cermeno M., Crowley D., O’Callaghan Y., O’Brien N. M., FitzGerald R. J., **2019**. Characterisation of the in vitro bioactive properties of alkaline and enzyme extracted brewers’ spent grain protein hydrolysates. *Food Research International*, 121, 524–532.

Cornier M., Dabelea D., Hernandez T., Lindstrom R., Steig, A., Stob N., **2008**. The metabolic syndrome. *Endocr. Rev.* 29, 777–822.

Cortacero-Ramírez S., De Castro M.H.B., Segura-Carretero A., Cruces-Blanco C., Fernández-Gutiérrez A., **2003**. Analysis of beer components by capillary electrophoretic methods. *Trends in Analytical Chemistry* 22, 440–455.

Crowley D., O’Callaghan Y., McCarthy A., Connolly A., Piggott C. O., FitzGerald R. J., **2015**. Immunomodulatory potential of a brewers’ spent grain protein hydrolysate incorporated into low-fat milk following in vitro gastrointestinal digestion. *International Journal of Food Sciences & Nutrition*, 66(6), 672–676.

Daems, V., Delvaux F., **1997**. Multivariate analysis of descriptive sensory data on 40 commercial beers. *Food Quality and Preference*, 8(5–6), 373–380.

Dale C., West C., Eade J., Palomares M., Lyddiatt A., **1999**. Studies on the physical and compositional changes in collapsing beer foam. *Chemical Engineering Journal* 72, 83-89.

Della Rosa, F., Tonin A.P. Rocah S.B., Santos A.R. Marco, Silveira.M., Cardoso-Filho,L., Ribeiro V.M., Meurer E.C., **2023**, Optimization of Hydrolysis and Identification of Bioactive Peptides in Brewery Yeast Residuals, *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 00, No. 00, e-20230146, 1-11

Delvaux, D., Moeys, R., Stapel, G., Melnikov, A., Ermikov, V., **1995**. Palaeostress reconstruction and geodynamics of the Baikal region, Central Asia, Part 1. Palaeozoic and Mesozoic pre-rift evolution. *Tectonophysics* 252, 61-101.

Dostálek P., Hochel I., Mendez E., Hernando A., **2006**. Immunochemical determination of gluten in malts and beers. *Food Additives and Contaminants* 23(11):1074-8.

Douma, W.R., Bosman, I.J., Rutgers, S.R., Ensing, K., de Zeeuw, R.A., Koter, G.H., and Postma, D.S., **1997**. Effects of transdermal scopolamine on pulmonary function, symptoms and bronchial hyperresponsiveness to methacholine. *Eur. J. Pharm. Sci.* 5, 326-334.

Europe, T. B. of. **2002**. *Guidance note for establishing BAT in the brewing industry*.

Evans S., Gregory M., Ryan C., Bergendahl M., Tan A., **2009**. *Towards a Sustainable Industrial System: With Recommendations for Education, Research, Industry and Policy*. University of Cambridge, Cambridge

Evans D., Bamforth C., **1999**. Beer foam: achieving a suitable head. *Handbook of alcoholic beverages: Beer, a quality perspective*.

Fix G., **1999**. *Principles of Brewing Science: A Study of Serious Brewing Issues*. Colorado: Brewers association.

Forrest J., Marjoribanks E., Johnston R.J., **1977**. Local effects at New Zealand and local elections. In *People, Places and Votes: Essays on the Electoral Geography of Australia and New Zealand* (R.J. Johnston, ed.) pp. 35-50. Armidale: University of New England, Department of Geography.

Forrester S. J., Booz G. W., Sigmund C. D., Coffman T. M., Kawai T., Rizzo V., **2018**. Angiotensin II signal transduction: An update on mechanisms of physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews*, *98*(3), 1627–1738.

Garzon A. G., Cian R. E., Aquino M. E., Drago S. R., **2020**. Isolation and identification of cholesterol esterase and pancreatic lipase inhibitory peptides from brewer's spent grain by consecutive chromatography and mass spectrometry. *Food & Function*, *11*(6), 4994–5003.

Gorinstein, S., Jaramillo, N. O., Medina, O. J., Rogrigues, W. A., Tosello, G. A., and Paredes-Lopez, O., **1999**. Evaluation of some cereals, plants and tubers through protein composition. *J. Protein Chem.* *18*, 687-693

Han, Y., Wang, J., Li, Y., Hang, Y., Yin, X., & Li, Q., **2015**. Circular dichroism and infrared spectroscopic characterization of secondary structure components of protein Z during mashing and boiling processes. *Food Chemistry*, *188*(3), 201–209.

Hecht K. A., O'Donnell A. F., Brodsky J. L., **2014**. The proteolytic landscape of the yeast vacuole. *Cellular Logistics*, *4*, Article e28023.

Hejgaard, J., Kaersgaard, P., **1983**. Purification and properties of the major antigenic beer protein of barley origin. *Journal of the Institute of Brewing*, *89*(6), 402–410.

Hong J. H., Choi J. H., Lee S. J., **2017**. Investigation of sensory attributes contributing to beer preference among Koreans by using fuzzy reasoning. *Journal of the Institute of Brewing* *123*(1).

limure T., Nankaku N., Hirota N., Tiansu Z., Hoki T., Kihara M., Hayashi K., Ito K., Sato K., **2010**. Construction of a novel beer proteome map and its use in beer quality control. *Food Chemistry* *118*, 566–574.

limure, T., Kimura, T., Araki, S., Kihara, M., Sato, M., Yamada, S., Sato, K., **2012**. Mutation analysis of barley malt protein Z4 and protein Z7 on beer foam stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(6), 1548–1554

Ikram S., Zhang H., Ahmed M. S., Wang J., **2020**. Ultrasonic pretreatment improved the antioxidant potential of enzymatic protein hydrolysates from highland barley brewer's spent grain (BSG). *Journal of Food Science*, *85*(4), 1045–1059.

Ingledeew, W.M., Thomas, K.C., Hynes, S.H., McLeod, J.G., **1999**. Viscosity concerns with rye mashes used for ethanol production. *Cereal Chemistry* 76, 459-464.

Ishizuka O., Tani K. and Reagan M. K.,**2014**. Izu-Bonin-Mariana forearc crust as a modern ophiolite analogue. *Elements* 10, 115– 120.

Jin, X., Shearman, L. P., Weaver, D. R., Zylka, M. J., de Vries, G. J., & Reppert, S. M., **1999**. A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock. *Cell*, 96(1), 57–68.

Jolly N.P., Augustyn O.P.H., and Pretorius I.S, **2006**. The Role and Use of Non-Saccharomyces Yeasts in Wine Production. *South African Journal of Enology & Viticulture*. 27(1):15-38.

Jung, J., Yeom, J., Kim, J., Han, J., Lim, H.S., Park, H., Hyun, S., Park, W., **2011**. Change in gene abundance in the nitrogen biogeochemical cycle with temperature and nitrogen addition in Antarctic soils. *Res. Microbiol.* 162, 1018-1026

Kanauchi O., Igarashi K., Ogata R., Mitsuyama K., Andoh A., **2005**. A yeast extract high in bioactive peptides has a blood-pressure lowering effect in hypertensive model. *Current Medical Chemistry*, 12(26), 3085-3090.

Koller H., Perkins L.,**2022**. Brewing and the Chemical Composition of Amine-Containing Compounds in Beer: A Review. 11(3):257.

König H., Uden G., & Fröhlich, J., **2009**. Yeasts. In H. U. König, *Biology of Microorganisms on Grape, in Must and in Wine*.

Kordialik-Bogacka E., Ambroziak W., **2007**. The relationship between polypeptides and foaming during fermentation. *LWT – Food Science and Technology* 40, 368-373.

Kotlar C. E., Ponce A. G., Roura S. I., **2013**. Improvement of functional and antimicrobial properties of brewery byproduct hydrolysed enzymatically. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie- Food Science and Technology*, 50(2), 378–385.

Kunze W., **2004**. *Technology Brewing and Malting*. VLB Berlin. Germany.

Langstaff, S. A., & Lewis, M. J., **1993**. The mouthfeel of beer — A review. *Journal of the Institute of Brewing*, 99(1), 31–37.

Langstaff, S.A., Guinard, J-X. and Lewis, M.J., **1991**. Sensory Evaluation of the Mouthfeel of Beer/. *Am. Sot. Brew. Chem.* 49, 54-59.

Lassegue B., Griendling K. K., **2004**. Reactive oxygen species in hypertension; an update. *American Journal of Hypertension*, 17(9), 852–860.

Lekkas C., Hill A.E., Taidi B., Hodgson J., Stewart G.G., **2009**. The Role of Small Wort Peptides in Brewing Fermentations. *J. Inst. Brew.* 115(2), 134–139.

Lewis M. J., Bamforth C. W., **2006**. Essays in brewing science. Davis, California, USA: Springer.

Lusk, S. N., Kert, M. J., & Ronis, D. L., **1995**. Healthpromoting lifestyles of blue-collar, skilled trade, and white-collar worker. *Nursing Research*, 44, 20–24.

Lynch K. M., Steffen E. J., Arendt E. K., **2016**. Brewers' spent grain: A review with an emphasis on food and health. *Journal of the Institute of Brewing*, 122(4), 553–568.

Marder, M.L., Channing, C.P., and Schwartz, N.B., **1977**. *Endocrinology* 101, 1639-1642.

Marson G. V., Machado, M. T. da C., de Castro R. J. S., Hubinger M. D., **2019**. Sequential hydrolysis of spent brewer's yeast improved its physico-chemical characteristics and antioxidant properties: A strategy to transform waste into added-value biomolecules. *Process Biochemistry*, 84, 91–102.

Marson G. V., de Castro R. J. S., Belleville M. P., Hubinger M. D., **2020**. Spent brewer's yeast as a source of high added value molecules: A systematic review on its characteristics, processing and potential applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36(7), 1–22.

McCarthy A. L., O'Callaghan Y. C., Connolly A., Piggott C. O., FitzGerald R. J., O'Brien N. M., **2013**. Brewers' spent grain (BSG) protein hydrolysates decrease hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced oxidative stress and concanavalin-A (con-A) stimulated IFN- γ production in cell culture. *Food and Function*, 4(11), 1709–1716.

McCarthy A. L., O'Callaghan Y. C., Connolly A., Piggott C. O., FitzGerald R. J., O'Brien N. M., **2013b**. In vitro antioxidant and anti-inflammatory effects of brewers' spent grain protein rich isolate and its associated hydrolysates. *Food Research International*, 50(1), 205–212.

McDougall, I., Brown, F.H., Fleagle, J.G., **2005**. Stratigraphic placement and age of modern humans from Kibish, Ethiopia. *Nature* 433, 733-736.

McWilliam J. R., Clemcmts R. J. and Dowling P. M., **1969**. Some factors influencing germination and early seedling development of pasture plants. *Australian Journal of Agricultural Research* 21, 19-32

Meilgaard, M. C., Dalgliesh, C. E., & Clapperton, J. F., **1979**. Beer flavour terminology. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 37, 47–52.

Michel M., Kopecká J., Meier-Dörnberg T., Zarnkow M., Jacob F., and Hutzler M., 2016. Screening for New Brewing Yeasts in the Non- Saccharomyces Sector with *Torulaspota Delbrueckii* as Model: Brew Screening for Non- 104 Saccharomyces Yeasts. *National Library of Medicine*. 33(4):129-44.

Michel, M., Meier-Dörnberg, T., Jacob F., Methner F.-J., Wagner R. S., & Hutzler M., 2016,b. Review: Pure non-Saccharomyces starter cultures for beer fermentation with a focus on secondary metabolites and practical applications. *Journal of the Institute of Brewing*. Volume 122, Issue 4 p. 569-587.

Moneton P., Sarthou P., Le Goffic F., **1986**. Transport and Hydrolysis of Peptides in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology Society*, 132, 8.

Mosher R., **2006**. Major flavor and aroma groups in beer. *All About Beer Magazine*. Volume 27, Issue 5.

Mundy. J., Rogers. J.C., **1986**. Selective expression of a probable amylase protease inhibitor in barley aleurone cells: comparison to the barley amylase: subtilisin inhibitor. *Planta* 169 51 63.

Munoz-Durango N., Fuentes, C. A., Castillo, A. E., Gonz´alez-Gomez, L. M., Vecchiola, A., Fardella, C. E., et al., **2016**. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system beyond blood pressure regulation: Molecular and cellular mechanisms involved in end-organ damage during arterial hypertension. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(7), 797.

Mussatto S.I., Dragone G., Roberto I.C, **2006**. *Journal of Cereal Science* 43, 1–14.

Nissen, R.M., Yan, J., Amsterdam, A., Hopkins, N., Brugess, S.M., **2003**. Zebrafish foxi one modulates cellular responses to Fgf signaling required for the integrity of ear and jaw patterning. *Development* 130, 2543–2554.

Nongonierma, A. B., FitzGerald, R. J., **2013**. Dipeptidyl peptidase IV inhibitory and antioxidative properties of milk protein-derived dipeptides and hydrolysates. *Peptides*, 39, 157–163.

Perrocheau L., Bakan B., Boivin P., Marion D., **2006**. Stability of Barley and Malt Lipid Transfer Protein 1 (LTP1) toward Heating and Reducing Agents: Relationships with the Brewing Process. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54, 8, 3108–3113.

Perry, D., Freed, J., Kushman J., **1994**. The California demonstration project in independent practice. *Journal of Dental Hygiene*, 68(3), 137-142.

Picariello G., Bonomi F., Iametti S., Rasmussen P., Pepe C., Lilla S., Ferranti P., **2011**. Proteomic and peptidomic characterisation of beer: Immunological and technological implications. *Food Chemistry*, 124.

Picariello G., Mamone G., Cutignano A., Fontana A., Zurlo L., Addeo F. and Ferranti P., **2015**, Proteomics, Peptidomics, and Immunogenic Potential of Wheat Beer (Weissbier), *Agric. Food Chem.*, 63, 13, 3579–3586.

Podgorska I. P., Zidkova J., Flodrova D., Bobalova J., **2010**. 2D-HPLC and MALDI-TOF/TOF analysis of barley proteins glycosylated during brewing. *Journal of Chromatography B*, 878, 30.

Podpora B., Swiderski F., Sadowska A., Piotrowska A., Rakowska R., **2015**. Spent brewer's yeast autolysates as a new and valuable component of functional food and dietary supplements. *Journal of Food Processing & Technology*, 6(12), Article 1000526.

Reinold, M. R., **1997**. *Manual prático de cervejaria* (1st ed.) (Aden Editora e Comunicacoes Ltda).

Ribeiro-Oliveira R., Martins Z., Sousa J., Ferreira I., Diniz C., **2021**. The health-promoting potential of peptides from brewing by-products: An up-to-date review. *Trends in Food Science & Technology* 118.

Schönberger, C. and Kostecky, T., **2011**. 125th anniversary review: The role of hops in brewing. *Journal of the Institute of Brewing*, 117(3), 259–267.

Sheehan, M.C., Skerritt, J.H., **1997**. Identification and characterization of beer polypeptides derived from barley hordeins. *Journal of the Institute of Brewing* 103, 297–306.

Smythe LD, Smith IL, Smith GA, Dohnt MF, Symonds ML, Barnett LJ, McKay DB, **2002**. A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic *Leptospira* spp. *BMC Infect Dis* 2:13.

Sorensen, S. B., Ottesen M., **1978**. Fractionation and characterization of beer proteins. *Carlsberg Research Communications*, 43(3), 133–144.

Sorensen S., Bech, L., Muldbjerg, M., Beenfeldt, T., & Breddam, K., **1993**. Barley lipid transfer protein 1 is involved in beer foam formation. *MBAA Technical Quarterly (USA)*, 30(4), 136–145.

Steiner C., Das K.C., Melear N., Lakly D., **2010**. Reducing nitrogen loss during poultry litter composting using biochar. *J. Environ. Qual.* 39, 1236-1242.

Stojceska, V., **2019**. Brewer's spent grain from by-product to health: A rich source of functional ingredients. In V. R. P. Watson, & R. Ross (Eds.), *Flour and breads and their fortification in health and disease prevention* (2nd ed., pp. 189–198).

Thiago, R., Pedro P. M. de M., Eliana F. C. S., **2014**. Solid wastes in brewing process: A review. *Journal of Brewing and Distilling*, 5(1), 1–9.

Van Doorn G., Timorab J., Watsonc S., Moored C., Spence C., **2019**. The visual appearance of beer: A review concerning visually-determined expectations and their consequences for perception. *Food Research International* 126.

Van Nierop S. N. E., Evans D. E., Axcell B. C., Cantrell I. C., Rautenbach M., **2004**. Impact of Different Wort Boiling Temperatures on the Beer Foam Stabilizing Properties of Lipid Transfer Protein 1. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52, 10, 3120-3129.

Verni M., Pontonio E., Krona A., Jacob S., Pinto D., Rinaldi F., Verardo V., Díaz-de-Cerio E., Coda R., Rizzello C.G., **2020**. Bioprocessing of Brewers' Spent Grain Enhances Its Antioxidant Activity: Characterization of Phenolic Compounds and Bioactive Peptides, *Frontiers in Microbiology*, July 2020 | Volume 11 | Article 1831

Vieira E. F., Carvalho J., Pinto E., Cunha S., Almeida A. A., Ferreira I., **2016**. Nutritive value, antioxidant activity and phenolic compounds profile of brewer's spent yeast extract. *Journal of Food Composition and Analysis*, 52, 44–51.

Vieira E. F., Melo A., Ferreira I., **2017**. Autolysis of intracellular content of Brewer's spent yeast to maximize ACE-inhibitory and antioxidant activities. *Lebensmittel- Wissenschaft und - Technologie- Food Science and Technology*, 82, 255–259.

Wenhui T., Shumin H., Yongliang Z., Liping S., Hua Y., **2021**. Identification of in vitro angiotensin converting enzyme and dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides from draft beer by virtual screening and molecular docking. Wiley Online Library.

Xiros C., Topakas E., & Christakopoulos P., **2013**. Hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. *WIRE Energy and Environment*. Volume 2, Issue 6 p. 633-654.

Yonezawa, T., & Fushiki, T., **2002**. Testing for taste and flavour of beer. In J. F. Jackson (Ed.), *Molecular methods of plant analysis*, Vol. 21 (pp. 29–45). Berlin: Springer.

Ελληνική Ένωση Ζυθοποιών. <https://www.ellinikienosizithopoion.gr/>

Beerologio.gr. <https://www.beerologio.gr/p/greek-breweries.html>

Beeroskopio.com. https://www.beeroskopio.com/2014/06/blog-post_2608.html