



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ, ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«ΖΥΜΩΣΗ SACCHAROMYCES CEREVISIAE ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ
ΑΛΚΟΟΛΟΥΧΟΥ ΡΟΦΗΜΑΤΟΣ ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΕΝΟΥ ΣΕ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΑ
ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ»



ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ ΦΟΙΤΗΤΗ : ΒΟΥΡΤΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

ΑΡΙΘΜΟΣ ΜΗΤΡΩΟΥ : 22002

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ : ΜΠΑΤΡΙΝΟΥ ΑΝΘΙΜΙΑ

ΑΙΓΑΛΕΩ, 2024



UNIVERSITY OF WEST ATTICA
SCHOOL OF FOODSCIENCE
DEPARTMENT OF SCIENCE AND TECHNOLOGY OF FOOD
GRADUATE STUDIES PROGRAM
«INNOVATION, QUALITY AND FOOD SAFETY»

MSc THESIS

**«FERMENTATION WITH SACCHAROMYCES CEREVISIAE FOR THE
PRODUCTION OF AN ALCOHOL-BASED BEVERAGE ENRICHED WITH
BIOACTIVE COMPOUNDS»**

STUDENT NAME: VOURTIS DIMITRIOS

REGISTRATION NUMBER: 22002

SUPERVISOR PROFESSOR: BATRINOU ANTHIMIA

AIGALEO, 2024

ΔΗΛΩΣΗ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Οι υπογράφοντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη διπλωματική εργασία (Master Thesis) με τίτλο : **‘Ζύμωση *Saccharomyces cerevisiae* για την παραγωγή αλκοολούχου ροφήματος εμπλουτισμένου σε βιοδραστικά συστατικά’** που παρουσιάστηκε από τον **Βούρτη Δημήτριο**, υποψηφίου για τον μεταπτυχιακό τίτλο σπουδών στην ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ, ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

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

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο κάτωθι υπογεγραμμένος/η Δημήτρης Βούρτης του Ιωάννη με αριθμό μητρώου 22002 φοιτητή του του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών (Π.Μ.Σ.) «ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ, ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ» του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων της Σχολής Επιστημών Τροφίμων, του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής Μηχανικών, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

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

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

Ο Δηλών



Βούρτης Δημήτρης

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ την υποψήφια διδάκτωρ Αικατερίνη Πυροβόλου για την βοήθειά της καθώς η παρούσα διπλωματική αποτελεί κομμάτι της διδακτορικής της διατριβής. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. Μπατρίνου για την βοήθειά της και τις κατευθυντήριες οδηγίες της.

Περιεχόμενα

ΔΗΛΩΣΗ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	8
ABSTRACT	11
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΕΙΚΟΝΩΝ	13
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΠΙΝΑΚΩΝ	13
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ.....	14
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	15
1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	18
1.1 Ιστορικά στοιχεία	18
1.2 Η προέλευση και η ανάπτυξη του ζύθου	19
1.3 Οι πρώτες ύλες του ζύθου	21
1.3.1 Η βύνη	21
1.3.2 Το νερό	21
1.3.3 Ο λυκίσκος	22
1.4 Η σύσταση του ζύθου.....	23
1.5 Η βιομηχανική παρασκευή του ζύθου.....	25
1.5.1 Βυνοποίηση	25
1.5.2 Ζυθοποίηση	27
1.5.3 Ελαττώματα και επιμολύνσεις.....	29
1.5.4 Το Σύστημα Ανάλυσης Κινδύνων και Κρίσιμα Σημεία Ελέγχου	30
2. ΧΑΡΟΥΠΙ	33
2.1 Ιστορικά στοιχεία	33
2.1 Χαρούπι, σιρόπι χαρουπιού και ροφήματα χαρουπιού	33
2.3 Τα οφέλη του χαρουπιού και οι εφαρμογές του	36
2.4 Η αντιοξειδωτική ικανότητα του χαρουπιού.....	42
2.5 Βιοδραστικές ενώσεις χαρουπιού.....	43
2.6 Μέθοδοι ποσοτικοποίησης φαινολικών ενώσεων	44
2.7 Μέθοδοι προσδιορισμού αντιοξειδωτικής δράσης.....	48
2.8 Ζύμωση.....	50
2.8.1 Αλκοολική ζύμωση	50
3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	54
3.1 Δημιουργία και προετοιμασία δειγμάτων πριν την ανάλυση	54
3.1.1 Προετοιμασία σιροπιού χαρουπιού	54

3.1.2	Προετοιμασία Stout & Imperial Carob Beers	55
3.1.3	Προετοιμασία δείγματος προς ανάλυση των τύπων μύρας.....	60
3.2	Ανάλυση των δειγμάτων μύρας και δειγμάτων μύρας με χαρουπόμελο.....	60
3.2.1	Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά (pH, Brix, Plato, Ειδικό Βάρος, Περιεκτικότητα σε Αλκοόλ, Χρώμα)	60
3.2.2	Φασματοσκοπικές αναλύσεις (Προσδιορισμός ολικών φαινολικών με μέθοδο Folin Ciocalteu).....	65
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	82
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1	88
	Δείγμα:	88

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή : Τα τελευταία χρόνια ο τομέας παραγωγής του ζύθου φαίνεται να παρουσιάζει σημαντική εξέλιξη και να δοκιμάζει νέες καινοτομίες στα προϊόντα ακολουθώντας την ροή της αγοράς και τις αυξανόμενες απαιτήσεις των καταναλωτών. Στο πλαίσιο αυτό, πρόσφατες έρευνες εστιάζουν στην παραγωγή ζύθου με ευεργετικά οφέλη για τον οργανισμό μέσω της προσθήκης αρωματικών βοτάνων, μπαχαρικών και φρούτων, τα οποία είναι πλούσια σε βιοδραστικές ενώσεις. Την ίδια στιγμή, το ενδιαφέρον των επιστημών τροφίμων φαίνεται να έχει στραφεί στη μελέτη των φυσικών αντιοξειδωτικών σε μια προσπάθεια να τα εντάξει στα προϊόντα, προκειμένου να αντικαταστήσει τα ήδη χρησιμοποιούμενα συνθετικά αντιοξειδωτικά, τα οποία φαίνονται να είναι ιδιαίτερα επιβλαβή για την ανθρώπινη υγεία. Μάλιστα, θεωρείται πως η προσθήκη στα τρόφιμα και στα ποτά ουσιών με αντιοξειδωτική δράση παρουσιάζει ευεργετικά αποτελέσματα, καθώς συμβάλλει στην πρόληψη του οξειδωτικού στρες και επακόλουθα στην μείωση της βλάβης στα κύτταρα. Μεταξύ άλλων τα φαινολικά συστατικά έχουν διακριθεί για τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες και για τον λόγο αυτό χρησιμοποιούνται ολοένα και περισσότερο στην βιομηχανία τροφίμων.

Σκοπός: Σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν ο προσδιορισμός του ολικού φαινολικού περιεχομένου των μπυρών τύπου stout & imperial όπου έχει προστεθεί χαρουπόμελο σε διαφορετικές συγκεντρώσεις καθώς και η αισθητηριακή ανάλυση από πάνελ εκπαιδευμένων δοκιμαστών.

Μέθοδος : Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε περιλαμβάνει την δημιουργία εκχυλίσματος μπυρών στο οποίο προστέθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις χαρουπόμελου. Συγκεκριμένα, στην πρώτη παρτίδα μπυρών με αλκοολικό τίτλο 6% δεν προστέθηκε χαρουπόμελο, στην δεύτερη παρτίδα με αναμενόμενο αλκοολικό τίτλο 8% προστέθηκαν 100g/L χαρουπόμελου και τέλος στην τρίτη παρτίδα με αναμενόμενο αλκοολικό τίτλο 10% προστέθηκαν 222g/L χαρουπόμελου. Τόσο πριν τη έναρξη της ζύμωσης (t=0d) όσο και στο τέλος της 1^{ης} ζύμωσης (t=30d) αλλά και στο τέλος της 2^{ης} ζύμωσης (t=60d) πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις του φαινολικού περιεχομένου των μπυρών πλην των βασικών αναλύσεων. Οι βασικές αναλύσεις περιλαμβάνουν: την

μέτρηση περιεκτικότητας σε αλκοόλη προς επιβεβαίωση των αναμενόμενων επιπέδων (6%, 8%, 10%), την αξιολόγηση χρώματος με τη χρήση παραμέτρων όπως περιγράφονται στον πίνακα 7 παρακάτω, βαθμοί Plato για την αξιολόγηση του αρχικού δείγματος σε επίπεδα σακχάρων πριν τη ζύμωση, τη μέτρηση της πυκνότητας σε διάφορα στάδια παρακολούθησης κατά την διαδικασία ζύμωσης, αισθητηριακή αξιολόγηση της γεύσης, του αρώματος, της αίσθησης του στόματος και της εμφάνισης με τη βοήθεια ερωτηματολογίων. Ακόμα αναλύσεις pH για μέτρηση οξύτητας, η οποία μπορεί να επηρεάσει τη σταθερότητα της γεύσης και την μικροβιακή δραστηριότητα, αναλύσεις ως προς την πικρότητα η οποία μπορεί να επηρεαστεί έμμεσα από την προσθήκη σιροπιού χαρουπιού, μετρήσεις θολερότητας για εξέταση οπτικής διαύγειας ή θολότητας της μύρας, η οποία μπορεί να επηρεαστεί από τη ζύμωση και την προσθήκη σιροπιού χαρουπιού.

Αποτελέσματα : Μετά την δεύτερη ζύμωση (t=60 d) και οι δύο χαρουπόμυρες παρουσίασαν σημαντική αύξηση στην περιεκτικότητα σε φαινολικά (958,50 mg GAE/100 mL για 8% και 1915,17 mg GAE/100 mL για 10%). Με αύξηση της συγκέντρωσης χαρουπιού παρατηρείται αύξηση της περιεκτικότητας σε βιοδραστικές ενώσεις τέσσερις και επτά φορές αντίστοιχα. Ταυτόχρονα, τα αποτελέσματα του οργανοληπτικού δείχνουν πως η ενσωμάτωση σιροπιού χαρουπιού στις μύρες τους προσδίδει πιο έντονα καβουρδισμένα, καπνιστά και βοτανικά αρώματα. Αυτό οφείλεται στις αντιδράσεις Maillard και στην καραμελοποίηση. Αυτές οι αντιδράσεις δημιουργούν μια σειρά αρωματικών ενώσεων, όπως οι πυραζίνες, τα φουράνια και η μαλτόλη, οι οποίες συμβάλλουν στις καβουρδισμένες και καπνιστές νότες. Αυτά τα αρώματα μεταφέρονται στη μύρα κατά τη διάρκεια της ζυθοποίησης. Σημαντικό ρόλο παίζουν και οι φυσικές τανίνες στο χαρούπι, οι οποίες συμβάλλουν στην πικράδα αλλά και ενισχύουν τις βοτανικές και γήινες νότες στη μύρα, δίνοντάς της ένα πιο σύνθετο προφίλ αρώματος. Εξίσου σπουδαίες και οι συνεργιστικές επιδράσεις κατά τη διάρκεια της ζύμωσης όπου τα σάκχαρα και οι βιοδραστικές ενώσεις στο σιρόπι χαρουπιού αλληλεπιδρούν με τη μαγιά κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και αυτό μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό πρόσθετων πτητικών αρωματικών ενώσεων, όπως εστέρες, αλδεΐδες και φαινόλες, οι οποίες ενισχύουν τα καβουρδισμένα και φυτικά χαρακτηριστικά. Με όμοιο τρόπο λειτουργεί θετικά και η υψηλή περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες και φαινολικά οξέα, όπως το γαλλικό οξύ και οι κατεχίνες, όπου το σιρόπι χαρουπιού είναι πλούσιο και παίζουν ρόλο στην ανάπτυξη της γεύσης. Τέλος, οι ενζυματικές δράσεις στη μύρα όπου τα ένζυμα που υπάρχουν στη βύνη και τη μαγιά μπορούν να

διασπασουν ορισμένες από τις ενώσεις στο σιρόπι χαρουπιού, απελευθερώνοντας πρόσθετα αρωματικά μόρια που ενισχύουν τις καβουρδισμένες, καπνιστές και φυτικές νότες. Συνοπτικά, το σιρόπι χαρουπιού λειτουργεί ως φυσική πηγή αρωματικών ουσιών που υφίστανται χημικές και ενζυματικές μετατροπές κατά τη διάρκεια των διαδικασιών ζυθοποίησης και ζύμωσης, με αποτέλεσμα την ενίσχυση των καβουρδισμένων, καπνιστών και βοτανικών αρωμάτων στην τελική μύρα.

Συμπεράσματα : Συμπερασματικά, παρατηρούμε πως με αύξηση των συγκεντρώσεων χαρουπιού παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσης του ολικού φαινολικού περιεχομένου γεγονός που υποδηλώνει την αντιοξειδωτική δράση του σιροπιού χαρουπιού. Ταυτόχρονα, παρατηρείται μία διαφοροποίηση στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των οίνων, με τους ζύθους που έχουν εμπλουτιστεί με χαρουπόμελου να διακρίνονται από υψηλότερα φρέσκα βοτανικά αρώματα και γεύσεις καθώς και πιο έντονη αίσθηση αλκοόλης.

Λέξεις κλειδιά : χαρούπι, μύρα, αντιοξειδωτικά, βιοδραστικές ενώσεις.

ABSTRACT

Introduction : In recent years the beer production sector shows significant development in testing novel products following the flow of the market and the growing demands of consumers. In this context, recent research focuses on the production of beer with beneficial benefits through the addition of aromatic herbs, spices and fruits, which are rich in bioactive compounds. At the same time, the interest of food sciences seems to have turned to the study of natural antioxidants in an attempt to incorporate them into products, in order to replace the already used synthetic antioxidants, which appear to be particularly harmful to human health. In fact, it is considered that the addition of substances with antioxidant activity to foods and drinks has beneficial effects, as it contributes to the prevention of oxidative stress and subsequently to the reduction of damage to cells. Among other things, phenolic components have been distinguished for their antioxidant properties and for this reason they are increasingly used in the food industry.

Purpose: The purpose of this research was to develop a novel beer fermented with carob syrup in different concentrations and to determine the total phenolic content of the carob beer as well as to perform a sensory analysis by a panel of trained tasters.

Methodology: The methodology followed involved the creation of beer extract to which different concentrations of carob honey were added. Specifically, no carob honey was added to the first batch of beers with an alcoholic strength of 6%, to the second batch with an expected alcoholic strength of 8%, 100g/L of carob honey was added and finally to the third batch with an expected alcoholic strength of 10%, 222g/L of carob honey was added. Both before the start of fermentation (t=0d) and at the end of the 1st fermentation (t=30d) and at the end of the 2nd fermentation (t=60d), analysis of the total phenolic content of the beers was performed, apart from the basic analyses. In addition, an organoleptic evaluation of the beers was carried out with the help of the approved standard beer questionnaire from the panel.

Results: After the second fermentation (t=60 d) both carob beers showed a significant increase in their antioxidant activity and phenolic content (958.50 mg equivalent GAE/100 mL for 8% and 1915.17 mg equivalent GAE/100 mL for 10%). With an increase in the concentration of carob, an increase in the content of bioactive compounds is observed four and seven times respectively. At the same time, the

organoleptic results show that the incorporation of carob syrup in their beers imparts more intense roasted, smoky and herbal aromas.

Conclusions : In conclusion, we observe that with an increase in carob concentrations, an increase in the concentration of the total phenolic content is observed, a fact that indicates the bioactivity of carob syrup. At the same time, a differentiation is observed in the organoleptic characteristics of the beers enriched with carob honey which are distinguished by higher fresh botanical aromas and flavors as well as a stronger sense of alcohol.

Key words: carob, beer, antioxidants, bioactive compounds

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1 Το χαρουπόμελο που χρησιμοποιήθηκε.....	54
Εικόνα 2 Οι διαφορετικές παρτίδες δειγμάτων που αναλύθηκαν	56
Εικόνα 3 Ο προς ζύμωση ζύθος.....	57
Εικόνα 4 Η καθαριότητα των μπουκαλιών που χρησιμοποιήθηκαν για την εμφιάλωση του ζύθου	59
Εικόνα 5 Προσδιορισμός περιεκτικότητας σε αιθανόλη (% v/v) , πυκνότητας (g/cm ³) , και ειδικής βαρύτητας (SG).....	61
Εικόνα 6 Χρησιμοποιούμενο πυκνόμετρο	62
Εικόνα 7 Το αγωγιμόμετρο που χρησιμοποιήθηκε	62
Εικόνα 8 Το όργανο προσδιορισμού του pH.....	63
Εικόνα 9 Το χρησιμοποιούμενο χρωματόμετρο.....	65
Εικόνα 10 Το χρησιμοποιούμενο υδατόλουτρο	66
Εικόνα 12 Αποτελέσματα οργανοληπτικής αξιολόγησης σχετικά με τα άμεσα αρώματα του ζύθου	76
Εικόνα 13 Αποτελέσματα οργανοληπτικής αξιολόγησης σχετικά με τις βασικές γεύσεις και αισθήσεις στο στόμα	77
Εικόνα 14 Αποτελέσματα οργανοληπτικής αξιολόγησης σχετικά με τα έμμεσα αρώματα των ζύθων.....	77

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1 Τα συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν προς παραγωγή του ζύθου.....	55
Πίνακας 2 Το πρόγραμμα πολτοποίησης που ακολουθήθηκε.....	55
Πίνακας 3 Αποτελέσματα αρχικών αναλύσεων ζυθογλεύκου.....	67
Πίνακας 4 Αποτελέσματα αναλύσεων αγωγιμότητας ζύθων	68

Πίνακας 5 Αποτελέσματα αναλύσεων ολικών διαλυτών στερεών ζύθων.....	68
Πίνακας 6 Αναλύσεις ζύθων	69
Πίνακας 7 Αποτελέσματα αναλύσεων χρώματος ζύθων.....	70
Πίνακας 8 Αποτελέσματα χαρουπόμπυρας σε ολική περιεκτικότητα φαινολικών	72
Πίνακας 9 Τα αποτελέσματα σχετικά με τα αρώματα και την αισθητική των ζύθων που προσδιορίστηκαν	78

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 2 Αποτελέσματα χαρουπόμπυρας σε ολικό φαινολικό περιεχόμενο (εκφρασμένα σε mg γαλλικού οξέος / L)	73
---	----

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο ζύθος αποτελεί ένα αλκοολούχο ποτό, με σχετικά χαμηλή περιεκτικότητα σε αλκοόλ, το οποίο από τα αρχαία χρόνια της ιστορίας του ανθρώπου έως και σήμερα παρουσιάζει ιδιαίτερη αξία. Ο ζύθος προέρχεται από τη σακχαροποίηση του αμύλου και την αλκοολική ζύμωση των ιδίων σακχάρων του. Το αμυλούχο υπόστρωμα έχει ως βάση συνήθως δημητριακά, όπως το κριθάρι, ο αραβόσιτος και το σιτάρι, ενώ αρκετά συχνά τα χρησιμοποιούμενα σάκχαρα προέρχονται από φρούτα και γλυκαντικές ουσίες, όπως είναι το μέλι, η σακχαρόζη και το σιρόπι γλυκόζης.

Ο ζύθος πρόκειται για ένα εξόχως αγαπημένο ποτό, κυρίως λόγω του δροσιστικού του χαρακτήρα, του αρώματος και της γεύσης του. Σήμερα, υπάρχει μια πληθώρα ειδών ζύθου με διάφορες παραλλαγές, οι οποίες διακρίνονται ανάλογα με το χρώμα, το άρωμα και την γεύση τους. Σημαντικό ρόλο για το είδος και την ποιότητα της παραγωγή του τελικού προϊόντος έχουν οι χρησιμοποιούμενες πρώτες ύλες και ο τύπος της διαδικασίας επεξεργασίας που ακολουθείται. Η κύρια διάκριση είναι εκείνη μεταξύ των ζύθων *ale* (και *stout*), των ζύθων *lager* και των ζύθων *lambic*, αν και πολλοί ζυθοποιοί διατείνονται πως ακόμα και για τους ζύθους που ακολουθείται η ίδια συνταγή παρασκευής το τελικό προϊόν θα διατηρεί πάντα τον δικό του διακριτό και ξεχωριστό χαρακτήρα (Νερατζής et al., 2014).

Σε διεθνές επίπεδο, ο ζύθος κατέχει σημαντική θέση στην βιομηχανία των αλκοολούχων ποτών, με την Ευρωπαϊκή Ένωση να κρατά σταθερά την πρώτη θέση, καθώς οι βιομηχανίες της συντηρούν άμεσα ή έμμεσα περί τις 3.800.000 θέσεις εργασίας, συμβάλλοντας στο 25% της παγκόσμιας παραγωγής. Το εν λόγω ποσοστό υπολογίζεται ότι αντιστοιχεί σε περίπου 315.000.000 λίτρα. Από το σύνολο αυτό υπολογίζεται πως εξάγονται περίπου τα 40.000.000 λίτρα, το οποίο ισοδυναμεί με το 60% των εξαγωγών παγκοσμίως. Η παραγωγή του ζύθου παρουσιάζει διεθνώς αυξητική τάση, ενώ την ίδια στιγμή, φαίνεται να εισάγονται νέες καινοτομίες, οι οποίες αποσκοπούν στην παραγωγή προϊόντων που να ανταποκρίνονται στις αυξανόμενες απαιτήσεις της αγοράς. Ομοίως, και οι μικρές ζυθοποιίες, αν και περιορίζονται στην παραγωγή μικρής κλίμακας, φαίνεται να κερδίζουν όλο και περισσότερο έδαφος στις προτιμήσεις των καταναλωτών, λόγω της έμφασης που δίνεται στην παραγωγή ζύθου με ιδιαίτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά.

Πέρα από τα ιδιαίτερα αισθητηριακά χαρακτηριστικά του ζύθου, στις μέρες μας, πολλές έρευνες εστιάζουν στα ευεργετικά οφέλη του για την υγεία του ανθρώπου. Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται πλέον και στην προσθήκη συστατικών πλούσιων σε βιοδραστικές ενώσεις, όπως ενδεικτικά αναφέρονται τα αρωματικά βότανα, τα μπαχαρικά και τα φρούτα. Τα εν λόγω συστατικά συνιστούν ισχυρά αντιοξειδωτικά και ως εκ τούτου μπορούν να συμβάλλουν στην μείωση των πιθανοτήτων ανάπτυξης ασθενειών που σχετίζονται με την οξειδωτική βλάβη στα κύτταρα του ανθρώπου.

Λόγω των ανωτέρω, τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον των επιστημόνων διατροφής έχει στραφεί στην εκτενέστερη μελέτη των ως άνω φυσικών αντιοξειδωτικών και των πηγών προέλευσής τους. Ιδιαίτερη σημασία δίνεται στο χαρούπι και τα παράγωγα του, τα οποία συνιστούν μια πηγή πλούσια σε αντιοξειδωτικά. Στο πλαίσιο αυτό, φαίνεται

πως το χαρουπόμελο, το οποίο παράγεται με εκχύλιση σε νερό του καρπού του χαρουπιού και με συμπύκνωση του μείγματος, παρουσιάζει πολλές δυνατότητες αξιοποίησης ως φυσικού αντιοξειδωτικού. Πολλώ δε μάλλον της ευχάριστης, γλυκιάς γεύσης του που το καθιστά ικανό υποκατάστατο της ζάχαρης και άλλων στοιχείων, κατάλληλο για χρήση σε πληθώρα ποτών και τροφίμων.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η δημιουργία ενός ζύθου με καινοτόμα χαρακτηριστικά μέσω της ενίσχυσης του με χαρουπόμελο και αντιοξειδωτική ικανότητα.

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Ιστορικά στοιχεία

Η παραγωγή του ζύθου μέσω της διαδικασίας της ζύμωσης συναντάται από τα αρχαία χρόνια της ιστορίας του ανθρώπου. Αν και δεν μπορεί να υπολογιστεί με ακρίβεια σε ποια ιστορική χρονική περίοδο έγινε η ανακάλυψη του, εντούτοις υπάρχουν στοιχεία χρονολογούμενα 6.000 χρόνια πριν κατά την περίοδο της ακμής του πολιτισμού των Σουμερίων. Εξάλλου, στοιχεία για την εφαρμογή της ζύμωσης, ως μέσο συντήρησης και βελτίωσης της θρεπτικής αξίας και του οργανοληπτικού χαρακτήρα των τροφίμων, ανευρίσκονται παλαιότερα, και ήδη από το 7.000 π.Χ. σε αγγειογραφίες του κινεζικού πολιτισμού. Με την βοήθεια της τεχνολογίας και μόλις στα τέλη του περασμένου αιώνα οι επιστήμονες διαπίστωσαν την γενεσιουργό αιτία της ζύμωσης που είναι η παρουσία των μικροοργανισμών και της εξειδικευμένης δραστηριότητάς τους (Marsh, Hill, Ross, & Co, 2014).

Σε μια σύντομη επισκόπηση της ιστορίας, θα μπορούσαμε να πούμε πως αφ' ης στιγμής οι άνθρωποι δημιούργησαν οργανωμένες κοινωνίες και κατάφεραν να ικανοποιήσουν τις πρώτες και βασικές ανάγκες τους, ήτοι της εξασφάλισης τροφής και στέγης, το επόμενο άμεσο ενδιαφέρον τους ήταν η ανάπτυξη οινοπνευματωδών, του ζύθου και του οίνου, τα οποία και εξελίχθηκαν σε αναπόσπαστο στοιχείο της καθημερινής τους ζωής.

Αποδείξεις πρώιμης παρασκευής ζύθου βρέθηκαν στον σουμεριακό οικισμό Γκοντίν Τεπέ, στο σύγχρονο Ιράν, οι οποίες χρονολογούνται στο 3.500 – 3.100 π.Χ.. Ο γνωστός ασσυριολόγος Ζαν Μποτερό μάλιστα αναφέρει το εξής : *«Στην Αρχαία Μεσοποταμία, ανάμεσα στους παλαιότερους «πολιτισμένους ανθρώπους» στον κόσμο, τα αλκοολούχα ποτά ήταν μέρος των εορτασμών κάθε φορά που μια απλή συνάθροιση μετατρεπόταν σε γιορτή. Αν και ο ζύθος, που παρασκευαζόταν κυρίως από κριθάρι, παρέμενε το «εθνικό ποτό» το κρασί δεν ήταν ασυνήθιστο.»*

Ο ζύθος στην Μεσοποταμία ήταν ιδιαίτερα δημοφιλής για χιλιάδες χρόνια. Δεν είναι τυχαίο μάλιστα το γεγονός ότι οι κάτοικοι αυτής της περιοχής είχαν αποδώσει την δημιουργία του στους θεούς. Σε πολλούς από τους μύθους των Σουμερίων, όπως είναι το «Έπος του Γκιλγκαμές» ο ζύθος επιτελεί ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο ενώ στον «Ύμνο

στη Νινκάσι», που γράφτηκε το 1.800 π.Χ. εξυμνείται η Θεά του Ζύθου και παρατίθεται για πρώτη φορά μια συνταγή για την παρασκευή του (Marsh, Hill, Ross, & Co, 2014).

Στην Μεσοποταμία, οι ζυθοποιοί ήταν γυναίκες και εικάζεται πως ήταν οι ιέρειες της Θεάς Νινκάσι. Ωστόσο, και στις απλές οικογενειακές εστίες, φαίνεται πως οι γυναίκες ήταν εκείνες που είχαν αναλάβει αποκλειστικά την παρασκευή του ζύθου, τον οποίο χρησιμοποιούσαν ως συμπλήρωμα στα γεύματα. Στην πρώιμη μορφή του ο ζύθος ήταν ένα παχύρευστο ποτό, ομοιάζον με τον χυλό, το οποίο καταναλωνόταν με τη βοήθεια ενός αχυρένιου καλαμιού. Παρασκευαζόταν δε από κριθαρένιο ψωμί, το οποίο είχε ψηθεί δύο φορές και αφού το διέβρεχαν χρησιμοποιώντας μεγάλη ποσότητα νερού, το άφηναν να υποστεί ζύμωση σε έναν κάδο (Marsh, Hill, Ross, & Co, 2014).

Εν συνεχεία, την συνταγή των ζυθοποιών της Μεσοποταμίας ακολούθησαν οι Βαβυλώνιοι. Μάλιστα, ο βασιλιάς Χαμουραμί είχε συντάξει νόμο σχετικά με τον ζύθο και τα παραγόμενα είδη του, συνολικά 20 : 4 από μίγμα σπόρων, 8 από κριθάρι και 8 από ένα φυτό με την ονομασία «Εμμέρ».

Κατόπιν, στην Αρχαία Αίγυπτο ο ζύθος καταναλωνόταν ιδιαίτερα από τους πιστούς των Φαραώ αλλά και τον εν γένει αγροτικό πληθυσμό ενώ στην Αρχαία Ελλάδα και την Αρχαία Ρώμη ο ζύθος ήταν γνωστός αλλά δεν είχε την ίδια απήχηση που είχε ο οίνος, ο οποίος θεωρούνταν το ποτό των θεών.

Σε γερμανικό έδαφος, ο ζύθος φαίνεται να εμφανίζεται για πρώτη φορά περίπου το 800 π.Χ. σε αμφορέα ζύθου, ο οποίος βρέθηκε κοντά στην σημερινή περιφέρεια Κούλμπαχ της Βαυαρίας. Στους Γερμανούς, μάλιστα, αποδίδεται το πρώτο δείγμα μαγιάς τύπου lager (Marsh, Hill, Ross, & Co, 2014).

Τον 15^ο αιώνα γίνεται η πρώτη αναφορά στο όνομα και την χρήση του λυκίσκου από τους Φλαμανδούς που το εισήγαγαν στην Αγγλία.

Σημαντική στην εξέλιξη της παραγωγής του ζύθου, ήταν η συμβολή του επιστήμονα Λουί Παστέρ με την εργασία του αναφορικά με την λειτουργία των ζυμών, ο οποίος απέδειξε ότι η διαδικασία που ονομάζεται ζύμωση και η παρασκευή διαλυμάτων θρεπτικών συστατικών δεν οφείλεται σε αυτόματη γένεση από άβια ύλη αλλά προκαλείται από την ανάπτυξη μικροοργανισμών.

1.2 Η προέλευση και η ανάπτυξη του ζύθου

Από τις αρχαιολογικές και επιστημονικές έρευνες και μελέτες εικάζεται πως η ζύμωση του ζύθου ξεκίνησε σε οικιακές κουζίνες, όταν ξεχάστηκαν τα σιτηρά που

χρησιμοποιούνταν για το ψήσιμο του ψωμιού και υπέστησαν ζύμωση. Συγκεκριμένα, οι ιστορικοί Τζέρεμι Μπλακ και Άντονι Γκριν πιστεύουν πως «τα αλκοολούχα ποτά πιθανότατα προήλθαν από μια τυχαία ανακάλυψη κατά τη διάρκεια του πρώιμου σταδίου της ανθρώπινης προϊστορίας, της εποχής των τροφοσυλλεκτών». Ενώ αυτή η θεωρία έχει γίνει από καιρό αποδεκτή, ο Στίβεν Μπέρτμαν διατύπωσε μια άλλη θεωρία και εξέτασε τη μακροχρόνια δημοτικότητα του ποτού «αν και το ψωμί ήταν βασικό στοιχείο της διατροφής της Μεσοποταμίας, ο βοτανολόγος Τζόναθαν Σάουερ πρότεινε ότι η παρασκευή ψωμιού μπορεί να μην ήταν το αρχικό κίνητρο για την καλλιέργεια κριθαριού. Αντίθετα, υποστήριξε ότι το πραγματικό κίνητρο ήταν ο ζύθος, που ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά όταν σπόροι κριθαριού βλάστησαν και υπέστησαν ζύμωση κατά την αποθήκευση. Είτε είχε δίκιο ο Σάουερ είτε όχι, ο ζύθος σύντομα έγινε το αγαπημένο ποτό της Αρχαίας Μεσοποταμίας. Όπως το θέτει μια Σουμεριακή παροιμία : "Όποιος δεν ξέρει τον ζύθο δεν ξέρει τι είναι καλό". Οι Βαβυλώνιοι είχαν περίπου 70 ποικιλίες, και τον ζύθο απολάμβαναν θεοί και άνθρωποι, οι οποίοι, όπως βλέπουμε μέσα από καλλιτεχνικές απεικονίσεις, την έπιναν με μακριά καλαμάκια για να αποφεύγουν τις φλούδες του κριθαριού που επέπλεαν στην επιφάνεια.».

Ο Μαξ Νέλσον επίσης απορρίπτει τον ισχυρισμό ότι ο ζύθος ανακαλύφθηκε τυχαία, γράφοντας : «τα φρούτα, συχνά, υφίστανται ζύμωση στη φύση η οποία προκαλείται από την επίδραση της άγριας μαγιάς και τα ζώα αναζητούν και απολαμβάνουν το αλκοολούχο αυτό μίγμα. Οι προ-αγροτικοί πληθυσμοί σε πολλές περιοχές, από τη Νεολιθική περίοδο, σίγουρα, αναζητούσαν παρόμοια προϊόντα ζύμωσης και πιθανότατα μάζευαν άγρια φρούτα με την ελπίδα ότι θα τους πρόσφεραν ένα ενδιαφέρον φυσικό αποτέλεσμα (δηλαδή μέθη) αν αφήνονταν στον ανοιχτό αέρα.».

Ο ζύθος έγινε δημοφιλής όχι μόνο εξ αιτίας της γεύσης της και της επίδρασης που είχε, αλλά και επειδή ήταν πιο υγιεινή από το νερό της περιοχής. Ο Πολ Κρίβατσεκ περιγράφει πώς τα περίπλοκα συστήματα διάθεσης αποβλήτων των πόλεων της Μεσοποταμίας σχεδιάστηκαν για να αποθέτουν ανθρώπινα και ζωικά απόβλητα έξω από τα τείχη της πόλης, όμως εκεί ακριβώς ήταν που βρισκόταν η παροχή νερού. Ο Κρίβατσεκ σημειώνει πως αυτό ήταν «ένα θαυμάσιο επίτευγμα της μηχανικής αλλά μια πιθανή καταστροφή για τη δημόσια υγεία». Το καλής ποιότητας νερό βρισκόταν μακριά από τις πόλεις, αλλά τα κοντινά ρυάκια μπορούσαν να αξιοποιηθούν και με το νερό τους να παραχθεί ζύθος, η οποία ήταν πιο ασφαλής για κατανάλωση λόγω της διαδικασίας ζύμωσης που περιελάμβανε και τον βρασμό του νερού.».

1.3 Οι πρώτες ύλες του ζύθου

Τα βασικά συστατικά του ζύθου είναι το νερό, η βύνη (κυρίως από κριθάρι), η μαγιά και ο λυκίσκος

1.3.1 Η βύνη

Η βύνη έχει ως κύριο συστατικό της το κριθάρι και η παραγωγή ζύθου με βάση αυτό το δημητριακό αντιστοιχεί στο 90% της παραγωγής παγκοσμίως. Τα δύο βασικά είδη κριθαριού που χρησιμοποιούνται είναι το εξάστιχο και το δίστιχο κριθάρι, με την περιεκτικότητά τους σε πρωτεΐνη και άμυλο να υποδεικνύει την καταλληλότητα τους για βυνοποίηση και ζυθοποίηση. Βασικό κριτήριο της περιεκτικότητας του είδους του κριθαριού είναι η αναλογία των δύο στοιχείων, ήτοι της πρωτεΐνης και του αμύλου, με ιδανικότερη συνθήκη, την χαμηλότερη ποσότητα πρωτεΐνης σε σχέση με το άμυλο.

Η βύνη παράγεται με την διαδικασία της ελεγχόμενης διαβροχής, της βλάστησης και ξήρανσης του κριθαριού και μέσω των επιστημονικών ελέγχων και πειραμάτων που έχουν πραγματοποιηθεί, θεωρείται το καταλληλότερο δημητριακό για την ολοκλήρωση της ζυθοποίησης. Η βύνη συνιστά μια σημαντική πηγή αμύλου και ενζύμων και ανάλογα με το είδος της και τις συνθήκες επεξεργασίας της εξαρτάται το κύριο χρώμα και η διακριτή γεύση του ζύθου που θα προκύψει στην συνέχεια.

1.3.2 Το νερό

Ο ζύθος αποτελείται από νερό σε ποσοστό 92% – 95%. Πριν όμως από την παρασκευή του τελικού προϊόντος, η αξία του νερού κρίνεται ιδιαίτερα σημαντική, καθώς χρησιμοποιείται σε όλα τα στάδια της παραγωγής διαδικασίας. Το νερό παίζει καταλυτικό ρόλο στην διαδικασία της ζυθοποίησης, δηλαδή στις εργασίες ψύξης, παραγωγής ατμού για τη θέρμανση και στον καθαρισμό. Επίσης, το νερό χρησιμοποιείται και για τον καθαρισμό του ζυθοποιείου, για την αποστείρωση και το πλύσιμο των δεξαμενών, των επιφανειών και των σωληνώσεων, όπως και ως νερό υπηρεσίας για προορισμό χρήσης σε λέβητες. Μάλιστα, ακόμα και η σύνθεση του νερού που θα χρησιμοποιηθεί στη διαδικασία παραγωγής του ζύθου επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την ποιότητα του τελικού προϊόντος.

Ως εκ τούτου δεν είναι τυχαίο το γεγονός ότι τα μέρη που ανέπτυξαν την παραγωγή του ζύθου και συνέβαλαν στην εξέλιξη της ζυθοποιίας ήταν οι περιοχές εκείνες στις οποίες υπήρχε σε αφθονία ποσότητα νερού, όπως για παράδειγμα η Βαυαρία, η Τσεχία κ.ά.. Ανάλογα με τα ξεχωριστά χαρακτηριστικά κάθε νερού κάθε διαφορετικής περιοχής δημιουργήθηκαν και τα διαφορετικά είδη ζύθου. Το νερό της περιοχής Burton

on Trent για παράδειγμα, το οποίο θεωρείται «σκληρό» νερό, διότι παρουσιάζει θειικό ασβέστιο σε υψηλή συγκέντρωση, είναι γνωστό για τις παραγόμενες ζύθους Pale Ale. Το νερό της περιοχής Πίλζεν στην Τσεχία, το οποίο θεωρείται αρκετά «μαλακό» νερό, διότι παρουσιάζει χαμηλή αναλογία σε ανόργανα άλατα, είναι κατάλληλο για την παραγωγή λεπτών Lager και Pale ζύθων.

Κατά το στάδιο της ζυθοποίησης, σημαντικό ρόλο παίζει η σκληρότητα του νερού, η οποία επηρεάζει την ποιότητα και το χρώμα του τελικού προϊόντος. Η σκληρότητα του νερού εξαρτάται από την αναλογία της περιεκτικότητας του συνόλου των αλάτων μαγνησίου και των αλάτων ασβεστίου. Ανάλογα με την σκληρότητα του χρησιμοποιούμενου νερού δημιουργείται αντίστοιχα ζύθος ανοικτού ή σκούρου χρώματος. Επίσης, συνήθης πρακτική είναι η διόρθωση της αναλογίας των αλάτων χλωρίου και του θείου, διότι και τα θειούχα άλατα και τα ιόντα χλωρίου είναι σημαντικά για την ποιότητα του ζύθου. Σε σχέση με τα λοιπά συστατικά του ζύθου, όπως είναι για παράδειγμα ο λυκίσκος, ο οποίος σε ένα ανοιχτόχρωμο προϊόν βρίσκεται σε αυξημένη περιεκτικότητα, προτιμάται το μαλακό νερό, για να επιτευχθεί καλύτερο αποτέλεσμα.

1.3.3 Ο λυκίσκος

Ο λυκίσκος (επιστημονικά ονομάζεται *Humulus lupulus*) είναι ένα αρωματικό φυτό, το οποίο είναι υπεύθυνο κυρίως για την πικράδα του ζύθου και τα ιδιαίτερα αρωματικά του χαρακτηριστικά και καλλιεργείται συνήθως σε ψυχρά κλίματα. Οι χώρες με την μεγαλύτερη παραγωγή λυκίσκου είναι η Γερμανία, οι Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής (Η.Π.Α.) και η Τσεχία. Αξίζει δε να σημειωθεί ότι η μεγαλύτερη καλλιέργεια λυκίσκου γίνεται στην περιοχή Hallertau της Γερμανίας, η οποία είναι και η περιοχή στην οποία ξεκίνησε η καλλιέργεια του λυκίσκου το 736. Χρησιμοποιείται στην ζυθοποιία από το 1079 και ο σκοπός του είναι να εξισορροπήσει την γλυκύτητα της βύνης. Υπάρχουν συνολικά τρία είδη λυκίσκου : α) *Humulus lupulus* ο οποίος καλλιεργείται κυρίως στο βόρειο ημισφαίριο αλλά και στο νότιο (στην Αυστραλία, τη Ν. Ζηλανδία και τη Ν. Αφρική), β) *humulus japonicus* ο οποίος καλλιεργείται στην Κίνα και Ιαπωνία και ο *H.yunnaensis* ο οποίος καλλιεργείται στην νότια Κίνα. Στην ζυθοποιία βέβαια χρησιμοποιείται ο *humulus lupulus* και μόνο τα θηλυκά άνθη του φυτού (Rettner et al., 2018).

Υπάρχουν πολλές ποικιλίες λυκίσκων η καθεμία από τις οποίες δίνει διαφορετικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά στον ζύθο, όμως επίσης έχουν και διαφορετικό βαθμό

πικρικών μονάδων. Υπάρχουν τρεις κατηγορίες λυκίσκου : α) οι πικρικοί (α-οξέα από 10 – 18%), β) οι αρωματικοί (α-ξέα από 2,5–6%) και γ) οι διπλής χρήσεως δηλαδή που χρησιμοποιούνται είτε ως πικρικοί ή ως αρωματικοί (α-οξέα από 6% έως 10%). Υπάρχουν επίσης τα β – οξέα, τα οποία δεν είναι τόσο διαδεδομένα όπως τα α – οξέα αλλά είναι αρκετά σημαντικά. Στα α-οξέα οφείλονται τα πικρά χαρακτηριστικά του ζύθου, από την μετατροπή τους κατά τη διάρκεια του βρασμού σε ισο-α-οξέα. Ο λυκίσκος είναι και φυσικό συντηρητικό καθώς θεωρείται αντιμικροβιακός παράγοντας και πρέπει να φυλάσσεται σε δροσερό μέρος με απουσία αέρα ώστε να διατηρεί τα αρώματα αλλά και τα α-οξέα του αλλιώς χάνει την πικρική ικανότητά του. Η βέλτιστη θερμοκρασία είναι 0–3°C και μια πολύ καλή συσκευασία είναι σακούλες αλουμινίου υπό κενό (Rutnik et al., 2022).

1.4 Η σύσταση του ζύθου

Η μεθυστική ιδιότητα του ζύθου εξαρτάται από την περιεκτικότητα της σε αιθανόλη, η γεύση και το άρωμα της αποδίδονται στον χρησιμοποιούμενο λυκίσκο, στα “kiln – dried” στοιχεία που δημιουργούνται κατά την ξήρανση της βύνης στον κλίβανο και στο σύνολο των αρωματικών ενώσεων που σχηματίζονται κατά το στάδιο της ζύμωσης. Για την δροσιστική αξία του ζύθου μεγάλο ρόλο παίζει η περιεκτικότητα του διοξειδίου του άνθρακα, ενώ η διατροφική της αξία καθορίζεται από τα μη διαλυτοποιημένα, μη ζυμωθέντα εκχυλίσματα που περιέχει, όπως είναι οι υδατάνθρακες και οι πρωτεΐνες. Ειδικότερα, η αιθανόλη δημιουργείται από την ζύμωση της βύνης από τη μαγιά, η περιεκτικότητα της δε εξαρτάται από το είδος του ζύθου, για παράδειγμα στους ζύθους χαμηλής ζύμωσης η αιθανόλη κυμαίνεται σε ποσοστό 1,0 – 1,5% ενώ στους ζύθους δυνατής ζύμωσης σε ποσοστό 4,8 – 5,5 %. Πέρα από την αιθανόλη, στη σύσταση του ζύθου εμφανίζονται σε μικρότερες ποσότητες ανώτερες αλκοόλες, όπως είναι η 2 – μέθυλο – βουτανόλη, η 3 – μέθυλο – βουτανόλη, η μεθυλοπροπανόλη και η 2 – φαίνυλο – αιθανόλη. Η αιθανόλη μαζί με τις πρωτεΐνες, τους πολυσακχαρίτες, κυρίως τις β-γλυκάνες, και διάφορα άλλα πικρά συστατικά είναι υπεύθυνα για την σταθεροποίηση του αφριστικού χαρακτήρα του ζύθου (Buiatti, 2009).

Επίσης, ο ζύθος περιέχει ποσότητες οξέων, σε διαφορετικές αναλογίες, τα οποία συμβάλλουν στην σταθερότητα του τελικού προϊόντος. Τα στοιχεία αυτά είναι το διοξείδιο του άνθρακα, το γαλακτικό οξύ, το οξικό, το μυρμηκικό και το ηλεκτρικό οξύ. Στις βυθοζύμες η περιεκτικότητα σε διοξείδιο του άνθρακα υπολογίζεται να

κυμαίνεται σε ποσοστό 0,36 – 0,44%, ενώ στις αφροζύμες σε ποσοστό 0,6 – 0,7%. Ανάλογα με το είδος του ζύθου, το pH κυμαίνεται από 4,7 – 4,1 (Buiatti, 2009).

Ιδιαίτερα σημαντικές είναι και οι αρωματικές ενώσεις, οι οποίες είναι και εκείνες που καθορίζουν τον τύπο και τον ιδιαίτερο χαρακτήρα του ζύθου. Για παράδειγμα, η πικρή γεύση του ζύθου αποδίδεται στις υψηλές συγκεντρώσεις ισοχουμουλονίων, χουμουλενίων και μυρσενίου, ενώ η φρουτώδης γεύση στην παρουσία του βουτανοϊκού και εξανοϊκού αιθυλίου (He et al., 2014).

Οι βιταμίνες του ζύθου ανήκουν στο σύμπλεγμα των βιταμινών Β και προέρχονται από τον καρπό του κριθαριού, όπου κατά το στάδιο της πολτοποίησης εκχυλίζονται και διαλυτοποιούνται στο υγρό γλεύκος. Αυτές οι βιταμίνες είναι η θειαμίνη (B₁), η ριβοφλαβίνη (B₂), η νιασίνη (B₃), το παντοθενικό οξύ (B₅), η πυριδοξίνη (B₆), το φυλλικό οξύ (B₉) και η κοβαλαμίνη (B₁₂). Επιπλέον, στον ζύθο εντοπίζονται και ανόργανα στοιχεία, κυρίως φώσφορο και κάλλιο, και σε μικρότερο ποσοστό ασβέστιο, νάτριο, μαγνήσιο και μαγγάνιο (He et al., 2014).

Διάφορα άλλα συστατικά εκχυλίσματος που εντοπίζονται στον ζύθο ανέρχονται σε ποσοστά 2 – 3% και 8 – 10%, ανάλογα με την ένταση του προϊόντος. Τα εν λόγω στοιχεία πρόκειται για τα μη – αλκοολούχα, στερεά συστατικά του ζύθου και αποτελούνται κατά 80% από υδατάνθρακες. Σε αυτούς ανήκουν οι δεξτρίνες, οι πεντοζάνες και οι ολιγοσακχαρίτες, με κυριότερες τη μαλτοτριόζη και τη μαλτόζη. Επίσης, παραπροϊόν της αλκοολικής ζύμωσης είναι και η γλυκερόλη, η οποία εντοπίζεται συνήθως σε ποσοστό 0,2 – 0,3% (Buiatti, 2009).

Στην σύσταση του ζύθου συγκαταλέγονται και οι αζωτούχες ενώσεις σε ποσοστό περίπου και ανά είδος προϊόντος 0,15 – 0,75%. Οι αζωτούχες ενώσεις προέρχονται από τις πρωτεΐνες και τα υψηλού μοριακού βάρους προϊόντα αποικοδόμησης των πρωτεϊνών, και ευθύνονται για το θόλωμα του ζύθου κατά το στάδιο της ψυχρής αποθήκευσης (Koller & Perkins, 2022).

Ανεξάρτητα από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά και το είδος του ζύθου, η παραγωγική διαδικασία για τη δημιουργία του περιλαμβάνει πέντε βασικά στάδια : α) την βυνοποίηση, β) τη ζυθοποίηση, γ) το φιλτράρισμα, δ) την εμφιάλωση και ε) την αποθήκευση. Κατά το πρώτο στάδιο, ξεκινά η προετοιμασία του κριθαριού ή άλλου δημητριακού προκειμένου να απαλλαγεί το κριθάρι από τις αδιάλυτες πρωτεΐνες και να μετατραπεί σε επεξεργάσιμη για την μετέπειτα διαδικασία της ζύμωσης βύνη. Η μετατροπή αυτή γίνεται μέσω μια ελεγχόμενης και περιορισμένης βλάστησης των

καρπών του κριθαριού. Εν συνεχεία, ακολουθεί η προσθήκη του λυκίσκου και ο βρασμός, με τα οποία επιτυγχάνεται η αποστείρωση και η εκχύλιση των συντηρητικών και αρωματικών συστατικών του λυκίσκου. Στο τρίτο στάδιο γίνεται η προσθήκη της μαγιάς, με την οποία ξεκινά η ζύμωση και η παραγωγή της αιθυλικής αλκοόλης και του ανθρακικού του ζύθου. Στο τέταρτο στάδιο γίνεται η τοποθέτηση και αποθήκευση του ζύθου σε κατάλληλη συσκευασία άλλως εμφιάλωσή του. Τέλος, ακολουθεί η ωρίμανση του ζύθου, όπου κατά το στάδιο αυτό ολοκληρώνεται η ζύμωση του εναπομείναντος εκχυλίσματος, επέρχεται ο φυσικός κορεσμός του προϊόντος με διοξείδιο του άνθρακα και σχηματίζονται οι αρωματικές ενώσεις (Koller & Perkins, 2022).

1.5 Η βιομηχανική παρασκευή του ζύθου

Η βιομηχανική διαδικασία παραγωγής του ζύθου χωρίζεται σε δύο επιμέρους διαδικασίες, τη βυνοποίηση και τη ζυθοποίηση. Τα στάδια δεν έχουν αλλάξει πολύ κατά το πέρασμα των ετών, όμως ποικίλουν στο εύρος των θερμοκρασιών και στα χρονικά διαστήματα στο κάθε βήμα της παραγωγικής διαδικασίας ανάλογα με τον τύπο της μπίρας που πρέπει να παραχθεί.

1.5.1 Βυνοποίηση

Η βιομηχανική παρασκευή του ζύθου ακολουθεί δύο επιμέρους διαδικασίες, τη βυνοποίηση και τη ζυθοποίηση, οι οποίες και θα αναπτυχθούν αναλυτικά. Τα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας του ζύθου δεν έχουν διαφοροποιηθεί σημαντικά στο πέρασμα του χρόνου. Ποικίλλουν όμως ως προς το είδος του ζύθου που θα παραχθεί καθώς από το εύρος των θερμοκρασιών και τα χρονικά διαστήματα που αφιερώνονται στο κάθε στάδιο της παραγωγικής διαδικασίας εξαρτάται και η παραγωγή του τελικού προϊόντος (Filipowska et al., 2021).

Όπως αναφέρθηκε και ανωτέρω, το στάδιο της βυνοποίησης είναι εκείνο το οποίο ξεκινά από τον οποίο έλεγχο καταλληλότητας του χρησιμοποιούμενου κριθαριού ή άλλου δημητριακού. Κατά την παραλαβή του κριθαριού λαμβάνει χώρα η μακροσκοπική εξέταση, όπως και η μηχανική και χημικοτεχνική ανάλυσή του.

Επίσης, ο βυνοποιός είναι και εκείνος που ζυγίζει τους καρπούς του κριθαριού, τους ελέγχει οπτικά και τους αποθηκεύει ανάλογα με το μέγεθος τους. Κατά τον εν θέματι έλεγχο λαμβάνονται υπόψη κριτήρια ποιότητας που αφορούν την οσμή, το χρώμα, την ομοιογένεια και την ποιότητα του κελύφους του κριθαριού που προορίζεται προς επεξεργασία, όπως και ο προσδιορισμός της βλαστικής του ικανότητας. Η βλαστική

ικανότητα είναι σημαντική προκειμένου να εντοπισθούν και να απομακρυνθούν οι μη φυτρωμένοι καρποί, οι οποίοι και αποτελούν αιτία ανάπτυξης βακτηρίων (Farzaneh et al., 2017).

Κατόπιν, το ελεγχόμενο κριθάρι εισάγεται στις δεξαμενές διαβροχής, ήτοι μεγάλες κυλινδρικές δεξαμενές, οι οποίες περιέχουν μεγάλη περιεκτικότητα νερού. Σε αυτές το κριθάρι μένει για να μουλιάσει περίπου δύο με τρεις ημέρες. Ακολουθεί ένας ποιοτικός διαχωρισμός, στον οποίο αφαιρούνται οι κόκκοι που επιπλέουν και συγκεντρώνονται οι μουλιασμένοι κόκκοι με το ζητούμενο ποσοστό υγρασίας, ώστε να μεταφερθούν σε δοχεία βλάστησης. Υπολογίζεται ότι ο σπόρος του κριθαριού ξεκινά να βλαστάνει με υγρασία της τάξεως του 30%. Προκειμένου ωστόσο ο σπόρος του κριθαριού να σχηματίσει μεγάλες ποσότητες ενζύμων κατά το στάδιο της διαβροχής και να γίνουν οι δυνατές μετατροπές των αποθησαυριστικών του ουσιών απαιτείται μια υγρασία της τάξεως του 40 – 47%. Την ίδια στιγμή, είναι απαραίτητο ο σπόρος του κριθαριού να τροφοδοτηθεί με οξυγόνο, ώστε να αναπτυχθεί ομαλά σε συνθήκες αερόβιου μεταβολισμού (Farzaneh et al., 2017).

Κατά την διαδικασία της βλάστησης ενεργοποιείται και αναπτύσσεται το ριζίδιο και το βλαστίδιο του κριθαριού, κυρίως μέσω της κατανάλωσης των αποθησαυριστικών ουσιών του σπόρου. Η βλάστηση θεωρείται επιτυχής με τον σχηματισμό των ενζύμων του, ήτοι τις αμυλάσες, τις πρωτεάσες, τις γλυκανάσες, τις πεντοζανάσες και τις φωσφατάσες, με την χαμηλότερη δυνατή απώλεια σε αποθησαυριστικές ουσίες (Farzaneh et al., 2017).

Ακολούθως, το κριθάρι ψήνεται σε ειδικούς κλιβάνους σε υψηλές θερμοκρασίες για 24 ώρες. Η θερμοκρασία που απαιτείται κυμαίνεται από 85 – 105 °C για τους ζύθους τύπου Ale και 40–80 °C για τους ζύθους τύπου lager. Ενώ προκειμένου να παραχθεί ακόμα πιο σκουρόχρωμη βύνη η θερμοκρασία ξεπερνά σταθερά τους 105°C Στο στάδιο της ξήρανσης διακόπτεται η βλάστηση του κριθαριού και η αδρανοποιείται ο σχηματισμός των ενζύμων της πράσινης βύνης. Λόγω της υψηλής θερμοκρασίας που απαιτείται το ποσοστό του νερού που απομένει ανέρχεται σε 2–3%. Με την εν λόγω διαδικασία δηλαδή σταθεροποιούνται οι χημικοβιολογικές μεταβολές που έλαβαν χώρα κατά την διάρκεια της βλάστησης και σχηματίζονται οι ιδιαίτερες αρωματικές και χρωστικές ουσίες του προϊόντος (Frank et al., 2011).

1.5.2 Ζυθοποίηση

Η παραγωγή του ζύθου ονομάζεται «ζυθοποίηση» και εντάσσεται στην κατηγορία των μικροβιακών ζυμώσεων. Οι διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα στο στάδιο αυτό ακολουθούν την εξής σειρά: άλεση, πολτοποίηση, διήθηση, βρασμός, ψύξη, ζύμωση, ωρίμανση και σταθεροποίηση (Νερατζής et al., 2014).

Η διαδικασία της ζυθοποίησης ξεκινάει με την άλεση της βύνης (miling), με τη συμβολή διάφορων αλεστικών κυλίνδρων. Η αύξηση της επιφάνειας της βύνης θα επιτρέψει στο νερό να αναμιχθεί πιο εύκολα με το άλεσμα και να ξεκινήσει το στάδιο της πολτοποίησης. Κατά την φάση αυτή εφαρμόζεται ένα πρόγραμμα συγκεκριμένων θερμοκρασιών και χρόνων ώστε να μπορέσουν τα ένζυμα να αποικοδομήσουν τις αδιάλυτες ουσίες της βύνης, κυρίως του αμύλου και των πρωτεϊνών, και να τις μετατρέψουν σε διαλυτά σάκχαρα, κυρίως μονοσακχαρίτες και δισακχαρίτες (ζυμώσιμο και μη ζυμώσιμο εκχύλισμα). Τα προϊόντα της διάλυσης αυτής είναι και αυτά που θα χρησιμεύσουν στην ανάπτυξη των ζυμών και θα δώσουν τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά στον ζύθο που θα παραχθεί.

Κατόπιν ακολουθεί η διήθηση του πολτού (lautering), άλλως το στάδιο της διαύγασης. Σε αυτή τη φάση και αφού έχει ολοκληρωθεί η πλήρης διάσπαση του αμύλου, ακολουθεί ο διαχωρισμός του υγρού μέρους, το οποίο ονομάζεται ζυθογλεύκος (wort) και του στερεού μέρους το οποίο ονομάζεται βυνοϋπολείμματα (spent grains). Ο εν λόγω διαχωρισμός γίνεται με τη μέθοδο της διήθησης όπου στον πυθμένα μιας δεξαμενής που ονομάζεται διηθητήρας (lauter tun) υπάρχουν σήτες, οι οποίες θα κρατήσουν τα στερεά υπολείμματα της βύνης. Μέσω αυτής, ο υγρός πολτός, ήτοι το γλεύκος θα διηθηθεί και θα μεταφερθεί στον βραστήρα (Kuhbeck et al., 2006).

Με την παραλαβή του ζυθογλεύκους και τον βρασμό του σε ειδικές δεξαμενές, συντελείται η αποστείρωση του ζυθογλεύκους, η συμπύκνωση του στην επιθυμητή πυκνότητα και η ολοκληρωτική απομάκρυνση του θερμού ιζήματος. Την ίδια στιγμή γίνεται και η αδρανοποίηση των ενζύμων, η μετατροπή των πικρικών ουσιών του λυκίσκου και η αύξηση του βαθμού διαλυτότητας του προϊόντος. Για τον βρασμό του απαιτούνται μία έως δύο ώρες, στους 103°C, ωστόσο ο ακριβής προσδιορισμός του χρόνου και της θερμοκρασίας καθορίζεται από την συνταγή του είδους του ζύθου που είναι να παραχθεί. Σε αυτό το στάδιο προστίθεται το εκχύλισμα του λυκίσκου, αλλά και άλλα στοιχεία, όπως η δεξτρόζη και διάφορα είδη σιροπιών δημητριακών, και ο ζύθος λαμβάνει νέα μορφή και γεύση. Οι δεξαμενές που χρησιμοποιούνται σήμερα είναι κυρίως ανοξείδωτες με κωνικό πάτο και κυλινδρική μορφή. Ο κωνικός πάτος που

έχει άνοιγμα περίπου 60 μοιρών επιτρέπει την συλλογή των στερεών υπολειμμάτων και της ζύμης (στην περίπτωση των βυθοζυμών) στην κορυφή του και από εκεί την εύκολη απομάκρυνσή τους (Kuhbeck et al., 2006).

Στον πάτο της δεξαμενής βρασμού απομένει ένα στρώμα από υπολείμματα λυκίσκου και πρωτεϊνών που έχουν συσσωματωθεί (hot trub). Επίσης, χρησιμοποιείται ένας κάθετος κύλινδρος (whirlpool), ο οποίος λειτουργεί ως συμπαγής κώνος στη βάση και υποβάλλει σε επιπλέον κυκλοφορία το εν λόγω στρώμα υπολειμμάτων. Αυτός επιτρέπει την μείωση της χρησιμοποίησης του λυκίσκου και την αύξηση των προ-ισομερισμένων εκχυλισμάτων. Επιπλέον, όταν για την παραγωγή του ζύθου έχουν χρησιμοποιηθεί ολόκληροι κώνοι από λυκίσκο είναι απαραίτητο να λαμβάνει χώρα στάδιο κατακράτησης του λυκίσκου ή διαχωριστής φίλτρου.

Εν συνεχεία, το ζυθογλεύκος ψύχεται στην θερμοκρασία εμβολιασμού, γίνεται προσθήκη αέρα και ως εκ τούτου απομακρύνεται το ψυχρό θόλωμα. Το ζυθογλεύκος μεταφέρεται στις δεξαμενές ζύμωσης, όπου προστίθεται η μαγιά και ξεκινάει η διαδικασία της ζύμωσης. Η αλκοολική ζύμωση πραγματοποιείται με χρήση κυρίως στελεχών του είδους *Saccharomyces cerevisiae*. Κύριος στόχος του εν λόγω σταδίου είναι η κατανάλωση του ζυμώσιμου εκχυλίσματος, η παραγωγή αιθυλικής αλκοόλης και διοξειδίου του άνθρακα. Την ίδια στιγμή σχηματίζονται και τα δευτερεύοντα προϊόντα του μεταβολισμού της ζύμης, με τα οποία εκτός από συντήρηση επιτυγχάνεται και βελτίωση των θρεπτικών και οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του προϊόντος (Lekkas et al., 2007).

Έπειτα από την ζύμωση και πριν από την δημιουργία του τελικού προϊόντος του ζύθου μεσολαβεί η ωρίμανση του ζύθου. Κατά την διεργασία αυτή λαμβάνει χώρα και δεύτερη ζύμωση, όπου το προϊόν βρίσκεται σε θερμοκρασία -1 έως -2 °C για δύο έως οκτώ εβδομάδες ανάλογα με το τύπο του ζύθου. Είθισται οι σκουρόχρωμες να απαιτούν περισσότερο χρόνο από τις ξανθιές. Κατά την περίοδο αυτή, γίνεται πλήρης ζύμωση του εναπομείναντος ζυμώσιμου εκχυλίσματος, σχηματίζονται οι επιθυμητές αρωματικές ενώσεις και αποικοδομούνται οι μη επιθυμητές, επέρχεται ο φυσικός κορεσμός του προϊόντος με διοξείδιο του άνθρακα και σταθεροποιείται το τελικό αποτέλεσμα.

Μόλις παρέλθει ο χρόνος ξεκούρασης στις δεξαμενές ακολουθεί η διαύγαση του ζύθου άλλως το φιλτράρισμα. Από το στάδιο αυτό εξαρτάται η σταθεροποίηση και η λαμπερή εικόνα του ζύθου, όπως και η διατήρηση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του. Ακολουθεί η εμφιάλωση και αποθήκευση του ζύθου σε δοχεία. Πριν την εμφιάλωση

γίνεται η παστερίωση της χρησιμοποιούμενης συσκευασίας για την εξουδετέρωση των διάφορων μικροοργανισμών. Ο βαθμός της παστερίωσης εξαρτάται από τον τρόπο αποθήκευσης του ζύθου και τον χρόνο διατήρησης προς κατανάλωση. Η εμφιάλωση γίνεται μαζί με την ανθράκωση της φιάλης, αν και ο ζύθος είθισται να εμφιαλώνεται και σε βαρέλια και σε κουτάκια αλουμινίου. Όποιο είδος συσκευασίας και αν χρησιμοποιηθεί είναι ζωτικής σημασίας για τον ζύθο να μην έρθει σε επαφή με τον ατμοσφαιρικό αέρα, καθώς αυτό αναμένεται να επηρεάσει και την διάρκεια ζωής και την ποιότητα του τελικού προϊόντος. Αντίστοιχα, σημαντική είναι και η σύνθεση του υλικού της συσκευασίας, καθώς είναι καίριας σημασίας να μην συντίθεται από υλικά τα οποία αντιδρούν με τα συστατικά του ζύθου και που μπορεί να ευνοούν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιούνται σχεδόν αποκλειστικά κουτάκια από αλουμίνιο και ανοξείδωτο ατσάλι. Τέλος, σημαντική κρίνεται και η τελική αποθήκευση του προϊόντος, διότι ο ζύθος, ως ποτό με χαμηλή περιεκτικότητα σε αλκοόλ, είναι ευαίσθητος και πρέπει να φυλάσσεται σε δροσερό περιβάλλον (Wunderlich & Back, 2009).

1.5.3 Ελαττώματα και επιμολύνσεις

Είναι σημαντικό να τηρούνται με ακρίβεια και συνέπεια οι ως άνω διαδικασίες ελέγχου στα στάδια παραγωγής του ζύθου, καθώς ακόμα και μια φαινομενικά μικρής τάξεως διαφοροποίηση έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ελαττωμάτων στο προϊόν, τα οποία είναι δυνατόν να οδηγήσουν και σε πιθανές μολύνσεις του ζύθου.

Μερικά από τα ελαττώματα που μπορεί να παρουσιάσει ο ζύθος είναι τα θολώματα βιολογικής ή φυσικοχημικής φύσεως, ανεπιθύμητες γεύσεις και πτωχά φυσικά χαρακτηριστικά.

Η πρώτη κατηγορία ελαττωμάτων, ήτοι τα θολώματα του ζύθου οφείλονται στην ανάπτυξη μικροοργανισμών όπως είναι οι ζύμες και τα βακτήρια. Αυτά συνήθως παρατηρούνται στους μη παστεριωμένους ζύθους. Μερικές από τις αιτίες για την εμφάνιση τους είναι λόγω της παρουσίας της γλουτένης ή αλβουμίνης, όταν για παράδειγμα το κριθάρι είναι πλούσιο σε πρωτεΐνες και η βύνη παρουσιάζει υψηλότερα ποσοστά υγρασίας. Θολώματα εμφανίζονται και στην περίπτωση της αδρανοποίησης των αμυλασών, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε υψηλότερη περιεκτικότητα αμύλου στον προϊόν, λόγω της μη πλήρους υδρόλυσης του, το οποίο με την σειρά του θα αυξήσει την παραγωγή των μεγαλομοριακών δεξτρίνων. Ακόμα, θόλωμα στον ζύθο μπορεί να προκύψει από την ένωση των λευκωμάτων με μέταλλα από τα δοχεία

αποθήκευσης, σε περίπτωση που χρησιμοποιείται υλικό το οποίο αντιδρά με τα συστατικά του ζύθου, με ενδεικτικό παράδειγμα τον κασσίτερο. Τέλος, στα θολώματα βιολογικής ή φυσικοχημικής φύσεως εντάσσονται και εκείνα που προκαλούνται από σύμπλοκα πρωτεϊνών – ταννινών, τα οποία ευνοούνται από το οξυγόνο και το ηλιακό φως, επιφέροντας άσχημη επίγευση στο τελικό προϊόν (Kirkpatrick & Shellhammer, 2018).

Περαιτέρω, σημαντικό ελάττωμα που παρατηρείται σε προϊόντα του ζύθου είναι η εμφάνιση της γεύσης της ζύμης ή του μελανιού, τα οποία οφείλονται στην παρουσία άγριων ζυμών και υψηλής ποσότητας σιδήρου, αντίστοιχα.

Τέλος, ένας ζύθος εμφανίζεται με πτωχά φυσικά χαρακτηριστικά σε δύο περιπτώσεις. Η πρώτη περίπτωση είναι εκείνη στην οποία γίνεται χρήση ακατάλληλων ή χαμηλής ποιότητας πρώτων υλών, όπως είναι το κριθάρι και ο λυκίσκος. Μάλιστα, η χρήση αλλοιωμένου κριθαριού είναι και εκείνη που οδηγεί στον υπεραφρισμό του ζύθου. Η δεύτερη περίπτωση είναι εκείνη που παρουσιάζονται μολύνσεις στον ζύθο, λόγω της παρουσίας μικροοργανισμών, ιδίως βακτηρίων, τα οποία εμφανίζονται όταν το στάδιο της ζυθοποίησης δεν έχει ολοκληρωθεί επιτυχώς. Σημαντική, επίσης, πηγή μολύνσεων συνιστούν και οι καλλιέργειες ζύμης, οι οποίες δεν είναι καθαρές, καθώς λειτουργούν ως υπόστρωμα για τις άγριες ζύμες και τα βακτήρια, τα οποία και επιφέρουν την ανάπτυξη ανεπιθύμητων γεύσεων και οσμών (Kirkpatrick & Shellhammer, 2018).

1.5.4 Το Σύστημα Ανάλυσης Κινδύνων και Κρίσιμα Σημεία Ελέγχου

Προκειμένου να προληφθούν και να αποφευχθούν τα ως άνω ελαττώματα και οι πιθανές μολύνσεις του ζύθου χρησιμοποιείται πλέον το Σύστημα Ανάλυσης Κινδύνων και Κρίσιμα Σημεία Ελέγχου (Hazard Analysis Critical Control Points – HACCP). Το εν λόγω σύστημα εντοπίζει και αναλύει τους συγκεκριμένους κινδύνους και προσδιορίζει τα ενδεδειγμένα όρια ελέγχου προκειμένου να διασφαλισθεί η ποιότητα του ζύθου σε όλα τα στάδια της διαδικασίας παραγωγής και διάθεσης (Wallace et al., 2014).

Το σύστημα αυτό, το οποίο ξεκίνησε στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής το 1960, εφαρμόζεται πλέον υποχρεωτικά και στην Ελλάδα, σύμφωνα με τον Κανονισμό ΕΚ 852/2004 της Ευρωπαϊκής Ένωσης, και αφορά στην υποχρέωση όλων των επιχειρήσεων τροφίμων και ποτών να τηρούν τις αρχές του HACCP.

Ο ζύθος ανήκει στα αλκοολούχα ποτά, τα οποία χαρακτηρίζονται από την περιεκτικότητά τους σε αιθυλική αλκοόλη, η οποία προέρχεται είτε από την φυσική

ζύμωση είτε με προσθήκη αυτής κατά την επεξεργασία του προϊόντος. Κατά τα στάδια παραγωγής του προϊόντος, όπως αναφέρθηκε και ανωτέρω, μπορεί να παρουσιαστούν μικροβιολογικοί, φυσικοί ή χημικοί κίνδυνοι, οι οποίοι αν και δεν θεωρούνται υψηλής επικινδυνότητας έχουν εντούτοις μεγάλη επίδραση στο τελικό προϊόν και στον καταναλωτή (Wallace et al., 2014).

Στην ζυθοποιία, ως χημικοί κίνδυνοι αναγνωρίζονται οι μυκοτοξίνες, οι οποίες μπορεί να εμφανιστούν ιδίως κατά την αποθήκευση του κριθαριού και της βύνης. Περαιτέρω, λόγω της φύσης του κριθαριού, ως βασική πρώτη ύλη, απαιτείται να ελέγχεται για εμφάνιση βαρέων μετάλλων, τα οποία επιμολύνουν το κριθάρι από το χωράφι ή μπορεί να προέλθουν από σωληνώσεις και ακατάλληλες δεξαμενές. Ενώ επίσης, κρίνεται ιδιαίτερα σημαντική η πλήρης πλύση των γραμμών παραγωγής, καθώς ενδέχεται να απομένουν υπολείμματα των καθαριστικών απολύμανσης που χρησιμοποιούνται στην γραμμή παραγωγής, τα οποία μπορούν να επιμολύνουν το τελικό προϊόν (Pascari et al., 2018).

Εν συνεχεία, κατά την παρασκευή του ζύθου ενδέχεται να εμφανιστούν οι αναφερόμενοι ως φυσικοί κίνδυνοι, ιδιαίτερα στο στάδιο της διήθησης, που πρόκειται στην πραγματικότητα για την εμφάνιση ξένων σωμάτων στο προϊόν. Ο έλεγχος της παρουσίας φυσικών κινδύνων γίνεται από τους ζυθοποιούς και με το σύστημα HACCP και μέσω της οπτικής παρατήρησης και με την ορθή εφαρμογή των προγραμμάτων καθαριότητας. Ενώ και κατά το στάδιο της εμφιάλωσης είναι απαραίτητο να γίνονται αντίστοιχοι έλεγχοι στην χρησιμοποιούμενη συσκευασία, ιδιαίτερα όταν πρόκειται για γυάλινους περιέκτες, προκειμένου να απομακρυνθούν όσες έχουν ραγίσματα και ξένα σώματα. Ο έλεγχος αυτός γίνεται ακόμα πιο συστηματικός και με τη βοήθεια της τεχνολογίας καμερών ακτινών τύπου X εάν οι συσκευασίες που εφαρμόζονται είναι γυάλινες και επαναχρησιμοποιούμενες, λόγω της αυξημένης πιθανότητας ύπαρξης θραύσματος γυαλιού μέσα στο προϊόν. Ο εν λόγω έλεγχος επανέρχεται για τους ίδιους λόγους και για την εμφιάλωση του προϊόντος, καθώς και σε αυτή την φάση υφίσταται ο κίνδυνος σπασίματος της γυάλινης φιάλης, ο οποίος αντιμετωπίζεται περαιτέρω με τακτική συντήρηση και επιθεώρηση του εξοπλισμού. Τέλος, συχνό φαινόμενο είναι και η ύπαρξη εντόμων εντός της γυάλινης συσκευασίας, το οποίο αντιμετωπίζεται με σωστή πρόληψη και με την χρήση φερομονικών παγίδων και παγίδων UV (Pascari et al., 2018).

Μια τελευταία κατηγορία κινδύνων, η οποία επίσης εμφανίζεται αρκετά συχνά είναι οι μικροβιολογικού χαρακτήρα. Λόγω του γεγονότος ότι στην παρασκευή του ζύθου

χρησιμοποιούνται ζύμες επιφανείας και ζύμες βυθού, ήτοι στελέχη των *Saccharomyces cerevisiae* και του *Saccharomyces uvarum*, αντίστοιχα, οι έλεγχοι εμφάνισης μικροοργανισμών είναι συνεχής. Αρχής γενομένης της συλλογής και αποθήκευσης του κριθαριού αναπτύσσονται μύκητες που οδηγούν σε μούγλα μέρη του προϊόντος, με ζύμες και βακτήρια να είναι επίσης παρόντα. Εν συνεχεία, κατά το στάδιο της βυνοποίησης, αν και ο σκοπός είναι να απομακρυνθούν από την επιφάνεια του καρπού οι περισσότεροι μικροοργανισμοί, εντούτοις το περιβάλλον αυτό δημιουργεί τις ιδανικές συνθήκες ανάπτυξης για τους εναπομείναντες μικροοργανισμούς. Επίσης, κατά το στάδιο της ζυθοποίησης αναπτύσσεται μια πληθώρα μικροοργανισμών, όπου μετά και το στάδιο του βρασμού, το αποτέλεσμα αναμένεται να είναι άρτιο. Ακόμα, μικροοργανισμοί μπορούν να αναπτυχθούν στο νερό που χρησιμοποιείται κατά την παρασκευαστική διαδικασία του ζύθου, καθώς στην περίπτωση που η δεξαμενή προμήθειας νερού έχει επιμολυνθεί με ζύθο, αναμένεται να αναπτυχθεί το στέλεχος των *Bacillus SPP*, το στέλεχος *Enterobacteriaceae SPP* και σπόρια ζυμών, το οποίο αναμένεται να δημιουργήσει περαιτέρω πρόβλημα άπαξ και διοχετευτεί μέσω της γραμμής νερού και στα υπόλοιπα στάδια της διαδικασίας (Esmaeili et al., 2015).

Περαιτέρω, στη ζύμωση εμφανίζονται τα γένη των *Lactobacillus* και *Bacillus*, τα οποία είναι ικανά να αντέξουν σε συνθήκες χαμηλού pH και υψηλής θερμοκρασίας, σε αντίθεση με τα σπόρια των βακίλων τα οποία συνήθως επιβιώνουν του βρασμού αλλά λόγω του χαμηλού pH αδρανοποιείται ο πολλαπλασιασμός τους. Αντίστοιχα, συχνά εμφανίζεται και το βακτήριο *Obesumbacterium proteus*, το οποίο μπορεί να προκαλέσει αλλοίωση, ωστόσο η δραστηριότητα αυτή περιορίζεται από την αλκοόλη και το χαμηλό pH. Αρκετά συχνά επίσης, εμφανίζεται το θόλωμα του ζύθου. Αυτό προκαλείται από την ανάπτυξη των γενών *Lactobacillus* και *Pediococcus*, τα οποία μπορούν να επιβιώσουν μέχρι και το στάδιο της ωρίμανσης του ζύθου, και από τα βακτήρια *Hafnia*, *Aerobacter* και *Escherichia*, τα οποία εμφανίζονται λόγω κακής υγιεινής πρακτικής (Hutzler et al., 2013).

2. ΧΑΡΟΥΠΙ

2.1 Ιστορικά στοιχεία

Το χαρούπι, το οποίο στα αρχαία ελληνικά αναφέρεται ως «κεράτιον», αναπτύσσεται στην Μέση Ανατολή και στις χώρες της Μεσογείου από την αρχαιότητα έως και σήμερα. Σε αρχαιολογικές ανασκαφές στο Ισραήλ και στην Αίγυπτο έχουν βρεθεί δείγματα χαρουπιού, τα οποία χρονολογούνται μεταξύ 8.000 – 6.000 π.Χ., ενώ συχνά μνημονευόταν στα κείμενα της Παλαιάς και Καινής Διαθήκης. Η αξία του καρπού αναγνωρίστηκε από τους αρχαίους Έλληνες, οι οποίοι ήταν και εκείνοι που μετέφεραν την παραγωγή του στον ελλαδικό χώρο. Λόγω της αφθονίας του, της ευκολίας συντήρησης και των θρεπτικών συστατικών του, ο καρπός του χαρουπιού ήταν εκείνος που έθρεψε και έσωσε από την ασιτία μεγάλο μέρος του πληθυσμού κατά τον Β΄ Παγκόσμιο Πόλεμο και την Γερμανική Κατοχή (Tous et al., 2013).

Αντίστοιχα, αναφορές για το δέντρο του χαρουπιού υπάρχουν από αρχαιοτάτων χρόνων, όπως και πληροφορίες για την μεταφορά του στην Σικελία από τους Έλληνες τον 8^ο αιώνα π.Χ..

2.1 Χαρούπι, σιρόπι χαρουπιού και ροφήματα χαρουπιού

Το χαρούπι προέρχεται από το δέντρο Κερατόνια πυρίτια Λ., το οποίο αναπτύσσεται ευρέως στην Μεσόγειο και σε περιοχές που το κλίμα ομοιάζει με το μεσογειακό, όπως στην Καλιφόρνια, το Μεξικό, τη Νότιο Αφρική και την Ινδία. Με κυρίαρχες χώρες παραγωγής του την Ισπανία, την Ιταλία, το Μαρόκο και την Πορτογαλία, η παγκόσμια παραγωγή του υπολογίζεται ότι ανέρχεται στους 315.000 τόνους ετησίως.

Ο καρπός του χαρουπιού συνίσταται από πολύ σε ποσοστό 90%, ειδικά σάκχαρα, όπως είναι η σακχαρόζη, η γλυκόζη και η φρουκτόζη, από τανίνες, όπως είναι το γαλλικό οξύ, και άλλες πρωτεΐνες και λίπη σε χαμηλότερα ποσοστά. Το υπόλοιπο μέρος του καρπού αποτελείται από τους σπόρους, οι οποίοι περιέχουν γαλακτομαννάνες και άλλα βιοδραστικά συστατικά, όπως μέταλλα και φλαβονοειδή. Η εκχύλιση του καρπού σε νερό και στη συνέχεια η συμπύκνωση του μείγματος, οδηγεί σε ένα παχύρευστο υγρό με γλυκιά γεύση που ονομάζεται χαρουπόμελο (Yatmaz & Turhan, 2018).

Το χαρούπι καλλιεργείται κυρίως για τους σπόρους του, οι οποίοι χρησιμοποιούνται στην παραγωγή τσίγλας (Locust bean gum), η οποία χρησιμεύει ως μέσο ανάπτυξης και πύκνωσης με σταθεροποιητική βάση στα τρόφιμα. Επίσης, από το χαρούπι παράγεται και το αλεύρι φύτρων, το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως για τα ευεργετικά του οφέλη στην διατροφή του ανθρώπου. Πέρα από τον σπόρο του χαρουπιού, χρησιμοποιείται σε μικρότερη έκταση και ο πολτός του, κυρίως για την παραγωγή σοκολάτας στην ζαχαροπλαστική (Yatmaz & Turhan, 2018).

Αν και το χαρούπι πρόκειται για ένα ιδιαίτερα ευεργετικό τρόφιμο για τον άνθρωπο, διότι αποτελεί μια πηγή πλούσια σε αντιοξειδωτικά, θα λέγαμε πως ακόμα η παρουσία του στην διεθνή αγορά είναι περιορισμένη. Για τον λόγο αυτό και οι μελέτες αναφορικά με τις δυνατότητες του είναι ακόμα σε ένα σχετικά πρώιμο στάδιο (Marwa et al., 2022). Μέχρι στιγμής, ιδιαίτερη έμφαση φαίνεται να δίνεται στην υψηλή περιεκτικότητα του πολτού του σε πολυφαινόλες και τανίνες, με αντιοξειδωτική δράση η οποία είναι ιδιαίτερα ωφέλιμη για την υγεία του ανθρώπου. Συχνά μάλιστα γίνεται χρήση εκχυλισμάτων πλούσιων σε τανίνες αντί των αντιβιοτικών στα παραδοσιακά φάρμακα, καθώς αρκετές μελέτες δείχνουν πως πρόκειται για μια αρκετά αποτελεσματική εναλλακτική. Ιδιαίτερη μνεία αξίζει να δοθεί στο σιρόπι χαρουπιού, διότι παρουσιάζει ιδιαίτερη αντιμικροβιακή δράση λόγω της περιεκτικότητας του σε πολυφαινόλες και για τον λόγο αυτό πέρα από την παραδοσιακή του χρήση σε κέικ, μπισκότα και άλλα παρασκευάσματα ζαχαροπλαστικής, χρησιμοποιείται με πολύ καλά αποτελέσματα στην συντήρηση των εποχιακών φρούτων.

Το σιρόπι χαρουπιού απαιτεί υψηλή θερμοκρασία και σχετικά μεγάλο χρόνο επεξεργασίας προκειμένου να ενεργοποιηθεί η οξείδωση των δραστικών του ενώσεων. Προκειμένου να επιταχυνθεί η εν λόγω διαδικασία, χρησιμοποιούνται διάφορες τεχνικές εκχύλισης ώστε να εξοικονομηθεί χρόνος και ενέργεια, η οποία θα επιτρέψει την παραγωγή φαινολικών εκχυλισμάτων χαμηλού κόστους αλλά υψηλής ποιότητας. Παραδοσιακά, το σιρόπι χαρουπιού παρασκευάζεται με την μέθοδο της στερεάς εκχύλισης με βραστό νερό, σε θερμοκρασία μεγαλύτερη από 100°C, αλλά και με άλλες μεθόδους όπως είναι η εκχύλιση με υποβοήθηση υπερήχων (Ultrasound Assisted Extraction – UAE), η οποία θεωρείται αρκετά αποτελεσματική και γρήγορη, δεδομένης της χρήσης της συχνότητας 18 – 40 kHz, η οποία προκαλεί ρήξη του κυτταρικού τοιχώματος, ευνοώντας την πρόσβαση του διαλύτη στα κύτταρα του καρπού. Για την αποτελεσματικότητα της εν λόγω μεθόδου, συνδράμουν διάφοροι παράγοντες, με

επικρατέστερους την ποσότητα και αναλογία του διαλύτη, τον τύπο του, την συγκέντρωση και το μέγεθος των σωματιδίων, την θερμοκρασία και τον χρόνο εκχύλισης που παρέχεται (Yatmaz & Turhan, 2018).

Για την βελτιστοποίηση της μεθόδου εκχύλισης με υποβοήθηση υπερήχων συνήθως επιλέγονται δύο βασικές τεχνικές : α) τα πειράματα του ενός παράγοντα την φορά (one-factor-at-a-time experiments) και β) η μεθοδολογία απόκρισης επιφάνειας (Response Surface Methodology – RMS). Η πρώτη τεχνική αφορά στην αλλαγή ενός παράγοντα την φορά, διατηρώντας όλους τους υπόλοιπους σε σταθερές τιμές, το οποίο θεωρείται και περισσότερο χρονοβόρο εν αντιθέσει με την δεύτερη τεχνική η οποία επιτρέπει την ταυτόχρονη βελτιστοποίηση των μεμονωμένων παραγόντων και τις πιθανές αλληλεπιδράσεις τους παρέχοντας μια πολυωνμική εξίσωση η οποία ανταποκρίνεται στα δεδομένα του πειράματος. Αν και οι δύο τεχνικές χρησιμοποιούνται πια διότι θεωρητικά μειώνουν τον χρόνο παραγωγής και την κατανάλωση ενέργειας εντούτοις είναι αρκετά νωρίς για να παρατεθούν πιο παγιωμένες διαπιστώσεις (Clodoveo et al., 2022).

Το χαρουπόμελο, ήτοι το παχύρευστο σιρόπι που προέρχεται από τον πολτό του χαρουπιού, έχει υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα (κυρίως σακχαρόζη, γλυκόζη και μαλτόζη), η οποία κυμαίνεται από 62–74 βαθμούς Brix. Σε πολλές μεσογειακές χώρες μάλιστα χρησιμοποιείται ως βάση για την προετοιμασία άλλων παραδοσιακών σιροπιών. Μάλιστα, στο εργαστήριο μπορούν να παρασκευαστούν διάφορα σιρόπια από χαρούπι, τα οποία είναι συνήθως ιξώδη, στην απόχρωση της σοκολάτας, και κυμαίνονται μεταξύ των 64,30 – 74,43 βαθμών Brix. Η διακύμανση στους βαθμούς Brix στα χαρουπόμελα σχετίζεται με τον τελικό χρόνο βρασμού, ο οποίος και καθορίζει το τελικό αποτέλεσμα. Αναφορικά με το pH, αυτό κυμαίνεται μεταξύ του 4,3 – 5,4, ανάλογα με το αν υπάρχουν και σε πιο βαθμό μεταλλικά στοιχεία, τα οποία είναι και αυτά που καθιστούν το προϊόν περισσότερο όξινο (Clodoveo et al., 2022).

Τα ροφήματα χαρουπιού αν και μέχρι στιγμής χρησιμοποιούνται κυρίως ως συστατικά σε ροφήματα με βάση το γάλα έχουν απασχολήσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας για ποικίλους λόγους. Ένας από τους βασικότερους είναι ότι περιλαμβάνει απλούς υδατάνθρακες που το καθιστούν κατάλληλο υπόστρωμα για ζύμωση από μικροοργανισμούς, η οποία ευθύνεται για την παραγωγή διάφορων χημικών ενώσεων, όπως είναι το γαλακτικό οξύ και το ηλεκτρικό οξύ, ανοίγοντας τον δρόμο σε

ένα νέο πεδίο μελέτης στην ανάπτυξη ευεργετικών για τον άνθρωπο ροφημάτων (Vitali et al., 2023).

2.3 Τα οφέλη του χαρουπιού και οι εφαρμογές του

Τα τελευταία χρόνια, το ενδιαφέρον των επιστημόνων υγείας και διατροφής στρέφεται όλο και περισσότερο γύρω από τον καρπό του χαρουπιού, το χαρουπόμελο και τα λοιπά παράγωγα του, ιδίως λόγω της αντιοξειδωτικής δράσης του. Δεδομένης της στροφής των επιστημονικών μελετών σε πιο φυσικά αντιοξειδωτικά προκειμένου να αντικατασταθούν τα συνθετικά πρόσθετα, τα οποία θεωρούνται επιβλαβή για την υγεία του ανθρώπου, κυρίως για το ήπαρ και εν γένει καρκινογενέσεις και λοιπές τοξικές δράσεις, ο καρπός του χαρουπιού προτάσσεται ως μια πολύ καλή εναλλακτική λύση. Άλλωστε, το χαρουπόμελο, το οποίο έχει μια αρκετά γλυκιά γεύση συνίσταται ως υγιεινό υποκατάστατο της ζάχαρης, κατάλληλο για χρήση σε πληθώρα προϊόντων διατροφής, ζαχαροπλαστικής και ροφημάτων (Loullis & Pinakoulaki, 2018).

Η βάση των φυσικών αντιοξειδωτικών είναι κυρίως οι πολυφαινόλες, οι οποίες πέρα από τον καρπό του χαρουπιού, απαντώνται σε έναν μεγάλο αριθμό φυτικών εκχυλισμάτων. Ο καρπός του χαρουπιού αποτελεί μια ιδιαίτερος πλούσια πηγή πολυφαινολικών αντιοξειδωτικών, και η προσθήκη τους στα τρόφιμα κρίνεται ιδιαίτερος σημαντική. Για την ποσοτικοποίηση των φαινολικών ενώσεων προτείνονται διαφορετικές μέθοδοι, οι οποίες ωστόσο απαιτούν ειδικό και κατάλληλο εξοπλισμό, όπως και αρκετό χρόνο για την εφαρμογή τους (Stavrou et al., 2018).

Μερικά από τα οφέλη του χαρουπιού στην υγεία είναι η αντιοξειδωτική του δράση, η αντιδιαβητική του δράση και η αντικαρκινική. Περαιτέρω, ο καρπός του χαρουπιού φαίνεται να συμβάλει στην μείωση της χοληστερόλης και στην ενίσχυση του μεταβολισμού.

Για την αντιμετώπιση των μολύνσεων από παθογόνους μικροοργανισμούς σε ολοκληρωμένα βιολογικά συστήματα, παράγονται διάφορες ενεργές μορφές οξυγόνου ή αντιδραστικές μορφές αζώτου, με τις δεύτερες να ονομάζονται ελεύθερες ρίζες και να έχουν την ικανότητα να προκαλούν βλάβες σε πρωτεΐνες, λιπίδια και άλλα στοιχεία του DNA των κυττάρων και να επιφέρουν παθογένειες, όπως και γήρανση αυτών. Μάλιστα, έχει διαπιστωθεί ότι η παρατεταμένη έκθεση του οργανισμού στο οξειδωτικό στρες, οδηγεί σε υπέρμετρη παραγωγή ελεύθερων ριζών, η οποία με την σειρά της επηρεάζει την παραγωγή και λειτουργία των αντιοξειδωτικών του σώματος, με

αποτέλεσμα να δημιουργεί συνθήκες ικανές να λειτουργήσουν ως βάση για την εμφάνιση διάφορων εκφυλιστικών ασθενειών (Stavrou et al., 2018).

Για την ενίσχυση του οργανισμού, η δράση των πολυφαινολών κρίνεται ιδιαίτερα ευεργετική καθώς έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν και να αδρανοποιούν τις ελεύθερες ρίζες, μέσω της παροχής ηλεκτρονίων του αντιοξειδωτικού και της δημιουργίας σχετικά σταθερών ριζών φαινοξυλίου ή μέσω μηχανισμών συμπλοκοποίησης ιόντων, όπως Fe και Cu, των αντιοξειδωτικών, καταστέλλοντας με τον τρόπο αυτό τις αρνητικές επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες (Nasar - Abbas et al., 2016).

Περαιτέρω, οι ιδιότητες του καρπού του χαρουπιού φαίνονται ιδιαίτερα χρήσιμες στην αντιδιαβητική δράση του οργανισμού. Λόγω του σύγχρονου τρόπου ζωής και της αντίστοιχης γραμμής παραγωγής τροφίμων, η οποία στηρίζεται σε μεγάλο βαθμό στα επεξεργασμένα τρόφιμα, παρατηρείται να αυξάνεται ο διαβήτης τύπου 2 στον πληθυσμό. Μάλιστα, σύμφωνα με μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε άτομα μετά από την λήψη γεύματος διαπιστώθηκε άμεση συσχέτιση του γλυκαιμικού δείκτη και του δείκτη ινσουλίνης των τροφίμων, με τον διαβήτη τύπου 2. Για την αντιμετώπιση αυτού του τύπου διαβήτη έχει διαπιστωθεί πως είναι ιδιαίτερα σημαντικό να είναι χαμηλός ο γλυκαιμικός δείκτης του τροφίμου. Τα τρόφιμα δηλαδή που είναι εύπεπτα και έχουν χαμηλή απόκριση γλυκόζης στο αίμα, είναι ευεργετικά, διότι βοηθούν στην διαχείριση του διαβήτη και της υπερλιπιδαιμίας (Loullis & Pinakoulaki, 2018).

Από αντίστοιχο πείραμα, που έλαβε χώρα σε αρουραίους, παρατηρήθηκε ότι έπειτα από την χορήγηση πολυφαινολικού εκχυλίσματος από τον λοβό του χαρουπιού, η γλυκόζη στον οργανισμό τους μειώθηκε μετά από 30, 60 και 120 λεπτά, αντίστοιχα, ανάλογα με την ομάδα ελέγχου. Θεωρείται ότι αυτό συνέβη διότι το χαρούπι περιλαμβάνει ενώσεις οι οποίες μπορούν να μειώνουν την απόκριση γλυκόζης στο αίμα, αναστέλλοντας την ενζυμική δραστηριότητα (αμυλάσες) (Macho-Glnzalez et al., 2020).

Σε μια άλλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, παρατηρήθηκε ότι η κατανάλωση D – πινιτόλης πριν από το γεύμα, καταστέλλει την αύξηση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα. Αντίστοιχα αποτελέσματα, ως προς την αντιπεργλυκαιμική ιδιότητα της πινιτόλης λήφθηκαν και από πείραμα σε ποντικούς με διαβήτη, στους οποίους χορηγήθηκαν πινιτόλη σόγιας και πινιτόλη χαρουπιού (Macho-Glnzalez et al., 2020).

Κατόπιν των ανωτέρω, φάνηκε πως η D – πινιτόλη, η οποία περιέχεται στο χαρούπι περίπου σε ποσοστό 5,5%, είναι ιδιαίτερα ευεργετική, καθώς μπορεί να ελέγξει τις αυξήσεις της γλυκόζης στο αίμα και μπορεί να αξιοποιηθεί για την μείωση του διαβήτη τύπου 2 (Macho-Gonzalez et al., 2020).

Όπως ανησυχητικά εμφανίζονται τα επίπεδα του διαβήτη τύπου 2 στον πληθυσμό άλλο τόσο εμφανίζονται και τα ποσοστά εμφάνισης του καρκίνου, τα οποία τα τελευταία χρόνια έχουν αυξηθεί σημαντικά. Μέχρι στιγμής, από τις μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, έχει παρατηρηθεί ότι το εκχύλισμα από ίνες χαρουπιού, το οποίο είναι πλούσιο σε πολυφαινόλες και τανίνες, λειτουργεί προστατευτικά έναντι του οξειδωτικού στρες των κυττάρων του αδενώματος, τα οποία με τη σειρά τους συμβάλλουν στην επιβράδυνση της εξάπλωσης τόσο των κυττάρων του αδενώματος όσο και του αδενοκαρκινώματος του ανθρώπινου παχέος εντέρου. Αντίστοιχα, σε μελέτη ηπατοκυτταρικού καρκινώματος ποντικού, τα υδατικά εκχυλίσματα από τους καρπούς του χαρουπιού έδειξαν αξιοσημείωτη μεταβολή στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μια κυτταρικής σειράς του καρκινώματος, αποδεικνύοντας την αντιπολλαπλασιαστική δραστηριότητα του χαρουπιού, η οποία θα μπορούσε να φανεί ιδιαίτερα χρήσιμη στην παρασκευή λειτουργικών τροφίμων και χημειοπροληπτικών φαρμάκων.

Μια ακόμα από τις ευεργετικές ιδιότητες του καρπού του χαρουπιού θεωρείται και η συμβολή της στην μείωση της χοληστερόλης. Πολλές μελέτες που συνδέουν τα καρδιαγγειακά νοσήματα με την αύξηση της LDL χοληστερόλης στο αίμα, έχουν δείξει πως η κατανάλωση ινών χαρουπιού, προστατεύει το λιπίδια των κυττάρων του ανθρώπινου αίματος (Ruiz-Roso et al., 2010).

Σε μελέτη που έλαβε χώρα με δείγμα 47 εθελοντές, οι οποίοι παρουσίαζαν μέτρια υπερχοληστερολαιμία, παρατηρήθηκε μετά από 8 εβδομάδες ότι με την προσθήκη 15g χαρουπιού την ημέρα, είτε μέσω των δημητριακών πρωινού, είτε μέσω μπάρας δημητριακών και αντίστοιχων ροφημάτων, η μέση ολική χοληστερόλη τους μειώθηκε σε ποσοστό 7,1% και της LDL κατά 10,6% σε συντομότερο διάστημα (Zunft et al., 2001).

Ακολούθως, έλαβε χώρα μια τυχαιοποιημένη κλινική μελέτη με εικονικό φάρμακο, σε ένα δείγμα 58 εθελοντών, οι οποίοι έπασχαν από υπερχοληστερολαιμία. Οι μισοί από τους εθελοντές κατανάλωναν 15g χαρουπιού ημερησίως και οι άλλοι μισοί λάμβαναν το εικονικό φάρμακο. Μετά από 6 εβδομάδες παρατηρήθηκε πως η συγκέντρωση της

ολικής χοληστερόλης και της LDL χοληστερόλης μειώθηκε σε ποσοστό 9,5% και 10,5% στην ομάδα που κατανάλωνε τα προϊόντα χαρουπιού σε σχέση με την ομάδα που έπαιρνε το εικονικό φάρμακο (Ruiz-Roso et al., 2010).

Αντίστοιχες μελέτες, με πιο πρόσφατη εκείνη των Ruiz – Roso και άλλων, επιβεβαίωσε το αποτέλεσμα, καθώς διαπιστώθηκε πως με την κατανάλωση 4g δύο φορές την μέρα για 4 εβδομάδες η ολική χοληστερόλη μειώθηκε κατά 18% και των τριγλυκεριδίων κατά 16%. Η λειτουργία αυτή του χαρουπιού φαίνεται να σχετίζεται με την αυξημένη δραστηριότητα της 7 α -υδροξυλάσης της χοληστερόλης και με την αυξημένη απέκκριση του χολικού οξέος (η σύνθεση χολικών αλάτων αποτελεί κύρια οδό αποικοδόμησης της χοληστερόλης χαρουπιού), η οποία περιλαμβάνεται στις ίνες του χαρουπιού (Ruiz-Roso et al., 2010).

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί πως μια από τις ευεργετικές ιδιότητες του χαρουπιού είναι και η συμβολή τους στην ενίσχυση του μεταβολισμού. Λόγω του ότι οι τροφές που περιέχουν χαρούπι είναι αργά εύπεπτες, καλύπτουν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα το αίσθημα του κορεσμού. Αυτό θεωρείται ότι μπορεί να είναι μια καλή λύση για τη διαχείριση του σωματικού βάρους και ειδικά της παχυσαρκίας. Το αλεύρι από χαρούπι ενδείκνυται για την αντιμετώπιση διάφορων διαρροϊκών διαταραχών τόσο στους ενήλικες όσο και στα βρέφη. Έχει διαπιστωθεί πως ο χυμός του χαρουπιού σε συνδυασμό με το ORS, ένα ειδικό διάλυμα το οποίο χρησιμοποιείται για από του στόματος χρήση, εγκεκριμένο από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, για την θεραπεία της οξείας διάρροιας στα παιδιά, είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της διάρκειας και των συμπτωμάτων της νόσου κατά 45% σε σύγκριση με τη χρήση αποκλειστικά του ORS (Nasar – Abbas et al., 2016).

Τα προϊόντα που παράγονται από το χαρούπι ποικίλλουν και μπορούν να προστεθούν σε διάφορα τρόφιμα, γλυκά και ποτά. Ευρείας χρήσης είναι το χαρουπάλευρο, ήτοι ο λοβός του χαρουπιού σε σκόνη, και το χαρουπόμελο, ήτοι η παρασκευή σιροπιού από χαρούπι (Ibrahim et al., 2020).

Το χαρουπάλευρο παρασκευάζεται από την άλεση του καρπού του χαρουπιού (ψημένου ή μη) σε σημείο που γίνεται λεπτή σκόνη, το οποίο χρησιμοποιείται ήδη σε διάφορα αρτοποιητικά προϊόντα, όπως το ψωμί και τα παξιμάδια, και σε γλυκά, ως υποκατάστατο της σκόνης κακάο. Έχει λεπτή σύσταση, οπότε και μπορεί να αναμειχθεί εύκολα με άλλα αλεύρια και προσδίδει μια ιδιαίτερη γλυκιά γεύση. Άλλωστε, πέρα από την καλή του γεύση, λόγω της πλούσιας σύστασης του σε φυτικές ίνες και

πολυφαινόλες με την προσθήκη του αναμένεται η παρασκευή ενός τροφίμου ή ποτού, εμπλουτισμένου με αυτές τις ευεργετικές ουσίες για την ανθρώπινη υγεία. Σύμφωνα με τους *Berna και άλλους* (1997), για να επιτευχθεί η χαμηλότερη ποσότητα ισοβουτυρικού οξέος και να αποφευχθεί η δυσάρεστη οσμή που δημιουργείται κατά το καβούρδισμα του χαρουπιού αυτό θα πρέπει να θερμανθεί στους 150°C για εξήντα λεπτά (Berna et al., 1997).

Έχει παρατηρηθεί πως το χαρουπάλευρο κατά την χρήση του στην παρασκευή άρτου από ρυζάλευρο έχει την ικανότητα να βελτιώνει και τα ποιοτικά χαρακτηριστικά της ζύμης, έστω και όταν προστίθεται σε μικρή ποσότητα, ήτοι της τάξης του ποσοστού 15%, καθώς αυξάνει την περιεκτικότητα του ζυμαριού σε νερό και βελτιώνει την σταθερότητα και τη δομή της ψίχας. Ακόμα, όπως και όταν χρησιμοποιείται ως υποκατάστατο του κακάο, το χαρουπάλευρο συμβάλλει στο προϊόν με την ελάττωση της περιεκτικότητας του σε λίπος και την αύξηση των φυτικών ινών και των αντιοξειδωτικών του. Άλλωστε, λόγω της υψηλής περιεκτικότητας του σε σάκχαρα, κυρίως σακχαρόζη, απαιτείται προσθήκη μικρότερης ποσότητας ζάχαρης σε σχέση με το κακάο (Tsatsaragkou et al., 2014).

Ακόμα, το χαρουπάλευρο χρησιμοποιείται ως συστατικό και για την παρασκευή ζυμαρικών χωρίς γλουτένη, είτε μόνο του, είτε σε συνδυασμό με άλλα αλεύρια. Σε πειραματική μελέτη ζυμαρικών χωρίς γλουτένη με παρουσία χαρουπιού σε ποσοστό 10% και ζυμαρικών χωρίς, διαπιστώθηκε πως αυτά που ήταν συμπληρωμένα με χαρούπι είχαν πιο σκούρο χρώμα, ήταν πιο μαλακά και κολλώδη και παρουσίαζαν υψηλότερη ποσότητα βιοδραστικών ενώσεων (Arribas et al., 2020). Ακόμα, θετικά ήταν και τα αποτελέσματα της έρευνας που πραγματοποιήθηκε για την παρασκευή αλείμματος από χαρουπάλευρο προσθήκης 38g σε 100g αλείμματος. Σε συνδυασμό με υδρογονομένο φοινικέλαιο ποσοστού 42g σε 100g αλείμματος το προϊόν παρουσίασε βέλτιστες οργανοληπτικές ιδιότητες αναφορικά με το χρώμα, την υφή και την θρεπτική του αξία (Aydın & Özdemir, 2017).

Αναφορικά με το χαρουπόμελο, αυτό παρασκευάζεται από την εκχύλιση των λοβών του χαρουπιού σε νερό, που ακολουθείται από συμπύκνωση με θέρμανση, όπου λόγω της υψηλής περιεκτικότητας του χαρουπιού σε σάκχαρα, έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ενός παχύρευστου υγρού με γλυκιά γεύση και υψηλή διατροφική αξία. Το χαρουπόμελο προστίθεται συχνά σε τρόφιμα, αρτοσκευάσματα, σάλτσες, ροφήματα και προϊόντα ζαχαροπλαστικής, κυρίως ως γλυκαντικό αλλά και ως μέσο καλλιέργειας

μικροοργανισμών χρήσιμων για το παρασκευαζόμενο προϊόν, όπως είναι η μαννιτόλη (Carvalho et al., 2016).

Σε μελέτη που είχε γίνει είχε διερευνηθεί η προσθήκη του χαρουπόμελου σε διάφορες συγκεντρώσεις, ως υποκατάστατο της ζάχαρης, στην παρασκευή μαρμελάδας πικρού πορτοκαλιού, ώστε να καλυφθεί η πικράδα, χωρίς άλλους κινδύνους για το προϊόν. Στο εν λόγω πλαίσιο μετρήθηκε το pH, η οξύτητα, η υγρασία και η ολική περιεκτικότητα σε σάκχαρα και ακατέργαστες ίνες, οι ολικές φαινολικές ενώσεις, η αντιοξειδωτική δράση και οι οργανοληπτικές ιδιότητες του προϊόντος. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι με τη χρήση χαρουπόμελου η συνολική περιεκτικότητα σε σάκχαρα μειώθηκε, ενώ οι ακατέργαστες ίνες, το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο και η αντιοξειδωτική δράση στη μαρμελάδα αυξήθηκε. Επίσης, βελτιώθηκαν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της μαρμελάδας όπως η φωτεινότητα, η υφή, η οσμή, η γεύση και η πικράδα. Μάλιστα, στο δείγμα μαρμελάδας με 100% χαρουπόμελο δεν ανιχνεύθηκε καθόλου πικράδα. Αυτό βρέθηκε να οφείλεται στις φαινολικές ενώσεις (κυρίως το γαλλικό οξύ), οι οποίες σχημάτισαν ένα σύμπλοκο με τη ναριγκίνη, εξαλείφοντας την πικρή της γεύση (Özbek, 2023).

Ακόμη μια εφαρμογή του χαρουπόμελου, ως υποκατάστατο της ζάχαρης, η οποία αποδείχθηκε εξαιρετικά επιτυχής, ήταν η προσθήκη του σε παντεσπάνι. Σε δείγμα τριών διαφορετικών ειδών, ήτοι παντεσπάνι ελέγχου χωρίς χαρουπόμελο, παντεσπάνι με 25% χαρουπόμελο και παντεσπάνι με 50% χαρουπόμελο, διαπιστώθηκε ότι στα δείγματα με το χαρουπόμελο αυξήθηκε η περιεκτικότητα του προϊόντος σε πρωτεΐνη, διαιτητικές ίνες και υδατάνθρακες και βελτιώθηκε η γλυκύτητα και τρυφερότητα της ψίχας (Fidan et al., 2019).

Ακολούθως, οι Florbela Carvalho και άλλοι προέβησαν το 2011 στην μελέτη του χαρουπόμελου ως μέσο καλλιέργειας μικροοργανισμών. Στην έρευνα τους ενέταξαν 8 διαφορετικά στελέχη γαλακτικών βακτηρίων που παράγουν μαννιτόλη και τα άφησαν να αναπτυχθούν για 30 ώρες. Σκοπός τους ήταν να αξιολογήσουν την κατανάλωση σακχάρων, όπως και την παραγωγή της βιομάζας και των μεταβολιτών. Το αποτέλεσμα της εν λόγω διαδικασίας ήταν να καταφέρουν να αναπτυχθούν και να παραχθεί μαννιτόλη με ογκομετρική παραγωγικότητα και ανθεκτικότητα μόνο με βάση το χαρούπι (Carvalho et al., 2011).

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί η χρήση πολυφαινολών από χαρούπι για την επικάλυψη των τροφίμων. Αξιοσημείωτη είναι και μία έρευνα που πραγματοποιήθηκε για την ανάπτυξη ενός καινοτόμου βιοϋλικού επικάλυψης για την συσκευασία των τροφίμων

με έντονη αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή δράση, μέσω του πολυμερισμού των φαινολικών ενώσεων του λοβού του χαρουπιού με τη μέθοδο της εκχύλισης με μεθανόλη. Τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντική μείωση της οξείδωσης των λιπιδίων κατά την ψυχρή αποθήκευση των τροφίμων. Ενώ όσον αφορά στην μικροβιακή ισχύ, η ως άνω επικάλυψη φαίνεται να εξάλειψε την ανάπτυξη της *listeria monocytogenes* μετά από αποθήκευση 10 ημερών (Goulas et al., 2019).

2.4 Η αντιοξειδωτική ικανότητα του χαρουπιού

Όπως προαναφέρθηκε, πολλές επιστημονικές έρευνες έχουν προσανατολιστεί στην μελέτη των δυνατοτήτων των φυσικών αντιοξειδωτικών, όπως είναι οι φαινολικές ενώσεις, η Βιταμίνη E, η Βιταμίνη C και τα καροτενοειδή, τα οποία περιέχονται στα τρόφιμα. Σκοπός της εν λόγω έρευνας και μελέτης των φυσικών αντιοξειδωτικών είναι η διερεύνηση των δυνατοτήτων τους, προκειμένου να αντικατασταθούν σταδιακά τα συνθετικά αντιοξειδωτικά που προστίθενται στα τρόφιμα και τα ποτά, τα οποία θεωρούνται ιδιαίτερα επιβλαβή για την ανθρώπινη υγεία, λόγω της τοξικής επίδρασής τους (Rodríguez-Solana et al., 2021). Επισημαίνεται πως τα αντιοξειδωτικά, φυσικά και συνθετικά, χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία των τροφίμων, λόγω της ικανότητάς τους να συντηρούν τα τρόφιμα και να τα προστατεύουν από αλλοιώσεις που προκαλούνται από την οξείδωση τους, ήτοι αλλοιώσεις στο χρώμα και την τάγγιση των λιπών τους (Σφλώμος & Βαρζάκης, 2019).

Τα φυτικά εκχυλίσματα του χαρουπιού θεωρούνται ιδιαίτερα σημαντικά στην προσπάθεια εγκαθίδρυσης των φυσικών αντιοξειδωτικών στα τρόφιμα και τα ποτά, καθώς δρουν ευεργετικά, όπως εκτέθηκε αναλυτικά ανωτέρω, στην πρόληψη ασθενειών όπως είναι το οξειδωτικό στρες, ο καρκίνος και τα καρδιαγγειακά νοσήματα (Rodríguez-Solana et al., 2021). Μια από τις κύριες αντιοξειδωτικές ουσίες που περιέχεται και στο χαρούπι είναι οι βιοφαινόλες, οι οποίες βρίσκονται και σε άλλα τρόφιμα και ποτά, και οι οποίες εντάσσονται στην κατηγορία των φυτοχημικών συστατικών που συχνά χρησιμοποιούνται και στα φάρμακα (Σφλώμος, 2019).

Οι φαινολικές ενώσεις ανήκουν στην κατηγορία των δευτερογενών μεταβολιτών των φυτών και εμπεριέχονται σε διάφορους φυτικούς οργανισμούς, όπως είναι τα φρούτα, τα λαχανικά και τα όσπρια, με την μορφή πολυμερών, τα οποία ονομάζονται πολυφαινόλες. Οι πολυφαινόλες συνιστούν οργανικές ενώσεις, οι οποίες περιλαμβάνουν μία ή περισσότερες υδροξυλομάδες, συνδεδεμένες σε έναν εξαμελή αρωματικό δακτύλιο (Martel, Monteiro, & Calhau, 2010). Οι φαινολικές ενώσεις

διαθέτουν ένα ευρύ φάσμα λειτουργιών και χωρίζονται σε δύο βασικές κατηγορίες : α) τις απλές φαινόλες, όπως είναι τα φαινολικά οξέα (κινναμικό οξύ, τα παράγωγα του κ.ά.) και β) τις πολυφαινόλες, όπως είναι τα φλαβονοειδή, οι λιγνάνες, τα στυλβένια και οι ταννίνες (Owen et al., 2003). Οι φαινολικές ενώσεις, όπως αναφέρθηκε και ανωτέρω συνιστούν βιοδραστικές ουσίες, με πολλές από αυτές να παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση, όπως είναι εκείνες που ανήκουν στην κατηγορία των φλαβονοειδών και των ταννινών (Σφλώμος, 2019). Ειδικότερα, τα φλαβονοειδή ανήκουν στην τάξη των φυτικών χρωστικών ουσιών και είναι πολυυδροξύ-παράγωγα της 2-φαινυλοβενζο-γ-πυρόνης με κύριο στοιχείο τους τη φλαβόνη. Πολλές φορές λόγω της υψηλής βιταμινικής τους ιδιότητας χαρακτηρίζονται και ως βιταμίνες P. Επίσης, στα φλαβονοειδή περιλαμβάνονται οι κατεχίνες και οι ανθοκυάνες.

Τα φλαβονοειδή ανιχνεύονται κυρίως σε ροφήματα όπως είναι το τσάι και σε φρούτα και λαχανικά, όπως είναι τα εσπεριδοειδή (Σφλώμος, 2019). Οι ταννίνες, από την άλλη, είναι πολυμερείς πολυφαινολικές ενώσεις, εστέρες του γαλλικού και μ-διγαλλικού οξέος με γλυκόζη. Ανήκουν στις δεσικές ύλες, ήτοι φυτικής προέλευσης άμορφα υλικά μεγάλου μοριακού βάρους. Βασικότερη ένωση από τις ταννίνες αποτελεί το ταννικό οξύ (ή ταννίνη), οι οποίες εντοπίζονται σε τροπικά φρούτα, όπως είναι το μάνγκο και οι χουρμάδες, στα σταφύλια, στο τσάι, στον καφέ και στο κακάο (Σφλώμος, 2019).

Οι φαινολικές ενώσεις συνδέονται στενά με τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τόσο των φρέσκων, όσο και των επεξεργασμένων τροφίμων, όπως και με τη διατροφική ποιότητα τους.

2.5 Βιοδραστικές ενώσεις χαρουπιού

Ο λοβός του χαρουπιού είναι πλούσιος σε βιοδραστικές ενώσεις. Η σύνθεση των βιοδραστικών συστατικών του διαφοροποιείται και εξαρτάται από την ποικιλία του χαρουπιού, την γεωγραφική του προέλευση, την ωριμότητα του καρπού, όπως και τη μέθοδο εκχύλισης που ακολουθείται (Ikram et al., 2023). Οι κυριότερες βιοδραστικές ενώσεις του χαρουπιού είναι οι πολυφαινόλες και οι ινοσιτόλες (D-πινιτόλη), οι οποίες είναι ιδιαίτερα ευεργετικές για την υγεία του ανθρώπου και συμβάλλουν στην βελτίωση των οργανοληπτικών ιδιοτήτων ενός τροφίμου (Nasar- Abbas et al., 2016).

Πολυφαινόλες

Οι φαινολικές ενώσεις, οι οποίες ανιχνεύονται στον λοβό του χαρουπιού με την εφαρμογή της τεχνικής της υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High-performance liquid chromatography – HPLC) κατατάσσονται στα φαινολικά οξέα, στις

ταννίνες και στα φλαβονοειδή (Clodoveo, Crupi, Muraglia, & Corbo, 2022). Σε πειράματα επιταχυνόμενης φθοράς με χρήση θειο-γλυκολικού οξέος ή υδροχλωρικού οξέος στον πολτό του χαρουπιού ανιχνεύτηκαν πολυμερή των υπομονάδων φλαβαν-3-όλης και φλαβαν-3,4-διόλης όπως η (+)-κατεχίνη, η (-)-επικατεχίνη γαλλικού εστέρα, (-)-επιγαλλοκατεχίνη γαλλικού εστέρα και (-)-επιγαλλοκατεχίνη. Σε εκχύλιση με νερό στον πολτό του χαρουπιού εντοπίστηκε κυρίως γαλλικό οξύ, και σε μικρότερες ποσότητες (-)-επιγαλλοκατεχίνη, (+)-κατεχίνη, (-)-επικατεχίνη γαλλικού εστέρα και (-)-επιγαλλοκατεχίνη γαλλικού εστέρα. Ομοίως, σε εκχύλιση με μεθανόλη και οξικό οξύ, ποσοστού 90% και 0,5%, αντίστοιχα, ανιχνεύτηκαν επιπλέον γλυκοζίτες της κουερσετίνης και ελλαγικό οξύ (Owen et al., 2003)

Ινοσιτόλες (D - πινιτόλη)

Ο λοβός του χαρουπιού περιέχει, εκτός από τα κύρια σάκχαρα, ήτοι σακχαρόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη, χαμηλή συγκέντρωση και άλλων σακχάρων, όπως είναι η μαλτόζη, η ραφινόζη, η σταχυόζη, η βερμπασκόζη, η ξυλόζη και οι ινοσιτόλες. Οι ινοσιτόλες είναι φυσικές πολυόλες, στερεοϊσομερή του εξαϋδροξυ κυκλοεαξανίου και αναφέρονται με τον εμπειρικό τύπο $C_6H_{12}O_6$ (Azab, 2022). Το χαρούπι επίσης υπολογίζεται ότι περιέχει έξι ινοσιτόλες και τα παράγωγα τους, ήτοι τους μεθυλαιθέρες (Nasar – Abbas et al., 2016). Επίσης, όπως και σε πολλούς άλλους φυτικούς ιστούς, έτσι και στους λοβούς των χαρουπιών εμφανίζονται συχνά η μυο-ινοσιτόλη και σε μεγάλη περιεκτικότητα η D-πινιτόλη. Η D-πινιτόλη είναι ένα βιοδραστικό συστατικό των φυτικών ινών και συναντάται σε υψηλότερη περιεκτικότητα στους λοβούς των χαρουπιών σε σχέση με άλλους φυτικούς ιστούς (Azab, 2022; Nasar – Abbas et al., 2016).

2.6 Μέθοδοι ποσοτικοποίησης φαινολικών ενώσεων

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί διάφορες αναλυτικές τεχνικές για την ανίχνευση, ποσοτικοποίηση και ανάλυση των φαινολικών ενώσεων. Η ποσοτικοποίηση των φαινολικών ενώσεων είναι μια αρκετά σύνθετη και πολύ σημαντική διαδικασία λόγω της ευρείας παρουσίας της στην βιομηχανία των τροφίμων και στην φαρμακοβιομηχανία. Η επιλογή της χρησιμοποιούμενης τεχνικής εξαρτάται από την χημική φύση της ένωσης, το υπόστρωμα του δείγματος, την απαιτούμενη ευαισθησία και τον διαθέσιμο εξοπλισμό. Δύο από τις βασικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται είναι η φασματοφωτομετρία ορατού – υπεριώδους (Ultraviolet –

Visible Spectrophotometry – UV–Vis) και η τεχνική της χρωματογραφίας, στην οποία περιλαμβάνονται η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (High Performance Liquid Chromatography – HPLC) και η αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography – GC) (Khoddami, Wilkes, & Roberts, 2013).

Αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography – GC)

Η αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography–GC) αποτελεί μια τεχνική ανάλυσης, η οποία χρησιμοποιείται στην αναλυτική χημεία κυρίως για πτητικές ή ημι–πτητικές ενώσεις. Με την εν λόγω τεχνική γίνεται διαχωρισμός και ανάλυση των ενώσεων που μπορούν να εξατμιστούν και να ανιχνευθούν με κατάλληλο ανιχνευτή, όπως είναι για παράδειγμα ο ανιχνευτής ιονισμού φλόγας (FID) ή η φασματομετρία μάζας (MS) (Μπρατάκος, 2021). Η τεχνική αυτή επιτρέπει την διάκριση των ενώσεων με βάση τη μάζα τους και τη διασπορά τους στον χώρο. Η εν λόγω τεχνική συχνά χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με άλλες χρωματογραφικές τεχνικές, όπως είναι η υγρή και η αέρια χρωματογραφία.

Ο ως άνω συνδυασμός χρησιμοποιείται και στην ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των φαινολικών ενώσεων. Τα βασικά βήματα εφαρμογής της αέριας χρωματογραφίας είναι η επιλογή της κατάλληλης στήλης διαχωρισμού, η συνεπής προετοιμασία του δείγματος και η εισαγωγή του στην κεφαλή της στήλης με σωστό τρόπο. Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη στήλη είναι τριχοειδής στήλη μήκους 30m από τηγμένο διοξείδιο του πυριτίου με εσωτερική διάμετρο 25– 32 μm και μέγεθος σωματιδίων στατικής φάσης 0,25μm. Η εφαρμογή της αέριας χρωματογραφίας παρέχει μεγαλύτερη ευαισθησία και εκλεκτικότητα σε συνδυασμό με τη φασματομετρία μάζας (MS) (Khoddami et al., 2013). Για την ανάλυση των φαινολικών ενώσεων των τροφίμων είναι απαραίτητο να γίνει καθαρισμός του δείγματος (πχ απομάκρυνση λιπιδίων από το εκχύλισμα) και απελευθέρωση των φαινολικών από τους γλυκοζιτικούς και εστερικούς δεσμούς με χρήση ενζυμικών, αλκαλικών και όξινων χημικών μέσων, με σκοπό των μετασχηματισμό τους σε περισσότερα πτητικά παράγωγα.

Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography – HPLC)

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αποτελεί μία από τις πιο διαδεδομένες μεθόδους διαχωρισμού, ταυτοποίησης και ποσοτικοποίησης σύνθετων μειγμάτων, η οποία εφαρμόζεται συχνά στην τεχνολογία τροφίμων. Η εν λόγω μέθοδος μπορεί να είναι κανονικής φάσης (Normal Phase – NP) ή αντίστροφης φάσης (Reversed Phase –

RP). Κατά την μέθοδο HPLC κανονικής φάσης, γίνεται χρήση πολικής στατικής φάσης και μη πολικής κινητής φάσης. Έτσι, όσο πιο πολικοί είναι οι αναλυτές ή προσδιοριζόμενες ενώσεις, τόσο μεγαλύτερη θα είναι η συγκράτηση στη στατική φάση, ενώ όσο πιο υδρόφιλοι είναι οι αναλυτές, τόσο περισσότερο θα τείνουν προς την κινητή φάση. Με την HPLC μπορεί να αναλυθεί οποιαδήποτε ένωση διαλύεται σε ένα υγρό και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως κινητή φάση, ανεξαρτήτως του μεγέθους των σωματιδίων. Αυτό οφείλεται στη χρήση αντλίας η οποία αναγκάζει το υγρό να διέλθει στην κινητή φάση, ώστε να γίνει ο διαχωρισμός των συστατικών του μείγματος (Μπρατάκος, 2021).

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

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

Όσον αφορά την επιλογή στήλης για τον προσδιορισμό των φαινολικών ενώσεων, με βάση την πολικότητα, μπορούν να ανιχνευθούν διαφορετικές κατηγορίες φαινολικών χρησιμοποιώντας στήλη κανονικής φάσης C18 ή αντίστροφης φάσης C18 (RP – C18) μήκους 10 – 30 cm, εσωτερικής διαμέτρου 3,9 – 4,6 mm και μεγέθους σωματιδίων 3 – 10 μm. Ωστόσο, νέοι τύποι στηλών (μονολιθικές και επιφανειακά πορώδεις στήλες σωματιδίων) με 3 – 25 cm μήκος, 1 – 4,6 mm εσωτερική διάμετρος και 1,7 – 10 μm μέγεθος σωματιδίων χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση φαινολών με προηγμένες

τεχνικές HPLC, όπως η UHPLC (υγρή χρωματογραφία υπερ – υψηλής απόδοσης), HTLC (υγρή χρωματογραφία υψηλής θερμοκρασίας) και δισδιάστατη υγρή χρωματογραφία (LC x LC). Οι περισσότερες αναλύσεις HPLC φαινολικών ουσιών διεξάγονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος στήλης, ωστόσο έχουν προταθεί υψηλότερες θερμοκρασίες (φτάνουν τους 120 °C) λόγω εφαρμογής νέων στηλών και οργάνων. Ο χρόνος λειτουργίας HPLC είναι ένας ακόμα παράγοντας που επηρεάζει την ανίχνευση των φαινολικών και μπορεί να κυμαίνεται από 10 έως 150 λεπτά (Khoddami et al., 2013). Για τον εντοπισμό των φαινολικών ενώσεων χρησιμοποιούνται συνήθως ανιχνευτές UV – Vis και συστοιχία φωτοδιοδίων (PDA) με μήκη κύματος 190 – 380 nm, αλλά και ανιχνευτές φθορισμού (FLD), χρωματομετρικές συστοιχίες και συστοιχίες φωτοδιοδίων σε συνδυασμό με φθορισμό. Επίσης, για δομικό χαρακτηρισμό και επιβεβαίωση διαφορετικών φαινολικών τάξεων έχουν χρησιμοποιηθεί ανιχνευτές φασματομετρίας μαζών (MS) προσαρτημένοι σε υγρό χρωματογράφο υψηλής απόδοσης (HPLC – MS). Το HPLC σε συνδυασμό με ανιχνευτές MS είναι εξαιρετικά ευαίσθητο και έχει τη δύναμη να επιτύχει υψηλή εξειδίκευση λόγω της ικανότητας προσδιορισμού της μάζας (μοριακό βάρος) ενός μορίου (Khoddami et al., 2013).

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

Φασματογραφία ορατού – υπεριώδους – Μέθοδος Folin– Ciocalteu

Η φασματοφωτομετρία είναι μία από τις σχετικά απλές τεχνικές για τον ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολικών ενώσεων των φυτών. Μία συχνά χρησιμοποιούμενη φασματοφωτομετρική δοκιμασία για τη μέτρηση των συνολικών φαινολικών ενώσεων σε φυτικά δείγματα είναι η μέθοδος Folin– Ciocalteu (F– C). Το αντιδραστήριο F– C είναι ένα μείγμα αλάτων μολυβδαινίου (Mo) και βολφραμίου (W) το οποίο αντιδρά με φαινόλες και μη φαινολικές αναγωγικές ουσίες (π.χ. ασκορβικό οξύ, αρωματικές αμίνες και σάκχαρα) και σχηματίζει χρωμογόνες ομάδες (Lamuela – Raventós, 2018). Όταν το μείγμα βρίσκεται σε αλκαλικό περιβάλλον οι φαινολικές ενώσεις οξειδώνονται και το αντιδραστήριο F – C ανάγεται προς οξείδια, αυτά τα προϊόντα της αντίδρασης έχουν χαρακτηριστικό μπλε χρώμα με ευρύ φάσμα απορρόφησης φωτός γύρω στα 760 nm (Khoddami et al., 2013). Η ένταση αυτού του κυανού χρωματισμού είναι ανάλογη του

φαινολικού περιεχομένου του εξεταζόμενου δείγματος και μετρείται με τη βοήθεια του φασματοφωτομέτρου. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του ολικού φαινολικού περιεχομένου του δείγματος, σύμφωνα με τη συγκεκριμένα μέθοδο, γίνεται χρήση πρότυπης καμπύλης αναφοράς και η συγκέντρωση εκφράζεται σε ισοδύναμα ενός επιλεγμένου πρότυπου διαλύματος (συνήθως γαλλικού οξέος) ανά L ή g δείγματος (Lamuela-Raventós, 2018).

2.7 Μέθοδοι προσδιορισμού αντιοξειδωτικής δράσης

Για να μπορέσει να γίνει αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης διαφόρων φυσικών προϊόντων, χρειάζεται να πραγματοποιηθούν πολλές *in vitro* δοκιμές με διαφορετικούς μηχανισμούς, λαμβάνοντας υπόψιν τις αντιδράσεις οξείδωσης που γίνονται στα τρόφιμα. Για τη μέτρηση της συνολικής αντιοξειδωτικής δράσης μιας ένωσης ή μείγματος ενώσεων χρησιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι όπως FRAP, SET, ORAC, CUPRAC, ABTS, DPPH κ.λπ. όπου στην περίπτωση μας η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Folin Ciocalteu (Rodríguez-Solana et al., 2021).

FRAP

Η μέθοδος Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) συνιστά μια απλοποιημένη και γρήγορη φασματοφωτομετρική μέθοδο, με την οποία υπολογίζεται το σύνολο της αντιοξειδωτικής δράσης, ήτοι αναγωγικής ικανότητας, ενός δείγματος. Η μέτρηση γίνεται βάσει του συστήματος «*Single Electron Transfer*», με την αναγωγή του συμπλόκου ιόντων σιδήρου $Fe(3+)$ στο έντονα μπλε σύμπλοκο σιδήρου $Fe(2+)$ λόγω παρουσίας αντιοξειδωτικών σε όξινο περιβάλλον. Η αντιοξειδωτική δράση προσδιορίζεται ως αύξηση της απορρόφησης και τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μικρομοριακά ισοδύναμα του $Fe(2+)$ ή σε σχέση με ένα τυπικό αντιοξειδωτικό. Σε αντίθεση με άλλες μεθόδους, η δοκιμή FRAP λαμβάνει χώρα σε όξινα περιβάλλοντα, ήτοι σε συνθήκες pH της τάξεως του 3,6 για τη διατήρηση της διαλυτότητας του σιδήρου. Η αντίδραση σε χαμηλό pH μειώνει το δυναμικό ιονισμού που οδηγεί σε μεταφορά ηλεκτρονίων και αυξάνει το δυναμικό οξειδοαναγωγής, προκαλώντας μια μετατόπιση στον κυρίαρχο μηχανισμό αντίδρασης. Στη δοκιμή FRAP χρησιμοποιείται συνήθως 2,4,6 - τρι - (2- πυριδυλ) – τριαζίνη (TPTZ) ως συνδετική ένωση με το ιόν σιδήρου (Fe^{3+} -TPTZ), ωστόσο έχουν χρησιμοποιηθεί και άλλες ενώσεις, όπως η φερροζίνη για την αξιολόγηση της αναγωγικής ισχύος του ασκορβικού οξέος (Huang D. et al., 2005)

DPPH

Η DPPH είναι μία απλή και αρκετά γρήγορη μέθοδος για την εκτίμηση της ικανότητας δέσμευσης των ελεύθερων ριζών ενός δείγματος. Η ρίζα DPPH (2,2-διφαινυλ-1-πικρυλυδραζύλιο) είναι μία σταθερή οργανική ρίζα αζώτου με σκούρο μωβ χρώμα, η οποία παρουσία ουσίας με αντιοξειδωτική δράση ανάγεται στην 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (DPPH-H) που έχει κίτρινο χρώμα, λόγω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου (ή ηλεκτρονίου). Για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση το μείγμα αφήνεται σε σκοτεινό μέρος για περίπου 30 λεπτά. Η ρίζα DPPH (μωβ) απορροφά στα 520 nm και η αναγωγή της σε DPPH-H (κίτρινη) έχει ως αποτέλεσμα της ελάττωση της οπτικής απορρόφησης. Η αλλαγή αυτή της απορρόφησης παρακολουθείται με χρήση φασματοφωτόμετρου, ώστε να υπολογιστεί η αντιοξειδωτική δράση του εξεταζόμενου δείγματος. Η ρίζα DPPH μπορεί να διαλυθεί σε αρκετούς οργανικούς διαλύτες, αλλά δεν μπορεί να διαλυθεί στο νερό. Για τη διάλυσή της χρησιμοποιούνται τυπικά μεθανόλη, αιθανόλη ή υδατικά μείγματα αυτών των ενώσεων (η ποσότητα νερού δεν πρέπει να υπερβαίνει το 60% του μείγματος) (Christodoulou et al., 2022). Για τον υπολογισμό του ποσοστού αναγωγής (εξουδετέρωσης) τη ρίζας DPPH χρησιμοποιείται ο τύπος: $\text{αναστολή (\%)} = (\text{Απορρόφηση Control} - \text{Απορρόφηση δείγματος} / \text{Απορρόφηση Control}) \times 100$

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

ABTS

Η μέθοδος ABTS είναι μια γρήγορη και εύκολη, ευρέως γνωστή δοκιμή, για τη μέτρηση της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας ενός δείγματος, πρόσφατα ανεπτυγμένη από τους Miller et al (1993). Στη μέθοδο αυτή αξιολογείται η αντιριζική ισχύ των ουσιών που εξετάζονται μέσω της χρήσης της ρίζας ABTS•+ [2,2'-αζινοδισ(3-αιθυλοβενζοθειαζολινο-6-σουλφονικό οξύ)]. Η ρίζα ABTS•+, που έχει χρώμα μπλε-πράσινο, εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση στα 734nm και σχηματίζεται μέσω της οξείδωσης του μη ριζικού μορίου ABTS με υπερθειϊκό κάλιο ή νάτριο. Η παρουσία αντιοξειδωτικών που είναι δότες υδρογόνου, μειώνουν ποσοτικά τη ρίζα ABTS•+, ανάλογα με τη δραστηκότητά τους, τη συγκέντρωσή τους και τη διάρκεια της

αντίδρασης. Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να εξουδετερώσουν τη μονοκατιοντική ρίζα $ABTS^{\bullet+}$ είτε με μεταφορά υδρογόνου είτε με μεταφορά ηλεκτρονίου, σύμφωνα με τις εξής αντιδράσεις: $ABTS^{\bullet+}$ (μπλε-πράσινο χρώμα) + AH \rightarrow ABTS (άχρωμο) + $[AH]^{\bullet+}$ + $ABTS^{\bullet+}$ (μπλε-πράσινο χρώμα) + AH \rightarrow ABTS-H (άχρωμο) + A \bullet

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

2.8 Ζύμωση

2.8.1 Αλκοολική ζύμωση

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

Αλκοολική ζύμωση με χρήση του *Saccharomyces cerevisiae*

Ο *Saccharomyces cerevisiae*, όπως όλοι οι ζυμομύκητες, είναι μονοκύτταρος μύκητας που έχει παρόμοια δομικά χαρακτηριστικά με αυτά των ανώτερων ευκαρυωτικών κυττάρων (κυτταρικό τοίχωμα, πυρήνα, μιτοχόνδρια, ενδοπλασματικό δίκτυο, συσκευή Golgi, κενοτόπια, μικροσώματα κλπ.) (Walker & Stewart, 2016).

Για την ανάπτυξή του απαιτεί υψηλή ποσότητα διαθέσιμου νερού (ελάχιστη τιμή a_w περίπου 0,65). Κατά τη ζύμωση προϊόντων υψηλής περιεκτικότητας σε ζάχαρη ο ζυμομύκητας μπορεί να υποβληθεί σε οσμωτικό στρες, λόγω μειωμένης διαθεσιμότητας νερού. Αυτό συναντάται συχνά στη ζυθοποιία, στις ζυμώσεις πολύ υψηλής βαρύτητας (VHG, Very High Gravity) και στην παραγωγή ούισκι. Τα κύτταρα των ζυμομυκήτων έχουν την ικανότητα να επιβιώσουν σε συνθήκες αρκετά χαμηλής ενεργότητας νερού παράγοντας μεγάλη ποσότητα γλυκερόλης ή άλλους οσμολίτες, όπως η τρεαλόζη, που προστατεύουν τις μεμβράνες της ζύμης από την ξήρανση. Αυτές οι «συμβατές» ουσίες μπορούν να αντικαταστήσουν το διαθέσιμο νερό στο εσωτερικό του κυττάρου, να αποκαταστήσουν τον όγκο του και να επιτρέψουν την επανέναρξη των μεταβολικών αντιδράσεων της ζύμης. Ωστόσο, η μεγάλη ποσότητα γλυκερίνης είναι πιθανό να μειώσει την απόδοση αιθανόλης, σε ζυμώσεις υψηλής βαρύτητας (Walker & Stewart, 2016). Οι ζύμες ευδοκιμούν σε θερμά και όξινα περιβάλλοντα, με τα περισσότερα στελέχη *S.cerevisiae* να αναπτύσσονται καλύτερα μεταξύ 20 και 30 °C και pH 4,5 και 6,5. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης οι ζύμες οξινίζουν το περιβάλλον που αναπτύσσονται μέσω μίας σειράς αντιδράσεων, έκκρισης πρωτονίων κατά τη μεταφορά θρεπτικών συστατικών, άμεσης έκκρισης οργανικών οξέων, απομάκρυνση ρυθμιστικών παραγόντων και παραγωγής διοξειδίου του άνθρακα (CO₂) (Walker & Stewart, 2016).

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

Για την παραγωγή αλκοολούχων ποτών από το *S. cerevisiae*, η θρεπτική σύνθεση του μέσου ζύμωσης είναι βασικός παράγοντας για την ανάπτυξη και το μεταβολισμό της ζύμης, αλλά και την ποιότητα του τελικού προϊόντος. Εκτός από πηγή σακχάρων και νερού οι ζυμομύκητες απαιτούν, άλατα αμμωνίου, ανόργανα ιόντα και μερικούς αυξητικούς παράγοντες. Συγκεκριμένα, τα μακροθρεπτικά συστατικά πρέπει να παρέχονται σε χιλιοστογραμμομοριακές συγκεντρώσεις και περιλαμβάνουν πηγές άνθρακα (σάκχαρα), ελεύθερο αμινο άζωτο (αμινοξέα, μικρά πεπτίδια και άλατα αμμωνίου), οξυγόνο, θείο, φώσφορο, κάλιο και μαγνήσιο. Ενώ, τα μικροθρεπτικά

συστατικά χρειάζονται σε μικρομοριακές συγκεντρώσεις και περιλαμβάνουν ιχνοστοιχεία όπως το ασβέστιο, ο χαλκός, ο σίδηρος, το μαγγάνιο και ο ψευδάργυρος. Τα σύνθετα μέσα ζύμωσης που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή αλκοολούχων ποτών (πχ βύνη, μελάσα, γλεύκος κρασιού) συνήθως περιέχουν επαρκή επίπεδα ανόργανων ιόντων και αυξητικών παραγόντων για την ανάπτυξη της ζύμης, αλλά υπάρχουν περιπτώσεις όπου η συμπλήρωση με πρόσθετα μέταλλα είναι απαραίτητη (Walker & Stewart, 2016).

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

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

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

Δύο από τους βασικότερους δευτερογενείς μεταβολίτες είναι η γλυκερίνη και το ηλεκτρικό οξύ. Μετά την αιθανόλη και το CO₂, ο μεταβολίτης με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση στο κρασί είναι η γλυκερίνη. Το ηλεκτρικό οξύ παράγεται από τον *S. cerevisiae* είτε από τον κύκλο του κιτρικού οξέος (κύκλος Krebs) είτε από οξειδωτική απαμίνωση του γλουταμινικού, το οποίο μετατρέπεται σε α-κετογλουταρικό και αποκαρβοξυλιώνεται σε ηλεκτρική αλδεΐδη, η οποία οξειδώνεται σε ηλεκτρικό οξύ (Walker & Stewart, 2016).

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

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

3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

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

3.1 Δημιουργία και προετοιμασία δειγμάτων πριν την ανάλυση

3.1.1 Προετοιμασία σιροπιού χαρουπιού

Το σιρόπι χαρουπιού που χρησιμοποιήθηκε ήταν του εμπορίου προερχόμενο από την Κρήτη (ευγενική χορηγία της εταιρίας Raks Petrakis).



Εικόνα 1 Το χαρουπόμελο που χρησιμοποιήθηκε

3.1.2 Προετοιμασία Stout & Imperial Carob Beers

Για την παραγωγή 20L γλεύκους χρησιμοποιούνται βύνες καθώς και άλλα απαραίτητα συστατικά, όπως αναφέρεται στην συνέχεια.

Πίνακας 1 Τα συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν προς παραγωγή του ζύθου

Ingredients				
Amt	Name	Type	#	%/IBU
16,00 l	Attica deksameni Axamon 2018	Water	1	-
4,00 kg	Pale Malt (2 Row) Vergina (5,5 EBC)	Grain	2	75,0 %
0,36 kg	Vienna Malt (Weyermann) (9,0 EBC)	Grain	3	6,7 %
0,27 kg	Caramunich II (Weyermann) (110,0 EBC)	Grain	4	5,0 %
0,25 kg	Chocolate Malt (Simpsons) (1000,0 EBC)	Grain	5	4,7 %
0,18 kg	Special W (Weyermann) (300,0 EBC)	Grain	6	3,3 %
0,15 kg	Carafa Special I (Weyermann) (1000,0 EBC)	Grain	7	2,8 %
0,13 kg	Wheat Malt, Pale (Weyermann) (3,9 EBC)	Grain	8	2,4 %
40,00 g	Northern Brewer [10,00 %] - Boil 60,0 min	Hop	9	48,4 IBUs
4,00 g	Irish Moss (Boil 10,0 mins)	Fining	10	-
40,00 g	Cascade [7,80 %] - Steep/Whirlpool 5,0 min	Hop	11	3,4 IBUs
1,0 pkg	New World Strong Ale (Mangrove Jack's #M42)	Yeast	12	-

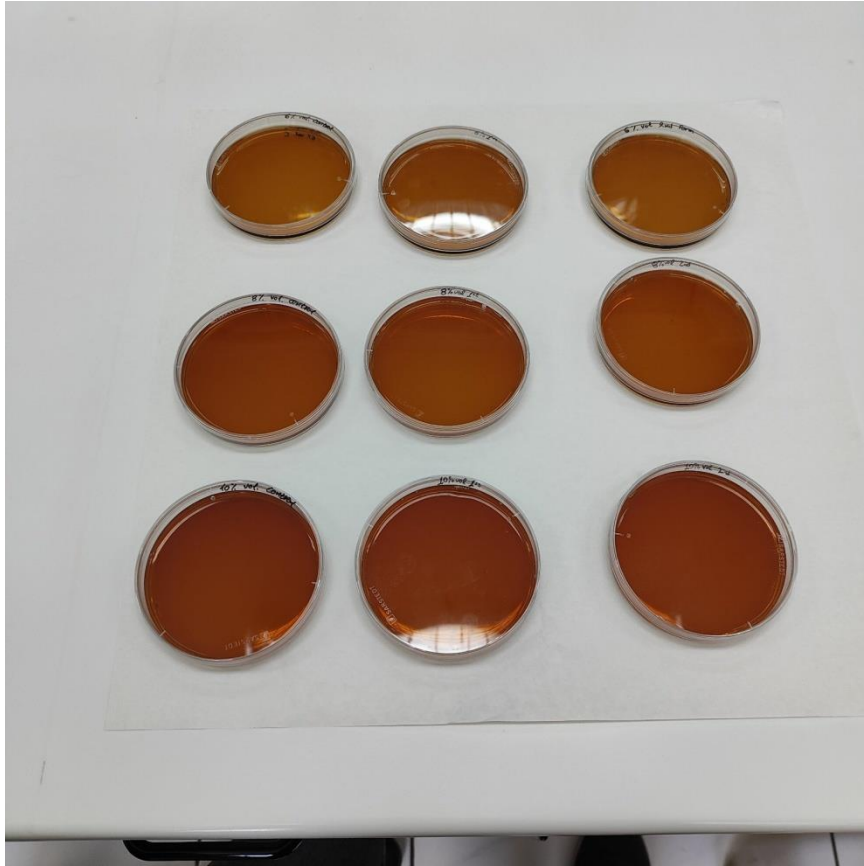
Πίνακας 2 Το πρόγραμμα πολτοποίησης που ακολουθήθηκε

Name	Description	Step Temperature	Step Time
Mash In	Add 17,99 l of water at 69,8 C	65,0 C	60 min
Mash Step	Add 0,00 l of water and heat to 72,0 C over 8 min	72,0 C	10 min
Mash Out	Add -0,00 l of water at 75,6 C	75,6 C	10 min

Αρχικά, το stout wort παρασκευάστηκε σε αρχικό εκχύλισμα 13,8° Plato και στη συνέχεια διαχωρίστηκε σε 3 παρτίδες. Στην πρώτη παρτίδα το γλεύκος παρέμεινε αμετάβλητο και το αναμενόμενο ABV ήταν 6%. Στην επόμενη παρτίδα προστέθηκαν 100 g σιρόπι χαρουπιού για να αυξηθεί το αρχικό Plato σε 18,8° και το αναμενόμενο ABV ήταν 8%. Τελικώς, η υψηλότερη συγκέντρωση (222 g) σιροπιού χαρουπιού προστέθηκε σε τρίτη παρτίδα που οδήγησε στον αρχικό Plato να φτάσει τους 23,8° Plato και στο τελικό ABV στο 10%.

Στη συνέχεια, το γλεύκος χωρίστηκε σε 3 παρτίδες, η καθεμία με διαφορετική τελική αλκοόλη κατ' όγκο (ABV). Αρχικά, η 1η παρτίδα δεν είχε αλλαγές σε σχέση με το αρχικό μούστο (μάρτυρας) και δεν προστέθηκε ποσότητα χαρουπιού. Επομένως, η συγκεκριμένη μπύρα είχε αναμενόμενο τελικό κατά όγκο αλκοόλης 6% ABV και χρησιμοποιήθηκε ως μπύρα «ελέγχου». Στη 2η και 3η παρτίδα του μούστου προστέθηκε σιρόπι χαρουπιού σε διαφορετικές αναλογίες (100 g/L και 222 g/L για να επιτευχθούν βαθμούς 18,8 °P και 23,8 °P αντίστοιχα) για να αναβαθμιστούν σε δυνατές μαύρες μπίρες με υψηλότερη τελική ποσοστά αλκοόλ.

Στη 2η παρτίδα, το αναμενόμενο ABV ήταν 8% ενώ στην 3η παρτίδα ήταν 10%.



Εικόνα 2 Οι διαφορετικές παρτίδες δειγμάτων που αναλύθηκαν

Τα παραπάνω ζυμώθηκαν στους 18°C με στέλεχος *S. cerevisiae* M42 (Mangrove Jack's). Η συνολική περιεκτικότητα σε φαινολικά μετρήθηκε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu.



Εικόνα 3 Ο προς ζύμωση ζύθος

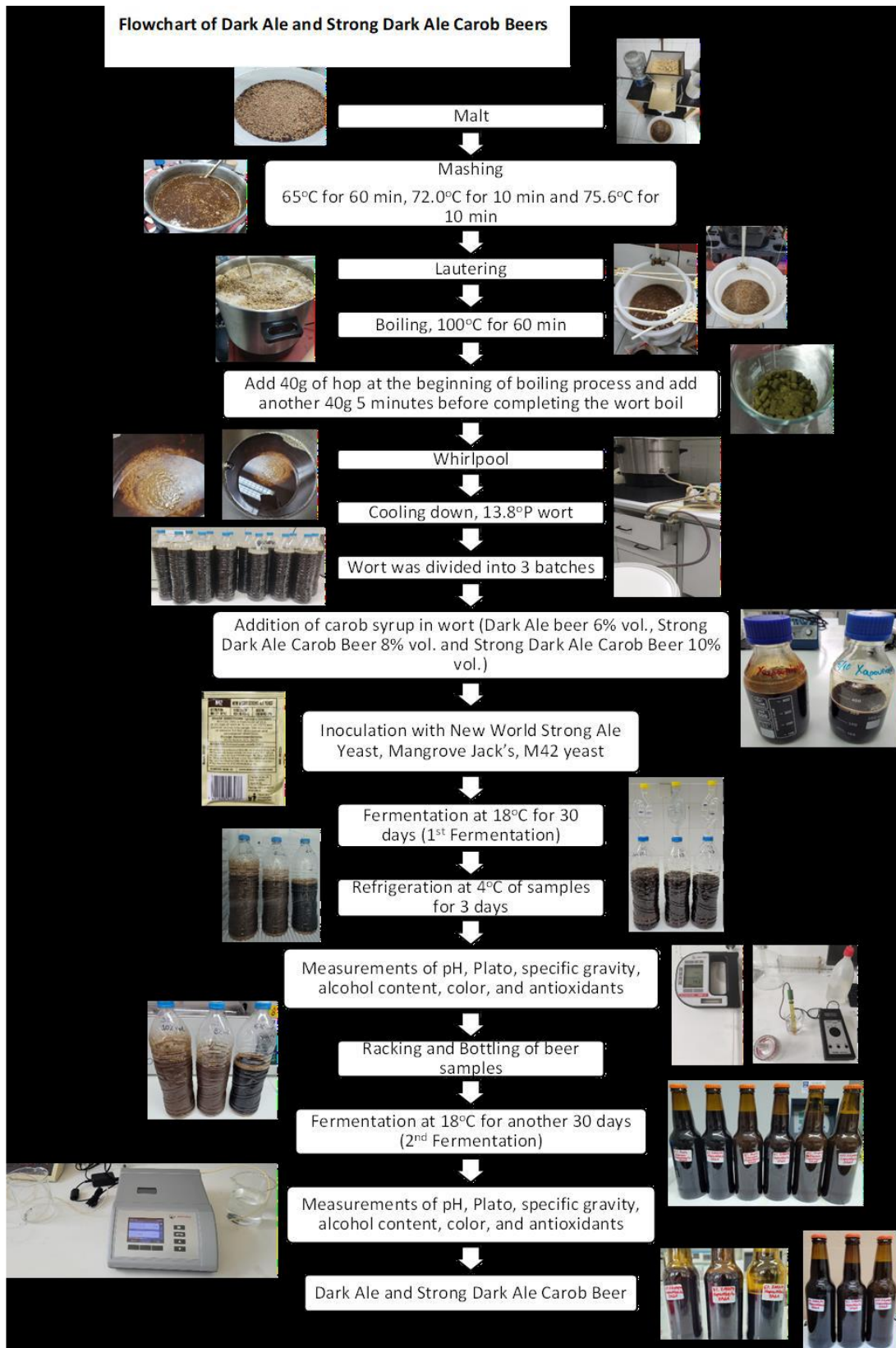
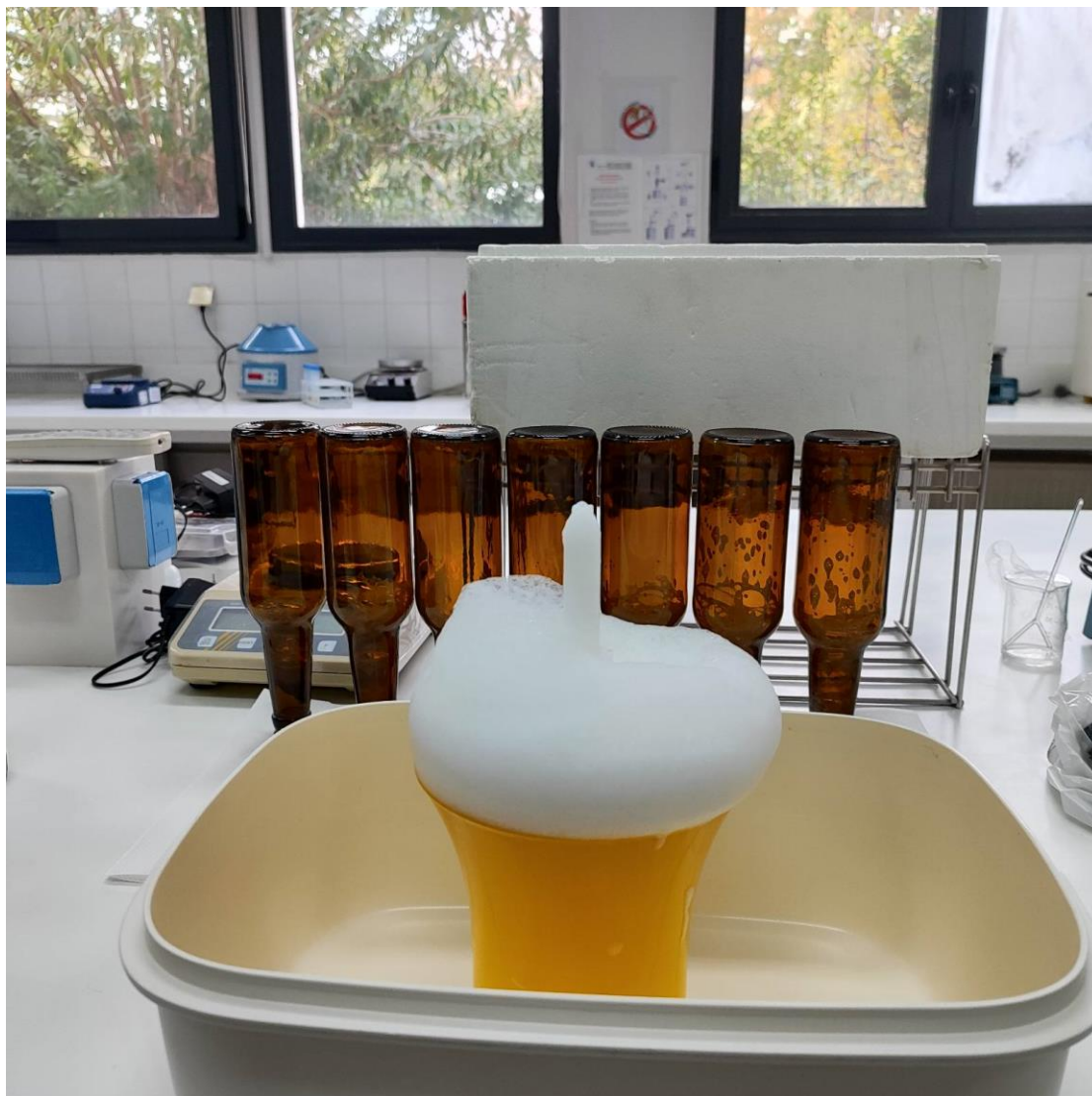


Figure 1 Διάγραμμα ροής παρασκευής των ζύθων

Για τη μαύρη μύρα ale με 6% ABV, προστέθηκαν 0,5 g/L μαγιάς. Για την μύρα με 8% ABV, προστέθηκαν 0,7 g/L μαγιάς και για την ισχυρή σκούρα μύρα χαρουπιού με 10% ABV, προστέθηκαν 0,86 g/L μαγιάς ale.



Εικόνα 4 Η καθαριότητα των μπουκαλιών που χρησιμοποιήθηκαν για την εμφιάλωση του ζύθου

Δεν προστέθηκε επιπλέον ζάχαρη στην πρώτη ζύμωση και 6,5 g/L ζάχαρης προστέθηκαν στη δεύτερη ζύμωση (ρυθμιστικό μπουκάλι). Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ζύμωσης, πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις για τον έλεγχο των δειγμάτων για παρακολούθηση της ζύμωσης. Πραγματοποιήθηκαν οργανοληπτικές αναλύσεις, μαζί με μετρήσεις pH, και τα αποτελέσματα δεν αποκάλυψαν ενδείξεις οσμών αυτόλυσης ή αλλοιώσεις στις τιμές pH των δειγμάτων.

3.1.3 Προετοιμασία δείγματος προς ανάλυση των τύπων μύρας

Τα δείγματα μύρας υποβάλλονται σε επεξεργασία πριν από την ανάλυση για να εξασφαλιστεί η ακρίβεια στις μετρήσεις και τα ευρήματα. Για την επίτευξη υψηλότερης ακρίβειας, η μέθοδος κατακρήμνισης πρωτεϊνών επιλέχθηκε προκειμένου να διευκρινιστεί το δείγμα (Tataridis et al., 2013). Η μεταφορά 8 mL του δείγματος είναι μέρος της διαδικασίας, συνδυάζοντάς το με ένα χιλιοστόλιτρο $\text{Ba}(\text{OH})_2$ (0, 3 N) και ένα χιλιοστόλιτρο ZnSO_4 (5%). Στη συνέχεια το παρασκεύασμα αναδεύτηκε και παρέμεινε για 5 λεπτά σε ηρεμία και το δείγμα αναδεύτηκε ξανά, αφέθηκε σε ηρεμία για επιπλέον πέντε λεπτά προκειμένου να καθιζήσουν τα στερεά που εντοπίζονται στο δείγμα.

Έπειτα, το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 3500 rpm για 10 λεπτά (φυγόκεντρος MRC Laboratory Instruments) και το υποκείμενο συλλέχθηκε και μεταφέρθηκε σε σωλήνα falcon. Λόγω της υψηλής θολερότητας των δειγμάτων καθώς και της παρουσίας σωματιδίων, μετά την φυγοκέντρωση πραγματοποιήθηκε διήθηση με την χρήση νάιλον φίλτρων μεμβράνης με μέγεθος πόρων 0,45 μm και διάμετρο 47 mm (Life Sciences).

3.2 Ανάλυση των δειγμάτων μύρας και δειγμάτων μύρας με χαρουπόμελο

3.2.1 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά (pH, Brix, Plato, Ειδικό Βάρος, Περιεκτικότητα σε Αλκοόλ, Χρώμα)

Πριν την έναρξη της ζύμωσης καθώς και στο τέλος της ζύμωσης πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις στα δείγματα μύρας.

Πριν την έναρξη της ζύμωσης πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις των Ολικών Στερεών (Brix), Plato και Ειδικού βάρους του ζυθογλεύκου (Specific Gravity).



Εικόνα 5 Προσδιορισμός περιεκτικότητας σε αιθανόλη (% v/v) , πυκνότητας (g/cm³) , και ειδικής βαρύτητας (SG)

Ο προσδιορισμός των διαλυτών στερεών για όλα τα δείγματα πραγματοποιήθηκε με την χρήση του ψηφιακού διαθλασίμετρου LDR-500-DRB 95 της XS Instruments σε θερμοκρασία δωματίου. Πιο αναλυτικά, ορισμένες σταγόνες δείγματος τοποθετήθηκαν ομοιόμορφα στο πρίσμα του διαθλασίμετρου με τέτοιο τρόπο ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός φυσαλίδων που θα μπορούσα να οδηγήσουν σε αποκλίσεις στους υπολογισμούς των τιμών. Σαν μονάδα μέτρησης χρησιμοποιήθηκαν οι μονάδες Brix, οι οποίες αντιστοιχούν στο κλάσμα μάζας της σακχαρόζης. Συγκεκριμένα, 1 Brix αντιστοιχεί σε 1 g σακχαρόζης ανά 100 g διαλύματος.



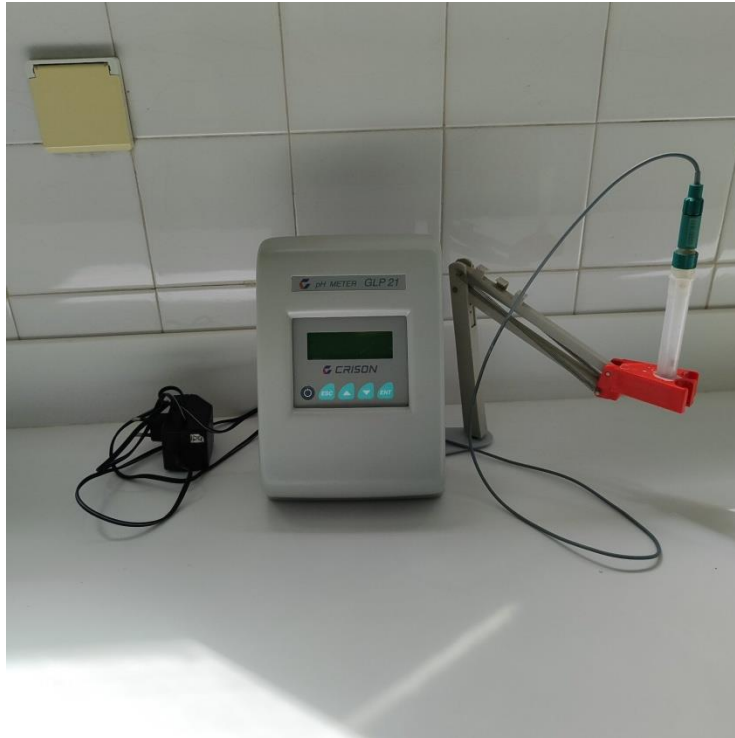
Εικόνα 6 Χρησιμοποιούμενο πυκνόμετρο

Μεταξύ άλλων προσδιορίστηκε και η αγωγιμότητα των δειγμάτων σε όλη την διάρκεια της ζύμωσης με την βοήθεια αγωγιμόμετρου.



Εικόνα 7 Το αγωγιμόμετρο που χρησιμοποιήθηκε

Ο προσδιορισμός του pH με την βοήθεια pH μετρου (Hanna instruments, HI 8010 pH meter).



Εικόνα 8 Το όργανο προσδιορισμού του pH

Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούς προς υπολογισμό της απόκλισης των τιμών. Για τα δείγματα οι μετρήσεις του pH (Μέθοδος ASBC beer-9), του ειδικού βάρους (SG), καθώς και των βαθμών Plato (ASBC Method beer-2B και 3), πραγματοποιήθηκαν σε όλη την διάρκεια της ζύμωσης.

Αναφερόμενοι πιο συγκεκριμένα, οι μετρήσεις στα δείγματα πραγματοποιήθηκαν στην αρχή της ζύμωσης ($t = 0$ ημέρες), πριν από την εμφιάλωση ($t = 30$ ημέρες, 1η ζύμωση) και μετά την ολοκλήρωση της ωρίμανσης ($t = 60$ ημέρες, 2η ζύμωση).

Αξίζει να σημειωθεί πως πριν τις μετρήσεις Plato και pH είναι η απαέρωση, η φυγοκέντρωση και η διήθηση των δειγμάτων. Αναφερόμενοι πιο συγκεκριμένα, 80ml του δείγματος τοποθετούνται σε σωληνάριο Falcon και φυγοκεντρούνται στις 3.500 rpm για 10 λεπτά. Έπειτα, τα δείγματα φιλτράρονται με την βοήθεια φίλτρων 0,45 μm προς επίτευξη της επιθυμητής διαύγειας (απαραίτητη πριν την πραγματοποίηση των μετρήσεων). Στην περίπτωση των μετρήσεων Plato και ειδικού βάρους χρησιμοποιήθηκε το φορητό ψηφιακό πυκνόμετρο Anton Paar-DMA 35, το οποίο λαμβάνει δείγματα μέσω της ενσωματωμένης αντλίας του.

Οι μετρήσεις του pH πραγματοποιήθηκαν με την βοήθεια του μετρητή pH HANNA Instruments-HI 8010.

Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν όταν τα δείγματα ήταν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (~25 °C).

Οι μετρήσεις της περιεκτικότητας σε αλκοόλη (Μέθοδος ASBC beer-4), της πυκνότητας (g/cm³), του αρχικού εκχυλίσματος % w/w και του πραγματικού εκχυλίσματος % w/w πραγματοποιήθηκαν με την βοήθεια του οργάνου Anton Paar-Alex 500 (μετρητής αλκοόλης και εκχυλίσματος).

Ο συνδυασμός της μέτρησης της απορρόφησης μέσω φασματοσκοπίας NIR και της μέτρησης της πυκνότητας με βάση την αρχή του ταλαντευόμενου σωλήνα U αποτελεί τον μηχανισμό μέσω του οποίου επιτυγχάνεται η ανάλυση από το όργανο. Η διαδικασία πριν την ανάλυση του δείγματος στο φασματοφωτόμετρο είναι η προαναφερθείσα. Επομένως και πάλι το δείγμα υπέστη διαύγαση μέσω φυγοκέντρησης στις 3.500 rpm για 10 λεπτά κι έπειτα διηθήθηκε μέσω φίλτρου 0,45 μm.

Τα αποτελέσματα του φαινομενικού τελικού εκχυλίσματος (°P) χρησιμοποιήθηκαν για τον τελικό υπολογισμό του βαθμού ζύμωσης, δηλαδή της απόδοσης σε αιθανόλη (% v/v).

Ο προσδιορισμός του χρώματος πραγματοποιήθηκε τόσο στην αρχή της ζύμωσης, πριν την εμφιάλωση και μετά την ωρίμανση με την χρήση χρωματομέτρου.



Εικόνα 9 Το χρησιμοποιούμενο χρωματόμετρο

Το χρώμα προσδιορίστηκε με χρωματόμετρο in Quality NR110. Το όργανο ρυθμιζόταν στο εργοστασιακό πρότυπο λευκό χρώμα α ($Y = 93,9$, $X = 0,313$ και $y = 0,3209$). Από τις ενδείξεις του οργάνου χρησιμοποιήθηκαν η παράμετρος L^* (φωτεινότητα με εύρος $0 = \text{μαύρο}$ $100 = \text{λευκό}$) ενώ προσδιορίστηκαν επίσης οι παράμετροι a^* και b^* όπου χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό του chroma [$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{0.5}$] (κορεσμός του χρώματος, με τις χαμηλές τιμές να δείχνουν θαμπό χρώμα και τις υψηλές έντονο) και το hue angle [$h^\circ = \tan^{-1}(b^*/a^*)$, όταν $a^* > 0$ και $b^* > 0$ ή $h^\circ = 180^\circ + \tan^{-1}(b^*/a^*)$, όταν $a^* < 0$ και $b^* > 0$) (κόκκινο-πορφυρό χρώμα στις 0° , κίτρινο στις 90° , μπλε-πράσινο στις 180° και μπλε στις 270°) (Lancaster et al., 1997).

3.2.2 Φασματοσκοπικές αναλύσεις (Προσδιορισμός ολικών φαινολικών με μέθοδο Folin Ciocalteu)

➤ Προσδιορισμός Ολικής Περιεκτικότητας σε Φαινολικά (Total Phenolic Content, TPC)

Η ολική περιεκτικότητα σε φαινολικά των δειγμάτων μύρας προσδιορίστηκε με την χρήση της τροποποιημένης έκδοσης της μεθόδου Folin-Ciocalteu (Andreou et al., 2018).

Η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής :

Λήφθηκαν 10 mL πρότυπο στα οποία προστέθηκαν 2500 μL H₂O + 200 μL F-C. Το δείγμα αναδεύτηκε και παρέμεινε σε σκότος για 8 min. Εν συνεχεία προστέθηκαν 500 μL κορεσμένου δ/τος Na₂CO₃ , αναδευτήκαν και θερμάνθηκαν στους 40°C σε υδατόλουτρο για 30min. Μετά το πέρας της θέρμανσης πραγματοποιήθηκε και πάλι ανάδευση και φασματοσκοπικός προσδιορισμός στα A=750 nm (Karadag et al., 2009).

Πιο συγκεκριμένα, η απορρόφηση μετρήθηκε στα 750nm με την χρήση φασματοφωτόμετρου ορατού φωτός (Spectro 23, Digital Spectrophotometer, Labomed Inc., Culver City, CA 90034, USA).

Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σαν mg ισοδύναμου γαλλικού οξέος (GAE) ανά 100 mL μύρας, χρησιμοποιώντας μια πρότυπη καμπύλη με εύρος 25-2600 mg γαλλικού οξέος /L ζύθου ($y = 0,0005x + 0,0783$, $R^2 = 0,9989$).



Εικόνα 10 Το χρησιμοποιούμενο υδατόλουτρο

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Αποτελέσματα

4.1.1 Σιρόπι χαρουπιού

Το σιρόπι χαρουπιού μύρας που χρησιμοποιήθηκε ήταν έτοιμο σιρόπι με προέλευση από την Κρήτη. Προστέθηκε στην αρχική φάση της ζύμωσης στις μύρες 8% και 10% ABV.

4.1.2 Χαρακτηριστικά δειγμάτων μύρας

Αυτό το πείραμα είχε ως στόχο να παρασκευάσει μια μαύρη μύρα που θα μπορούσε να μετατραπεί σε μια ισχυρή μαύρη μύρα προσθέτοντας σιρόπι χαρουπιού. Το αναμενόμενο αλκοόλ κατ' όγκο (ABV) μιας μαύρης μπίρας αυξάνεται σημαντικά όταν αναβαθμίζεται σε μια ισχυρή σκούρα μύρα, ενώ η τελική ABV μιας μαύρης μπίρας είναι χαμηλότερη. Τα τελικά προϊόντα ζύμωσης διοξειδίου του άνθρακα και αιθανόλη παράγονται όταν οι ζύμες που προστίθενται στις μύρες μεταβολίζουν τα σάκχαρα που βρίσκονται στις αρχικές βύνες σύμφωνα με τη διαδικασία της αλκοολικής ζύμωσης. Εξαιτίας αυτού, η προσθήκη σιροπιού χαρουπιού στην αρχική μύρα αυξάνει την περιεκτικότητά της σε σάκχαρα και την περιεκτικότητα σε Plato που μπορούν να καταναλώσουν οι ζύμες για να παράγουν υψηλότερα ποσοστά αλκοόλης. Έτσι η αρχική μαύρη μύρα ενισχύεται και βελτιώνεται σε μια δυνατή μύρα μαύρης μπίρας λόγω της διαθεσιμότητας σακχάρων. Ενώ συμβαίνει αυτό, το σιρόπι χαρουπιού προσθέτει άλλα εξίσου σημαντικά συστατικά όπως πολυφαινόλες στα τελικά προϊόντα εκτός από υδατάνθρακες. Τυπικά, οι σκούρες βύνες πλούσιες σε σάκχαρα και άλλα συστατικά χρησιμοποιούνται σε μύρες με μύρες και μαύρες μπίρες, δίνοντας στο τελικό προϊόν έντονη γεύση, χαρακτηριστικό άρωμα και σκούρο χρώμα.

Τα αποτελέσματα των αναλύσεων παρουσιάζονται παρακάτω με control=παγωμένα βυνογλεύκη, 1st = πρώτη ζύμωση (30 ημέρες) , 2nd = δεύτερη ζύμωση (60 ημέρες)

Πίνακας 3 Αποτελέσματα αρχικών αναλύσεων ζυθογλεύκους

	Δείγματα	Brix	Plato	Ειδικό Βάρος (Specific Gravity)
1	6% vol. control	11,2	11,2	14,0
2	8% vol. control	16,7	16,7	20,9

3	10% vol. control	19,2	19,2	24,0
4	6% vol. 1st	30,6	3,1	3,9
5	8% vol. 1st	4,3	4,3	5,4
6	10% vol. 1st	5,5	5,5	6,9
7	6% vol. 2nd	3	3	3,8
8	8% vol. 2nd	4,1	4,1	5,1
9	10% vol. 2nd	5,9	5,9	7,4

Οι σκούρες βύνες με υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα και πρόσθετα συστατικά χρησιμοποιούνται συνήθως για την παρασκευή μύρας και μαύρης μπίρας που συμβάλλουν στο διακριτικό άρωμά τους σκούρο χρώμα και έντονη γεύση. Οι τιμές Plato για τη μαύρη μύρα ale με 6 % ABV ήταν 11,2 °P στην αρχή της διαδικασίας ζύμωσης της μύρας (t = 0 ημέρες) η ισχυρή χαρουπιά μύρα μαύρης μπίρας με 8 % ABV ήταν 16,7 °P και μαύρη μύρα χαρούπι μύρα με 10 % ABV ήταν 19,2 °P Η κατανάλωση ζυμώσιμων σακχάρων παρατηρήθηκε στο Plato 3,1 °P για τη μαύρη μύρα ale με 6% ABV 4,3 °P για την μαύρη μύρα χαρουπιών με 8% ABV και 5,5 °P για την μαύρη χαρουπόμυρα με 10% ABV στο τέλος της πρώτης διαδικασίας ζύμωσης (t = 30 ημέρες) (Silva et al., 2022).

Πίνακας 4 Αποτελέσματα αναλύσεων αγωγιμότητας ζύθων

	Δείγματα	Αγωγιμότητα (μS/cm)
1	6% vol. control	3870,0
2	8% vol. control	5074,3
3	10% vol. control	6150,3
4	6% vol. 1st	3088,5
5	8% vol. 1st	3292,0
6	10% vol. 1st	6148,6
7	6% vol. 2nd	3208,4
8	8% vol. 2nd	4606,6
9	10% vol. 2nd	6564,4

Πίνακας 5 Αποτελέσματα αναλύσεων ολικών διαλυτών στερεών ζύθων

	Δείγματα	Ολικά Διαλυτά Στερεά (mg/L)	Ολικά Διαλυτά Στερεά (mg/L)
1	6% vol. control	1942,13	2427,66
2	8% vol. control	2581,09	3226,36
3	10% vol. control	3197,36	3996,70
4	6% vol. 1st	1724	2155,00
5	8% vol. 1st	2526,36	3157,95
6	10% vol. 1st	3281,69	4102,11
7	6% vol. 2nd	1693,19	2116,49
8	8% vol. 2nd	2503,33	3129,16
9	10% vol. 2nd	3347	4183,75

Αναφορικά με την σακχαροπεριεκτικότητα όπως βλέπουμε στον πίνακα 3 (εκφρασμένη σε ολικά διαλυτά στερεά mg/L) όλη η ποσότητα των σακχάρων στη μαύρη μύρα ale με 6% αλκοόλη ABV προέρχεται από το βυνογλεύκος. Ωστόσο, στην περίπτωση της χαρουπόμπυρας με 8% ABV και 10% ABV αλκοολοπεριεκτικότητα, τα σάκχαρα προέρχονται τόσο από το βυνογλεύκος όσο και από το σιρόπι χαρουπιού που προστίθενται.

Η προστιθέμενη μαγιά μεταβολίζει τα σάκχαρα με αποτέλεσμα την παραγωγή των δύο κύριων μεταβολιτών της αλκοολικής ζύμωσης : αιθανόλη; και διοξείδιο του άνθρακα (CO₂). Κατά συνέπεια, με αύξηση της συγκέντρωσης σε αλκοόλη (% v/v) αυξάνεται στις μύρες, η περιεκτικότητα σε σάκχαρα του τελικού προϊόντος (Plato) μειώνεται, παρουσιάζοντας μία αντιστρόφως ανάλογη σχέση.

Πίνακας 6 Αναλύσεις ζύθων

	Δείγματα	pH (25°C)	Αλκοόλη (% v/v)	PLATO (ORIGINAL EXTRACT)	DENSITY (g/cm³)	REAL EXTRACT (Er) % w/w
1	6% vol. control	7,1875	0	0	0	0
2	8% vol. control	6,675	0,4125	21,4125	1,332	20,825

3	10% vol. control	6,5125	0,5375	24,7125	1,345875	12,725
4	6% vol. 1st	6,6875	4,7625	12,8625	1,262625	5,55
5	8% vol. 1st	6,55	7,45	18,5625	1,26675	7,4875
6	10% vol. 1st	6,3875	9,2625	23,225	1,273875	9,8375
7	6% vol. 2nd	6,65	5,125	13,2875	1,261625	5,45
8	8% vol. 2nd	6,3625	7,6375	18,775	1,26625	7,425
9	10% vol. 2nd	6,375	9,375	23,775	1,275375	10,2625

Και στα τρία δείγματα παρατηρήθηκε μείωση του pH με την ολοκλήρωση της πρώτης ζύμωσης όπως βλέπουμε στον πίνακα 4. Η κύρια αιτία υπεύθυνη πίσω από το συγκεκριμένο φαινόμενο έχει να κάνει με την παραγωγή ασθενών οργανικών οξέων (κυρίως οργανικού οξέος) κατά την ζύμωση των δειγμάτων με αποτέλεσμα τις προαναφερθέντες μεταβολές στο pH. Όπως είναι εμφανές και στην βιβλιογραφία, οι τιμές pH του γλεύκους κυμαίνονται από 5,3 έως 5,6, ενώ τα όρια pH για την τελική μύρα είναι από 4,3 έως 4,6 (Sakamoto & Konings, 2003).

Ένας άλλος σημαντικός παράγοντας είναι ο προσδιορισμός του χρώματος της μύρας. Στην παρούσα εργασία το χρώμα αναλύθηκε με χρωματόμετρο και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 7.

Πίνακας 7 Αποτελέσματα αναλύσεων χρώματος ζύθων

	Δείγματα	L	a	b	C	h
1	6% vol. control	53,18	3,48	4,81	5,91	382,31
2	8% vol. control	52,25	4,36	6,49	7,60	381,61
3	10% vol. control	51,63	4,24	7,54	8,64	377,86
4	6% vol. 1st	53,63	4,15	4,44	6,18	392,69
5	8% vol. 1st	52,65	4,51	5,71	7,29	385,49
6	10% vol. 1st	51,25	4,95	6,63	7,99	383,51
7	6% vol. 2nd	53,50	4,49	4,13	6,10	397,03
8	8% vol. 2nd	52,68	5,05	5,30	7,34	392,10
9	10% vol. 2nd	52,49	6,54	5,53	8,58	399,75
10	Carob syrup (crete)	-	-	-	-	-

Η παράμετρος L παρέμεινε σχετικά σταθερή σε όλα τα είδη μύρας με τις διαφορές να είναι ελάχιστες μεταξύ των διαφορετικών ειδών μύρας. Οι τιμές L μειώνονται

ελαφρώς καθώς αυξάνεται η περιεκτικότητα σε αλκοόλ σε όλα τα στάδια ζύμωσης, υποδεικνύοντας ότι οι μπύρες με υψηλότερο ABV είναι πιο σκούρες. Για παράδειγμα, η τιμή L μειώνεται από 53,18 (δείγμα No. 1, 6% alc.) σε 51,63 (δείγμα No. 3, 10% alc.). Τα στάδια ζύμωσης παρουσιάζουν μικρές διακυμάνσεις στο L, με τη δεύτερη ζύμωση (60 ημέρες) να διατηρεί γενικά ελαφρώς χαμηλότερες τιμές L από τη αρχικό δείγμα control, αλλά υψηλότερες από την πρώτη ζύμωση.

Σχετικά με την παράμετρο a , παρουσιάζει αύξηση με αύξηση του αλκοολικού βαθμού της μπύρας σε όλη την διάρκεια της ζύμωσης. Για παράδειγμα, στις μπύρες με 10% alc., το a αυξάνεται από 4,24 (control, δείγμα No. 3) σε 4,95 (πρώτη ζύμωση, δείγμα No. 6) και περαιτέρω σε 6,54 (δεύτερη ζύμωση, δείγμα No. 9). Αυτό υποδηλώνει μια πιο έντονη απόχρωση στις μπύρες με υψηλότερο ABV και με παρατεταμένη ζύμωση.

Η παράμετρος b παρουσιάζει μια σταδιακή αύξηση του αλκοολικού βαθμού με την περιεκτικότητα σε αλκοόλη κατά το στάδιο της βύνης ελέγχου. Για παράδειγμα, το b αυξάνεται από 4,81 (δείγμα No. 1, 6% alc.) σε 7,54 (δείγμα No. 3, 10% alc.). Ωστόσο, κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, οι τιμές του b παρουσιάζουν κάποια διακύμανση και ακόμη και μικρή μείωση σε ορισμένα δείγματα (π.χ. δείγμα No. 7, 6% alc. μετά από 60 ημέρες, $b = 4,13$). Αυτό υποδηλώνει ότι η ζύμωση επηρεάζει τη συγκεκριμένη παράμετρο, ιδίως στις μπύρες με χαμηλότερο ABV.

Παρόμοια είναι και τα αποτελέσματα για την παράμετρο C , όπου και πάλι παρουσιάζει αύξηση ανάλογη με την αύξηση του αλκοολικού τίτλου σε όλη την διάρκεια της μπύρας. Για παράδειγμα, στις μπύρες με 10% alc., το C αυξάνεται από 8,64 (δείγμα No. 3, control) σε 8,58 (δείγμα No. 9, δεύτερη ζύμωση). Οι υψηλότερες τιμές C αντικατοπτρίζουν πιο ζωντανό και έντονο χρωματισμό, ο οποίος ευθυγραμμίζεται με τις προσδοκίες για πιο σκούρες, πιο πλούσιες μπύρες όπως οι stout και οι imperial.

Τέλος, σχετικά με την παράμετρο h παρατηρούνται διαφορούμενα αποτελέσματα. Γενικότερα, όσο προχωράει η ζύμωση φαίνεται πως αυξάνεται και η τιμή της συγκεκριμένης παραμέτρου σε όλα τα είδη μπύρας. Όμως μεταξύ των διαφόρων ειδών μπύρας σε κάθε στάδιο της ζύμωσης , οι διαφορές είναι αντιστρόφως ανάλογες με την τιμή της παραμέτρου να μειώνεται όσο αυξάνεται ο αλκοολικός τίτλος. Εξαιρέση αποτελούν τα τελευταία αποτελέσματα όπου οι τιμές της μπύρας 10% είναι οι υψηλότερες, ακολουθούνται από τις τιμές της μπύρας 6% ενώ οι χαμηλότερες τιμές

παρατηρούνται για τις μύρες με αλκοολικό τίτλο 8%, αποτελέσματα που παρουσιάζουν διαφορά από το μοτίβο έως τότε.

Ο συντελεστής αραίωσης είναι ανάλογος με την επεξεργασία του δείγματος και παρουσιάζει εξάρτηση από το αν έχουν προστεθεί αντιδρώντα για την καθίζηση των πρωτεϊνών. Λόγω του γεγονότος πως το χρώμα των χαρουπόμπυρων είναι σκούρο, απαιτήθηκε αραίωση των δειγμάτων 1:6, ανεξάρτητα από την πρόσθετη αραίωση η οποία εφαρμόστηκε για βελτίωση της διαύγειας. Από αυτά τα αποτελέσματα εξάχθηκε το συμπέρασμα πως οι χαρουπόμπυρες ήταν αρκετά πιο σκουρόχρωμες από τις παραδοσιακές μύρες της κατηγορίας stout και imperial stout και ο λόγος ήταν τόσο η χρήση σκούρας βύνης όσο και η προσθήκη του χαρουπιού στο ζυθογλεύκος, το οποίο έχει σκούρο χρώμα.

Συνολική περιεκτικότητα σε φαινολικά

Κάθε παρασκευασμένο δείγμα σιροπιού χαρουπιού είχε υψηλή ολική περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες. Η κύρια αιτία του συγκεκριμένου γεγονότος είναι η υψηλή συγκέντρωση συστατικών και πολυφαινολών που βρίσκονται στο χαρούπι που χρησιμοποιείται για την παρασκευή των σιροπιών χαρουπιού (Stavrou et al., 2018;Christou et al., 2021;Ioannou et al., 2023).

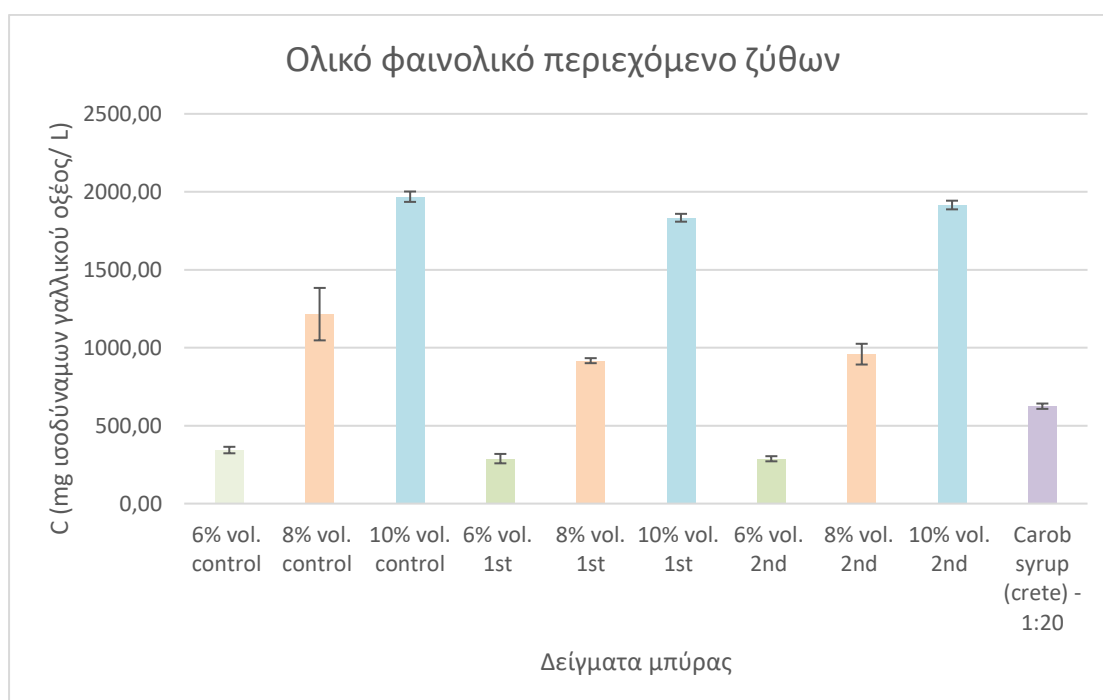
Τα αποτελέσματα της μεθόδου Folin-Ciocalteu των δειγμάτων μύρας και σιροπιού χαρουπιού εκφράστηκαν σαν mg γαλλικού οξέος/L μύρας με την χρήση τυπικής καμπύλης για την περιοχή συγκέντρωσης 25-2600 mg/L γαλλικού οξέος ($y = 0,0005x - 0,0783$, $R^2 = 0,9989$).

Πίνακας 8 Αποτελέσματα χαρουπόμπυρας σε ολική περιεκτικότητα φαινολικών

Δείγματα	C average (mg/L)	SD
6% vol. control	343,42	20,82
8% vol. control	1215,17	168,23
10% vol. control	1968,50	33,29
6% vol. 1st	288,42	30,14
8% vol. 1st	916,83	16,07
10% vol. 1st	1833,50	25,17

6% vol. 2nd	287,58	16,39
8% vol. 2nd	958,50	66,58
10% vol. 2nd	1915,17	27,84
Carob syrup (crete) - 1:20	624,70	17,04
Carob syrup (crete)	15617,50	425,98

Διάγραμμα 1 Αποτελέσματα χαρουπόμπυρας σε ολικό φαινολικό περιεχόμενο (εκφρασμένα σε mg γαλλικού οξέος / L)



Το σιρόπι χαρουπιού που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των χαρουπιών είχε ολικό φαινολικό περιεχόμενο 15617,5 mg GAE/L. Τα σιρόπια χαρουπιού υψηλής περιεκτικότητας σε πολυφαινόλες τα καθιστούν ιδανικά ως πρόσθετα προσθέτοντας αντιοξειδωτικά σε τρόφιμα και ποτά.

Οι φαινολικές ενώσεις της μύρας που προέρχονται από το κριθάρι και τον λυκίσκο είναι κυρίως υπεύθυνες για την αξιοσημείωτη αντιοξειδωτική δράση της (Siqueira et al., 2011).

Η περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά της μαύρης μύρας με 6% ABV (t=60d) στο τέλος της δεύτερης ζύμωσης ανέρχεται τα 287,58 mg FGAE/L. Σύμφωνα με παρόμοια έρευνα, οι μαύρες μπίρες είχαν ελάχιστη περιεκτικότητα σε συνολικά φαινολικά 300

mg GAE /L και ήταν υψηλότερες σε συνολικά φαινολικά από τις ανοιχτόχρωμες μπίρες λόγω της αυξημένης ποσότητας βυνοποιημένου κριθαριού και της παραγωγής πολυφαινολών κατά τη διαδικασία βυνοποίησης (Martinez-Gomez et al., 2020).

Ωστόσο, αποδείχθηκε ότι η συνολική περιεκτικότητα σε φαινολικά των χαρουπιών ενισχύθηκε σημαντικά με την προσθήκη σιροπιού χαρουπιού. Σε σύγκριση με τη μαύρη μύρα μπίρας χωρίς χαρούπι, οι ισχυρές μαύρες μπίρες με χαρούπι είχαν σημαντικά υψηλότερη συνολική περιεκτικότητα σε φαινολικά.

Συγκεκριμένα, η σκούρα μύρα χαρουπιού με 8 % ABV είχε 958,50 mg γαλλικού οξέος /L στο τέλος της δεύτερης ζύμωσης (t=60d) η οποία αντιστοιχεί περίπου σε τρεις φορές υψηλότερη από αυτές της τυπικής μαύρης μύρας (6 % ABV) χωρίς την προσθήκη σιροπιού χαρουπιού.

Μετά από 60 ημέρες ζύμωσης, η μύρα χαρουπιού με 10 % ABV είχε υψηλότερη περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις που ανέρχεται στα 1915,17mg γαλλικού οξέος/L από την τυπική μαύρη μύρα (6 % ABV) χωρίς την προσθήκη σιροπιού χαρουπιού. Αυτές οι τιμές ήταν μεγαλύτερες κατά περισσότερο από έξι φορές (Pyrovolou et al., 2023).

Πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει ότι η προσθήκη φυτικών συστατικών με υψηλή περιεκτικότητα σε βιοδραστικές ουσίες κατά τη διαδικασία παρασκευής μύρας craft μπορεί να αυξήσει τη συνολική περιεκτικότητα των προϊόντων σε φαινολικά και αντιοξειδωτική δράση (Gasinski et al., 2020; Chen et al., 2022). Ο χυμός κράταιγος (*Crataegus punctata*) προστέθηκε στην μύρα κατά τη διάρκεια της διαδικασίας παρασκευής, η ποσότητα των πολυφαινολικών ενώσεων καθώς και οι ικανότητες εξάλειψης των ριζών ABTS και DPPH αυξήθηκαν κατά περισσότερο από διπλάσιο διπλάσιο και περίπου εξαπλάσιο αντίστοιχα (Gasinski et al., 2020). Σύμφωνα με μια διαφορετική μελέτη, η προσθήκη χυμού μάνγκο στην μύρα αύξησε τη συνολική περιεκτικότητά του σε πολυφαινόλες και την ικανότητά του να εξαλείφει τις ελεύθερες ρίζες (ABTS και DPPH) κατά 42,8%, 44, 3% και 42,4% αντίστοιχα. Επιπλέον, η αντικατάσταση του λυκίσκου με το ρουβίμ (*Leonurus sibiricus L.*) είχε ως αποτέλεσμα υψηλά επίπεδα ολικών φαινολικών ενώσεων και αντιοξειδωτική δράση (Lazzari et al., 2023).

Η πλειονότητα των συγκρίσιμων μελετών έχει εξετάσει τις πολυφαινόλες που βρίσκονται στα σιρόπια χαρουπιού και στον πολτό χαρουπιού, τα οποία τυπικά εκχυλίζονται χρησιμοποιώντας διαφορετικούς οργανικούς διαλύτες σε αντίθεση με το νερό. Αντίθετα, οι πολυφαινόλες σε αυτή τη μελέτη εκχυλίστηκαν ενώ το σιρόπι χαρουπιού παρασκευαζόταν σύμφωνα με το πρωτόκολλο (Pyrgonolou et al., 2023).

Επιπλέον, ακόμη και μετά την εφαρμογή θερμικής επεξεργασίας, η συνολική περιεκτικότητα σε φαινολικά προϊόντα των τελικών προϊόντων βρέθηκε υψηλή, παρά το γεγονός ότι προηγούμενες έρευνες είχαν δείξει ότι η περιεκτικότητα σε φαινολικά σιρόπια χαρουπιού είχε υποβαθμιστεί (Ioannou et al., 2023).

Αν και παρατηρήθηκαν κάποιες αλλαγές μετά τη δεύτερη ζύμωση, όπως μείωση του ολικού φαινολικού φορτίου, οι συνολικές τιμές ήταν ακόμα πολύ υψηλότερες από αυτές της μύρας ελέγχου (η οποία δεν περιείχε χαρούπι). Άλλοι ερευνητές βρήκαν επίσης παρόμοια αποτελέσματα (Ditrych et al. 2015) που διερεύνησαν τις αντιριζικές ιδιότητες των εμπορικών μύρας κατά την αποθήκευση και διαπίστωσαν ότι η αποθήκευση οδήγησε σε μείωση της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας που ήταν πιο αισθητή μετά τις πρώτες τέσσερις εβδομάδες αποθήκευσης. Αυτή η μείωση μπορεί να προκλήθηκε από τη δυσκολία στον έλεγχο του επιπέδου οξυγόνου που σημαίνει ότι η μύρα πρέπει να καταναλώνεται γρήγορα επειδή δεν είναι παστεριωμένη όταν παράγεται. Επιπλέον, οι He et al., (2012) διαπίστωσαν ότι κατά τις πρώτες 18 ημέρες αποθήκευσης στους 20 °C η φρέσκια θολή μύρα σίτου είχε 10% λιγότερη αντιοξειδωτική δράση (He et al., 2012).

Για το αντιοξειδωτικό και αντιριζικό δυναμικό των ζύθων οι πολυφαινόλες παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο (He et al., 2012;Ditrych et al., 2015).

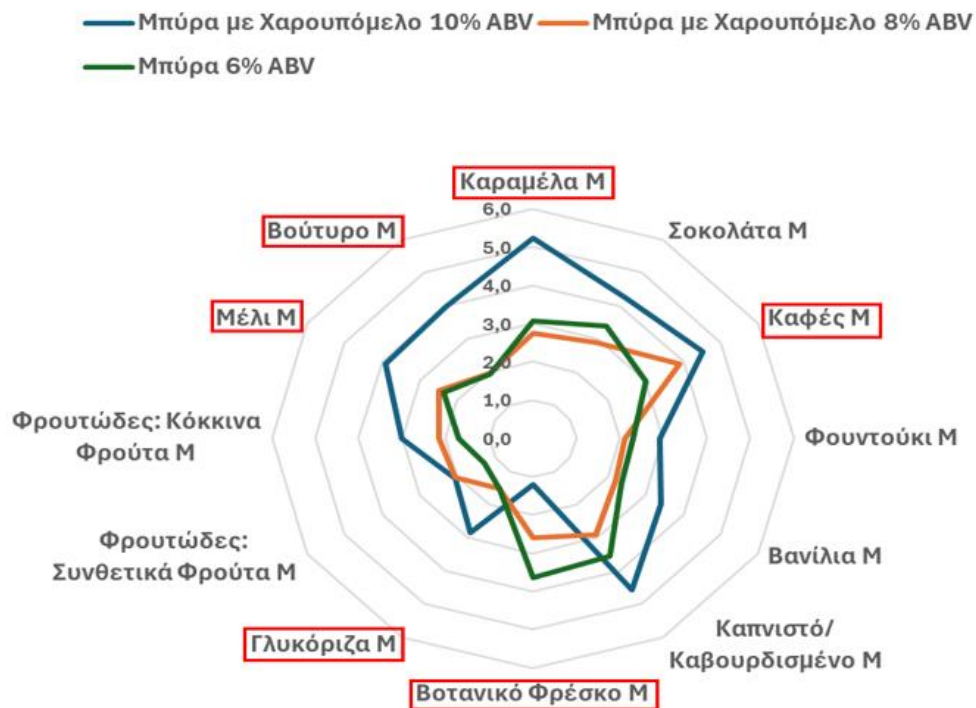
4.1.3 Οργανοληπτική αξιολόγηση δειγμάτων

Πέραν των αναλύσεων των αντιοξειδωτικών χαρακτηριστικών των μπυρών, πραγματοποιήθηκε οργανοληπτική αξιολόγηση. Συγκεκριμένα, στις μύρες πραγματοποιήθηκε περιγραφική αισθητηριακή ανάλυση από ένα ειδικά εκπαιδευμένο πάνελ μύρας του Τμήματος Επιστημών Οίνου, Αμπέλου και Ποτών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής. Η ανάλυση επικεντρώθηκε στο άρωμα καθώς και στη συνολική γεύση των προϊόντων.

Οι 12 δοκιμαστές οι οποίοι συμμετείχαν στην συγκεκριμένη μελέτη δημιούργησαν ένα λεξιλόγιο με 24 όρους προς την περιγραφή τόσο των άμεσων όσο και των έμμεσων αρωμάτων, 3 βασικές γεύσεις καθώς και 5 όρους σχετικά με την αίσθηση στο στόμα και επίγευση των ζύθων. Πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση ANOVA στα δείγματα και το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το XLSTAT.



Άμεσα Αρώματα Ζύθων



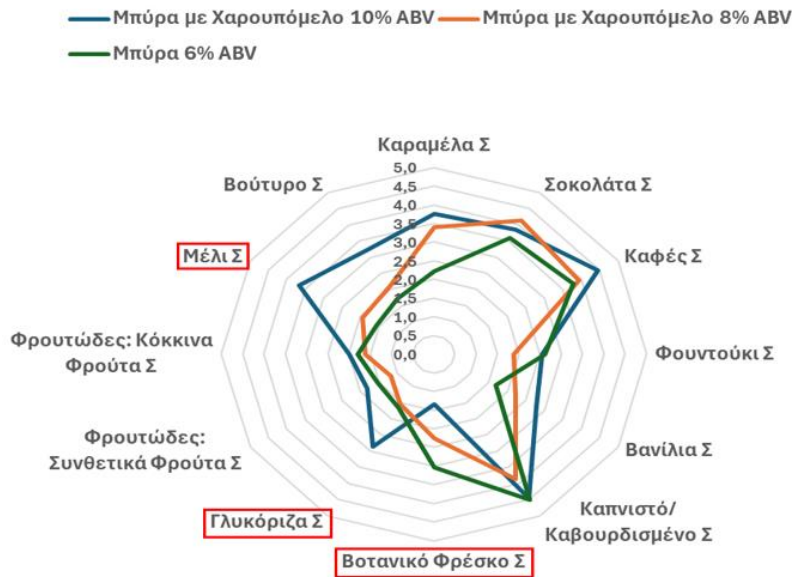
Εικόνα 11 Αποτελέσματα οργανοληπτικής αξιολόγησης σχετικά με τα άμεσα αρώματα του ζύθου

Βασικές Γεύσεις και Αισθήσεις στο στόμα



Εικόνα 12 Αποτελέσματα οργανοληπτικής αξιολόγησης σχετικά με τις βασικές γεύσεις κι αισθήσεις στο στόμα

Έμμεσα Αρώματα Ζύθων



Εικόνα 13 Αποτελέσματα οργανοληπτικής αξιολόγησης σχετικά με τα έμμεσα αρώματα των ζύθων

Πίνακας 9 Τα αποτελέσματα σχετικά με τα αρώματα και την αισθητική των ζύθων που προσδιορίστηκαν

Άμεσα και Έμμεσα Αρώματα Ζύθων - Βασικές Γεύσεις και Αισθήσεις Στόματος	Μπύρα με Χαρουπόμελο 10% ABV	Μπύρα με Χαρουπόμελο 8% ABV	Μπύρα 6% ABV	P-value
Καραμέλα (Μ)	5,2	2,7	3,1	0,005
Σοκολάτα (Μ)	4,3	2,9	3,4	0,259
Καφές (Μ)	4,5	3,9	3,0	0,085
Φουντούκι (Μ)	2,9	2,1	2,3	0,425
Βανίλια (Μ)	3,4	2,2	2,4	0,231
Καπνιστό/ Καβουρδισμένο (Μ)	4,6	2,9	3,5	0,102
Βοτανικό Φρέσκο (Μ)	1,2	2,6	3,6	0,000
Γλυκόριζα (Μ)	2,9	1,5	1,5	0,050
Φρουτώδες: Συνθετικά Φρούτα (Μ)	2,1	2,1	1,3	0,393
Φρουτώδες: Κόκκινα Φρούτα (Μ)	3,0	2,2	1,7	0,201
Μέλι (Μ)	3,9	2,5	2,4	0,066
Βούτυρο (Μ)	4,0	2,0	1,9	0,003
Γλυκιά Γεύση	4,1	3,8	3,9	0,893
Πικρή Γεύση	4,1	4,4	3,6	0,502
Ξινή Γεύση	2,5	2,6	2,0	0,489
Σώμα - Δομή	4,4	4,3	3,1	0,073
Στυπτικότητα	2,6	2,8	2,0	0,301
Αλκοόλ (Θερμαντική αίσθηση - κάψιμο)	3,2	2,4	1,9	0,064
Ένταση Επίγευσης	4,7	4,1	3,5	0,152
Διάρκεια Επίγευσης	4,9	4,7	3,8	0,255
Καραμέλα (Σ)	3,8	3,4	2,2	0,129
Σοκολάτα (Σ)	3,9	4,1	3,6	0,801
Καφές (Σ)	4,5	4,0	3,8	0,630
Φουντούκι (Σ)	2,5	1,9	2,6	0,406
Βανίλια (Σ)	2,8	2,2	1,7	0,256
Καπνιστό/ Καβουρδισμένο (Σ)	4,5	3,9	4,5	0,622
Βοτανικό Φρέσκο (Σ)	1,4	2,3	3,0	0,037
Γλυκόριζα (Σ)	2,9	1,6	1,7	0,065
Φρουτώδες: Συνθετικά Φρούτα (Σ)	1,8	1,2	1,5	0,478
Φρουτώδες: Κόκκινα Φρούτα (Σ)	2,0	1,6	1,8	0,841
Μέλι (Σ)	3,7	2,0	1,6	0,003
Βούτυρο (Σ)	3,2	2,1	1,7	0,105

Οι μπύρες με χαρούπι παρουσίασαν ένα ιδιαίτερο προφίλ που τις διαφοροποίησαν από τις τυπικές μαύρες μπύρες (control). Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν στα εξής χαρακτηριστικά :

Στην Καραμέλα (Μ) και στη Γλυκόριζα (Σ) παρατηρήθηκε ο υψηλότερος μέσος όρος τιμών η οποία είχε η μπύρα με χαρουπόμελο 10% ABV και μικρότερο η μπύρα με χαρουπόμελο 8% ABV. Στον Καφέ (Μ), στη Γλυκόριζα (Μ), στο Μέλι (Μ), στο Βούτυρο (Μ), στο Μέλι (Σ), στο Σώμα-Δομή και στο Αλκοόλ υψηλότερο μέσο όρο τιμών είχε η μπύρα με χαρουπόμελο 10% ABV και μικρότερο η μπύρα (control) 6% ABV. Τέλος, στο Βοτανικό Φρέσκο (Μ) και στο Βοτανικό Φρέσκο (Σ) υψηλότερο μέσο όρο τιμών είχε η μπύρα (control) 6% ABV και μικρότερο η μπύρα με

χαρουπόμελο 10% ABV (Nunes et al., 2021;Pyrovolou et al., 2023;Pyrovolou et al., 2024).

4.2 Συμπεράσματα

Το χαρούπι χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή μπυρών stout & imperial 6% , 8% , 10% ABV στην παρούσα έρευνα και προσδιορίστηκε το ολικό φαινολικό περιεχόμενο σε αυτή τη μελέτη.

Εκτός από το ότι έχουν σημαντικά υψηλότερο ολικό φαινολικό φορτίο από την τυπική μαύρη μύρα με 6% ABV χωρίς χαρούπι, οι χαρουπόμπυρες διέθεταν τις ιδιότητες της μαύρης μύρας, συμπεριλαμβανομένου του χρώματος πυκνότητας περιεκτικότητας σε αλκοόλ και των βαθμών Plato.

Οι υψηλότερες τιμές ολικού φαινολικού φορτίου παρατηρούνται στην μύρα 10% stout & imperial. Αυτές οι τιμές αυξήθηκαν κατά περισσότερο από έξι φορές από τις τυπικές μαύρες μύρες (6 % ABV) χωρίς προσθήκη χαρουπιού. Το σκούρο χρώμα των ζύθων είναι απαραίτητο για την συγκεκριμένη κατηγορία ζύθων Stout & Imperial όπου και είναι προαπαιτούμενο και δείγμα ποιοτικών χαρακτηριστικών των συγκεκριμένων ζύθων. Επομένως, η ενσωμάτωση σιροπιού χαρουπιού όχι μόνο βελτιώνει το σκούρο χρώμα των ζύθων (προαπαιτούμενο για τη συγκεκριμένη κατηγορία) αλλά και βελτιώνει τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά σε συνδυασμό με βελτίωση της θρεπτικής τους αξίας.

Η εφαρμογή χαρουπιού σε τρόφιμα σχετίζεται με επίδραση στο χρώμα των προϊόντων που εφαρμόζεται. Η εφαρμογή σιροπιού χαρουπιού σε κέικ οδηγεί σε πιο κίτρινο και σκούρο χρώμα , το οποίο αυξάνεται αναλογικά με την αύξηση της εφαρμοζόμενης ποσότητας χαρουπιού. Σχετικά με τα γευστικά και αρωματικά χαρακτηριστικά παντεσπανιού που εφαρμόστηκε σιρόπι χαρουπιού διακρίνεται από στυφή γεύση η οποία οφείλεται στην υψηλή περιεκτικότητα σε συμπυκνωμένες ταννίνες του σιροπιού χαρουπιού (Fidan et al., 2019). Μεταξύ άλλων το σκούρο χρώμα του σιροπιού χαρουπιού είναι υπεύθυνο για το σκουρό χρωματισμό της παραγόμενης μύρας, με αύξηση της συγκέντρωσης χαρουπόμελου στις μύρες να σχετίζεται με πιο σκούρο χρώμα των παραγόμενων ζύθων (Boruk et al., 2024).

Ταυτόχρονα, το σιρόπι χαρουπιού έχει συσχετιστεί με οργανοληπτικά χαρακτηριστικά παρόμοια με εκείνα της σοκολάτας και σε αρκετές περιπτώσεις έχει χρησιμοποιηθεί

σαν υποκατάστατο της σοκολάτας σε διάφορα προϊόντα όπως και στην περίπτωση της μπύρας μας (Caliskan et al., 2023).

Οι ζυθοποιίες θα μπορούσαν να δημιουργήσουν ένα βιολειτουργικό προϊόν χρησιμοποιώντας σιρόπι χαρουπιού για την παραγωγή μπύρας και σε περιοχές όπου οι χαρουπιές είναι άφθονες και χρησιμοποιούνται ανεπαρκώς θα μπορούσαν επίσης να βοηθήσουν την τοπική γεωργία. Επιπλέον, το σιρόπι χαρουπιού είναι φυσικά χωρίς γλουτένη, γεγονός που το καθιστά εξαιρετική προσθήκη σε μπίρες που παρασκευάζονται χωρίς γλουτένη (Tsatsaragkou et al., 2014).

Ταυτοχρόνως, η προσθήκη χαρουπόμελου επηρεάζει, όπως βρήκαμε από την έρευνά μας, θετικά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των ζύθων στους οποίους έχει προστεθεί. Ιδιαίτερα στις μπίρες τύπου stout βελτιώνει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά καθιστώντας τα πιο πολύπλοκα, εμπλουτίζοντας το με αρώματα μελιού, αποξηραμένων ερυθρών φρούτων και καθιστώντας το σώμα πιο γεμάτο. Ταυτόχρονα, προσδίδει βοτανικά αρώματα στον παραγόμενο ζύθο προσδίδοντας πολυπλοκότητα στον παραγόμενο ζύθο.

Συνοψίζοντας, η παρασκευή νέας μπύρας με σιρόπι χαρουπιού έχει πολλά οφέλη, όπως υψηλότερη βιοδραστικότητα και ιδιαίτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά δημιουργώντας νέες προοπτικές στα ποιοτικά χαρακτηριστικά των παραγόμενων ζύθων σε συνδυασμό με τα θετικά οφέλη των βιοδραστικών συστατικών που περιέχονται. Έτσι λοιπόν, το σιρόπι χαρουπιού παρουσιάζει μεγάλες δυνατότητες για χρήση σαν λειτουργικό συστατικό τροφίμων καθώς και για την κάλυψη των πιθανών μελλοντικών απαιτήσεων για υποκατάστατα από φυσικές πηγές και βελτίωση της θρεπτικής αξίας των προϊόντων.

Στην αισθητηριακή ανάλυση που πραγματοποιήθηκε, οι συμμετέχοντες στην επιτροπή, που αποτελούνταν τόσο από εκπαιδευμένους γευσιγνώστες μπύρας, παρατήρησαν ευδιάκριτες αισθητηριακές βελτιώσεις στις μπίρες stout και imperial εμπλουτισμένες με χαρούπι. Οι μπίρες χαρακτηρίστηκαν από πλουσιότερα και πιο σύνθετα γευστικά προφίλ, με αξιοσημείωτη παρουσία σοκολατένιων και καρυδιούχων υπονοούμενων που προέρχονταν από το σιρόπι χαρουπιού. Η προσθήκη σιροπιού χαρουπιού συνέβαλε σε ένα πιο γεμάτο σώμα και μια πιο απαλή αίσθηση στο στόμα, βελτιώνοντας τη συνολική εμπειρία κατανάλωσης. Το αρωματικό προφίλ περιγράφηκε ως πολυδιάστατο, με νότες μελιού, αποξηραμένων φρούτων και βοτανικών σημείων, οι

οποίες προσέδωσαν βάθος και εκλεκτικότητα. Οι μύρες παρουσίασαν επίσης μια ισορροπημένη πικράδα, η οποία συμπλήρωνε τις γλυκές και πικάντικες νότες που προσδίδονταν από το χαρούπι. Συνολικά, η οργανοληπτική ανάλυση επιβεβαίωσε ότι το σιρόπι χαρουπιού αναβαθμίζει σημαντικά τις οργανοληπτικές ιδιότητες των μπυρών stout και imperial, καθιστώντας τες πιο ελκυστικές σε ένα ευρύτερο φάσμα καταναλωτών.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Andreou, V., Strati, I. F., Fotakis, C., Liouni, M., Zoumpoulakis, P., & Sinanoglou, V. J. (2018). Herbal distillates: A new era of grape marc distillates with enriched antioxidant profile. *Food Chemistry*, 253, 171-178.
- Arribas, C., Cabellos, B., Cuadrado, C., Guillamón, E., & Pedrosa, M. M. (2020). Cooking Effect on the Bioactive Compounds, Texture, and Color Properties of Cold-Extruded Rice/Bean-Based Pasta Supplemented with Whole Carob Fruit. *Foods*, 9(4), 415.
- Aydın, S., & Özdemir, Y. (2017). Development and Characterization of Carob Flour Based Functional Spread for Increasing Use as Nutritious Snack for Children. *Journal of Food Quality*, 2017, e5028150.
- Azab, A. (2022). D-Pinitol—Active Natural Product from Carob with Notable Insulin Regulation. *Nutrients*, 14(7), 1453.
- Berna, A., Pérez-Gago, M. B., Guardiola, V. G., Salazar, D., & Mulet, A. (1997). Effect of Temperature on Isobutyric Acid Loss during Roasting of Carob Kibble. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(10), 4084–4087.
- BORUK, S., WINKLER, I., ROMANOVSKA, O., & PILYUGINA, I. (2024). SOME RHEOLOGICAL AND ORGANOLEPTIC PROPERTIES OF THE BISCUIT DOUGH WITH CACAO AND CAROB FLOUR. *Food and Environment Safety Journal*, 22(4).
- Buiatti, S. (2009). Beer composition: An overview. *Beer in health and disease prevention*, 213-225.
- Caliskan, A., Abdullah, N., Ishak, N., & Caliskan, I. T. (2023). Physicochemical, microbial and sensory properties of wild carob bar: A shelf-life study. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 31, 100668.
- Carvalho, F., Moniz, P., Duarte, L. C., Esteves, M. P., & Gírio, F. M. (2011). Mannitol production by lactic acid bacteria grown in supplemented carob syrup. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38(1), 221–227. doi: 10.1007/s10295-010-0823-5.
- Chen, X., Li, L., Yang, H., & Zhou, H. (2022). Effects of the addition of *Dendrobium officinale* on beer yeast fermentation. *Fermentation*, 8(11), 595.
- Christodoulou et al., 2022, *Antioxidants* 2022, 11(11), 2213; <https://doi.org/10.3390/antiox11112213>.
- Christou, A., Stavrou, I. J., & Kapnissi-Christodoulou, C. P. (2021). Continuous and pulsed ultrasound-assisted extraction of carob's antioxidants: Processing parameters

optimization and identification of polyphenolic composition. *Ultrasonics Sonochemistry*, 76, 105630.

Clodoveo, M. L., Crupi, P., Muraglia, M., & Corbo, F. (2022). Ultrasound Assisted Extraction of Polyphenols from Ripe Carob Pods (*Ceratonia siliqua* L.): Combined Designs for Screening and Optimizing the Processing Parameters. *Foods*, 11(3), 284.

Ditrych, M., Kordialik-Bogacka, E., & Czyżowska, A. (2015). Antiradical and reducing potential of commercial beers. *Czech J. Food Sci*, 33(3), 261-266.

Esmaeili, S., Mogharrabi, M., Safi, F., Sohrabvandi, S., Mortazavian, A. M., & Bagheripoor-Fallah, N. (2015). THE COMMON SPOILAGE MICROORGANISMS OF BEER: OCCURRENCE, DEFECTS, AND DETERMINATION-A REVIEW. *Carpathian Journal of Food Science & Technology*, 7(4).

Farzaneh, V., Ghodsvali, A., Bakhshabadi, H., Zare, Z., & Carvalho, I. S. (2017). The impact of germination time on the some selected parameters through malting process. *International journal of biological macromolecules*, 94, 663-668.

Fidan, H., Petkova, N., Sapundzhieva, T., Baeva, M., Goranova, Z., Slavov, A., & Krastev, L. (2019). Carob Syrup and Carob Flour (*Ceratonia Siliqua* L.) As Functional Ingredients in Sponge Cakes *Carpathian Journal of Food Science & Technology*, 12(2).

Filipowska, W., Jaskula-Goiris, B., Ditrych, M., Bustillo Trueba, P., De Rouck, G., Aerts, G., ... & De Cooman, L. (2021). On the contribution of malt quality and the malting process to the formation of beer staling aldehydes: A review. *Journal of the Institute of Brewing*, 127(2), 107-126.

Frank, T., Scholz, B., Peter, S., & Engel, K. H. (2011). Metabolite profiling of barley: Influence of the malting process. *Food chemistry*, 124(3), 948-957.

Gasiński, A., Kawa-Rygielska, J., Szumny, A., Czubaszek, A., Gašior, J., & Pietrzak, W. (2020). Volatile compounds content, physicochemical parameters, and antioxidant activity of beers with addition of mango fruit (*Mangifera Indica*). *Molecules*, 25(13), 3033.

Goulas, V., Hadjivasileiou, L., Primikyri, A., Michael, C., Botsaris, G., Tzakos, A. G., & Gerothanassis, I. P. (2019). Valorization of Carob Fruit Residues for the Preparation of Novel Bi-Functional Polyphenolic Coating for Food Packaging Applications. *Molecules*, 24(17), 3162.

He, G., Du, J., Zhang, K., Wei, G., & Wang, W. (2012). Antioxidant capability and potableness of fresh cloudy wheat beer stored at different temperatures. *Journal of the Institute of Brewing*, 118(4), 386-392.

He, Y., Dong, J., Yin, H., Zhao, Y., Chen, R., Wan, X., ... & Chen, L. (2014). Wort composition and its impact on the flavour-active higher alcohol and ester formation of beer—a review. *Journal of the Institute of Brewing*, 120(3), 157-163.

- Huang D., Ou B., and Rrior R.L., (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 1841-1856.
- Hutzler, M., Müller-Auffermann, K., Koob, J., Riedl, R., & Jacob, F. (2013). Beer spoiling microorganisms—a current overview. *Brauwelt Int*, 31, 23-25.
- Ikram, A., Khalid, W., Wajeeha Zafar, K., Ali, A., Afzal, M. F., Aziz, A., Koraqi, H. (2023). Nutritional, biochemical, and clinical applications of carob: A review. *Food Science & Nutrition*, 11(7), 3641–3654.
- Ibrahim, R. M., Abdel-Salam, F. F., & Farahat, E. (2020). Utilization of carob (*Ceratonia siliqua* L.) extract as functional ingredient in some confectionery products.
- Ioannou, G. D., Savva, I. K., Christou, A., Stavrou, I. J., & Kapnissi-Christodoulou, C. P. (2023). Phenolic profile, antioxidant activity, and chemometric classification of carob pulp and products. *Molecules*, 28(5), 2269.
- Karadag, A., Ozcelik, B., & Saner, S. (2009). Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food analytical methods*, 2, 41-60.
- Khoddami, A., Wilkes, M. A., & Roberts, T. H. (2013). Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules*, 18(2), 2328–2375.
- Kirkpatrick, K. R., & Shellhammer, T. H. (2018). Evidence of dextrin hydrolyzing enzymes in Cascade hops (*Humulus lupulus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(34), 9121-9126.
- Koller, H., & Perkins, L. B. (2022). Brewing and the chemical composition of amine-containing compounds in beer: A review. *Foods*, 11(3), 257.
- Kühbeck, F., Back, W., & Krottenthaler, M. (2006). Influence of lauter turbidity on wort composition, fermentation performance and beer quality—A review. *Journal of the Institute of Brewing*, 112(3), 215-221.
- Lantzouraki, D. Z., Sinanoglou, V. J., Zoumpoulakis, P., & Proestos, C. (2016). Comparison of the antioxidant and antiradical activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) by ultrasound-assisted and classical extraction. *Analytical Letters*, 49(7), 969-978.
- Lazzari, A., Barbosa, H. D., Machado Filho, E. R., Maldonado da Silva, L. H., Anjo, F. A., Sato, F., & Matumoto Pinto, P. T. (2023). Effect on bioactive compounds and antioxidant activity in the brewing process for beers using Rubim and Mastruz as hop replacements. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 81(2), 265-275.
- Lekkas, C., Stewart, G. G., Hill, A. E., Taidi, B., & Hodgson, J. (2007). Elucidation of the role of nitrogenous wort components in yeast fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, 113(1), 3-8.

Loullis, A., & Pinakoulaki, E. (2018). Carob as cocoa substitute: a review on composition, health benefits and food applications. *European Food Research and Technology*, 244, 959-977.

Macho-González, A., López-Oliva, M. E., Merino, J. J., García-Fernández, R. A., Garcimartín, A., Redondo-Castillejo, R., ... & Benedí, J. (2020). Carob fruit extract-enriched meat improves pancreatic beta-cell dysfunction, hepatic insulin signaling and lipogenesis in late-stage type 2 diabetes mellitus model. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 84, 108461.

Marsh, A. J., Hill, C., Ross, R. P., & Cotter, P. D. (2014). Fermented beverages with health-promoting potential: Past and future perspectives. *Trends in Food Science & Technology*, 38(2), 113–124.

Martel, F., Monteiro, R., & Calhau, C. (2010). Effect of polyphenols on the intestinal and placental transport of some bioactive compounds. *Nutrition Research Reviews*, 23(1), 47–64.

Martinez-Gomez, A., Caballero, I., & Blanco, C. A. (2020). Phenols and melanoidins as natural antioxidants in beer. Structure, reactivity and antioxidant activity. *Biomolecules*, 10(3), 400.

Marwa Itani, Mona Zeidan, Osama Al Yamani, and Samer Kharroubi, Nutritional and Functional Potential of Carob Syrup Versus Date and Maple Syrups, Imad Toufeili.

Nasar-Abbas, S. M., e-Huma, Z.-, Vu, T.-H., Khan, M. K., Esbenshade, H., & Jayasena, V. (2016). Carob Kibble: A Bioactive-Rich Food Ingredient. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(1), 63–72.

Nunes Filho, R. C., Galvan, D., Eftting, L., Terhaag, M. M., Yamashita, F., de Toledo Benassi, M., & Spinosa, W. A. (2021). Effects of adding spices with antioxidants compounds in red ale style craft beer: A simplex-centroid mixture design approach. *Food Chemistry*, 365, 130478.

Owen, R. W., Haubner, R., Hull, W. E., Erben, G., Spiegelhalder, B., Bartsch, H., & Haber, B. (2003). Isolation and structure elucidation of the major individual polyphenols in carob fibre. *Food and Chemical Toxicology*, 41(12), 1727–1738.

Pascari, X., Ramos, A. J., Marín, S., & Sanchís, V. (2018). Mycotoxins and beer. Impact of beer production process on mycotoxin contamination. A review. *Food Research International*, 103, 121-129.

Pyrovolou, K., Konteles, S., Strati, I., Tataridis, P., Tsioka, A., Konsta, I., Spiliotis V., & Batrinou, A. (2023, 5 – 7 July). *Fermentation of carob syrup with Saccharomyces cerevisiae produces a fermented high-polyphenol alcoholic beverage*. 7th International ISEKI-Food Conference - Next-Generation of Food Research, Education and Industry, University of Paris-Saclay, AgroParisTech, Paris, France

- Pyrovolou, K., Tataridis, P., Revelou, P. K., Strati, I. F., Konteles, S. J., Tarantilis, P. A., & Batrinou, A. (2024). Fermentation of a Strong Dark Ale Hybrid Beer Enriched with Carob (*Ceratonia siliqua* L.) Syrup with Enhanced Polyphenol Profile. *Applied Sciences*, *14*(3), 1199.
- Rettberg, N., Biendl, M., & Garbe, L. A. (2018). Hop aroma and hoppy beer flavor: chemical backgrounds and analytical tools—a review. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, *76*(1), 1-20.
- Rodríguez-Solana, R., Romano, A., & Moreno-Rojas, J. M. (2021). Carob Pulp: A Nutritional and Functional By-Product Worldwide Spread in the Formulation of Different Food Products and Beverages. *A Review Processes*, *9*(7), 1146.
- Ruiz-Roso, B., Quintela, J. C., de la Fuente, E., Haya, J., & Pérez-Olleros, L. (2010). Insoluble carob fiber rich in polyphenols lowers total and LDL cholesterol in hypercholesterolemic subjects. *Plant foods for human nutrition*, *65*, 50-56.
- Rutnik, K., Knez Hrnčič, M., & Jože Košir, I. (2022). Hop essential oil: Chemical composition, extraction, analysis, and applications. *Food Reviews International*, *38*(sup1), 529-551.
- Sakamoto, K., & Konings, W. N. (2003). Beer spoilage bacteria and hop resistance. *International journal of food microbiology*, *89*(2-3), 105-124.
- Siqueira, P. B., Bolini, H. M. A., & Macedo, G. A. (2011). Polyphenols and antioxidant properties in forced and naturally aged Brazilian beer. *J Brew Distill*, *2*(3), 45-50.
- Silva, S., Oliveira, A. I., Cruz, A., Oliveira, R. F., Almeida, R., & Pinho, C. (2022). Physicochemical properties and antioxidant activity of Portuguese craft beers and raw materials. *Molecules*, *27*(22), 8007.
- Stavrou, I. J., Christou, A., & Kapnissi-Christodoulou, C. P. (2018). Polyphenols in carobs: A review on their composition, antioxidant capacity and cytotoxic effects, and health impact. *Food chemistry*, *269*, 355-374.
- Tataridis, P., Kanelis, A., Logotetis, S., & Nerancis, E. (2013). Use of non-Saccharomyces *Torulaspora delbrueckii* yeast strains in winemaking and brewing. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*, (124), 415-426.
- Tous, J., Romero, A., & Batlle, I. (2013). The Carob tree: Botany, horticulture, and genetic resources. *Horticultural Reviews Volume 41*, 385-456.
- Tsatsaragkou, K., Gounaropoulos, G., & Mandala, I. (2014). Development of gluten free bread containing carob flour and resistant starch. *LWT - Food Science and Technology*, *58*(1), 124–129.

Tsatsaragkou, K., Yiannopoulos, S., Kontogiorgi, A., Poulli, E., Krokida, M., & Mandala, I. (2014). Effect of carob flour addition on the rheological properties of gluten-free breads. *Food and Bioprocess Technology*, 7, 868-876.

Vitali, M., Gandía, M., Garcia-Llatas, G., Tamayo-Ramos, J. A., Cilla, A., & Gamero, A. (2023). Exploring the Potential of Rice, Tiger Nut and Carob for the Development of Fermented Beverages in Spain: A Comprehensive Review on the Production Methodologies Worldwide. *Beverages*, 9(2), 47.

Wallace, C. A., Holyoak, L., Powell, S. C., & Dykes, F. C. (2014). HACCP—the difficulty with hazard analysis. *Food Control*, 35(1), 233-240.

Wunderlich, S., & Back, W. (2009). Overview of manufacturing beer: ingredients, processes, and quality criteria. In *Beer in health and disease prevention* (pp. 3-16). Academic Press.

Yatmaz, E., & Turhan, I. (2018). Carob as a carbon source for fermentation technology. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 16, 200-208.

Zunft, H., Lüder, W., Harde, A., Haber, B., Graubaum, H., & Gruenwald, J. (2001). Carob pulp preparation for treatment of hypercholesterolemia. *Advances in Therapy*, 18, 230–236.

Μπρατάκος, Μ. Σ. (2021). Ενόργανη χημική ανάλυση εφαρμογές σε τρόφιμα και ποτά. Αθήνα: Εκδόσεις Παπαζήση.

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

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

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1

ΕΡΩΤΗΜΑΤΟΛΟΓΙΟ

Δείγμα:

Όνοματεπώνυμο :

Ημερομηνία :

Παρακαλείσθε να αξιολογήσετε τα έξι (6) δείγματα ζύθου με τη σειρά που σας παρουσιάζονται από τα αριστερά προς τα δεξιά, ως προς τα αρωματικά τους χαρακτηριστικά (ξεχωριστά για μύτη & στόμα), τη γεύση, την αίσθηση στόματος και την επίγευση.

Με τη χρήση της κλίμακας σημειώστε την επιλογή σας, τοποθετώντας ένα X πάνω στη γραμμή. Το 0 αντιστοιχεί σε απουσία του προσδιοριζόμενου χαρακτηριστικού, ενώ το 10 στη μέγιστη παρουσία του.

ΜΥΤΗ – ΑΡΩΜΑΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Ένταση αρώματος

Καραμέλα	0 _____ 10
Σοκολάτα	0 _____ 10
Καφές	0 _____ 10
Φουντούκι	0 _____ 10
Βανίλια	0 _____ 10
Καπνιστό/ Καβουρδισμένο	0 _____ 10
Βοτανικό Φρέσκο	0 _____ 10
Γλυκόριζα	0 _____ 10
Φρουτώδες: Συνθετικά Φρούτα	0 _____ 10
Φρουτώδες: Κόκκινα Φρούτα	0 _____ 10
Μέλι	0 _____ 10
Βούτυρο	0 _____ 10

ΣΤΟΜΑ - ΒΑΣΙΚΕΣ ΓΕΥΣΕΙΣ

Γλυκιά γεύση	0 _____ 10
Πικρή γεύση	0 _____ 10
Ξινή γεύση	0 _____ 10

ΣΤΟΜΑ – ΑΡΩΜΑΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ**Ένταση αρώματος**

Καραμέλα	0 _____ 10
Σοκολάτα	0 _____ 10
Καφές	0 _____ 10
Φουντούκι	0 _____ 10
Βανίλια	0 _____ 10
Καπνιστό/ Καβουρδισμένο	0 _____ 10
Βοτανικό Φρέσκο	0 _____ 10
Γλυκόριζα	0 _____ 10
Φρουτώδες: Συνθετικά Φρούτα	0 _____ 10
Φρουτώδες: Κόκκινα Φρούτα	0 _____ 10
Μέλι	0 _____ 10
Βούτυρο	0 _____ 10

ΣΤΟΜΑ - ΑΙΣΘΗΣΗ ΣΤΟΜΑΤΟΣ

Σώμα-Δομή	0 _____ 10
Στυπτικότητα	0 _____ 10
Αλκοόλ Θερμαντική αίσθηση – «Κάψιμο	0 _____ 10
Επίγευση Περιγραφή:	
Ένταση Επίγευσης	0 _____ 10
Διάρκεια Επίγευσης	0 _____ 10