



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

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Διεργασίες παραγωγής σάκε

Θάνος Φοίβος Εσκίογλου και Anton Tunin

ΑΜ: 718161026, 718161124

Επιβλέπων: Παναγιώτης Ταταρίδης, D.E.A., PhD, Επίκουρος καθηγητής

ΑΘΗΝΑ, 2021

Διασαφήσεις εξεταστικής επιτροπής

Οι υπογράφοντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη διπλωματική εργασία με τίτλο «Διεργασίες Παραγωγής Σάκε» που παρουσιάστηκε από τον Θάνο Φοίβο Εσκίογλου και από τον Anton Tunin και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

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

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Οι κάτωθι υπογεγραμμένοι ο Θάνος Φοίβος Εσκίογλου του Παναγιώτη, με αριθμό μητρώου 718161026 και ο Anton Tunin του Evgenii, με αριθμό μητρώου 718161124 φοιτητές του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστήμων Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμων Οίνου, Αμπέλου και Ποτών, δηλώνουμε υπεύθυνα ότι:


«Είμαστε συγγραφείς αυτής της πτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχαμε 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 εμάς αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μας, όσο και του Ιδρύματος.

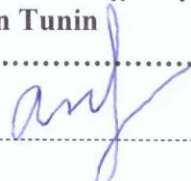
Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μας ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Ονοματεπώνυμο & Υπογραφές Συγγραφέων Πτυχιακής Εργασίας

Θάνος Φοίβος Εσκίογλου

Anton Tunin

.....


.....


.....

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα έρευνα παρουσιάζει την αρχική προσέγγιση στα προβλήματα και στα ζητήματα που τίθενται από τις διεργασίες παραγωγής του σάκε, κάτι που δεν αναφέρεται σχεδόν καθόλου στην ελληνική βιβλιογραφία. Κατά την έρευνα παράχθηκαν δείγματα σάκε με τη χρήση παραδοσιακής μεθόδου πλήρους κύκλου (από ρύζι σε κότζι και στη συνέχεια από κότζι σε σάκε). Δείχθηκε η πιθανότητα παραγωγής σάκε με χρήση εναλλακτικών αμυλούχων πρώτων υλών - κάστανων. Για την πραγματοποίηση αλκοολικής ζύμωσης χρησιμοποιήθηκαν 2 εμπορικά στελέχη ζυμών. Και τα 2 στελέχη έδειξαν υψηλότερη αντοχή σε αιθανόλη απ' ότι αναφέρεται από τους παραγωγούς τους. Αναπτύχθηκαν βοηθητικές μέθοδοι της παρακολούθησης αλκοολικής ζύμωσης (με χρήση δειγμάτων χαμηλότερου όγκου) και της εκτίμησης αποδοτικότητας της διαδικασίας παραγωγής.

Λέξεις κλειδιά: σάκε, αντοχή σε αιθανόλη, ρύζι, κάστανια, κότζι, *saccharomyces cerevisiae*

ABSTRACT

This study presents the first approach to the sake production technology problems that are still barely covered by publications in the Greek language. Sake samples have been produced during the research using the traditional full cycle method (from rice to koji, and then from koji to sake). The possibility of sake production with the use of alternative starch sources (chestnuts) was also investigated. Two different commercial yeast strains have been used for the fermentation. Both strains have shown higher ethanol tolerance than it was quoted by the strain suppliers. Two auxiliary methods have been developed and implemented, the first being the ethanol concentration determination protocol that uses small volume samples, and the second – the method of production efficiency estimation.

Keywords: sake, ethanol tolerance, rice, chestnut, koji, *saccharomyces cerevisiae*

Ευχαριστίες

Ευχαριστούμε θερμά τις οικογένειές μας, τους καθηγητές μας, το Τμήμα και το Ίδρυμά μας που μας στήριζαν κατά όλη τη διάρκεια του έργου, και ειδικά τον κ. Ταταρίδη χωρίς την βοήθεια του οποίου αυτό το έργο δε θα μπορούσε ποτέ να ολοκληρωθεί.

Πίνακας περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	i
ABSTRACT	i
Ευχαριστίες.....	ii
Κατάλογος Πινάκων.....	v
1 Εισαγωγή και Σκοπός της Εργασίας.	1
2 Βιβλιογραφική ανασκόπηση.....	2
2.1 Ιστορικά στοιχεία. Διαδικασία παραγωγής.....	2
2.1.1 Εισαγωγή.....	2
2.1.2 Είδη σάκε.....	3
2.1.3 Ιστορικά στοιχεία.	3
2.1.4 Ιστορία επιστημονικής μελέτης.....	4
2.1.5 Τα βασικά της διαδικασίας παραγωγής.....	5
2.2 Ατμηση του ρυζιού και παραγωγή κότζι.	18
2.2.1 Πρώτη ύλη: ρύζι. Επιλογή ρυζιού. Εναλλακτική πηγή αμύλου - κάστανα.....	18
2.2.2 <i>Aspergillus oryzae</i> - μύκητας του κότζι	24
2.2.3 Διαδικασία και συνθήκες παραγωγής κότζι.	26
2.3 Προετοιμασία <i>moto</i> . Νερό στη παραγωγή του σάκε.	31
2.3.1 Τι είναι το <i>moto</i> . Σκοπός του <i>moto</i>	31
2.3.2 Το νερό στην παραγωγή του σάκε. Τα χαρακτηριστικά του νερού.	31
2.3.3 Το pH κατά τη ζύμωση.....	33
2.3.4 Επιλογή ζύμης.	34
2.4 Κύρια ζύμωση.....	37
2.4.1 Αναλογίες νερο:ρύζι.	37
2.4.2 Θερμοκρασία ζύμωσης.....	38
2.5 Μεταζυμωτικές κατεργασίες.	40
2.5.1 Μεταζυμωτικές κατεργασίες πριν τη παστερίωση.....	40
2.5.2 Παστερίωση.....	41

2.5.3	Εμφιάλωση.....	42
2.6	Αξιολόγηση. Γευστικό και αρωματικό προφίλ.....	43
2.6.1	Χρώμα.....	43
2.6.2	Αρωματικό και γευστικό προφίλ.....	43
2.6.3	Διαδικασία αξιολόγησης.....	45
3	Υλικά και Μέθοδοι.....	47
3.1	Όργανα, σκεύη και αντιδραστήρια.....	47
3.2	Πειραματικός σχεδιασμός.....	47
3.3	Υπολογισμοί.....	47
3.4	Παραγωγή κότζι.....	48
3.5	<i>Moto</i>	50
3.6	<i>Moromi</i>.....	51
3.7	Μεταζυμωτικές κατεργασίες.....	53
3.8	Αναλυτικές μέθοδοι.....	54
3.8.1	Σχετική υγρασία.....	54
3.8.2	Παρακολούθηση της ζύμωσης.....	54
3.8.3	Πυκνότητα.....	54
3.8.4	Περιεκτικότητα σε αιθανόλη.....	55
3.8.5	Οξύτητα.....	56
3.8.6	Συγκέντρωση αμινοξέων.....	56
3.8.7	Χρώμα.....	57
3.8.8	Γευστική αξιολόγηση.....	57
4	Αποτελέσματα & Συζήτηση.....	58
4.1	Μέτρηση σχετικής υγρασίας της πρώτης ύλης.....	58
4.2	Πορεία της ζύμωσης.....	59
4.3	Το τελικό προϊόν και τα χαρακτηριστικά του.....	61
4.4	Αξιολόγηση της διαθλασιμετρικής μεθόδου εκτίμησης αλκοολικού τίτλου.....	64
5	Συμπεράσματα.....	67
6	Βιβλιογραφία.....	68

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 3.1. Αλλαγή μάζας ρυζιού κατά την παραγωγή κότζι.....	50
Πίνακας 3.2. Ζυμώσεις <i>moto</i>	51
Πίνακας 3.3. Προσθήκες <i>moromi</i>	52
Πίνακας 4.1. Σχετική υγρασία πρώτης ύλης.....	58
Πίνακας 4.2. Τα χαρακτηριστικά των σάκε.....	61
Πίνακας 4.3. Μετρήσεις αλκοολικού τίτλου και δείκτη διάθλασης στα δείγματα αναφοράς.....	65

Κατάλογος Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 4.1. Αλλαγή σχετικής υγρασίας κατά την άτμιση.....	59
Διάγραμμα 4.2. Η πορεία της ζύμωσης. Αλλαγή αλκοολικού τίτλου.....	60
Διάγραμμα 4.3. Η αλλαγή του pH κατά τη ζύμωση <i>moromi</i>	60
Διάγραμμα 4.4. Συσχέτιση %Vol. και δείκτη διάθλασης.....	66

Συντμήσεις, ακρωνύμια, σύμβολα και ορισμοί.

KAT	Κτηθείς Αλκοολικός Τίτλος
SVR	Support Vector Regression

1 Εισαγωγή και Σκοπός της Εργασίας.

Το σάκε παρουσιάζει ένα αντικείμενο μελέτης μεγάλου ενδιαφέροντος σήμερα για την επιστήμη ποτών (και όχι μόνο).

- Ως φαινόμενο πολιτισμού, το σάκε έχει μεγάλη ιστορία, η οποία ξεκινάει στην Ιαπωνία, μια χώρα της οποίας ο παραδοσιακός πολιτισμός σε πολλά σημεία παραμένει σχεδόν άγνωστος για το δυτικό κόσμο έως σήμερα.
- Ως αλκοολούχο ποτό, αν και μειώνεται η κατανάλωση του σάκε στη Ιαπωνία, προκαλεί ενδιαφέρον στη Δύση, στην Ευρώπη και Αμερική, όπου η κατανάλωσή του αυξάνεται και το σάκε θεωρείται ένα “υγιεινό” και “βιολογικό” προϊόν (Furukawa 2012: 192).
- Ως φαινόμενο βιοτεχνολογίας το σάκε εξάπτει το ενδιαφέρον εξερευνητών: όχι μόνο είναι μια μοναδική τεχνολογία παραγωγής με ταυτόχρονη διπλή ζύμωση, που ξεκινάει ως στερεάς φάσης και καταλήγει σε υγρή, αλλά και οι συνθήκες αλκοολικής ζύμωσης υψηλής συγκέντρωσης σακχάρων με χρήση φυτικού υλικού είναι ένα επίκαιρο θέμα έρευνας και για τη βιομηχανία παραγωγής ζύθου, και για τη βιοτεχνολογία παραγωγής καθαρής αιθυλικής αλκοόλης, και για τη βιομηχανία επεξεργασίας αγροτικών φυτικών υπολειμμάτων. Πιο μακρινές προοπτικές περιλαμβάνουν και χρήση συστημάτων μικροοργανισμών για στοχευμένη σύνθεση ενζύμων ή άλλων ουσιών - και η ζύμωση του σάκε είναι ένα σύστημα 2 μικροοργανισμών. Ένα ιδιαίτερο ενδιαφέρον στο Ελληνικό πεδίο το σάκε προκαλεί αφού προσθέτει μια υπεραξία στο ρύζι - ένα αγροτικό προϊόν με σημαντική παραγωγή τα τελευταία χρόνια στην Ελλάδα.

2 Βιβλιογραφική ανασκόπηση.

2.1 Ιστορικά στοιχεία. Διαδικασία παραγωγής.

2.1.1 Εισαγωγή.

Το σάκε είναι ένα παραδοσιακό αλκοολούχο ποτό ζύμωσης της Ιαπωνίας. Παράγεται από ρύζι με μια ειδική τεχνολογία, την οποία θα περιγράψουμε πιο αναλυτικά παρακάτω.

Το ρύζι αμιζείται (μαγειρεύεται σε υδρατμό) και μετά εμβολιάζεται με ένα συγκεκριμένο είδος ευρωτομυκήτων. Ο μύκητας αναπτύσσεται πάνω στο ρύζι μερικές μέρες. Αυτό το “μουχλιασμένο” ρύζι ονομάζεται κότζι και είναι γεμάτο ένζυμα του μύκητα. Αυτά τα ένζυμα (πρώτα απ’ όλα μερικές αμυλάσες) διασπούν το άμυλο του ρυζιού παράγοντας ζυμώσιμα σάκχαρα. Το κότζι αναμιγνύεται με νερό και άλλο ατμισμένο ρύζι το οποίο λειτουργεί σαν πηγή επιπλέον υποστρώματος για τα ένζυμα, και μετά το μείγμα αυτό εμβολιάζεται με ζύμες *Saccharomyces cerevisiae*. Τα παραγόμενα σάκχαρα μετατρέπονται από τις ζύμες σε αλκοόλη. Μετά από το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης το προϊόν υπόκειται μερικές επεξεργασίες σταθεροποίησης. Το τελικό προϊόν προς κατανάλωση συνήθως είναι διαφανές, λευκού χρώματος και χαρακτηριστικής γεύσης. Η συνηθισμένη περιεκτικότητα σε αλκοόλη κυμαίνεται γύρω στα 15% Vol. Το σάκε απολαμβάνεται χωρίς αραίωση, ζεστό (μέχρι και 60°C) είτε κρύο (έως 5°C).

Το κότζι χρησιμοποιείται στην παραγωγή και άλλων αλκοολούχων ποτών της Άπω Ανατολής. Όλα αυτά μπορούν να ενταχθούν στην ίδια κατηγορία ποτών στην παραγωγή των οποίων τα ζυμώσιμα σάκχαρα προέρχονται από την αμυλούχα ύλη (συνήθως ρύζι), το δε άμυλο διασπάται από τα ένζυμα του μύκητα *Aspergillus* (*A. oryzae*). Ανάμεσα σε αυτά σημειωτέα είναι τα γιαπωνέζικα αμαζάκε (“γλυκιά μπύρα” από ρύζι και κότζι), μίριν (“επιδόρπιο γλυκό σάκε” κυρίως για μαγειρική χρήση), σότσου (απόσταγμα από διάφορη πρώτη ύλη επεξεργασμένη με κότζι, π.χ. ρύζι, γλυκοπατάτες, κριθάρι, φαγόπυρο), ενώ υπάρχουν βέβαια και παρόμοια ποτά από την Κίνα και Κορέα με ντόπιες ονομασίες. Σε μερικές συνταγές χρησιμοποιούνται πιο σπάνια είδη μύκητα (*A. luchuensis* - “μαύρο κότζι”, ενώ για “λευκό κότζι” χρησιμοποιείται στέλεχος του ίδιου μύκητα με αλφισμό¹, *Monascus purpureus* - “κόκκινο κότζι” (Erdoğanlı 2004). Σε όλα αυτά το σημαντικότερο στάδιο της παραγωγής παραμένει η καλλιέργεια του

¹ Η πιο αναλυτική ταξινόμηση των *Aspergilli* είναι εκτός θέματος της έρευνάς μας. Βλ. (Kitamoto 2002) και ιδιαίτερος (Hong 2013) με σχετική βιβλιογραφία. Το “απλό” κότζι αναφέρεται παραδοσιακά ως “κίτρινο”.

κότζι, το οποίο προσφέρει ιδιαιτερότητα και απαιτούμενα αρωματικά και γευστικά χαρακτηριστικά.

2.1.2 Είδη σάκε.

Στη Ιαπωνία ξεχωρίζονται 2 βασικά είδη σάκε: “κανονικό” (*ippan-shu*) και “ειδικής προέλευσης” (*tokutei meisho-shu*). Στο κανονικό σάκε, το οποίο καταλαμβάνει 75% της Γιαπωνέζικης αγοράς, επιτρέπονται προσθήκες σακχάρων, οξέων, αλκοόλης. Στο σάκε ειδικής προέλευσης διακρίνονται μερικές υποκατηγορίες:

- *Junmai-shu* παράγεται αποκλειστικά με τη χρήση ρυζιού, νερού και κότζι, με το μέγιστο βαθμό λείανσης 70%²
- *Honjozo-shu* - σάκε επιπέδου *junmai-shu*, στο οποίο όμως έχει προστεθεί μικρή ποσότητα αλκοόλης. Θεωρείται να είναι πιο ελαφρύ και προσφέρει περισσότερη φινέτσα,
- *Ginjo-shu* - σάκε που έχει παραχθεί από το ρύζι με βαθμό λείανσης τουλάχιστον 60% (και πιο κάτω), επιτρέπεται προσθήκη αλκοόλης, στη περίπτωση που η αλκοόλη δεν προστίθεται, θα χαρακτηριστεί ως *junmai ginjo-shu*,
- *Daiginjo-shu* - βαθμός λείανσης κάτω από 50%, επιτρέπεται προσθήκη αλκοόλης, στη περίπτωση που η αλκοόλη δεν προστίθεται, θα χαρακτηριστεί ως *junmai daiginjo-shu*,

Tokubetsu-shu - “ειδικό” σάκε, το οποίο θα έχει κάποιο ειδικό χαρακτηριστικό (όχι απαραίτητα βαθμό λείανσης, αλλά μπορεί και κάποιο ειδικό τρόπο παραγωγής). Ξεχωρίζονται *tokubetsu junmai-shu* (χωρίς προσθήκη αλκοόλης) και *tokubetsu honjozo-shu* (επιτρέπεται προσθήκη αλκοόλης) (Gauntner 2002, Furukawa 2012).

2.1.3 Ιστορικά στοιχεία.

Η λέξη «σάκε», την οποία βλέπουμε στις περισσότερες ευρωπαϊκές γλώσσες ως ‘ονομασία παραδοσιακού γιαπωνέζικου ποτού’, στα γιαπωνέζικα σημαίνει απλά ‘αλκοολούχο ποτό’. Η ετυμολογία της λέξης είναι ακόμα αβέβαιη, η πιο δεκτή ετυμολογία συνδέει ιστορικά το *sake* (酒) με *sakaeru* (栄える) ‘ανθίζω’. Προτείνονται και άλλες ετυμολογίες (Antoni 1988). Για το

² Για το βαθμό λείανσης βλ. παρακάτω.

σάκε *sensu stricto* πιο συνηθισμένα χρησιμοποιείται η λέξη *nihonshu* (日本酒), κυριολεκτικά “γιαπωνέζικο ποτό”.

Στη Ιαπωνία πιθανότατα έρχεται από την Κίνα. Πρώτη αναφορά στο *cchi* 麴 (κινέζικο ‘fermentation starter, κότζι’) - περίπου 500 π.Χ. (Huang 2000). Μπορεί να υποστηριχθεί ότι η τεχνολογία της παραγωγής ποτών από τα αμυλούχα υλικά με την σακχαροποίηση με τη μούχλα ήταν γνωστή τουλάχιστον από την εποχή του κράτους του Χαν της περιόδου των εμπολέμων κρατών (από 4 αιώνα π.Χ.). Το βασικό υλικό για την παραγωγή “κρασιών” ήταν όμως το σιτάρι (Huang 2000). Αρχαιολογικές μαρτυρίες από 2ο αιώνα π.Χ. επιβεβαιώνουν αυτό (Huang 2000). Σίγουρη αναφορά στο ρύζι σαν βασικό υλικό για ένα ποτό από “μαγειρεμένο ρύζι” και μικρή ποσότητα του *cchi* (κότζι) βρίσκουμε σε ένα σχόλιο του 2 αιώνα μ.Χ. (Shurtleff 2012). Από 8ο αιώνα εμφανίζονται αναφορές στο κότζι και σάκε και στις γιαπωνέζικες πηγές (Shurtleff 2012). Η διαδικασία εμπορικής παραγωγής σάκε που μοιάζει πάρα πολύ με τη σύγχρονη αναπτύσσεται από το 14ο αιώνα (Yoshizawa 2004a). Από 17ο αιώνα έχουμε αρκετές αναφορές και πηγές με τις συνταγές του σάκε από ρύζι στα γιαπωνέζικα και στις ευρωπαϊκές γλώσσες (Shurtleff 2012). Τα τέλη του 17ο αιώνα ήδη υπάρχουν 27000 μονάδες παραγωγής σάκε στη Ιαπωνία. Το 19ο αιώνα με τις δραματικές αλλαγές στη γιαπωνέζικη κοινωνία γίνονται προσπάθειες εκμοντερνισμού παραγωγικής διαδικασίας με βάση τη σύγχρονη βιομηχανική παραγωγή μύρας στη Ευρώπη. Ενώ γενικώς οι προσπάθειες αυτές απέτυχαν εξαιτίας σημαντικών διαφορών στις εν λόγω τεχνολογίες, αυτές έγιναν ένα τεράστιο κίνητρο της επιστημονικής μελέτης του σάκε (Yoshizawa 2004a).

2.1.4 Ιστορία επιστημονικής μελέτης.

Ενδιαφέρον για την επιστημονική μελέτη του σάκε αναπτύσσεται με την ανάπτυξη της μικροβιολογίας ως επιστήμης στα τέλη του 19ου αιώνα. Το 1895 δημοσιεύεται πρώτη επιστημονική περιγραφή από το Wehmer του *A. oryzae* - του μύκητα του κότζι (Shurtleff 2012). Το 1881 δημοσιεύτηκε το “The chemistry of saké-brewing: Tables, graphs, and illustrations” του R.W. Atkinson - πλήρης περιγραφή της διαδικασίας της παραγωγής του κότζι και σάκε με πολλές πρακτικές μετρήσεις. Πρέπει να σημειωθεί και αναφορά στην παραδοσιακή παστερίωση του έτοιμου σάκε, η οποία εφαρμόζεται “εδώ και 300 χρόνια”, δηλαδή από τα τέλη του 16ου αιώνα, αν και τα σκεύη που μετά μεταγγίζεται το παστεριωμένο σάκε δεν ήταν απολυμασμένα. Ακολουθεί και το “On the diastase of kôji”, όπου ο R.W. Atkinson περιγράφει τη δράση των αμυλολυτικών ενζύμων (“διαστάσης”) του *A. oryzae* (Shurtleff 2012).

Οι μελέτες του κότζι προκαλούν μεγάλο ενδιαφέρον στην αρχή του 20ου αιώνα με την ανακάλυψη μεθόδου της παραγωγής των καθαρών αμυλολυτικών ενζύμων του *A. oryzae* (“τακαδιαστάση”) από τον T. Takahashi. Τα ένζυμα αυτά έχουν βρει μεγάλη εφαρμογή ως φάρμακο, στη βιομηχανία αποσταγμάτων, κ.α.

Τα 1970 επανέρχεται το ενδιαφέρον για το κότζι και σάκε με τη μόδα στα “βιολογικά” και “υγιεινά” προϊόντα παραδοσιακών κουζινών της Ασίας. Τελευταία χρόνια το βασικό κίνητρο μελέτης του *Aspergillus* είναι οι προοπτικές της χρήσης του μύκητα αυτού στις βιομηχανικές ζυμώσεις στερεάς φάσης σαν φτηνός τρόπος παραγωγής ενζύμων και επεξεργασίας αποβλήτων.

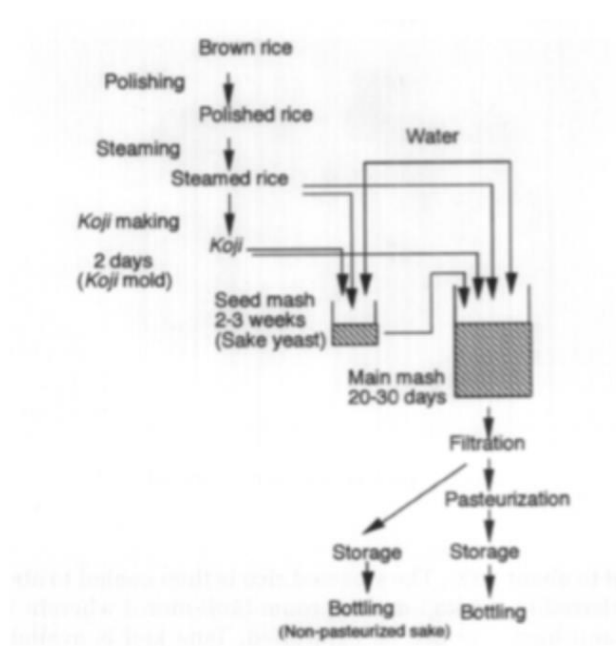
2.1.5 Τα βασικά της διαδικασίας παραγωγής.

Στη παραγωγή σάκε ως πρώτη ύλη χρησιμοποιείται ρύζι και νερό. Το ρύζι χρησιμοποιείται στις δύο μορφές, απλό ατμισμένο ρύζι και κότζι. Το ρύζι με νερό αναμειγνύονται σε μερικά στάδια, και οι αναλογίες ποικίλλουν στη βιβλιογραφία (Yoshizawa 2004b), ενώ διατηρούν την κύρια ιδέα σταδιακής αύξησης του όγκου μείγματος εν ζυμώσει.

Σε γενικές γραμμές η διαδικασία παραγωγής του σάκε ακολουθεί τα εξής στάδια: προετοιμασία του ρυζιού (γυάλισμα ή λείανση, άτμιση, κτλ), παραγωγή κότζι, προκαταρκτική ζύμωση (“πόδι”), κύρια ζύμωση, μεταζυμωτικές κατεργασίες (βλ. Εικόνα 2.1) (Kitamoto 2002).

Το πρώτο στάδιο είναι λείανση ρυζιού. Το καστανό ρύζι, πλούσιο σε πρωτεΐνες, λιπίδια και μέταλλα θεωρείται ακατάλληλο για την παραγωγή σάκε. Αυτές η ουσίες συγκεντρώνονται στα εξωτερικά μέρη του κόκκου του ρυζιού (καστανό περικάρπιο και τα εξωτερικό στρώμα του ενδοσπερμίου, το στρώμα της αλευρώνης) (Champagne 2004). Για να απομακρυνθούν αυτές οι στρώσεις, οι κόκκοι λειαινούνται. Κατά τη διάρκεια της λείανσης οι κόκκοι χάνουν 25-30% της μάζας τους (Yoshizawa 2004b: 541)³.

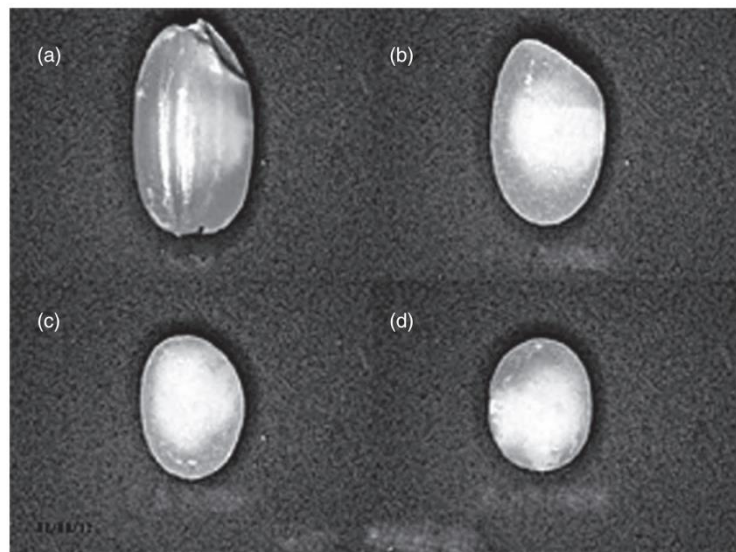
³ Στη βιβλιογραφία βρίσκουμε εκτιμήσεις 30-60% (Kitamoto 2002). Δεν είναι αντίφαση όμως, γιατί θεωρείται ότι όσο υψηλότερου βαθμού λείανσης χρησιμοποιείται το ρύζι, τόσο ποιοτικότερο θα είναι το σάκε.



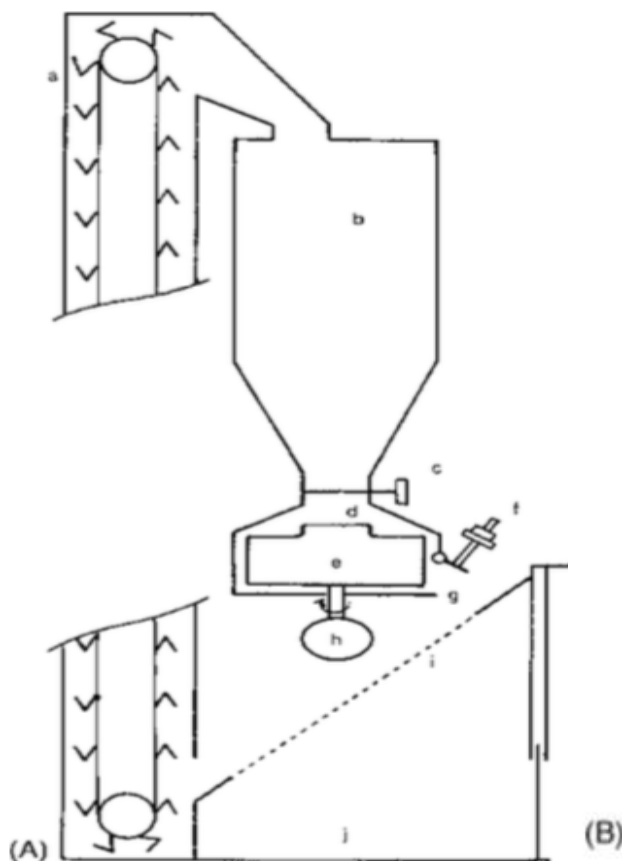
Εικ. 2.1 Στάδια παραγωγής σάκε κατά το (Kitamoto 2002)

Για τη περιγραφή βαθμού λείανσης χρησιμοποιείται στα αγγλικά όρος milling rate ή polishing rate, το οποίο αντιστοιχεί σε τελική μάζα του ρυζιού προς αρχική μάζα του καστανού ρυζιού, εκφραζόμενη σε ποσοστό %.

Δηλαδή το ρύζι, που έχει χάσει 30% της μάζας του θα έχει το milling rate 70%. Όσο πιο χαμηλό είναι το ποσοστό αυτό, τόσο σε ανώτερη κατηγορία θα ανήκει το τελικό προϊόν, δε θα σημαίνει βέβαια αυτομάτως ότι θα αξιολογηθεί καλύτερο από τους κριτές και καταναλωτές, γενικότερα όμως λόγω της μικρότερης συγκέντρωση λιπιδίων, πρωτεϊνών και άλλων συστατικών εμφανίζει βελτιωμένα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά.



Εικ. 2.2 Λείανση του ρυζιού. a) Καστανό ρύζι b) βαθμός λείανσης 70% c) βαθμός λείανσης 50%, d) βαθμός λείανσης 35% (Furukawa 2012)



Εικ. 2.3 Βιομηχανικός μύλος κάθετου τύπου, ο οποίος χρησιμοποιείται στη παραγωγή σάκε (σχήμα). (a) - μεταφορέας με καλάθια, (b) - χοάνη τροφοδοσίας ρυζιού, (c) - βαλβίδα ελέγχου ροής ρυζιού, (d) - θάλαμος σπασίματος, (e) - σπαστήρας, (f) - αντίσταση, (g) - έξοδος, (h) - μηχανή, (i) - κόσκινο, (j) - δοχείο αποθήκευσης φλούδων (Yoshizawa 2004a)



Εικ. 2.4 Βιομηχανικός μύλος κάθετου τύπου (φωτογραφία) (Yoshizawa 2004a)

Μετά τη λείανση το ρύζι ξεπλένεται. Κατά το ξέπλυμα οι κόκκοι χάνουν ακόμα 1-3% της μάζας του, αλλά ο κύριος σκοπός της διαδικασίας αυτής είναι καθαρισμός του ρυζιού από σκόνη μετά την κύρια λείανση και ενυδάτωση των κόκκων. Το ρύζι απορροφά νερό στη ποσοστό 25-30% της αρχικής μάζας του ρυζιού. Το νερό αυτό θα διευκολύνει τη διάδοση θερμότητας στα εσωτερικά μέρη του κόκκου κατά την άτμιση και επομένως διευκολύνει τις απαιτούμενες αλλαγές στη δομή των εσωτερικών κόκκων του αμύλου. Η απορρόφηση είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής υγρασίας του ρυζιού. Το ρύζι αφήνεται να στραγγίξει για 4-8 ώρες και είναι έτοιμο για την άτμιση (Yoshizawa 2004a).

Το ρύζι ατμίζεται 40-60 λεπτά με κύριο σκοπό ζελατινοποίηση του αμύλου ώστε να είναι πιο προσβάσιμο για τα ένζυμα του *Aspergillus*. Επίσης με αυτή τη διαδικασία επιτυγχάνουμε την

“αποστείρωση” του υλικού (Yoshizawa 2004a). Ταυτόχρονα μετουσιώνονται οι απομένοντες πρωτεΐνες του ρυζιού, ενώ τα λιπίδια μεταναστεύουν προς τα εξωτερικά μέρη των κόκκων και τελικά αποχωρούν από τους κόκκους ακόμα μειώνοντας τη συγκέντρωσή τους στο ρύζι. Παρατηρούνται και άλλες αλλαγές στη σύσταση του ρυζιού (πολύ πιο λεπτομερώς βλ.



Εικ. 2.5 Παραδοσιακή άτμιση του ρυζιού (Yoshizawa 2004a)

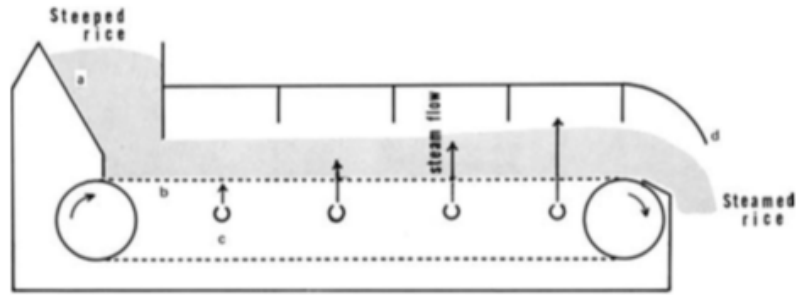
(Bhattacharya 2004)), ενώ ερμηνεύονται⁴ να μην έχουν ιδιαίτερη σημασία στη παραγωγή του σάκε.

Κατά την άτμιση το ρύζι απορροφά άλλα 7-12%⁵ νερού. Παραδοσιακά για την άτμιση χρησιμοποιούνται μεγάλες “κατσαρόλες” με το νερό που βράζει υπό την ατμοσφαιρική πίεση, και το ρύζι τοποθετείται επάνω σε αυτά μέσα σε ειδικά σκεύη που λέγονται *koshiki*⁶. Η άτμιση γίνεται ασυνεχώς, με δόσεις. Σήμερα στις μεγάλες βιομηχανίες χρησιμοποιούνται ειδικά συστήματα συνεχούς άτμισης (Yoshizawa 2004a).

⁴ Τουλάχιστον δεν αναφέρονται στην αντίστοιχη βιβλιογραφία του σάκε.

⁵ Της αρχικής μάζας του ρυζιού.

⁶ (Kitamoto 2002).



Εικ. 2.6 Σύστημα συνεχούς άτμισης (σχήμα) (Yoshizawa 2004a)

Στη συνέχεια το ρύζι ψύχεται μέχρι 40°C αν πρόκειται να προχωρήσει στη παραγωγή κότζι, και μέχρι 10°C για τα επόμενα στάδια της παραγωγής.

Κότζι είναι ένα παραδοσιακό προϊόν ζύμωσης στερεάς φάσης. Βασικός σκοπός της ζύμωσης αυτής είναι η παραγωγή αμυλολυτικών ενζύμων από το μύκητα *Aspergillus oryzae*. Τα βασικά αμυλολυτικά ένζυμα που παράγονται κατά τη ζύμωση είναι α -αμυλάση (“τάκα-αμυλάση”) και γλυκοαμυλάση. α -Αμυλάση του *A. oryzae* είναι ικανή να υδρολύει το άμυλο μέχρι μαλτόζη και γλυκόζη, ενώ η γλυκοαμυλάση υδρολύει το άμυλο αποτελεσματικά μέχρι τη γλυκόζη (ARSJ 1988). Πρέπει να σημειωθεί ότι κατά τη ζύμωση στερεάς φάσης του *A. oryzae* ευνοείται ιδιαίτερα η παραγωγή γλυκοαμυλάσης ενώ στην υγρή καλλιέργεια αυτό το ένζυμο παράγεται ελάχιστα (Ichishima 2012: 168-170). Η αυξημένη παραγωγή της γλυκοαμυλάσης μπορεί να ερμηνευθεί θετικό επειδή το προϊόν της δράσης της, η γλυκόζη, θεωρείται το πιο προσβάσιμο υπόστρωμα για τη ζύμη *S.cerevisiae*. Τα ένζυμα αυτά αργότερα συνεχίζουν να δρουν κατά τη ζύμωση του σάκε παράγοντας σάκχαρα από το άμυλο των κόκκων του μη-μουχλιασμένου ρυζιού.

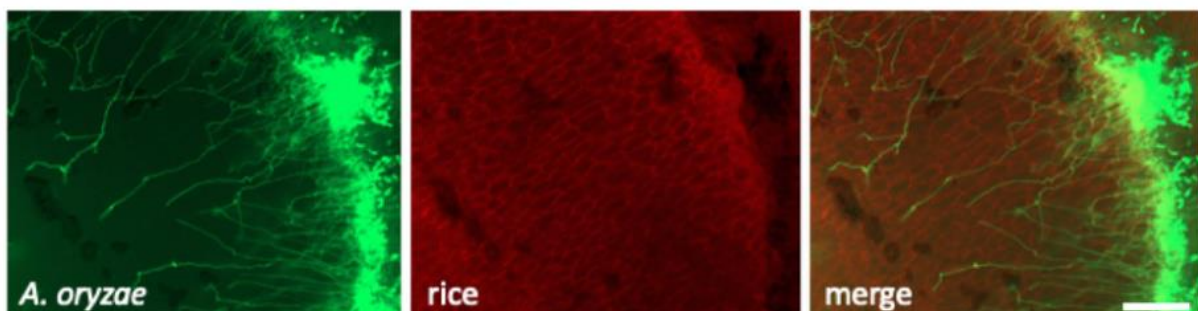
Για τη παραγωγή του κότζι το κρυωμένο μέχρι 40°C ρύζι μεταφέρεται σε ειδικό δωμάτιο *kojimuro*, στο οποίο διατηρείται σταθερή θερμοκρασία 26-28°C και σχετική υγρασία 80-90%. Το ρύζι σκορπίζεται στα μεγάλα ξύλινα “ταψιά” *toko* και καλύπτεται με ύφασμα. Σε 2-3 ώρες το ρύζι αφού έχει ισορροπηθεί η θερμοκρασία του και η υγρασία, εμβολιάζεται με τα ασκοσπόρια του *Aspergillus*. Τα σπόρια αυτά παραδοσιακά ονομάζονται *tane-koji*. Το ύφασμα αφαιρείται, τα σπόρια σκορπίζονται επάνω στη στρώση του ρυζιού και στη συνέχεια το ρύζι αναμιγνύεται για να επιτευχθεί η ομοιόμορφη διασπορά των σπορίων. Συνήθως χρησιμοποιούνται 60-100 g σπορίων ανά 100 kg αρχικής μάζας του ρυζιού ώστε κάθε κόκκος ρυζιού να αποκτήσει περίπου 2000 σπόρια. Στο τέλος της διαδικασίας το ρύζι πάλι καλύπτεται με ύφασμα. Η θερμοκρασία του ρυζιού αναμένεται να είναι 31-32°C (Kitamoto 2002, Yoshizawa 2004a).

Σε 10-12 ώρες εμφανίζονται πρώτες αποικίες του μύκητα ως άσπρες τελίτσες. Το ρύζι αναμειγνύεται ξανά. Με την ανάμειξη αυτή αποφεύγεται και υπερθέρμανση του ρυζιού επειδή το ρύζι ξεκινά να θερμαίνεται από το μεταβολισμό του μύκητα. Σε 24 ώρες η ανάπτυξη γίνεται τόσο γρήγορη και παράγεται τόσο πολλή θερμότητα ότι δεν είναι πλέον δυνατό να διατηρείται η



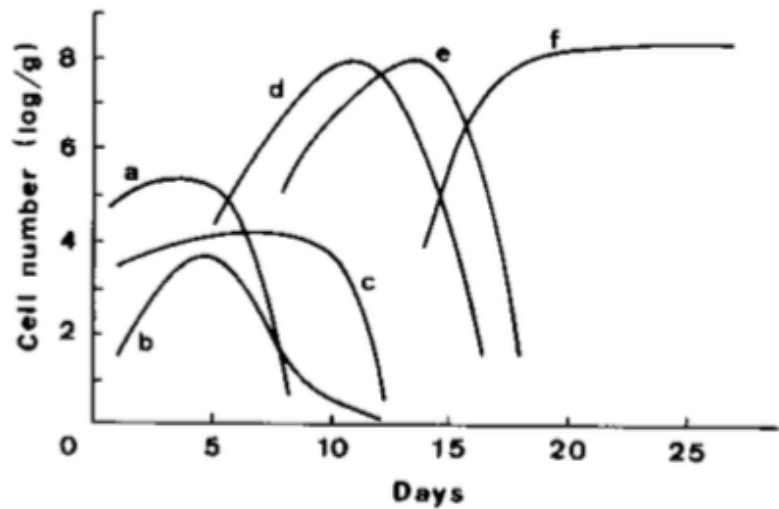
Εικ. 2.7 “Ταπί” *toko* με ρύζι και μικρότερα ταπιά του *mori* (στο βάθος) (Yoshizawa 2004a)

επιθυμητή θερμοκρασία στα μεγάλα *toko*, οπότε το ρύζι διαιρείται ανά μικρότερες δόσεις 1.5 kg και τοποθετείται στα μικρότερα ξύλινα “ταπιά” ώστε να αποφευχθεί απότομη αύξηση θερμοκρασίας. Η θερμοκρασία σε αυτό το στάδιο *mori* αναμένεται να είναι 32-34°C. Στη συνέχεια το ρύζι αναμειγνύεται μερικές φορές ανά 6 ώρες, ενώ η θερμοκρασία σταδιακά φτάνει στους 41-43°C. Συνολικά η καλλιέργεια διαρκεί 40-45 ώρες. Όταν όλο το ρύζι έχει επικαλυφθεί με τον μύκητα η ζύμωση διακόπτεται με ψύξη (Kitamoto 2002, Yoshizawa 2004a). Σημαντικό είναι να “τρυγηθεί” το κότζι πριν τη σπορογένεση του *Aspergillus*. Το κότζι πρέπει να έχει λευκό χρώμα και ευχάριστο άρωμα *kuri-ka*. Σήμερα στη βιομηχανία χρησιμοποιούνται και αυτοματοποιημένα συστήματα ζύμωσης κότζι. Σημειώνεται ότι δεν είναι επιθυμητή η παρουσία νερού στο εξωτερικό των κόκκων ρυζιού, αλλά η αύξηση της υγρασία στο εσωτερικό του, εξ’ ου και η χρήση της άτμισης, ώστε να επιτευχθεί η ανάπτυξη του μύκητα στο εσωτερικό του κόκκου του ρυζιού, και όχι μόνο στην επιφάνεια.



Εικ. 2.8 Οι υφές του *A. oryzae* μέσα στο κόκκο του ατμισμένου ρυζιού μετά από τις 14 ώρες της καλλιέργειας κότζι (Yasui 2020)

Το επόμενο στάδιο παραγωγής (*moto*) μπορεί να θεωρηθεί ως μια προκαταρκτική ζύμωση ή ως καλλιέργεια εμβολίου. Ο κύριος σκοπός του *moto* είναι να παραχθεί αρκετή ποσότητα των κυττάρων ζύμης *S. cerevisiae* για την ασφαλή έναρξη της κύριας ζύμωσης. Δεύτερος σκοπός είναι να παραχθεί από τα γαλακτικά βακτήρια αρκετή οξύτητα η οποία θα εξασφαλίσει το επιθυμητό pH και την προστασία της κύριας ζύμωσης από



Εικ. 2.9 Αλλαγές στη μικροχλωρίδα του *yamahai-moto*. (a) - απονιτροποιητικά βακτήρια, (b) - ζύμες που δημιουργούνται, (c) - “άγριες” ζύμες, (d) - γαλακτικά βακτήρια (κόκκοι), (e) - γαλακτικά βακτήρια (ράβδοι), (f) - ζύμη του σάκε (Yoshizawa 2004a)

ανεπιθύμητους μη-οξόφιλους μικροοργανισμούς (Yoshizawa 2004a). Για το *moto* χρησιμοποιούνται συνήθως περίπου 7% της συνολικής ποσότητας του ρυζιού.

Σήμερα χρησιμοποιούνται τρεις κύριες μέθοδοι παραγωγής *moto*. Το παραδοσιακό *yamahai-moto* βασίζεται στη χρήση γαλακτικών βακτηρίων για τη διόρθωση οξύτητας στο *moto*. Παράδειγμα τέτοιου πρωτοκόλλου παρουσιάζεται στο (Yoshizawa 2004a). Σε 100 L νερού θερμοκρασίας 6-7°C τοποθετούμε 70 κιλά ατμισμένο ρύζι και 30 κιλά κότζι. Στη συνέχεια ανεβάζουμε θερμοκρασία κατά 0.5-1°C ανά μέρα φτάνοντας σε 10-15 μέρες τους 14-15°C. Κατά αυτή την περίοδο γίνονται σημαντικές αλλαγές στη μικροχλωρίδα του *moto*. Αρχικά αναπτύσσονται απονιτροποιητικά βακτήρια όπως *Pseudomonas* και *Achromobacter*. Τα βακτήρια παράγουν νιτρώδη ιόντα NO_2^- από τα νιτρικά NO_3^- του νερού, και με αυτό τον τρόπο αναστέλλουν ανάπτυξη άγριων ζυμών εκτός από τις *S. cerevisiae*⁷. Από 5^η μέρα αυξάνεται

⁷ Ενδιαφέροντα αποτελέσματα ανάλυσης μετατροπών στη μικροχλωρίδα του *kimoto* (εδώ χρησιμοποιείται ως συνώνυμο του *yamahai-moto*) και γενικώς μικροχλωρίδας στο “κελλάρι” με τη χρήση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) παρουσιάζονται στο (Bokulich 2014). Όλα τα δείγματα συλλέχθηκαν από μια βιομηχανική μονάδα παραγωγής του σάκε στην Βόρεια Αμερική. Αν και δε βρέθηκαν σημαντικές ποσότητες των απονιτροποιητικών βακτηρίων στο *moto* (ενώ τακτοποιήθηκε *Pseudomonas* στο στάδιο του κότζι, επίσης βρέθηκαν και στο *moto*, και στο *moromi* *Klebsiella*, αλλά χωρίς να διακριθεί αν το στέλεχος αυτό έχει απονιτροποιητική δράση, η οποία σημειώνεται στη βιβλιογραφία για μερικά στελέχη *Klebsiella* (π.χ. Lin 1993, Wu 1999), δεν παρατηρείται παρουσία των ζυμών non-*S. cerevisiae* εκτός από την *Wickerhamomyces anomalus*.

σημαντικά ο πληθυσμός των γαλακτικών βακτηρίων (π.χ. *Lactobacillus sakei*⁸). Ο πληθυσμός τους φτάνει $10^5 - 10^8$ cfu/g, στη συνέχεια όμως αναστέλλεται η ανάπτυξή τους λόγω υψηλής συγκέντρωσης σακχάρων και χαμηλού pH. Μετά από τις 15 μέρες στο *moto* τα νιτρώδη ιόντα έχουν εξαφανιστεί και ξεκινάνε να κυριαρχούν οι *Saccharomyces cerevisiae*. Σύμφωνα με τη σύγχρονη πρακτική του *yamahai-moto* εκείνη τη στιγμή το *moto* εμβολιάζεται με το επιλεγμένο στέλεχος της *S. cerevisiae*. Σε μερικές μέρες η θερμοκρασία αυξάνεται μέχρι 18-20°C λόγω της ενεργητικής αλκοολικής ζύμωσης (“*wakitsuki*”). Όταν η πυκνότητα του φιλτραρισμένου *moto* φτάνει στους 8-9° Bé, το *moto* ψύχεται για να αποτραπεί η πτώση της βιωσιμότητας της καλλιέργειας λόγω αυξανόμενης συγκέντρωσης αιθανόλης, και συντηρείται παγωμένο για ακόμα 5-7 μέρες (περίοδος “ξεκούρασης”, *yasumi*). Μετά από το *yasumi* το *moto* είναι έτοιμο να εμβολιάσει την κυρία παραγωγή (Yoshizawa 2004a).

Η πιο διαδεδομένη όμως μέθοδος στη βιομηχανική παραγωγή σάκε είναι *sokujo-moto*. Το πρώτο στάδιο της βακτηριακής ζύμωσης παραλείπεται, και στο μείγμα ρυζιού, κότζι και νερού προστίθεται ανάλογη ποσότητα καθαρού γαλακτικού οξέος (600-700 mL/L μέχρι το pH 3.5-3.8). Με αυτό το τρόπο μειώνεται συνολικός χρόνος προετοιμασίας του *moto* από ~30 ημέρες σε 10-15 μέρες. Είναι απαραίτητος όμως ο εμβολιασμός με το επιλεγμένο στέλεχος των *S. cerevisiae* σε ποσότητα τουλάχιστον $10^5 - 10^6$ cfu/g επειδή η ανάπτυξη των “άγριων” ζυμών δεν αναστέλλεται από τα νιτρώδη ιόντα (Yoshizawa 2004a).

Ακόμη πιο γρήγορη μέθοδος προετοιμασίας του *moto* είναι *ko-on-toka moto*. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, το μείγμα νερού, ρυζιού και κότζι θερμαίνεται μέχρι τις 55-50°C και παραμένει σε αυτή τη θερμοκρασία για μερικές ώρες για να επιτευχθεί η σακχαροποίηση, παρομοίως με τη πολτοποίηση κατά την παραγωγή μπύρας. Η αμυλάση προέρχεται από το κότζι, η οξύτητα διορθώνεται με την προσθήκη γαλακτικού οξέος μετά την πολτοποίηση. Η τελική πυκνότητα

Γενικά το πρόβλημα της παρουσίας των απονιτροποιητικών βακτηρίων στο *yamahai-moto* παραμένει ανοιχτό, υπάρχουν αρκετές αναφορές στη βιβλιογραφία όσο στην ταυτοποίησή τους, τόσο και στην απουσία τους κατά το *yamahai-moto*. Δεν αποκλείεται ότι υπάρχουν δύο παραλλαγές των βιοσυστημάτων *yamahai-moto*, με τα απονιτροποιητικά βακτήρια και χωρίς (Koyanagi 2016, Tsuji 2018), και η απονιτροποιητική δράση δεν είναι κρίσιμη για το επιτυχές *yamahai-moto* (Tsuji 2018).

⁸ Σημειωτέον ότι μερικά στελέχη του *Lactobacillus sakei*, το οποίο θεωρείται κύριο γαλακτικό βακτήριο του *moto*, παράγουν αντιβιοτικά τα οποία αναστέλλουν την ανάπτυξη των επικίνδυνων για τον άνθρωπο βακτηρίων γένους *Listeria* και προτείνονται ως φυσική προστασία για τα μαγειρεμένα τρόφιμα, αλλαντικά (Bredholt 2001). Στη βιβλιογραφία αναφέρονται και άλλα γαλακτικά βακτήρια παρόντα κατά το *yamahai-moto*, και η λίστα των ανιχνεύσιμων ειδών των *Lactobacilli* και *Leuconostoc* όχι μόνο από περιοχή σε περιοχή, αλλά και στο ίδιο παραγωγό από χρονιά σε χρονιά (Tsuji 2018).

του πολτού φτάνει στους 16-17° Βέ. Ο πολτός ψύχεται και εμβολιάζεται με επιλεγμένο στέλεχος των *S. cerevisiae* στη θερμοκρασία 25°C. Με αυτό το τρόπο το *moto* είναι έτοιμο περίπου σε μία εβδομάδα (Yoshizawa 2004a).

Σημειωτέων η συγκέντρωση ελεύθερων αμινοξέων στο *sokujo-moto* είναι τρεις φορές πιο χαμηλή σε σχέση με το *moto* το οποίο παράχθηκε με την παραδοσιακή μέθοδο (*yamahai-moto*). Το φαινόμενο αυτό βασίζεται στο γεγονός ότι κατά τη παραδοσιακή μέθοδο το pH αλλάζει σταδιακά από το σχεδόν ουδέτερο προς ξινό αφήνοντας το χρονικό περιθώριο να δράσουν και η πρωτεάσες του *moto* και η πεπτιδάσες (άριστο pH δράσης τείνει προς ουδέτερο⁹) να αποικοδομηθούν οριστικά οι πρωτεΐνες του ρυζιού ενώ στο *sokujo-moto* το pH αλλάζει δραματικά στο όξινο με την προσθήκη γαλακτικού οξέος και η κατεσταλμένη πεπτιδασική δράση του *moto* δεν αφήνει να ολοκληρωθεί η αποικοδόμηση των όλων πρωτεϊνών η οποία σταματάει στο στάδιο ολιγοπεπτιδίων (Iemura 2002, quoted by Yoshizawa 2004a). Η ολική ποσότητα αζωτούχων ενώσεων εκφραζόμενη σε άζωτο παραμένει ίδια. Συνεπώς το *sokujo-moto* περιέχει περισσότερες ολιγοπεπτίδια, το οποίο επηρεάζει και το γευστικό προφίλ του τελικού προϊόντος (Iemura 2002).

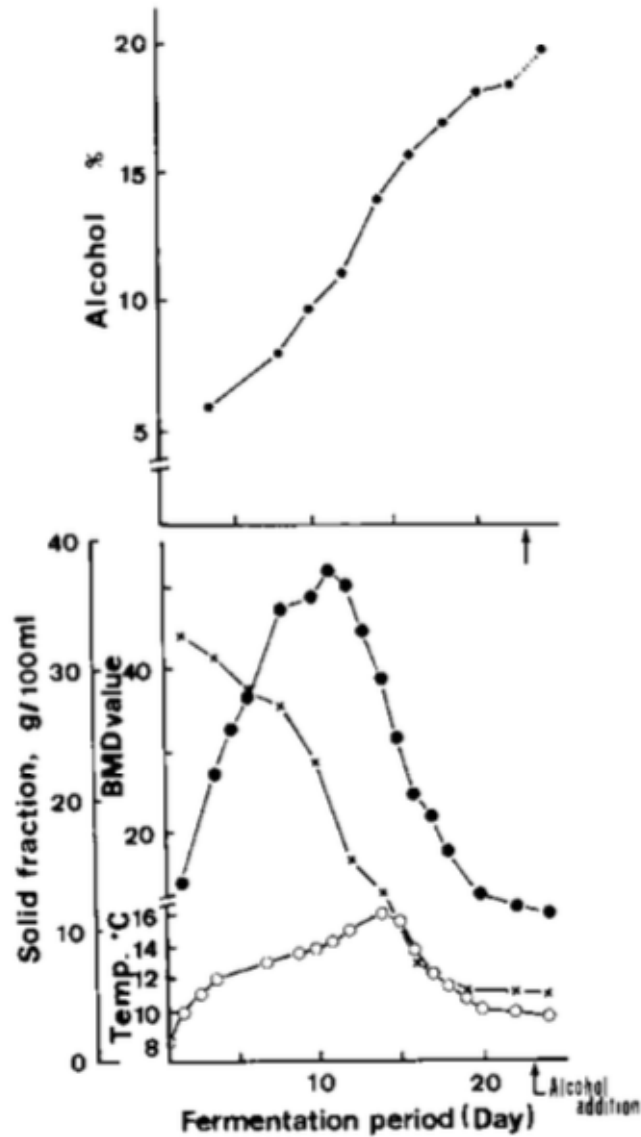
Το στάδιο της κύριας ζύμωσης ονομάζεται *moromi*. Η ζύμωση αυτή χαρακτηρίζεται με τη σταδιακή προσθήκη του ζυμώσιμου υλικού. Αρχικά το φρέσκο μείγμα ρυζιού, κότζι και νερού προστίθεται στο *moto* σε αναλογία 1:1. Η θερμοκρασία διατηρείται σταθερά χαμηλή (12-14°C). Τη δεύτερη μέρα, όταν οι ζύμες φτάνουν στη συγκέντρωση 10⁸ cells/g δηλαδή ίδια με τη συγκέντρωσή τους στο *moto*, προστίθεται διπλάσια της αρχικής ποσότητα του φρέσκου μείγματος¹⁰. Με την αραιώση αυτή αυξάνει το pH και πέφτει η προστατευτική δράση του, γι' αυτό τώρα διατηρείται πιο χαμηλή θερμοκρασία (9-10°C). Την τρίτη μέρα επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία, διπλασιάζοντας ξανά τον όγκο με φρέσκο δείγμα και χαμηλώνοντας τη θερμοκρασία μέχρι 7-8°C (Yoshizawa 2004a). Σακχαροποίηση και αλκοολική ζύμωση γίνονται ταυτόχρονα κατά το *moromi* (ενώ κατά το *moto* η σακχαροποίηση προηγείται τη ζύμωση). Η σταδιακή παραγωγή των διαλυτών σακχάρων προσφέρει στις ζύμες ευκαιρία να προσαρμοστούν στην υψηλή ωσμωτική πίεση και συγκέντρωση αλκοόλης με αποτέλεσμα η τελική συγκέντρωση αιθανόλης στο *moromi* να φτάνει έως και 20% Vol. Επίσης η παραγωγή

⁹ Οι πρωτεάσες του *kaji* δεν έχουν αμινο- ή καρβοξυπεπτιδασική δράση και δεν είναι ικανές να ολοκληρώσουν την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών μόνες τους. *A. oryzae* διαθέτει μια αλκαλική, ουδέτερες όπως και όξινες πρωτεάσες. Ο *A. oryzae* επίσης διαθέτει 4 καρβοξυπεπτιδάσες (άριστο pH 3-4) και 7 αμινοπεπτιδάσες (βέλτιστο pH 5-8.5) (Steinkraus 1995). Οι πεπτιδάσεις αυτές ολοκληρώνουν την υδρόλυση πρωτεϊνών.

¹⁰ Δηλαδή με το φρέσκο διπλασιάζουμε το συνολικό όγκο.

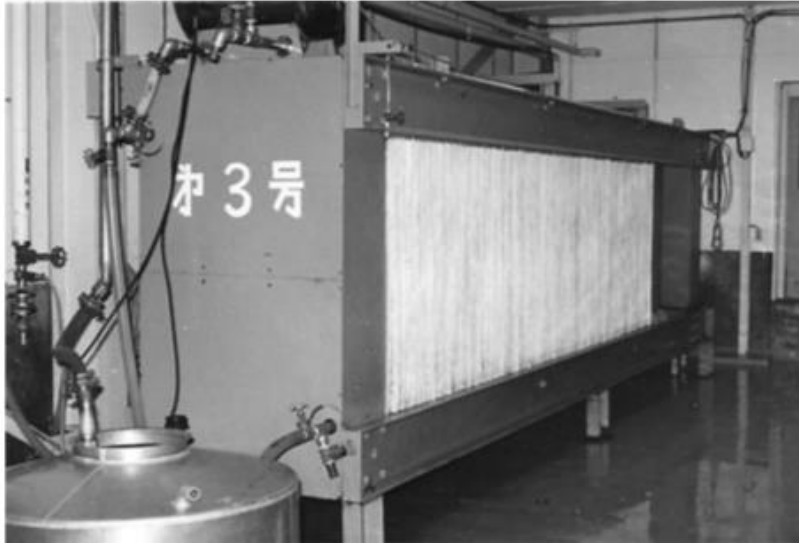
του σάκε χαρακτηρίζεται γενικώς από χαμηλές θερμοκρασίες (κάτω από 18°C) και υψηλή συγκέντρωση των μη-διαλυτών στερεών και των μεγάλων μορίων πρωτεολιπιδίων του *A. oryzae* το οποίο συνεισφέρει στην ικανότητα ζυμών να προσαρμοστούν στην υψηλή συγκέντρωση αλκοόλης στο σάκε (Yoshizawa 2004a).

Η ζύμωση του *moromi* προχωράει αργά με αναμενόμενο χρόνο ολοκλήρωσης 15-25 μέρες. Η θερμοκρασία αυξάνεται σταδιακά με την αύξηση ρυθμού ζύμωσης φτάνοντας στους 15-18°C την 6-9 μέρα. Στη συνέχεια η θερμοκρασία χαμηλώνεται πάλι. Στο τέλος της ζύμωσης η συγκέντρωση αλκοόλης φτάνει 18-20% Vol. Ανάλογα με το είδος του σάκε, αυτή τη στιγμή μπορεί να προστεθεί καθαρή αλκοόλη (να φτάσει το τελικό %Vol. σε 20-22%) ή φρέσκο ατμισμένο ρύζι, το οποίο θα είναι μια πηγή αζύμωτης γλυκόζης. Η γλυκόζη αυτή θα συνεισφέρει στο γευστικό προφίλ του σάκε ως γλυκαντικός παράγον (Yoshizawa 2004a).



Εικ. 2.10 Κύρια ζύμωση (*moromi*). Πάνω: αλκοόλη %Vol. Κάτω: ○ - θερμοκρασία, • - παράγον BMD (πυκνότητα σε Baumé*μέρα ζύμωσης, x - στερεά φάση g/100ml (Yoshizawa 2004a)

Μετά τη ζύμωση το σάκε φιλτράρεται ώστε να διαχωριστεί από τα στερεά υπολείμματα ρυζιού. Ως φίλτρο χρησιμοποιούνται πανιά με σχετικά μεγάλους πόρους και διαχωρίζονται μόνο σχετικά μεγάλα κομμάτια ρυζιού. Τα στερεά υπολείμματα στη συνέχεια πιέζονται με πιεστήρια-φιλτρόπρεσσες (παραδοσιακού ή μοντέρνου τύπου) να βελτιωθεί η απόδοση του υγρού. Κατά κανόνα από 1000 kg ρύζι παράγονται 300 L σάκε (20%Vol.) και 250-300 kg υπολειμμάτων (*sakekasu*). Το σάκε όμως μετά από αυτό το στάδιο παραμένει θολό.



**Εικ. 2.11 Φιλτρόπρεσσα για φιλτράρισμα
moromi (Yoshizawa 2004a)**

Στη συνέχεια το σάκε προχωράει σε μια στατική απολάσπωση παρόμοια με την απολάσπωση κατά την παραγωγή οίνου. Η απολάσπωση ολοκληρώνεται σε χαμηλή θερμοκρασία σε 1-2 βδομάδες, και στη συνέχεια πραγματοποιείται φιλτράρισμα με χρήση φίλτρων μεμβρανών ή/και ενεργού άνθρακα. Μετά το φιλτράρισμα το σάκε συνήθως συντηρείται ακόμα ένα μήνα περίπου πριν προχωρήσει στην παστερίωση η οποία είναι απαραίτητη για να ανασταλεί η ανάπτυξη των μη-επιθυμητών μικροοργανισμών. Κατά την περίοδο αυτή το σάκε παλαιώνεται δυναμικά λόγω δράσης ενζύμων του κότζι και των ζυμών. Η παστερίωση είναι μια παραδοσιακή διαδικασία κατά την παραγωγή του σάκε και είναι γνωστή από 16ο αιώνα αν και δεν υπήρχε τότε κατανόηση της μικροβιολογίας του σάκε. Κατά την παστερίωση το σάκε θερμαίνεται μέχρι 60-65°C για λίγο χρόνο (Yoshizawa 2004a). Πριν την εμφιάλωση το σάκε συντηρείται σε θερμοκρασίες από 13-18°C (για απλό σάκε) μέχρι 0-5°C (για σάκε άριστης ποιότητας). Κάθε παρτίδα μπορεί να αποκτήσει μοναδικό γευστικό προφίλ οπότε συνηθίζεται χαρμάνιασμα να διατηρείται σταθερή ποιότητα προϊόντος. Μετά το χαρμάνιασμα το σάκε αραιώνεται με νερό μέχρι τους 14-16% Vol., και φιλτράρεται με αποστειρωτικό φίλτρο μεμβρανών 0.45-1.0 μm. Με τη χρήση τέτοιου φιλτραρίσματος μερικοί παραγωγοί αποφεύγουν την παστερίωση (Yoshizawa 2004a), ενώ μερικοί χρησιμοποιούν και τη δεύτερη παστερίωση πριν την εμφιάλωση (Gauntner 2002: 61).

Ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που επηρεάζουν την εμπορευσιμότητα του σάκε είναι το πρωτεϊνικό θόλωμα. Το πρόβλημα αυτό λύνεται μερικώς με τη παραμονή του σάκε πριν την παστερίωση, η οποία δίνει χρόνο να δράσουν οι πρωτεάσες του σάκε. Επίσης

χρησιμοποιείται προσθήκη τανινών του λωτού (*Diospyros kaki*) και ζελατίνης για την καθίζηση των πρωτεϊνών του σάκε (Yoshizawa 2004a).

Το σάκε είναι πολύ ευαίσθητο στο ηλιακό φως γι' αυτό σήμερα συνήθως εμφιαλώνεται στα σκούρα καστανά ή πράσινα γυάλινα μπουκάλια (Yoshizawa 2004a).

2.2 Άτμιση του ρυζιού και παραγωγή κότζι.

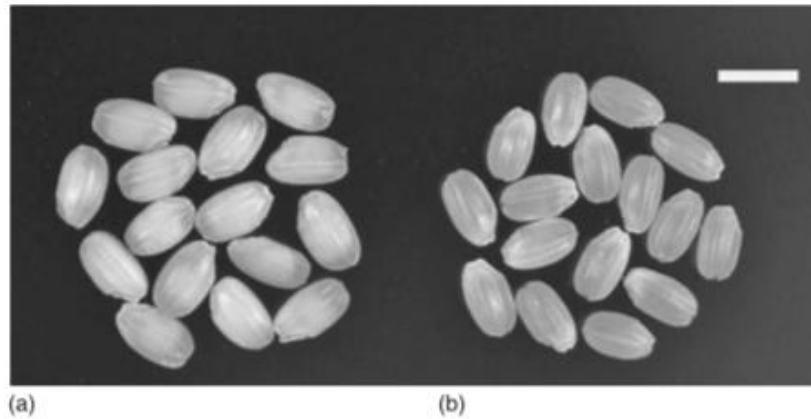
2.2.1 Πρώτη ύλη: ρύζι. Επιλογή ρυζιού. Εναλλακτική πηγή αμύλου - κάστανα.

Το ρύζι είναι η βασική πρώτη ύλη στη παραγωγή του σάκε και η ποιότητα και τα χαρακτηριστικά του ρυζιού παίζουν πολύ μεγάλο ρόλο στο τελικό προϊόν. Στο ρύζι (*Oryza sativa*) ξεχωρίζονται δύο υποείδη: *O. sativa subsp. indica* και *O. sativa subsp. japonica*¹¹, το πρώτο εκ των οποίων χαρακτηρίζεται από μακρόσπερμο σχήμα των κόκκων και μαγειρεμένο παραμένει σπυρωτό, ενώ το *japonica* έχει κοντούς κόκκους οι οποίοι κολλάνε μαγειρεμένα μεταξύ τους.

Στη Ιαπωνία όλες οι παραδοσιακές ποικιλίες του ρυζιού ξεχωρίζονται σε 2 κατηγορίες: επιτραπέζιο ρύζι και *shuzo-kotekimai* ‘ρύζι για το σάκε’¹² (Furukawa 2012). Και οι δύο ανήκουν στο υποείδος *japonica*. Σημειώνεται ότι το σάκε στη Ιαπωνία παράγεται και από επιτραπέζιο ρύζι (Furukawa 2012), δηλαδή πρακτικά θεωρούνται κατάλληλες όλες οι ποικιλίες *japonica*, ενώ οι ποικιλίες *indica* κρίνονται ακατάλληλες για την παραγωγή του σάκε με προβλήματα στην σακχαροποίηση και άρωμα (Yoshizawa 2004b).

¹¹ Για πιο λεπτομερή ανάλυση σχέσης αυτών των δύο μεγάλων υποειδών και μικρότερων ομάδων των ποικιλιών του ρυζιού βλ. (Garris 2005).

¹² Παραδείγματα ποικιλιών που φυτεύονται για το σάκε είναι Yamadanishiki, Gohyakumangoku, Omachi, Miyamanishiki, Hyogokitanishiki, εκ των οποίων η καλύτερη θεωρείται η πρώτη (Furukawa 2012).



Εικ. 2.12 Οι κόκκοι του ρυζιού a) ποικιλία του σάκε Hyogokitanishiki b) επιτραπέζιο ρύζι Koshihikari. Στο πρώτο φαίνεται ο λεγόμενος λευκός πυρήνας (Furukawa 2012).

Σημαντικό χαρακτηριστικό των *shuzo-kotekimai* ποικιλιών είναι ο “λευκός πυρήνας”, *shinpraku*. Το *shinpraku* είναι οι ελεύθεροι κόκκοι αμύλου, οι οποίοι συγκεντρώνονται στο κέντρο του σπόρου. Τέτοια δομή αφήνει την άτμιση να γίνεται ομοιόμορφα, το άμυλο είναι πιο προσβάσιμο στα ένζυμα του μύκητα και τελικά παρατηρείται αυξημένη παραγωγή σακχάρων, ενώ επιτραπέζιο ρύζι αποδίδει περισσότερα αμινοξέα και λιγότερα σάκχαρα (Yoshizawa 2004b).

Για την πρώτη αξιοποίηση του ρυζιού για την παραγωγή σάκε λαμβάνονται υπ’όψη χρησιμοποιούνται τρεις βασικοί παράγοντες: μάζα χιλίων κόκκων¹³, ειδικό βάρος και υγρασία. Για τα *japonica* της Ιαπωνίας η μάζα χιλίων κόκκων κυμαίνεται μεταξύ 20 και 30g, με 25g να θεωρούνται το πιο κατάλληλο μέγεθος των κόκκων. Ειδικό βάρος κυμαίνεται μεταξύ 1.36 και 1.44, με την πιο χαμηλή ένδειξη να θεωρείται καλύτερη αφού σημαίνει τη πιο κατάλληλη δομή του σπόρου (“λευκός πυρήνας”). Η υγρασία των φρέσκων κόκκων ρυζιού κατάλληλου για την παραγωγή του σάκε παρατηρείται να είναι 14-15%. Σε περίπτωση πιο υψηλής υγρασίας οι κόκκοι γίνονται πιο εύθραυστοι και σπάνε κατά τη λείανση χαμηλώνοντας την απόδοσή της. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιούνται πριν την πρώτη επεξεργασία (δηλαδή στο καστανό ρύζι) (Yoshizawa 2004b).

Το κύριο συστατικό των κόκκων του ρυζιού είναι οι υδατάνθρακες, πρώτα απ’ όλα το άμυλο (~90% επί ξηρού βάρους για λευκό ρύζι). Το άμυλο στο ρύζι βρίσκεται σε 2 βασικές μορφές: αμυλόζη και αμυλοπηκτίνη (Fitzgerald 2004). Και τα 2 είναι πολυμερή γλυκόζης. Τα μόρια αμυλοπηκτίνης έχουν πολλές διακλαδώσεις ενώ τα μόρια της αμυλόζης έχουν ελάχιστες

¹³ Η μάζα χιλίων κόκκων πρακτικά αποτελεί μια μέτρηση μεγέθους των κόκκων.

διακλαδώσεις. Το ποσοστό της αμυλόζης διαφέρει ανάλογα τη ποικιλία, και θεωρείται βασικός παράγον αξιολόγησης ρυζιού ως προς τη μαγειρική αξία. Οι κόκκοι αμύλου που στερούνται αμυλόζης λέγονται “κερένιοι” επειδή φαίνονται θολά, υπάρχουν ποικιλίες ρυζιού οι οποίοι δεν έχουν καθόλου αμυλόζη. Επίσης οι ποικιλίες διαφέρουν ανάλογα το ποσοστό της αμυλόζης που διαλύεται στο ζεστό νερό κατά τη ζελατινοποίηση. Σημειώνεται ότι αυτό το ποσοστό επηρεάζει τη δομή και χαρακτηριστικά του μαγειρεμένου ρυζιού (π.χ. αν κολλάει ή όχι) (Fitzgerald 2004).

Δομή των κόκκων αμύλου και αναλογία αμυλόζης/αμυλοπηκτικής παίζει μεγάλο ρόλο στο κατά πόσο “κολλάει” το μαγειρεμένο ρύζι. Οι περισσότερες ιαπωνικές ποικιλίες *japonica* χαρακτηρίζονται από χαμηλή περιεκτικότητα σε αμυλόζη (12-20%), και “κολλάνε”. Σε αυτό το χαρακτηριστικό συνεισφέρει η αμυλοπηκτική και ειδικά η αμυλοπηκτική μικρών αλυσίδων¹⁴ (Ayabe 2009). Στις 7 ποικιλίες ρυζιού που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή του σάκε η περιεκτικότητα σε αμυλόζη βρέθηκε να είναι 15.2-20.2%¹⁵, και αναλογία αμυλοπηκτικής μικρών προς μεγάλων αλυσίδων 2.7-3.5. Αυτά τα χαρακτηριστικά δε διαφέρουν σημαντικά για τις επιτραπέζιες ποικιλίες *japonica* και για τις ποικιλίες του σάκε (Okuda 2006). Σημειώνεται ότι ο σημαντικότερος παράγοντας της προσβασιμότητας του αμύλου είναι ο αργός ρυθμός αναδρομής του αμύλου μετά την ζελατινοποίηση, επειδή στις συνθήκες παραγωγής του σάκε ευνοείται η διεργασία αυτή, δηλαδή η επιστροφή του αμύλου στην αρχική του κατάσταση μη-προσβάσιμη στα ένζυμα. Ο αργός ρυθμός αναδρομής αμύλου συνδέεται με την υψηλή περιεκτικότητα σε αμυλοπηκτικής μικρών αλυσίδων (Okuda 2006). Γενικά οι ποικιλίες *japonica* χαρακτηρίζονται από πιο υψηλό ποσοστό της αμυλοπηκτικής μικρών αλυσίδων από τις ποικιλίες *indica*, ειδικά *japonica sensu stricto* (ή *temperate japonica*) (Nakamura 2002).

Η δομή και η σύσταση των κόκκων αμύλου και επομένως η προσβασιμότητα αμύλου στα ένζυμα του κότζι επηρεάζεται και από τις κλιματολογικές συνθήκες κατά την ωρίμανση του ρυζιού. Η υψηλή θερμοκρασία αέρα κατά την ωρίμανση του ρυζιού επηρεάζει αρνητικά τη προσβασιμότητα του αμύλου στα ένζυμα και ευνοεί τη σύνθεση της αμυλοπηκτικής μεγάλων αλυσίδων. Με άλλα λόγια, ζεστός καιρός κατά την ωρίμανση οδηγεί στη μείωση απόδοσης της παραγωγής και στο μεγαλύτερο ποσοστό μη-διαλυτών υπολειμμάτων (*sakekasu*).

Το δεύτερο βασικό συστατικό του ρυζιού είναι οι πρωτεΐνες με 6-8% στο καστανό ρύζι και 4-6% στο ρύζι με βαθμό λείανσης 70%. Γενικά στη παραγωγή του σάκε προτιμάται το ρύζι με χαμηλότερο ποσοστό πρωτεϊνών. Οι καλύτερες ποικιλίες για το σάκε χαρακτηρίζονται από

¹⁴ Short chain amylopectin.

¹⁵ Του συνολικού αμύλου.

χαμηλό ποσοστό πρωτεϊνών. Προϊόντα ενζυμικής υδρόλυσης πρωτεϊνών (αμινοξέα και ολιγοπεπτιδία) συνεισφέρουν στον τελικό γευστικό προφίλ του σάκε με διαφορετικούς τρόπους αλλά κυρίως αρνητικά¹⁶. Μια από τις βασικές πρωτεΐνες του κόκκου του ρυζιού είναι η γλουτελίνη. Η συγκέντρωση της γλουτελίνης είναι ανάλογη της συγκέντρωσης αμινοξέων και ολιγοπεπτιδίων στο τελικό προϊόν. Μελετήθηκε το γευστικό προφίλ του σάκε φτιαγμένο από μεταλλαγμένο ρύζι με χαμηλή παραγωγή της γλουτελίνης. Το σάκε αυτό κρίθηκε να έχει πάρα πολύ καλά γευστικά και αρωματικά χαρακτηριστικά εσπεριδοειδών. Οι πρωτεΐνες είναι και μια κύρια πηγή θείου στο σάκε, το οποίο συνεισφέρει στη δημιουργία των αρνητικών αναγωγικών αρωμάτων κατά την παλαίωση του σάκε (Okuda 2019).

Μελετάται και η επιρροή άλλων συστατικών του ρυζιού στην ποιότητα του τελικού προϊόντος. Οι συγκεντρώσεις των φαινολικών και πιθανόν επικίνδυνων ανόργανων στοιχείων (π.χ. καδμίου, κέσιου) ρυθμίζονται με τη λείανση με διαφορετική αποδοτικότητα (Okuda 2019). Ειδικά για το φαινολικό οξύ σημειώνεται ότι η απελευθέρωσή του από τους κόκκους του ρυζιού συνδέεται με τη δράση της φερουλοϋλεστεράσης του *A. oryzae*, η παραγωγή της οποίας όμως εξαρτάται από τη συγκέντρωση των φαινολικών οξέων στην πρώτη ύλη. Επομένως η μείωση των ποσοστών των φαινολικών στην πρώτη ύλη (π.χ. με τη λείανση) επηρεάζει άμεσα τη συγκέντρωσή τους στο τελικό προϊόν¹⁷ (Ito 2014). Η επιρροή των λιπιδίων κρίνεται και αυτή γενικά αρνητική και ρυθμίζεται με τη λείανση (από 2-3% στο καστανό ρύζι σε <0.1% στο ρύζι με βαθμό λείανσης 75%) (Yoshizawa 2004b).

Για την διεξαγωγή του πρακτικού μέρους της εργασίας μας έχουμε επιλέξει να χρησιμοποιήσουμε το ρύζι *Calrose*¹⁸. Το ρύζι *Calrose* ανήκει στο υποείδος *japonica*, χαρακτηρίζεται από τους κόκκους μεσαίου μήκους και χαμηλή περιεκτικότητα σε αμυλόζη¹⁹ (Moldenhauer 2004). Επίσης το *Calrose* χαρακτηρίζεται από σχετικά μεγάλο ποσοστό της αμυλοπηκτικής μικρών αλυσίδων (Chung 2011).

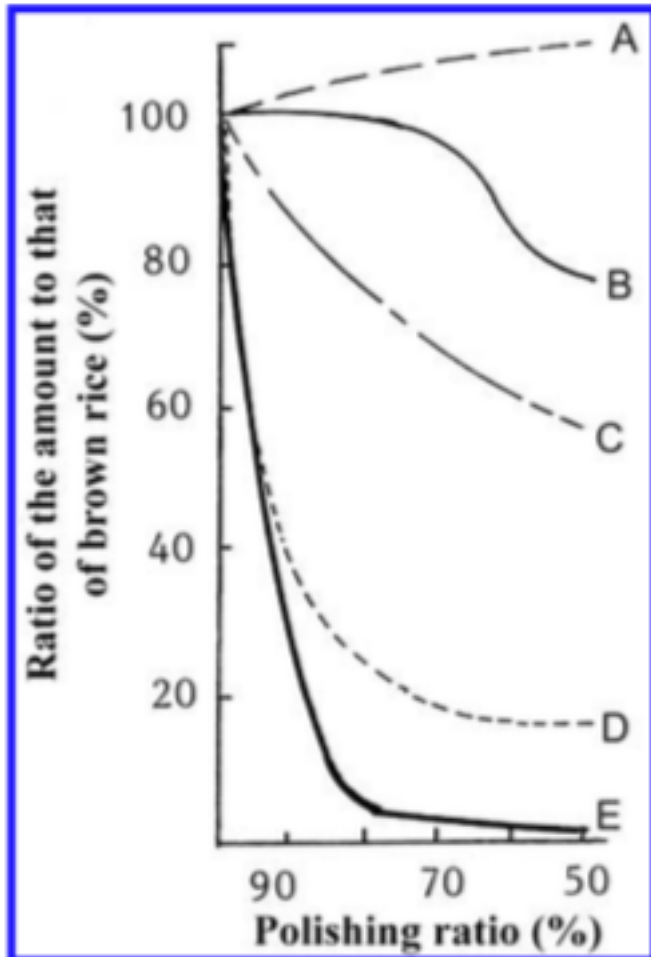
¹⁶ Ειδικά αναφέρεται πικρή γεύση μερικών ολιγοπεπτιδίων τα οποία σχηματίζονται κατά τις συνθήκες αλκοολικής ζύμωσης του σάκε (Maeda 2011).

¹⁷ Τα φαινολικά συνεισφέρουν στην πικράδα και στυφάδα του σάκε, και τα δύο θεωρούνται αρνητικά χαρακτηριστικά του γευστικού προφίλ.

¹⁸ Το ρύζι αυτό κρίθηκε να είναι κατάλληλο για την παραγωγή σάκε και ικανοποιητικό από την άποψη διαθεσιμότητας και κόστους. Στην πράξη *Calrose* είναι μια οικογένεια ποικιλιών αλλά για τους σκοπούς της έρευνάς μας αυτό δεν έχει ιδιαίτερη σημασία. Για την ιστορία της *Calrose* βλ. (Moldenhauer 2004: 51).

¹⁹ Για παράδειγμα στο (Moldenhauer 2004) αναφέρονται 4 ποικιλίες *Calrose* με το ποσοστό της αμυλόζης να κυμαίνεται σε 16.9-18.4%.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η λείανση είναι ένα πολύ σημαντικό στάδιο της κατεργασίας του ρυζιού για σάκε. Η σύσταση της πρώτης ύλης επηρεάζεται σημαντικά από τη λείανση. Τα συστατικά διανέμονται ανομοιόμορφα στο κόκκο του ρυζιού με το περικάρπιο να είναι πιο πλούσιο σε πρωτεΐνες και λιπίδια ενώ προς το κέντρο του κόκκου αυξάνει το ποσοστό αμύλου.



Εικ. 2.13 Αλλαγές στα ποσοστά των κύριων συστατικών του ρυζιού με την αλλαγή του βαθμού λείανσης. A - άμυλο, B - υγρασία, C - πρωτεΐνες, D - μεταλλικά στοιχεία, E - λιπίδια (Yoshizawa 2004b).

Με τη λείανση αφαιρούνται οι εξωτερικές στρώσεις του κόκκου με αποτέλεσμα το ποσοστό αμύλου στην πρώτη ύλη να αυξηθεί και ποσοστό άλλων ανεπιθύμητων συστατικών να μειωθεί. Βαθμός λείανσης επηρεάζει και την ικανότητα ρυζιού να απορροφά το νερό κατά το πλύσιμο και την άτμιση. Με τη μείωση του βαθμού λείανσης (και επομένως με την αύξηση του ποσοστού του αμύλου) αυξάνεται η απορρόφηση νερού κατά τα αντίστοιχα στάδια παραγωγής (Mizuma 2014).

Βαθμός λείανσης επιτραπέζιου λευκού ρυζιού μπορεί να εκτιμηθεί να είναι 90-92% (Okuda 2019)²⁰.

Σε μια πειραματική διαδικασία παραγωγής σάκε η οποία διεξάχθηκε κατά την ερευνά μας έχουμε αποφασίσει να χρησιμοποιήσουμε μια εναλλακτική πηγή αμύλου - κάστανα (καρποί *Castanea sativa*). Η χρήση των κάστανων για την παραγωγή αλκοολούχου ποτού με τη χρήση διαδικασίας παρόμοιας με την παραγωγή σάκε έχει αναφερθεί στο (Murado 2008), όπου επιδείχθηκε η δυνατότητα της παραγωγής “κότζι”, “moto” και “mogomi” με τη χρήση 100% κάστανων αντί ρυζιού. Τα κάστανα επίσης χρησιμοποιούνται ως συμπληρωματική πηγή αμύλου κατά την παραγωγή του *shochu*²¹ (Murado 2008) και δεν περιέχουν γλουτένη.

Όπως και το ρύζι, τα κάστανα περιέχουν άμυλο σε 2 βασικές μορφές: αμυλόζη και αμυλοπηκτίνη, με την αμυλόζη να αναφέρεται να έχει 21.5% (Demiate 2001). Το ποσοστό του αμύλου στα κάστανα επί ξηρού διαφέρει στη βιβλιογραφία, αυτό όμως μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι μελετώνται διαφορετικές ποικιλίες κάστανων και οι ποικιλίες διαφέρουν σημαντικά στα ποσοστά αμύλου (για τις διαφορετικές ποικιλίες αναφέρονται στη βιβλιογραφία ποσοστά επί ξηρού 56-71% για ψημένα κάστανα χωρίς φλούδα (Silva 2016), ~80% χωρίς φλούδα (Demiate 2001), 48-53% για ακατέργαστα κάστανα με φλούδα (σκληρό σκούρο περικάρπιο) (de Vasconcelos 2009a), και τελικά 38-80% (Kan 2016)). Στο (Murado 2008) το ποσοστό υδατανθράκων στα κάστανα εκτιμάται να είναι 37%. Το ποσοστό της αμυλόζης επίσης διαφέρει σημαντικά (από 18.3% μέχρι 32.9% (Cruz 2013)). Τα κάστανα επίσης περιέχουν σημαντικό ποσοστό ελεύθερων σακχάρων (πρώτα απ’ όλα σακχαρόζης) με αναφερόμενα ποσοστά 6.6-19.5% (de Vasconcelos 2010). Το ποσοστό επί ξηρού των πρωτεϊνών κυμαίνεται 4.1-5.8% (de Vasconcelos 2009b), και λιπιδίων ~5% (Demiate 2001).

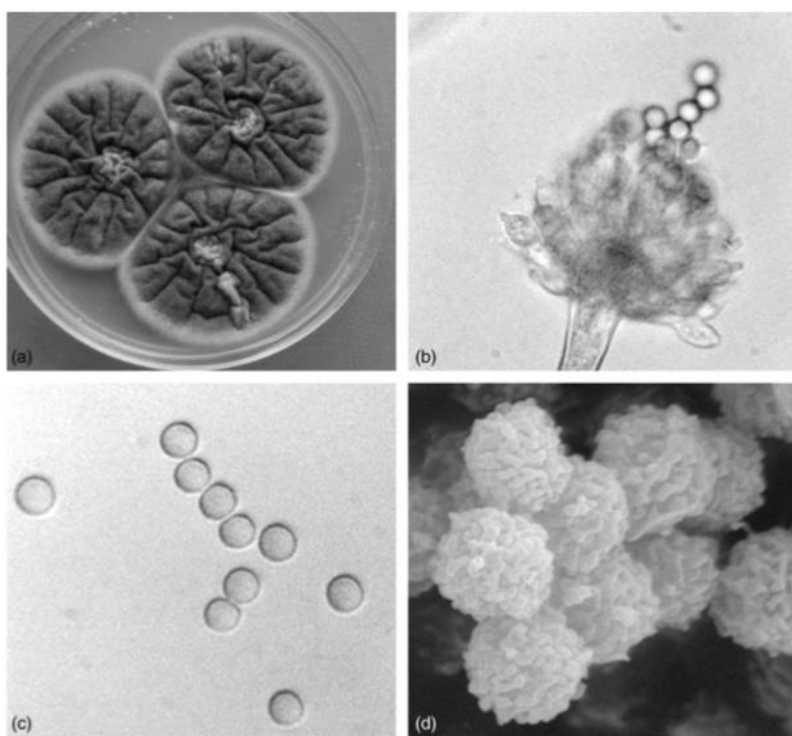
²⁰ Λόγω κόστους αναγκαστήκαμε να παραλείψουμε την περαιτέρω λείανση.

²¹ Παραδοσιακό γιαπωνέζικο “απόσταγμα του σάκε”.

2.2.2 *Aspergillus oryzae* - μύκητας του κότζι

Το κότζι παράγεται από το ρύζι με τη βοήθεια του μύκητα *Aspergillus oryzae*. Οι *Aspergilli* ταξινομικά ανήκουν στους ασκομύκητες²², μορφολογικά στους ευρωτομύκητες και “τα χαρακτηριστικά έχουν πολύ μεγάλη παθολογική, γεωπονική, βιομηχανική, φαρμακευτική, επιστημονική και πολιτισμική σημασία” (Baker 2007).

Ο *Aspergillus oryzae* παρουσιάζει ένα ενδιαφέρον παράδειγμα “εξημερωμένου” μύκητα. Κατά τη ζύμωση στερεάς φάσης (στην παραγωγή του κότζι) ο μύκητας παράγει μεγάλες ποσότητες



Εικ. 2.14 *Aspergillus caespitosus*. A - αποικίες, B - κωνιδιοφόροι, C - κωνίδια (3.5-4.5 μm σε διάμετρο), D - 8000x φωτογραφία κωνιδίων (Baker 2007)

των εξωκυτταρικών υδρολασών, πρώτα απ’ όλα αμυλασών και πρωτεασών, και η σημασία αυτών των ενζύμων στη παραγωγή του σάκε έχει αναφερθεί νωρίτερα. Στις συνθήκες ζύμωσης στερεάς φάσης παραγωγή αυτών των ενζύμων ευνοείται ιδιαίτερα (Abe 2007).

²² Το έργο της οριστικής ταξινόμησης των *Aspergilli* δεν έχει ολοκληρωθεί και πολύ συχνά τα τελειομορφικά και αναμορφικά στάδια περιγράφονται ως διαφορετικά είδη και γένη. Οι σύγχρονες έρευνες βασίζονται στις πληροφορίες γενετικής και δέχεται ότι οι *Aspergilli* είναι αναμορφικά στάδια των ασκομυκήτων, π.χ. *A. nidulans* είναι αναμορφικό στάδιο της *Emericella nidulans* (Baker 2007).

Το κότζι μπορεί να παραχθεί με διαφορετικά είδη μυκήτων. Μελετήθηκε αποτελεσματικότητα της υδρόλυσης αμύλου στα κότζι φτιαγμένα με χρήση διαφορετικών ειδών μυκήτων (*A. oryzae*, *A. niger*, *A. awamori*, *A. usamii* mut. *shiro-usamii*, *Rhizopus oligosporus*²³) υπό διαφορετικές συνθήκες. Το κότζι του *A. oryzae* βρέθηκε να είναι το πιο αποτελεσματικό ως προς την υδρόλυση αμύλου υπό τις συνθήκες αυξημένης συγκέντρωσης αλκοόλης (12.5% και 35%) (Oyashiki 1989).

Γενετικά *A. oryzae* βρίσκεται πολύ κοντά στα “άγρια” είδη (πρώτα απ’ όλα στο *A. flavus* που είναι γνωστός να παράγει πολύ επικίνδυνο καρκινογόνο, την αφλατοξίνη) και παρέχει θεωρητικά τα γονίδια για την παραγωγή της τοξίνης. Αλλά τα γονίδια αυτά δεν είναι γνωστό να εκφράζονται και το *A. oryzae* (και γειτονικό *A. sojae*) θεωρούνται ελεύθερα από την τοξίνη (Machida 2008: 175)²⁴. Το γονιδίωμα του *A. oryzae* είναι 20% μεγαλύτερο από το γονιδίωμα του *A. fumigatus* και *A. nidulans*. Οι περισσότερες “προσθήκες” συσχετίζονται με τη σύνθεση αμυλασών, με τη μεταφορά τους έξω από το κύτταρο και με μερικά άλλα ένζυμα που εκφράζονται κατά τη ζύμωση στερεάς φάσης (Machida 2008). Από την άλλη τα ίδια γονίδια βρίσκουμε και στο επικίνδυνο συγγενή του *A. oryzae* - *A. flavus*. Όπως και με τη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*, δεν μπορούμε να υποστηρίξουμε ότι έχουμε βρει το γενετικό “μοριακό σήμα” της εξημέρωσης του *A. oryzae* (Rokas 2009).

Και όμως η παραγωγή κότζι εδώ και χρόνια δε βασίζεται στα “άγρια” αερομεταφερόμενα στελέχη. Από την εποχή του Muromachi (14ο-16ο αιώνες) οι παραγωγοί του σάκε προμηθεύονται *tane koji* (τα κονίδια του *A. oryzae*) από ειδικούς επαγγελματίες (Kitamoto 2002). Ειδικά στελέχη χρησιμοποιούνται για τη παραγωγή του κότζι το οποίο θα χρησιμοποιηθεί για το σάκε, άλλα στελέχη - για άλλα προϊόντα, π.χ. το miso και σάλτσα σόγιας. Σημειώνεται ότι στη παραγωγή του κότζι για το σάκε προτιμώνται στελέχη με τη μεγαλύτερη παραγωγή αμυλολυτικών ενζύμων, ενώ στη παραγωγή του κότζι για τη σάλτσα σόγιας χρησιμοποιούνται στελέχη με την ευνοημένη παραγωγή των πρωτεασών. Επίσης τα στελέχη

²³ Χρησιμοποιείται στη παραγωγή *tempeh*.

²⁴ Αν και στη βιβλιογραφία υπάρχουν και παρατηρήσεις της παραγωγής της αφλατοξίνης από κάποια στελέχη του *A. oryzae*, πιθανότατα οφείλεται στη λάθος ταυτοποίηση του μύκητα που μορφολογικά βρίσκεται πολύ κοντά σε άλλα είδη της ομάδας *A. flavus* (Sosa 2013: 30).

A.oryzae για το σάκε πρέπει να παράγουν ελάχιστη πεπτιδάση, λιγότερη τυροσινάση και αποφερριχρυσίνη²⁵ (Kitamoto 2002, Abe 2007).

Διότι δε βρήκαμε ευκαιρία να προμηθευτούμε τα συγκεκριμένα στελέχη του *A. oryzae* για το σάκε στην Ελλάδα, αποφασίσαμε να χρησιμοποιήσουμε διαθέσιμο προς διαδικτυακή παραγγελία²⁶ στέλεχος, το οποίο προσδιορίζεται για την παραγωγή του αμαζάκε (συγγενικού ποτού από κότζι και ρύζι με χαμηλή περιεκτικότητα σε αλκοόλ).

2.2.3 Διαδικασία και συνθήκες παραγωγής κότζι.

Ο γενικός σκοπός της παραγωγής του κότζι για το σάκε είναι: γρήγορη ανάπτυξη των υφών του μύκητα και πρόσβασή τους στο κεντρικό πυρήνα του κόκκου, μέγιστη παραγωγή αμυλάσων, ελάχιστη παραγωγή καρβοξυπεπτιδάσης και τυροσινάσης, παραγωγή αρωματικών ουσιών και ελάχιστη παραγωγή χρωστικών (Kitamoto 2002: 133). Τα βασικά της διαδικασίας παραγωγής του κότζι έχουν αναφερθεί νωρίτερα.

2.2.3.1 Χρήση του ατμισμένου ρυζιού.

Ως υπόστρωμα στην παραγωγή του κότζι χρησιμοποιείται ατμισμένο ρύζι. Πριν την άτμιση το ρύζι ενυδατώνεται και πλένεται. Ο σκοπός είναι να αυξηθεί η υγρασία του κόκκου του ρυζιού στα 20-30% για να διευκολυνθεί η πρόσβαση της θερμότητας κατά την άτμιση στο εσωτερικό του ρυζιού (Yoshizawa 2004b: 554). Επίσης κατά το πλύσιμο απομακρύνονται τυχαία ξένα σωματίδια. Ρυθμός ενυδάτωσης επηρεάζεται από την ποικιλία, από την αρχική υγρασία και θερμοκρασία νερού. Ο απαιτούμενος χρόνος να φτάσει η υγρασία του ρυζιού μέχρι τον κορεσμό αυξάνεται όσο χαμηλότερη είναι η αρχική υγρασία και όσο χαμηλότερη είναι η θερμοκρασία νερού (Mizuma 2007). Η επιρροή της λείανσης σ' αυτήν την παράμετρο δεν είναι τόσο σαφής. Σημειώνεται ότι περισσότερη σημασία παίζει η δομή του κόκκου, η διασπορά των συστατικών και παρουσία *shinraku* (Mizuma 2014). Μπορεί να υποστηριχθεί όμως ότι στις



Εικ. 2.15 Φωτογραφία συσκευασίας επιλεγμένου για το πείραμα στελέχους *A.oryzae*.

²⁵ Deferrichrysin (deferriferrichrysin) - μια πρόδρομη ουσία για την φερριχρυσίνη, η οποία παίζει κύριο ρόλο στο σκούριασμα (browning) του σάκε. Πιο λεπτομερώς θα αναφερθεί αργότερα.

²⁶ Μέσω συστήματος eBay, στέλεχος Chouhaku-kin παραγωγής Hishiroku από τον προμηθευτή japanproductshop.

συνθήκες εργαστηρίου σε 80-100 λεπτά παραμονής στο νερό θερμοκρασίας 15-25°C οι κόκκοι του ρυζιού είναι κορεσμένοι σε νερό. Στη βιομηχανία όμως η διαδικασία αυτή παίρνει 3-20 ώρες (Yoshizawa 2004b). Κατά την ενυδάτωση αλλάζει και η σύσταση των κόκκων: τα ιόντα καλίου K^+ και ελεύθερα σάκχαρα απομακρύνονται ενώ απορροφώνται ιόντα ασβεστίου και σιδήρου (Yoshizawa 2004b).

Η διαδικασία της άτμισης έχει αναφερθεί νωρίτερα. Κατά την άτμιση, το άμυλο μετατρέπεται σε προσβάσιμη σε ένζυμα ζελατινοποιημένη μορφή, ενώ οι πρωτεΐνες μετουσιώνονται και γίνονται πιο ανθεκτικές στην πρωτεασική δράση. Αυξάνει την προσβασιμότητα και η μερική καταστροφή των κυτταρικών τοιχωμάτων του ενδοσπερμίου. Ταυτόχρονα απομακρύνονται από το ρύζι μερικώς τα λιπαρά οξέα. Σημαντικό είναι και το ότι κατά την άτμιση το ρύζι “απολυμαίνεται”. Σημειώνεται ότι 15-20 λεπτά είναι επαρκή για τη μετατροπή αμύλου, πρωτεϊνών και για την απορρόφηση του νερού, αλλά χρειάζονται τουλάχιστον 45 λεπτά για την απομάκρυνση των λιπαρών οξέων (Yoshizawa 2004b: 555). Κατά την άτμιση το ρύζι απορροφά επιπλέον νερό σε ποσότητα 7-12% της αρχικής μάζας του ρυζιού (Yoshizawa 2004a: 163).

Όπως έχει αναφερθεί νωρίτερα, μετά από την άτμιση το ρύζι κρυώνεται μέχρι ~40°C και εμβολιάζεται με τα κονίδια του μύκητα αν προσδιορίζεται για την παραγωγή κότζι ή μέχρι ~10°C αν προστίθεται όπως πρώτη ύλη κατά τη ζύμωση.

2.2.3.2 Υγρασία υποστρώματος και υγρασία του αέρα κατά τη ζύμωση του *A. oryzae*.

Η υγρασία του ατμισμένου ρυζιού το οποίο προετοιμάστηκε με τον παραδοσιακό τρόπο και είναι έτοιμο για το εμβόλιο κότζι αναφέρεται να είναι ~35% (Kitamoto 2002: 132). Σχετική υγρασία του αέρα στα παραδοσιακά δωμάτια *koji-muro* ρυθμίζεται σε 80-90% (Yoshizawa 2004a: 166) ή ακόμη και 96% (Liu 1997: 228). Αποδεικνύεται και από τις σύγχρονες μελέτες των ζυμώσεων στερεάς φάσης με τους *Aspergilli* ότι απαιτείται υψηλή υγρασία του υποστρώματος. Η μεγαλύτερη δραστηριότητα καλλιέργειας *A.oryzae* ως προς την αμυλάση παρατηρήθηκε με την υγρασία υποστρώματος 60% (ζύμωση στερεάς φάσης στα πίτουρα σιταριού) (Karr 2014), 76.25% (ειδικά κατασκευασμένα υποστρώματα με βάση σόγια, άμυλο, διαφορετικά βιομηχανικά απόβλητα) (Sahnoun 2015). Παρόμοιο νούμερο (70%) βρέθηκε για την πεκτινάση του *A. oryzae* στο (Koser 2014). Η βέλτιστη υγρασία του αέρα κατά την παραγωγή του κότζι αναφέρεται να είναι 75% (Lin 2014).

Η διαφορά στην υγρασία “της παραδοσιακής μεθόδου” και “προτεινόμενης σύγχρονης βιοτεχνολογικής μεθόδου” πιθανόν οφείλεται στο γεγονός ότι βιοτεχνολογική εφαρμογή

κυνηγά πρώτα απ' όλα την αποδοτικότητα της πρώτης ύλης σε ένα προϊόν (π.χ. ένζυμο), ενώ παραγωγή του κότζι (και μετά σάκε ή σάλτσας σόγιας) απαιτεί πιο περιπλοκή προσέγγιση γιατί η αξία (και η υπεραξία) του τελικού προϊόντος βασίζεται σε πολλούς παράγοντες, π.χ. αρωματικό προφίλ. Τα πτητικά αρωματικά τα οποία παράγονται από το *A. oryzae* όχι μόνο συνεισφέρουν στην ποιότητα του τελικού προϊόντος, αλλά και παρουσιάζουν σημαντικό κριτήριο επιλογής της στιγμής να “τρυγηθεί” το κότζι. Τα περισσότερα αρωματικά που στο σύνολο αντιλαμβάνονται ως “πράσινη, χορτώδης μυρωδιά” συνδέονται με τον υψηλό ρυθμό ανάπτυξης του μυκηλίου (μεσαίο στάδιο καλλιέργειας) και το ποσοστό τους (και επομένως συνεισφορά τους στο άρωμα του κότζι) πέφτει όταν ο μύκητας προετοιμάζεται πλέον για σπορογένεση, ενώ η παραγωγή της 1-οκτεν-3-όλης (“άρωμα μανιταριών”) παραμένει σταθερή και εμφάνιση της μυρωδιάς μανιταριών στο κότζι παραδοσιακά θεωρείται σήμα ότι η καλλιέργεια είναι έτοιμη να “τρυγηθεί” (Ito 1990).

Αν και αρχική σχετική υγρασία ρυθμίζεται να είναι υψηλή, στη συνέχεια, η υγρασία χαμηλώνεται προς το τέλος της καλλιέργειας (Yoshizawa 2004a). Στις διαφορετικές ερασιτεχνικές πηγές αναφέρεται ότι με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται η καλύτερη διείσδυση του μυκηλίου στο εσωτερικό των κόκκων αλλά το φαινόμενο αυτό εξ όσων γνωρίζουμε δεν έχει μελετηθεί λεπτομερώς.

Κατά την πειραματική παραγωγή αποφασίσαμε να ακολουθούμε την παραδοσιακή μέθοδο με την υγρασία υποστρώματος ~35% και υψηλή (90-100%) υγρασία του αέρα κατά το πρώτο στάδιο με πτώση της προς το τέλος.

2.2.3.3 Θερμοκρασία καλλιέργειας.

Παραδοσιακά η θερμοκρασία κατά την παραγωγή του κότζι για το σάκε ρυθμίζεται να είναι 30°C στον εμβολιασμό και 38-42°C στην καλλιέργεια, χωρίς όμως να ξεπερνάει τους 42°C (Kitamoto 2002: 132). Περιληπτικά η παραδοσιακή μέθοδος προβλέπει σταδιακό ανέβασμα από 30° σε 43° στο τέλος (Yoshizawa 2004a: 167-168). Κατά την παραγωγή του κότζι για τη σάλτσα σόγιας όμως η θερμοκρασία ρυθμίζεται να είναι πιο χαμηλή, με το μέγιστο 38°C και 29°C μετά τις πρώτες 24 ώρες (μετά το δεύτερο ανακάτεμα) (O'toole 2019). Η διαφορά αυτή εξηγείται με την επιρροή της θερμοκρασίας στην ενζυμική δράση: με την αύξηση της θερμοκρασίας καλλιέργειας αναστέλλεται η δράση των πρωτεασών του *A. oryzae* (Suzuki 1956, Kitano 2002). Η πρωτεολυτική δράση είναι επιθυμητή κατά την παραγωγή της σάλτσας σόγιας, ενώ ανεπιθύμητη στην παραγωγή του σάκε.

Για τις εργαστηριακές καλλιέργειες των *Aspergilli* στη βιβλιογραφία αναφέρονται θερμοκρασίες 30°C (Shafique 2009), 32-39°C (*A. oryzae* στο ρύζι, Morita 1966), 30°C (Karri 2014), 30°C (Sahnoun 2015), 33°C (*A. oryzae* σε αιματάλευρο, Zheng 2014), 35°C (Koser 2014). Για τις συνθήκες παραγωγής το κότζι αναφέρονται βέλτιστες (ως προς την αμυλολυτική δράση) θερμοκρασίες εμβολίου 35°C, και καλλιέργειας 37°C (Lin 2014).

Κατά την πειραματική παραγωγή του κότζι αποφασίσαμε να ακολουθούμε το παραδοσιακό πρωτόκολλο με εμβόλιο σε ~30-35°C και θερμοκρασία καλλιέργειας 38-40°C.

2.2.3.4 Παροχή αέρα (αερόβιες συνθήκες).

Ο *Aspergillus oryzae* είναι αερόβιος μύκητας και δεν επιβιώνει στις αναερόβιες συνθήκες. Η δραστηριότητα της εξωκυτταρικής αμυλάσης του *A. oryzae* εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα του οξυγόνου, μικρότερη διαθεσιμότητα οδηγούσε στη χαμηλότερη δραστηριότητα (Sahnoun 2015). Με τη μείωση διαθεσιμότητας του οξυγόνου μειώνεται και ειδικός ρυθμός παραγωγής της α-αμυλάσης (Rahardjo 2005). Παραδοσιακά η παροχή οξυγόνου ρυθμίζεται με καλό αερισμό των δωματίων, περιορισμό πάχους της στρώσης του ρυζιού στην καλλιέργεια με μερικά cm, απουσία υγρού νερού και ανακάτεμα²⁷.

Για την πειραματική παραγωγή του κότζι έχουμε προγραμματίσει απαιτούμενες διεργασίες ώστε να επιτευχθεί παροχή οξυγόνου στην καλλιέργεια.

2.2.3.5 pH υποστρώματος.

Παραδοσιακά κατά την παραγωγή κότζι για το σάκε δεν προβλέπεται διόρθωση pH, θεωρείται κατάλληλο το φυσικό pH²⁸ του ατμισμένου ρυζιού, ενώ στην αναπαραγωγική καλλιέργεια²⁹ (*tane koji*) χρησιμοποιείται στάχτη για αλλαγή του pH σε ελαφρά αλκαλικό (Kitamoto 2002: 133). Κατά την παραγωγή του κότζι ο κύριος σκοπός όσον αφορά τις αμυλάσες είναι να παραχθούν σε αρκετή ποσότητα και να παραμένουν σταθερές. Σημειώνεται ότι κατά τη ζύμωση του κότζι το pH αλλάζει τείνοντας προς pH 6 (Yamamoto 1957). Οι γλυκοαμυλάσες του *A. oryzae* παραμένουν πιο σταθερά σε pH 5-6 (Mitsue 1979). Παρόμοιο περιθώριο σταθερότητας παρατηρείται και για την α-αμυλάση του *A. oryzae* (μέτρηση σε 30°C) (Eriksen 1998). Βέλτιστη

²⁷ Ειδικά αναφέρεται η σημασία του πρώτου ανακατέματος για να σπάσει το νεαρό μυκήλιο και να αποφευχθεί η συσσώρευση των κόκκων ρυζιού. Σημειώνεται επίσης ότι η μελέτη της μηχανικής των ζυμώσεων στερεάς φάσης βρίσκεται σε αρχικό στάδιο (Schutyser 2003).

²⁸ Το οποίο μπορεί να εκτιμηθεί να είναι pH 6.0-7.0 για το φρέσκο και μαγειρεμένο ρύζι (Moulavi 2018, Shah 2013).

²⁹ Δηλαδή για την παραγωγή σπορίων

παραγωγή της α-αμυλάσης βρέθηκε στη ζύμωση στερεάς φάσης στα προετοιμασμένα υποστρώματα με pH 6, ενώ η ανάπτυξη του μύκητα δεν αναστέλλεται σε ευρύτερο pH 3-7 (Carlsen 1996). Το βέλτιστο pH για την παραγωγή της πρωτεάσης από το *A. oryzae* όμως βρέθηκε να είναι pH 7 σε διαφορετικά φυτικά υποστρώματα (Battaglino 1991), αλλά δεν μπορεί να υποστηριχθεί ότι η παραδοσιακή μείωση του pH βελτιώνει την απόδοση της καλλιέργειας ως προς τα κονίδια.

Ως προς τη παραγωγή ενζύμων από τους *Aspergilli* στη βιβλιογραφία αναφέρονται βέλτιστα pH 5 (Puri 2013), pH 5.8 (Alva 2007)³⁰, pH 5 (Karri 2014), pH 7.2 (Zheng 2015, σε αιματάλευρο).

Κατά την πειραματική παραγωγή αποφασίσαμε να ακολουθούμε την παραδοσιακή προσέγγιση χωρίς ειδική διόρθωση του pH στο στάδιο του κότζι.

2.2.3.6 Χρόνος επώασης.

Παραδοσιακά όλη η διαδικασία καλλιέργειας διαρκούσε 40-45 ώρες από το εμβολιασμό μέχρι το “τρύγο” (Kitamoto 2002: 133), (Liu 1997: 228). Η ιδέα είναι να “τρυγηθεί” το κότζι ακριβώς αυτή τη στιγμή όταν έχουν ήδη παραχθεί αρκετά ένζυμα, αλλά δεν έχει καταναλωθεί πολύ άμυλο για την ανάπτυξη του μύκητα και ιδιαίτερα να μην έχει ξεκινήσει ο μύκητας την προετοιμασία για την σπορογένεση.

Για την απομόνωση της γλυκοαμυλάσης ο Y. Morita χρησιμοποιεί διάρκεια καλλιέργειας 34 ώρες (Morita 1966). Κατά τις εργαστηριακές συνθήκες η μέγιστη δραστηριότητα της εξωκυτταρικής α-αμυλάσης στην καλλιέργεια *A. niger* και *A. flavus* παρατηρήθηκε στις 48 ώρες σε θερμοκρασία καλλιέργειας 30°C (Shafique 2009). Η βέλτιστη διάρκεια καλλιέργειας για την παραγωγή της α-αμυλάσης βρέθηκε να είναι 72 ώρες στο (Karri 2014). Ίδιο νούμερο βρέθηκε και στο (Zheng 2014, ως προς την ολική ενζυμική δραστηριότητα), ενώ στο (Lin 2014) αναφέρεται η διάρκεια 56 ώρες (Lin 2014, ως προς την γλυκοαμυλάση, α-αμυλάση και οξική πρωτεάση)

Στην επιλογή διάρκειας καλλιέργειας είναι σημαντικό να έχουμε υπόψη και την πιθανή παραγωγή του CPA (κυκλοπιαζονικό οξύ) γνωστό για την καρκινογόνο δράση του. Η παραγωγή του CPA ξεκινάει μετά από 50 ώρες καλλιέργειας από μερικά βιομηχανικά στελέχη του *A. oryzae*, ενώ μέσα στη περίοδο 40 ώρες στις συνθήκες της παραδοσιακής ζύμωσης στερεάς φάσης η δραστηριότητα αυτή δεν παρατηρείται (Goto 1987, quoted by Sosa 2013 &

³⁰ *Aspergillus sp. JGI 12* σε διαφορετικά υποστρώματα.

Hayashi 2005). Αν και η ποσότητα του CPA που παράγεται τείνει να είναι ελάχιστη, και μόνο μερικά στελέχη μπορούν να την παράγουν, στην πράξη το CPA έχει βρεθεί στα εμπορικά δείγματα του κότζι στη γιαπωνέζικη αγορά, αν και σε μικρό ποσοστό³¹ (Hayashi 2005).

Αυτό το γεγονός μας οδηγεί στον περιορισμό του χρόνου της επώασης κατά την πειραματική παραγωγή σε 40 ώρες ώστε να ελαχιστοποιήσουμε την πιθανότητα παραγωγής του CPA. Βέβαια θέλουμε να καταναλωθεί και όσο δυνατόν λιγότερο το άμυλο για την ανάπτυξη του μύκητα (αν και το μεγαλύτερο ποσοστό του αμύλου προστίθεται αργότερα).

2.3 Προετοιμασία *moto*. Νερό στη παραγωγή του σάκε.

2.3.1 Τι είναι το *moto*. Σκοπός του *moto*.

Το *moto* (ή *shubo*) είναι ένας παραδοσιακός τρόπος προετοιμασίας εμβολίου για την κυρία ζύμωση (Yoshizawa 2004a: 170, Gauntner 2002). Όπως έχει αναφερθεί και νωρίτερα, το *moto* επιτυγχάνει πολλούς σκοπούς. Ο βασικότερος σκοπός του *moto* είναι να παραχθεί πληθυσμός των ζυμών απαιτούμενος για την εξασφάλιση επιτυχημένης κυρίας ζύμωσης (*moromi*). Ο πληθυσμός αυτός θα είναι ήδη εγκλιματισμένος στις συνθήκες της διπλής ζύμωσης του σάκε. Επίσης κατά τη διαδικασία ζύμωσης του *moto* είτε παράγονται είτε προστίθενται οργανικά οξέα (κυρίως γαλακτικό), τα οποία συνεισφέρουν σημαντικά στη τελική γεύση του σάκε.

2.3.2 Το νερό στην παραγωγή του σάκε. Τα χαρακτηριστικά του νερού.

Η ποιότητα του νερού³² παίζει μεγάλο ρόλο στη παραγωγή του σάκε. Το νερό χρησιμοποιείται και κατά την προετοιμασία του ρυζιού για την άτμιση, και κατά την άτμιση, και πρώτα απ' όλα ως κύριο μέσο στο οποίο πραγματοποιούνται ζυμώσεις *moto* και *moromi*. Μερικά τυπικά χημικά προφίλ του νερού για το σάκε βρίσκουμε στο (Tomiyama 2013). Χημικά και ισοτοπικά ($\delta^{18}\text{O}$) προφίλ του σάκε αναλογούν στο προφίλ του νερού το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τη παραγωγή του και μπορεί να παρουσιάζει έναν τρόπο ελέγχου προέλευσης (Tomiyama 2013). Η μεγαλύτερη ποσότητα των ανόργανων στοιχείων στο σάκε προέρχονται από το ρύζι. Η διαδικασίες προετοιμασίας του ρυζιού όμως επηρεάζουν τη σύστασή του. Παραδείγματος χάρη, κατά το πλύσιμο από το ρύζι ξεπλένονται K, P, Mg και αντικαθίστανται με Ca και Na (Kano 1962a).

³¹ 1 στα 38 δείγματα (Hayashi 2005).

³² Στη παραγωγή του σάκε γενικά χρησιμοποιείται πόσιμο νερό με περιορισμένη περιεκτικότητα σε άλατα.

Από τα ανόργανα στοιχεία και ιχνοστοιχεία τα σημαντικότερα για τις ζύμες θεωρούνται Ca, Mg, Zn (Boulton 2001: 80). Ειδικά σημειώνεται και ότι το Ca^{2+} προστατεύει τη δραστηριότητα της αμυλάσης (ASRJ 1988: 246), προστατεύει την αμυλάση από τη πρωτεόλυση, ενισχύει θερμική σταθερότητα (Schomburg 1991a: 7). Στη βιβλιογραφία περιγράφεται αύξηση ενζυματικής δραστηριότητας κατά τη ζύμωση του κότζι *A. oryzae* με τη προσθήκη 0.15% CaCO_3 και 0.05% NaH_2PO_4 (Yu 2012).

Μια τυπική συγκέντρωση των στοιχείων στην αρχή της ζύμωσης του *moto* αναφέρεται στο (Kano 1962b). Ειδικά σημειώνεται η δραματική πτώση της συγκέντρωσης του καλίου και μαγνησίου με την αύξηση του πληθυσμού των ζυμών (ibid.).

Επαρκής συγκέντρωση του Mg^{2+} βρέθηκε να είναι σημαντική για την ζύμωση του πυκνού γλεύκους με υψηλή συγκέντρωση ζυμώσιμων σακχάρων με τα καλύτερα αποτελέσματα σε 700 ppm του Mg^{2+} (Udeh 2014).

Κατά την κύρια ζύμωση (*moromi*) η συγκέντρωση των K και Mg πέφτει σημαντικά λόγω αυξανόμενου πληθυσμού των ζυμών και τελικά μπορεί να μην είναι επαρκής. Ειδικά για το μαγνήσιο για την κύρια ζύμωση αναφέρεται τυπική συγκέντρωση στο *moromi* 20 ppm (Kano 1962c), η οποία σήμερα θεωρείται πιο χαμηλή από την συνιστώμενη για μια υγιή ζύμωση (42.5 ppm) (Rees 1997). Η διαθεσιμότητα του μαγνησίου είναι πολύ σημαντική για την αύξηση του πληθυσμού, της παραγωγής αλκοόλης και της αντοχής των ζυμών στην υψηλή αλκοόλη (Rees 1997). Η σημασία αυτή για την ανθεκτικότητα των ζυμών κατά τις συνθήκες του στρες επιβεβαιώνεται και από τις άλλες πηγές (βλ. ευρύτερη βιβλιογραφία στο (Udeh 2013)).

Ένας άλλος πολύ σημαντικός παράμετρος του νερού το οποίο θα χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή του σάκε είναι η περιεκτικότητα σε σίδηρο. Αν η συγκέντρωση του σιδήρου ξεπερνάει 2 ppb, χρώμα του σάκε αλλάζει σε καστανό-κόκκινο και εμφανίζονται αρνητικά αρώματα λόγω σχηματισμού φερριχρυσίνης (Kitamoto 2002: 142). Πρόκειται για μια αντίδραση συμπλοκοποίησης $\text{Fe(III)} + \text{αποφερριχρυσίνη (deferriferiichrysin}^{33})$. Λεπτομερώς αυτό το φαινόμενο περιγράφεται στο (Tadenuma 1967, Sato 1971).

Κατά την πειραματική παραγωγή αποφασίσαμε να χρησιμοποιήσουμε το νερό τοπικής παροχής³⁴, το προφίλ του οποίου δε διαφέρει σημαντικά από τα παραδείγματα του νερού στο (Tomiya 2013)³⁵.

³³ N -[3-[(2S,5S,8S,11S,14S)-5,8-bis[3-[acetyl(hydroxy)amino]propyl]-11,14-bis(hydroxymethyl)-3,6,9,12,15,18-hexaoxo-1,4,7,10,13,16-hexazacyclooctadec-2-yl]propyl]-*N*-hydroxyacetamide

³⁴ ΕΥΔΑΠ Αιγάλεω.

³⁵ Σύμφωνα με τα δεδομένα της επίσημης σελίδας ΕΥΔΑΠ (<https://www.eydap.gr/userfiles/c3c4382d-a658-4d79-b9e2-ecff7ddd9b76/%CE%A3%CF%84%CE%BF%CE%B9%CF%87%CE%B5%CE%AF%CE%B1%20%CF%80%>)

2.3.3 Το pH κατά τη ζύμωση.

Το pH κατά τη ζύμωση του σάκε, τόσο στο *moto*, όσο και στο *moromi* πρώτα απ' όλα πρέπει να είναι κατάλληλο για την ανάπτυξη των απαιτούμενων μικροοργανισμών και να είναι κατάλληλο για την εφικτή δράση των αμυλολυτικών ενζύμων του κότζι.

Όπως έχουμε αναφέρει νωρίτερα, κατά τη ζύμωση *yamahai-moto* με την ανάπτυξη μικροχλωρίδας παρατηρείται φυσική αλλαγή του pH από ελαφρά όξινο σε όξινο (π.χ. από 6.04 σε 3.69 σε περίπτωση του πειράματος του (Tsuji 2018)). Σε άλλες πιο σύγχρονες μεθόδους *moto*, ως *sokujo-moto*, το pH διορθώνεται με τη χρήση γαλακτικού οξέος μέχρι 3.5-3.8 (Yoshizawa 2004a).

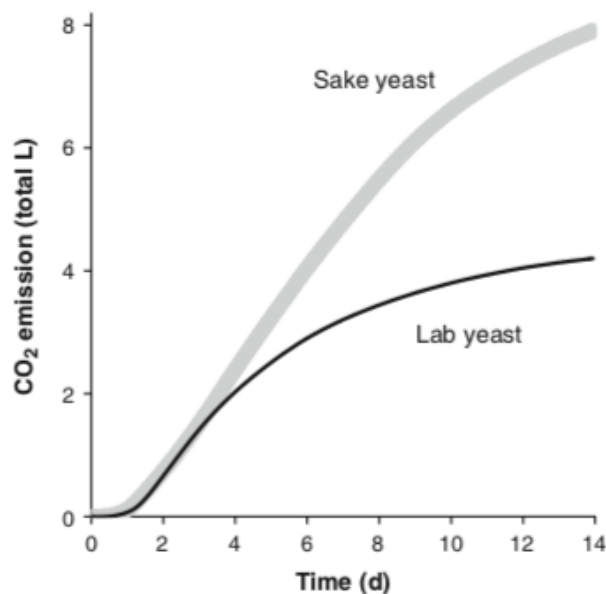
Το βέλτιστο pH για τη δράση της αμυλάσης εξαρτάται πάρα πολύ από τη πηγή του ενζύμου, αν και τα περισσότερα κυμαίνονται σε pH 4-6 (Schomburg 1991a). Ειδικά για την αμύλαση των *Aspergilli* αναφέρεται το βέλτιστο pH = 4.5 (Shafique 2009). Για τη γλυκοαμύλαση αναφέρονται τιμές της βέλτιστης δράσης pH = 4.5-5.0 (ARSJ 1988: 120), pH = 4-5 (Schomburg 1991b: 3).

Κατά την πειραματική διαδικασία αποφασίσαμε να ακολουθούμε τη μέθοδο *sokujo-moto*, η οποία προβλέπει τη διόρθωση του pH του *moto* μέχρι 3.5-3.8 με τη χρήση του γαλακτικού οξέος. Το pH διορθώνεται πιο χαμηλά από το βέλτιστο των αμυλολυτικών ενζύμων ώστε να εξασφαλίσουμε την ανασταλτική δράση του σε μη-επιθυμητά βακτήρια. Επίσης σημειώνεται ότι το χαμηλό pH αναστέλλει αντιδράσεις “σκουριάσματος” του σάκε (Oka 1969).

[CE%BF%CE%B9%CF%8C%CF%84%CE%B7%CF%84%CE%B1%CF%82%20%CE%BD%CE%B5%CF%81%CE%BF%CF%8D%202019_1.pdf](#) [accessed 19/06/2020]). Για την εξασφάλιση της χαμηλής περιεκτικότητας σε χλώριο, το οποίο εμποδίζει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, το νερό επιπρόσθετα φιλτραρίστηκε από το φίλτρο προετοιμασίας νερού του εργαστηρίου ζυθοποίησης ΠΑΔΑ (φίλτρο ενεργού άνθρακα).

2.3.4 Επιλογή ζύμης.

Η αλκοολική ζύμωση κατά το *moto* και *moromi* πραγματοποιείται με τα στελέχη του *Saccharomyces cerevisiae*. Η εξέλιξη του *S. cerevisiae* επηρεάστηκε σημαντικά από την ανθρώπινη δραστηριότητα (Albertin 2019). Τα παραδοσιακά στελέχη του σάκε και *shochu* ξεχωρίζονται γενετικά από τα στελέχη μπίρας, κρασιού ή αρτοποιίας διαμορφώνοντας ξεχωριστό σύμπλεγμα³⁶ (Yoshizawa 2004a: 176, Albertin 2019). Τα μη-παραδοσιακά στελέχη³⁷ παρουσιάζουν χαμηλότερη ζυμωτική ικανότητα κατά τις συνθήκες της ζύμωσης σάκε, και επομένως επιλογή στελεχών τουλάχιστον μερικός συνεισφέρει στην υψηλή απόδοση ως προς την αιθανόλη (Watanabe 2015: 60).



Εικ. 2.16 Διαφορετικά στελέχη των ζυμών και το ζυμωτικό προφίλ του σάκε. Οι πειραματικές ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν με τα στελέχη K7 (σάκε) και X2180 (εργαστηριακό). Ρυθμός ζύμωσης μετριέται με την εκπομπή CO₂ (Watanabe 2015)

Οι ζυμώσεις του σάκε ξεχωρίζονται από πολύ ψηλό τελικό αλκοολικό τίτλο και τα στελέχη αυτά προκαλούν μεγάλο ενδιαφέρον στους ερευνητές. Τα στελέχη του σάκε χαρακτηρίζονται από τρεις βασικούς φαινοτύπους: υψηλή βιωσιμότητα κατά τις συνθήκες του αιθανολικού στρες, υψηλός ρυθμός αναπαραγωγής κατά τις συνθήκες του αιθανολικού στρες και υψηλή ικανότητα παραγωγής αιθανόλης (Watanabe 2015). Στα στελέχη του σάκε βρέθηκαν μερικά

³⁶ Cluster

³⁷ Ειδικά το στέλεχος αναφοράς S288c και τα συγγενικά στελέχη.

χαρακτηριστικά τα οποία συνεισφέρουν στην υψηλή βιωσιμότητα και υψηλό ρυθμό ανάπτυξης κατά το στρες: ακεραιότητα του κυτταρικού τοιχώματος, περιεκτικότητα σε ινοσιτόλη, αποθηκευμένο παλμιτοϋλ-CoA, βιοσύνθεση εργοστερόλης, έκφραση γονιδίων του στρες, αλλά προς το παρόν δεν μπορούμε να τα συσχετίσουμε με την υψηλή ζυμωτική ικανότητα των ζυμών του σάκε (Watanabe 2015).

Τα στελέχη του σάκε μπορούν να χαρακτηριστούν από μερικές γενετικές ιδιαιτερότητες. Στην ανθεκτικότητα των ζυμών στην υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης μεγάλο ρόλο παίζουν τα γονίδια *MSN2* και *MSN4*. Και όμως μόνο το σύστημα *Msn2p* λειτουργεί στα στελέχη του σάκε K7 και K11. Η υπερέκφραση του *MSN2* στο μεταλλαγμένο K7 οδήγησε στην υψηλότερη παραγωγή της αιθανόλης στο σάκε (Watanabe 2009). Από την άλλη, υψηλότερη ανθεκτικότητα στην αιθανόλη δεν οδηγεί αυτομάτως στην υψηλότερη παραγωγή αιθανόλης κατά τη ζύμωση. Στην έρευνα (Cardona 2007) η υπερέκφραση του *MSN2* δεν οδήγησε στην καλύτερη ζυμωτική ικανότητα κατά τις συνθήκες του κρασιού. Επιπλέον, δεν παρατηρείται η αυξημένη έκφραση του *MSN2* στο ανθεκτικό σε αιθανόλη στέλεχος του σάκε SR4-3 (Ogawa 2000). Στις πειραματικές ζυμώσεις σάκε τα μεταλλαγμένα στελέχη με απενεργοποιημένα *MSN2* και *MSN4* έδειξαν πιο ψηλές τελικές συγκεντρώσεις αιθανόλης από τα στελέχη αναφοράς, με το υψηλότερο αποτέλεσμα να είναι του στέλεχος με και τα δύο γονίδια απενεργοποιημένα. Μπορεί να υποστηριχθεί ότι κατά τις συνθήκες του σάκε τα συστήματα *Msn2/4p* δεν είναι αποκλειστικός μηχανισμός της αντίδρασης στο αιθανολικό στρες και πιθανόν τα συστήματα αυτά λειτουργούν ως φυσικό “φρένο” αλκοολικής ζύμωσης κατά τις συνθήκες του στρες (Watanabe 2015).

Επίσης τα σύγχρονα στελέχη του σάκε χαρακτηρίζονται από την απουσία του γονιδίου *PPT1* (Watanabe 2015), το οποίο εκφράζεται κατά την εκθετική φάση της ζύμωσης³⁸. Σημειώνεται και σημαντικό ρόλο της αναστολής του *RIM15* (Watanabe 2015), το οποίο σχετίζεται με την ανάπτυξη του κυττάρου, ειδικά κατά την προαγωγή στη φάση στασιμότητας³⁹.

Το σύμπλεγμα των στελεχών του σάκε χαρακτηρίζεται και από παρουσία γονιδίων *BIO1* και *BIO6*, τα οποία αιτιολογούν την ικανότητα των ζυμών του σάκε να συνθέτουν βιοτίνη. Το γλεύκος του σάκε είναι φτωχό σε βιοτίνη. Παρόμοια χαρακτηριστικά παρουσιάζουν τα στελέχη τα οποία χρησιμοποιούνται στην παραγωγή συγγενικών ποτών από ρύζι στην Ινδονησία και

³⁸ Σύμφωνα με τη βάση δεδομένων Yeast Genome Database (<https://www.yeastgenome.org/locus/S000003355> [accessed 20/06/20])

³⁹ Σύμφωνα με τη βάση δεδομένων Yeast Genome Database (<https://www.yeastgenome.org/locus/S000001861> [accessed 20/06/20])

στις Φιλιππίνες. Η παρουσία των γονιδίων αυτών μπορεί να λειτουργεί ως σήμα εξημέρωσης για αυτό το κλάδο των *Saccharomyces cerevisiae* (Sampaio 2017).

Κατά την πειραματική παραγωγή του σάκε αποφασίσαμε να χρησιμοποιήσουμε δύο βιομηχανικά στελέχη του *Saccharomyces cerevisiae*: Vin13 που θεωρείται κατάλληλο για την παραγωγή λευκών οίνων και στέλεχος ζυθοποιίας W34/70.

2.4 Κύρια ζύμωση.

2.4.1 Αναλογίες νερο:ρύζι.

Όπως έχουμε αναφέρει, κατά την κύρια ζύμωση το ατμισμένο ρύζι, το κότζι και το νερό προστίθενται σε τρεις δόσεις κάθε φορά αυξάνοντας τη συνολική ποσότητα. Θεωρείται ότι με την σταδιακή προσθήκη αμυλούχου υλικού δίνεται η ευκαιρία στις ζύμες να προσαρμοστούν στις συνθήκες της υψηλόβαθμης ζύμωσης του σάκε (Yoshizawa 2004a).

Οι συγκεκριμένες αναλογίες ρύζι:κότζι:νερό διαφέρουν στη βιβλιογραφία, ακολουθώντας όμως την κύρια ιδέα: για το *moto* χρησιμοποιούμε 1:0.5:1.65⁴⁰, η πρώτη προσθήκη στο *moromi* 1:0.4:1.3, η δεύτερη 1:0.3:1.5, η τρίτη 1:0.25:1.8, με κλιμάκωση κάθε φορά του συνόλου 1:1.8:3.7:7⁴¹ (Yoshizawa 2004a, Yoshizawa 2004b).

Η επίδραση διαφορετικών αναλογιών ρύζι:κότζι με σταθερή ποσότητα νερού και σταθερή αναλογία (σύνολο ρυζιού:νερό) μελετήθηκε στο (Kim 2013). Με την τετραπλάσια αύξηση του ποσοστού του κότζι παρατηρείται αύξηση της ολικής σακχαροπεριεκτικότητας⁴² του πολτού για 23%, αύξηση της συγκέντρωσης της ελεύθερης γλυκόζης (132%), μαλτόζης (48%), κιτρικού οξέος, και σημαντική πτώση του ιξώδους. Τα αποτελέσματα αυτά όμως δεν είναι συναφή με το δικό μας πείραμα, επειδή οι συνθήκες του εν λόγω πειράματος δεν είναι συγκρίσιμα με τις συνθήκες της παραγωγής του σάκε. Εξ όσων γνωρίζουμε το θέμα αυτό δεν έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία και περιμένει τον ερευνητή του.

Κατά την πειραματική παραγωγή αποφασίσαμε να χρησιμοποιούμε τις παραδοσιακές αναλογίες προσαρμόζοντάς τους στους τεχνικούς περιορισμούς του εργαστηρίου όπου χρειάζεται.

Για την εκτίμηση της αποδοτικότητας της ζύμωσης αποφασίσαμε να χρησιμοποιήσουμε την εκτίμηση ΔΑΤ (δυναμικού αλκοολικού τίτλου) με τη χρήση των εξής συντελεστών: 85% ως μέση περιεκτικότητα του επιτραπέζιου λευκού ρυζιού σε άμυλο (Omar 2016), 60% ως αποδοτικότητα της υδρόλυσης των αμυλολυτικών ενζύμων ως προς τα ζυμώσιμα σάκχαρα (Morita 1966), 95% ως μέση αποδοτικότητα αλκοολικής ζύμωσης *S. cerevisiae*⁴³. Για την

⁴⁰ Εδώ και πιο κάτω οι αναλογίες είναι ως προς τη μάζα, η μάζα του ρυζιού μετράται πριν την άτμιση.

⁴¹ Συνολική μάζα *moto*:1° *moromi*:2° *moromi*:3° *moromi*.

⁴² Ως °Brix.

⁴³ Καταλαβαίνουμε ότι οι συντελεστές αυτοί κρίνονται πολύ σχετικοί και μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνο για τη σχετική σύγκριση διαφορετικών ζυμώσεων του σάκε. Για τις απόλυτες βιομηχανικές εκτιμήσεις χρειάζεται περαιτέρω μελέτη με χρήση σημαντικής στατιστικής βάσης.

εκτίμηση συνεισφοράς του αμύλου των καστώνων χρησιμοποιήσαμε την αναλογία 1γ κάστανα = 0.3 γ ρύζι ως προς το άμυλο⁴⁴.

2.4.2 Θερμοκρασία ζύμωσης.

Παραδοσιακά το σάκε παραγόταν μόνο το χειμώνα ως μια δουλειά με την οποία μπορούσε να ασχολείται μια παραδοσιακή κοινωνία εκτός κυρίου σεζόν αγροτικού κύκλου του ρυζιού. Με την εισαγωγή της ευρωπαϊκής τεχνολογίας μπίρας και βιομηχανικής ψύξης πολλοί παραγωγί εξειδικεύτηκαν στην παραγωγή του σάκε και ξεκίνησαν να παράγουν σάκε καθ' όλη τη διάρκεια του έτους. Κατά τη διάρκεια της κυρίας ζύμωσης *moromi* απαιτείται χαμηλή θερμοκρασία, κάτω από 15°C. Στην αρχή η θερμοκρασία ρυθμίζεται στους 12-14°C, μετά τη δεύτερη προσθήκη 9-10°C, και μετά την τρίτη προσθήκη 7-8°C. Με την αύξηση ρυθμού ζύμωσης αυξάνεται και η θερμοκρασία, φτάνοντας τους 15-18°C τη μέρα 6-9. Σε αυτή τη θερμοκρασία το σάκε εν ζυμώσει παραμένει για ακόμη 5-7 μέρες. Στη συνέχεια η θερμοκρασία πέφτει σταδιακά με τη πτώση του ρυθμού ζύμωσης (Yoshizawa 2004a).

Χαμηλή θερμοκρασία ζύμωσης μαζί με την σταδιακή προσαρμογή αναφέρεται ως ένας από τους παράγοντες οι οποίοι επιτρέπουν τις ζύμες να ολοκληρώνουν τη ζύμωση σε σχετικά υψηλό αλκοολικό τίτλο (20%Vol.) (Yoshizawa 2004a). Επιπλέον, η χαμηλή θερμοκρασία ζύμωσης ευνοεί παραγωγή δευτερογενών αρωματικών ουσιών, πρώτα απ' όλα οξικού ισοαμυλεστέρα (*isoamyl acetate*) και καπροϊκού αιθυλεστέρα (*ethyl caproate*). Αυτοί οι εστέρες θεωρούνται πολύ σημαντικοί για το επιθυμητό αρωματικό προφίλ του σάκε (Ichikawa 1991)⁴⁵. Για τον οξικό ισοαμυλεστέρα αναφέρεται ειδικά στη βιβλιογραφία, ότι η παραδοσιακή στρατηγική (έναρξη ζύμωσης σε χαμηλή θερμοκρασία, περιορισμένη αύξησή της και στη συνέχεια πάλι ψύξη) είναι βέλτιστη ως προς την παραγωγή του (Matsuura 1992).

Σημειωτέων η α-αμυλάση του *A.oryzae* χαρακτηρίζεται από σχετικά χαμηλή θερμική σταθερότητα (Rodriguez 2014), και η αποδοτικότητά της πέφτει σημαντικά ακόμα και σε 45-55°C.

Κατά την πειραματική παραγωγή αποφασίσαμε να χρησιμοποιήσουμε θάλαμο παθητικής ψύξης του περιβάλλοντος ρυθμιζόμενο στους 15°C για την πραγματοποίηση *moromi*. Το

⁴⁴ Σχετική υγρασία καστώνων εκτιμάται να είναι 50%, η περιεκτικότητα σε άμυλο επί ξηρού 50%, οπότε 1 γραμμάριο κάστανα αντιστοιχεί στα $1 \times 0.5 \times 0.5 / 0.85 \approx 0.3$ g ρύζι. Η σχετική υγρασία του δείγματος ~50% επιβεβαιώθηκε και στην πράξη (βλ. πρακτικό μέρος)

⁴⁵ Το φαινόμενο αυξημένης παραγωγής των “φρουτωδών” αρωματικών ουσιών από τους *S.cerevisiae* κατά τη ζύμωση σε χαμηλή θερμοκρασία και οι εμπλεκόμενοι μηχανισμοί είναι καλά μελετημένα, έχει πλούσια βιβλιογραφία και βρίσκεται όμως εκτός θέματος της έρευνάς μας. Μια πλούσια βιβλιογραφία περί φαινομένου βρίσκουμε στο (Procopio 2011).

αρχικό εμβόλιο και η πρώτη προσθήκη ήταν ψυγμένα μέχρι τους 10°C. Έτσι με τους τεχνικούς περιορισμούς που έχουμε θα προσεγγίσουμε την παραδοσιακή μέθοδο.

2.5 Μεταζυμωτικές κατεργασίες.

2.5.1 Μεταζυμωτικές κατεργασίες πριν τη παστερίωση.

Μετά την ολοκλήρωση της ζύμωσης πραγματοποιείται διαχωρισμός του υγρού σάκε από τα εναπομείναντα στερεά (“πατήματα”). Στη συνέχεια με μια στατική απολάσπωση διαχωρίζουμε αφιλτράριστο σάκε, το οποίο στη συνέχεια οδηγείται προς φιλτράρισμα. Όπως έχουμε αναφέρει, χρησιμοποιούνται φίλτρα μεμβρανών και φίλτρα ενεργού άνθρακα. Χρήση ενεργού άνθρακα παίζει ιδιαίτερο ρόλο επειδή αφαιρεί τη ριβοφλαβίνη⁴⁶, μια μη-επιθυμητή ουσία στο βιομηχανικό σάκε, η οποία συνεισφέρει στο χρώμα⁴⁷ και είναι ένας σημαντικός παράγοντας που ευνοεί την ανάπτυξη των βακτηρίων αλλοίωσης (Ohba 1986).

Παραδοσιακά, το απολασπωμένο σάκε αφήνεται για ένα μήνα περίπου πριν την παστερίωση (Yoshizawa 2004a). Υποστηρίζεται όμως ότι αυτή η περίοδος αναμονής πρέπει να είναι όσο μικρότερη γίνεται και η θερμοκρασία συντήρησης του νέου σάκε πρέπει να είναι όσο πιο χαμηλή γίνεται. Σημειώνεται, ότι αυτή η περίοδος παίζει κρίσιμο ρόλο στην αυτόλυση των κυττάρων των ζυμών⁴⁸ και στο σχηματισμό του διμεθυλο-τρισουλφιδίου (DMTS), το οποίο ελαττώνει σημαντικά το γευστικο-αρωματικό προφίλ του τελικού προϊόντος (Nishibori 2014). Κρίσιμος παράγοντας της ποιότητας του σάκε⁴⁹ παραμένει η διαύγειά του. Οπότε πολύ σημαντικό ρόλο στην παραγωγή του σάκε παίζει η πρωτεϊνική σταθερότητα. Οι πρωτεΐνες στο σάκε παρουσιάζουν κύρια πηγή ανεπιθύμητης θολότητας, πρώτα απ’ όλα τα αμυλολυτικά ένζυμα του κότζι (Yoshizawa 2004a). Ως κύριος παράγοντας της ικανότητας των πρωτεϊνών των ποτών να παράγουν θόλωση αντιδρώντας με τις πολυφαινόλες αναφέρεται το ποσοστό της προλίνης (Siebert 2009). Η α-αμυλάση του *A. oryzae* μπορεί να κριθεί σχετικά πλούσια σε προλίνη⁵⁰, ενώ παίζει ρόλο και η σχετικά υψηλή συγκέντρωση της αμυλάσης στο σάκε.

Στη βιομηχανία χρησιμοποιούνται προσθήκες πρωτεασών ή τανινών λωτού σε συνδυασμό με τη ζελατίνη (Yoshizawa 2004a). Οι τανίνες λωτού διαμορφώνουν δυσδιάλυτα σύμπλοκα με τις πρωτεΐνες του σάκε και απομακρύνονται με την απολάσπωση (Nunokawa 1973, σύμφωνα με

⁴⁶ Προέρχεται στο σάκε και από το ρύζι, και από το μεταβολισμό ζυμών (Ohba 1986).

⁴⁷ Όχι μόνο ως χρωστική ουσία, αλλά και ως ένας συμπαράγοντας φωτοχημικών αντιδράσεων που οδηγούν στο χρωματισμό του σάκε (Ohba 1986).

⁴⁸ Το φιλτράρισμα σ’ αυτό το στάδιο δεν είναι αποστειρωτικό.

⁴⁹ Πρόκειται για το “κανονικό” σάκε και όχι για τα πιο εξειδικευμένα είδη, όπως μη-φιλτραρισμένο μη-παστεριωμένο σάκε.

⁵⁰ Η σύσταση της α-αμυλάσης έχει μελετηθεί καλά, μπορούμε να εκτιμήσουμε το %mol. ποσοστό προλίνης ως 4.5%mol (Stein 1960, Narita 1966).

Takayama 1989). Για την απομάκρυνση από τα ποτά των πρωτεϊνών με τη ικανότητα θόλωσης χρησιμοποιούνται μπεντονίτες και διοξείδιο του πυριτίου (*silica*). Στα ποτά στα οποία είναι επιθυμητή η διαμόρφωση του αφρού κατά την κατανάλωσή τους προτιμάται SiO₂ επειδή απομακρύνει μόνο τις πρωτεΐνες θόλωσης, αλλά δεν είναι εφικτό στα ποτά πλούσια σε πολυφαινόλες (Siebert 2009). Στην βιβλιογραφία αναφέρεται η χρήση της *silica sol* στη σταθεροποίηση του σάκε (Ohba 1986).

Κατά την πειραματική παραγωγή αποφασίσαμε να χρησιμοποιήσουμε οινολογικό μπεντονίτη λόγω διαθεσιμότητας και κόστους.

2.5.2 Παστερίωση.

Πρωτεϊνικά σταθερό σάκε οδηγείται προς παστερίωση. Η παστερίωση είναι μια παραδοσιακή διεργασία στην παραγωγή του σάκε. Το σάκε θερμαίνεται για λίγο μέχρι 60-65°C⁵¹ για να ανασταλεί η ανάπτυξη μη-επιθυμητών μικροοργανισμών αλλοίωσης⁵² και η δράση ενζύμων “παλαίωσης” (Yoshizawa 2004a).

Στην πράξη όμως, αν και η αναστολή από την παστερίωση των μη-επιθυμητών μικροοργανισμών είναι σαφής, η χημική σύσταση του προϊόντος δεν σταθεροποιείται. Μελετήθηκαν οι αλλαγές στη σύσταση παστεριωμένου και απαστερίωτου σάκε μετά από τους 4 μήνες παλαίωσης. Η συγκέντρωση οργανικών οξέων παρέμεινε σταθερή και στις 2 περιπτώσεις. Η ολική συγκέντρωση αμινοξέων έπεσε δραματικά με το χρόνο μόνο στο παστεριωμένο σάκε, ενώ η συγκέντρωση γλυκόζης αυξήθηκε στο απαστερίωτο σάκε παράλληλα με τη πτώση συγκέντρωσης πολυσακχαριτών (προφανώς λόγω της υδρόλυσης πολυσακχαριτών υπό τη δράση των ενζύμων) (Sugimoto 2012)⁵³.

Αναφέρεται όμως ότι η πιο ψηλή θερμοκρασία παστερίωσης επιταχύνει τις αντιδράσεις οι οποίες οδηγούν στο “σκούριασμα” του σάκε (συμπλοκοποίηση της φερριχρυσίνης, αμυλο-καρβονυλικές αντιδράσεις) (Oka 1969). Επίσης η υψηλή θερμοκρασία παστερίωσης μπορεί να προκαλέσει πρωτεϊνική θόλωση του σάκε (Sugimoto 2012).

Αν και είναι μια παραδοσιακή και σχετικά εφικτή τεχνική, η παστερίωση οδηγεί στο γεγονός ότι το σάκε χάνει φρεσκάδα του αρώματος και της γεύσης λόγω εξάτμισης των αρωματικών

⁵¹ Αναφέρεται χρόνος ≤30 λεπτά (Sugimoto 2012), 15 λεπτά (Ohba 1986).

⁵² Τα λεγόμενα *hiochi*-βακτήρια: *Lactobacillus homohiochii* και *L. fructivorans*.

⁵³ Όπως αναφέρουν και οι ερευνητές, δυστυχώς δεν μπόρεσαν να πραγματοποιήσουν την οργανοληπτική ανάλυση, η οποία θα ήταν ιδιαίτερου ενδιαφέροντος σε αυτό το θέμα.

ουσιών και επιτάχυνσης φαινομένων παλαίωσης, οπότε προτείνονται εναλλακτικές τεχνικές όπως η ενανθράκωση υψηλής πίεσης (Tanimoto 2008).

Κατά την πειραματική παραγωγή αποφασίσαμε να πραγματοποιήσουμε την παστερίωση ήδη εμφιαλωμένου σάκε σε 63°C για 20 λεπτά.

2.5.3 Εμφιάλωση.

Μετά την παστερίωση το σάκε οδηγείται προς ωρίμανση για 6-12 μήνες (Ohba 1986). Κατά την περίοδο αυτή πραγματοποιούνται χαρμανιάσματα για να επιτευχθεί απαιτούμενη ομοιότητα της γεύσης και του αρωματικού προφίλ, επιπλέον φιλτραρίσματα και πρωτεϊνικές σταθεροποιήσεις (Ohba 1986).

Το διαφανές “χρώμα” του σάκε βρέθηκε να είναι ευαίσθητο στο ηλιακό φως. Με το φως σάκε σκουραίνει λόγω αμυλο-καρβονιλικών αντιδράσεων και παραγωγής φερριχρυσίνης στη περίπτωση παρουσίας σιδήρου (Yoshizawa 2004a: 185-186). Στο σκούριασμα συνεισφέρουν και άλλες φωτοχημικές αντιδράσεις και ευνοούνται παρουσία κουνερικού οξέος⁵⁴ και Mn^{2+} (Sato 1971). Αυτές οι αντιδράσεις απαιτούν το φως με $\lambda < 380nm$ (Ohba 1986). Το σκούρο σάκε δεν είναι αποδεκτό από την αγορά και από τους καταναλωτές, οπότε συνήθως το σάκε εμφιαλώνεται στα καστανά ή πράσινα γυάλινα μπουκάλια. Συνήθως το σάκε ενδέχεται να καταναλωθεί στην περίοδο 10 μηνών μετά την εμφιάλωση (Ohba 1986).

Κατά την πειραματική παραγωγή αποφασίσαμε να το εμφιαλώσουμε το σάκε στα καστανά γυάλινα μπουκάλια ζύθου όγκου 0.33L. Λόγω χρόνου αποφασίσαμε να πραγματοποιήσουμε ωρίμανση του σάκε στα μπουκάλια, για την περίοδο τουλάχιστον 3 μηνών.

⁵⁴ Το κουνερικό οξύ στο σάκε προέρχεται από τη ζύμωση (Sato 1971).

2.6 Αξιολόγηση. Γευστικό και αρωματικό προφίλ.

2.6.1 Χρώμα.

Το τυπικό εμπορεύσιμο σάκε είναι διαφανές πολύ ανοιχτού κίτρινου χρώματος. Όπως έχουμε αναφέρει και πριν, αυτό παρουσιάζει σημαντικό παράγοντα της ολικής ποιότητας του σάκε. Αν και υπάρχουν είδη σάκε τα οποία δέχονται από την αγορά παρότι είναι εκ φύσεως θολά ή με ίζημα⁵⁵, το “σκούριασμα” παραμένει να θεωρείται σημαντικό ελάττωμα του προϊόντος. Συνήθως το χρώμα του σάκε εκτιμάται ως απορρόφηση σε $\lambda=430$ nm, και για εμπορικά σάκε αναφέρεται μια τυπική απορρόφηση να είναι $A_{430}=0.016-0.019$ (Ohba 1986). Οι κύριες πηγές του χρώματος στο σάκε είναι ριβοφλαβίνη (και συγγενείς ουσίες) της πρώτης ύλης, φωτοχημική αλλοίωση, συμπλοκοποίηση φερριχρυσίνης, αμυλο-καρβονυλικές αντιδράσεις παλαίωσης και χαλκός σε συγκέντρωση μεγαλύτερη από 0.5 ppm (Ohba 1986). Διαφορετικές τεχνικές αποφυγής του χρωματισμού του σάκε αναφέρθηκαν νωρίτερα.

2.6.2 Αρωματικό και γευστικό προφίλ.

Το αρωματικό και γευστικό προφίλ του σάκε είναι περίπλοκο και ενσωματώνει σχεδόν όλες τις βασικές γεύσεις: γλυκύτητα, ξινή γεύση, δριμύτητα, πικράδα, umami. Οι πιο σημαντικές αρωματικές ενώσεις του σάκε θεωρούνται οι ανώτερες αλκοόλες και εστέρες (Furukawa 2012), αν και βέβαια συμμετέχουν στο τελικό μπουκέτο και άλλες ουσίες, οργανικά οξέα, αμινοξέα κτλ.

Οι ανώτερες αλκοόλες κυρίως παράγονται κατά την κύρια ζύμωση *moromi*. Ανάμεσα σε άλλα ανιχνεύονται ισοαμυλική αλκοόλη (γλυκό άρωμα, μπανάνα), φαινυλαιθανόλη (άρωμα τριαντάφυλλου), 2,3-βουτανεδιόλη (γλυκό άρωμα), μεθιονόλη (άρωμα λαχανικών τουρσί, πίκλες). Η τυροσόλη και η γλυκερόλη συνεισφέρουν κυρίως στο γευστικό προφίλ του σάκε (γλυκιά και πικρή γεύση). Οι ανώτερες αλκοόλες υποστηρίζουν τις γεύσεις *uwadachi-ka* (‘το άρωμα που νιώθεις γυρίζοντας ελαφρά το ποτήρι’) και *fukumi-ka* (‘επίγευση’) (Furukawa 2012).

Οι εστέρες καρβοξυλικών οξέων παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στο αρωματικό προφίλ του σάκε. Οι περισσότερες έχουν σχετικά χαμηλό κατώφλι αντίληψης και είναι κρίσιμα για το επιθυμητό φρουτώδες *ginjo-ka* άρωμα. Ο οξικός ισοαμυλεστέρας (άρωμα μπανάνα) έχει

⁵⁵ Π.χ. *nigorizake*.

ιδιαίτερη σημασία. Η αυξημένη παραγωγή του συσχετίζεται με τη χαμηλή δραστικότητα εστεράσων των ζυμών και με τη μετάλλαξη στην εστεράση EST2 στα μερικά στελέχη που απομονώθηκαν από το σάκε (Torres 2011). Ο καπροϊκός αιθυλεστέρας (άρωμα κονιάκ, ρούμι, φρούτα και άνθη) επίσης αναφέρεται στη βιβλιογραφία ως ουσία-κλειδί για το αρωματικό προφίλ του σάκε. Το καπροϊκό οξύ υποτίθεται ότι είναι παραπροϊόν της σύνθεσης λιπαρών οξέων από τις ζύμες. Προτείνεται η χρήση ειδικών στελεχών με την αυξημένη παραγωγή καπροϊκού οξέος (Ichikawa 1991)⁵⁶. Η παραγωγή και των δύο αυτών εστερών ευνοείται από την χαμηλή θερμοκρασία ζύμωσης, με τον καπροϊκό αιθυλεστέρα να απαιτεί πιο χαμηλή θερμοκρασία από τον οξικό ισοαμυλεστέρα (Takahashi 2016).

Είναι γνωστό ότι τα χαρακτηριστικά του κότζι επηρεάζουν το τελικό άρωμα και γεύση του σάκε τουλάχιστον μέσω διαθεσιμότητας διαφορετικών ενζύμων. Οι μηχανισμοί και ο βαθμός της επιρροής αυτής όμως δεν είναι ξεκάθαροι. Το κότζι ξεχωρίζεται από χημικά πλούσιο και περίπλοκο άρωμα. Ισοβαλερική αλδεΐδη (ελαφρύ φρουτώδες άρωμα) αναφέρεται ως ουσία-κλειδί του κότζι στο σάκε και *shochu* (Shiraishi 2016). Ως σημαντικότερες αρωματικές ουσίες του κότζι αναφέρονται 2-μεθυλ-2-επέν-6-όνη⁵⁷ (άρωμα καρυδιών), μεθειονάλη (πατάτες), 1-οκτέν-3-όνη⁵⁸, 1-οκτέν-3-όλη⁵⁹ (μανιτάρια), φαινυλαιθανάλη (μέλι, τριαντάφυλο) (Takahashi 2006). Διαφορετικά είδη κότζι έχουν διαφορετικά αρωματικά προφίλ. Σημειώνεται αισθητή παρουσία 2-πεντυλφουράνης⁶⁰, η οποία θεωρείται υπεύθυνη για το άρωμα του μαγειρεμένου ρυζιού. Υποστηρίζεται επίσης ότι διαφορετικά αρωματικά προφίλ του κίτρινου κότζι (σάκε) και του μαύρου (*shochu*) εξηγούν τις διαφορές στα τελικά προϊόντα (Yoshizaki 2010).

Μερικές ουσίες, αν και όπως φαίνεται δε συμμετέχουν άμεσα στο γευστικό προφίλ (ή τουλάχιστον δεν παίζουν ειδικά μεγάλο ρόλο σε αυτό), συσχετίζονται με την αισθητή, από ένα πάνελ δοκιμαστών, ποιότητα. Σημειώνεται, ότι στο *ginjo*-σάκε υψηλής ποιότητας παρατηρείται αυξημένη συγκέντρωση πυριδοξίνης, 2-οξογλουταρικού⁶¹ οξέος, γλουταμύλ-γλουταμινικού⁶² οξέος, πυροσταφυλικού οξέος. Στο *ginjo*-σάκε χαμηλής ποιότητας ανιχνεύονται αυξημένες συγκεντρώσεις φουμαρικού οξέος, ελεύθερων αμινοξέων εκτός από την αργινίνη και άλλων

⁵⁶ Τα στελέχη αυτά βρέθηκαν να είναι ανθεκτικά σε κερουλενίνη (*cerulenin*), έναν επιλεκτικό αναστολέα της συνθάσης λιπαρών οξέων (Ichikawa 1991)..

⁵⁷ *2-methyl-2-hepten-6-one*.

⁵⁸ *1-octen-3-one*.

⁵⁹ *1-octen-3-ol*.

⁶⁰ *2-pentylfuran*.

⁶¹ *2-oxoglutaric acid*.

⁶² *Glu-Glu dipeptide*.

ουσιών. Αντιπροσωπευτική για το σάκε χαμηλής ποιότητας είναι η αυξημένη συγκέντρωση μεταβολιτών κύκλου μεθειονίνης (Takahashi 2016).

Μελετάται και η αλλαγή αρωματικού προφίλ με την παλαίωση. Παρατηρείται μια δραστική πτώση συγκέντρωσης οξικού ισοαμυλεστέρα, ενώ αυξάνονται μεθυλβουτιρικός⁶³ αιθυλεστέρας, μεθειονάλη, δυμεθυλσουλφίδια (DMDS και DMTS) (Isogai 2005). Με την παλαίωση στο σάκε αναπτύσσεται αρνητικό άρωμα *hineka*. Κρίσιμες ενώσεις του αρώματος του παλαιωμένου σάκε θεωρούνται μεθυλσουλφίδια (και άλλες πτητικές οργανικές ενώσεις θείου), φουρφουράλη, φαινυλοξικό οξύ, βανιλίνη, HDMF⁶⁴ και άλλες. Επίσης με την υπερβολική παλαίωση αναπτύσσεται μια πικρή γεύση με το σχηματισμό μερικών αμινών, ολιγοπεπτιδίων και παραγόντων αμινοξέων (π.χ. PLA, MTA, χαρμανίνη⁶⁵) (Ohba 1986).

Τα οξέα του σάκε κυρίως δεν είναι πτητικά και συνεισφέρουν κυρίως στη γεύση. Κατά τη ζύμωση παράγονται γαλακτικό, μηλικό, ηλεκτρικό οξύ, τα οποία είναι υπεύθυνα πρώτα απ' όλα για την ξινή γεύση. Σημαντικό ρόλο στη γεύση παίζουν ελεύθερα αμινοξέα. Αν και απομονωμένα αμινοξέα συχνά έχουν ευχάριστες γεύσεις (γλυκό, ξινό, ουμάμι), η SVR ανάλυση έδειξε, ότι στο σύνολο στις τυπικές συγκεντρώσεις στο σάκε συνεισφέρουν κυρίως στη ξινή γεύση και σε μια ειδική αρνητική γεύση *zatsumi*⁶⁶, και λιγότερα στη γλυκιά και πικρή γεύση (Sugimoto 2010).

2.6.3 Διαδικασία αξιολόγησης.

Η οριστική αξιολόγηση της ποιότητας του σάκε γίνεται μέσω γευσιγνωσίας από έμπειρους γευσιγνώστες. Παραδοσιακά χρησιμοποιείται ειδικό ποτηράκι *kikichoko*, αλλά δέχεται και η χρήση του ποτηριού κρασιού τύπου Bordeaux.

Τα *kikichoko* φτιάχνονται από πορσελάνη και είναι λευκού χρώματος για την ευκολότερη οπτική ανάλυση του χρώματος του σάκε. Στο πάτωμα έχουν 2 κύκλους μπλε χρώματος για την ανίχνευση της θολότητας. Η διαδικασία βασικά θυμίζει αυτή του κρασιού:

- Πρώτα αναλύουμε την εμφάνιση: χρώμα, θολότητα,



Εικ. 2.15 Ποτήρι γευσιγνωσίας του σάκε (CGJS 2020)

⁶³ Και 2-μεθυλβουτιρικός, και 3-μεθυλβουτιρικός.

⁶⁴ 3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanone (άρωμα καμένου).

⁶⁵ L-prolyl-L-leucine anhydride, methyl thioadenosine, harmane.

⁶⁶ “απουσία δομής, θολότητα, μη-καθαρότητα γεύσης”.

- Αρωματική ανάλυση με τη μύτη: μυρίζουμε το σάκε και περιγράφουμε *uwadachika*, “η μύτη του σάκε”,
- Ανάλυση γεύσης: παίρνουμε περίπου 5 ml του σάκε, πλένουμε όλη τη γλώσσα με το δείγμα, συμπληρωματικά παίρνουμε μια μικρή ποσότητα αέρα και την αναμιγνύουμε με το σάκε
- Περιγράφουμε *fukumika* - οπισθορινικό άρωμα
- Αργά αναλύουμε και περιγράφουμε τη γεύση του σάκε
- Στο τέλος καταπίνουμε το δείγμα για να περιγράψουμε την επίγευση (SGJS 2020).

Το δείγμα προς ανάλυση θερμίζεται σε θερμοκρασία 18-20°C. Το δείγμα κατά τη γευσίγνωση συνήθως δεν περιστρέφεται (όπως κάνουμε πριν μυρίσουμε το κρασί). Ξεχωρίζονται 6 βασικές κατηγορίες αρωμάτων του σάκε: φρουτώδες *ginjo-ka* (μήλο, μπανάνα, λίτσι, πεπόνι, αχλάδι), μπαχαρώδες (μπαχαρικά, γαρίφαλο, καρύδια, κανέλα, αλκοόλη), πράσινο (χόρτα, κέδρο, τριαντάφυλλο), δημητριακά (δημητριακά, ρύζι, κότζι, μανιτάρια), καραμελώδες (καραμέλα, σάλτσα σόγιας, μέλι), ξινό (ξύδι, γιαούρτι, τυρί) (SGJS 2020). Στη γεύση συνήθως αναλύονται γλυκές/ξινές γεύσεις (*amakara*), σώμα (*notan*), πικράδα (*nigami*), ουμάμι, μαλακότητα (*kime*), επίγευση (*kire*). Αντίθετα από το κρασί, μακρά επίγευση θεωρείται ελάττωμα στο σάκε (SGJS 2020).



Εικ. 2.16 Αρώματα και γεύσεις του σάκε (SGJS 2020)

Τελευταία προτείνονται σχέδια τυποποίησης της διαδικασίας με χρήση των μεθόδων στατιστικής και διαγραμμάτων (π.χ., Kanno 2018).

3 Υλικά και Μέθοδοι.

3.1 Όργανα, σκεύη και αντιδραστήρια.

Κατά τη διάρκεια της εκτέλεσης του πειράματος έχουμε χρησιμοποιήσει εξοπλισμό και γυάλινα και πλαστικά σκεύη των εργαστηρίων του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, του Τμήματος Επιστημών Οίνου, Αμπέλου και Ποτών. Το νερό που χρησιμοποιήθηκε προέρχεται από τη βρύση, φιλτραρισμένο με το φίλτρο εργαστηρίου ζυθοποίησης (ενεργού άνθρακα). Για τις μετρήσεις έχουμε χρησιμοποιήσει την αναλυτική ζυγαριά Shimadzu AY120, το ηλεκτρονικό διαθλασίμετρο XS DBR95, το πεχάμετρο Hanna Instruments HI 8010. Τα όργανα πριν τη χρήση έχουν ρυθμιστεί σύμφωνα με τις προδιαγραφές των κατασκευαστών. Ως τεχνολογικές προσθήκες στις ζυμώσεις έχουμε χρησιμοποιήσει τον μπεντονίτη Spherobent Super (Laviosa Chimica Mineraria S.p.A.) και την αζωτούχα προσθήκη Nutristart SP (Laffort, LOT number 13046, DLUO 2021). Οι ζύμες είναι τα στελέχη Saflager W34/70 (Fermentis) και VIN13 (Anchor Oenology). Το ρύζι της ποικιλίας Calrose προμηθεύτηκε από την εταιρία WokShop, ο ασπεργίλλος προμηθεύτηκε από το σύστημα ebay.

3.2 Πειραματικός σχεδιασμός.

Έχουμε επιλέξει να πραγματοποιήσουμε 4 πειραματικές ζυμώσεις σάκε με χρήση δύο διαφορετικών στελεχών ζυμών, δύο από αυτές με το στέλεχος του *Saccharomyces cerevisiae* (VIN13) ευρέως διαδεδομένο στην οινοποίηση, μία με το στέλεχος του *S. pastorianus* (W34/70) το οποίο χρησιμοποιείται στη παραγωγή μύρας τύπου lager, και μία με τη ζύμη VIN13, αλλά με την εναλλακτική πηγή αμύλου - κάστανα. Η πρώτη ζύμωση με χρήση του VIN13 πραγματοποιήθηκε αρχές του 2019 (στο κείμενο αναφέρεται ως **VIN13a**), και άλλες το Μάιο του 2019, **VIN13b**, **W34/70** με το ομόνυμο στέλεχος lager και **Kast** με τη χρήση καστανών και στελέχους VIN13.

3.3 Υπολογισμοί.

Ως πρώτο στάδιο της πρακτικής παραγωγής του σάκε απαραίτητο είναι να παραχθεί αρκετή ποσότητα του ρυζιού – κότζι. Την απαιτούμενη ποσότητα του κότζι υπολογίσαμε χρησιμοποιώντας θεωρητικά νούμερα της βιβλιογραφίας και τις πρακτικές σημειώσεις των σπιτικών ερασιτεχνικών παραγωγών, οι οποία δε διαφέρουν σημαντικά.

Για την εκτίμηση της αποδοτικότητας των ζυμώσεων ως προς την παραγωγή αιθανόλης υπολογίσαμε θεωρητικό αλκοολικό τίτλο με χρήση των συντελεστών. Ως βάση της εκτίμησης χρησιμοποιήσαμε την αρχική μάζα του ρυζιού. Η περιεκτικότητα του ρυζιού σε άμυλο εκτιμήθηκε να είναι 85% (Omar 2016), η αποδοτικότητα της αμυλάσης – 60% (Morita 1966), η αποδοτικότητα των *S. cerevisiae* – 95%. Η παραγωγή αιθανόλης κατά την αλκοολική ζύμωση μπορεί να εκτιμηθεί να είναι 1% vol. αιθανόλης από 16,83g/L σύμφωνα με τον ΟΙV ζυμώσιμων σακχάρων (Pascual 2017).

3.4 Παραγωγή κότζι.

Όπως έχουμε ήδη αναφέρει, στην παραγωγή του σάκε χρησιμοποιήσαμε το ρύζι ποικιλίας Calrose⁶⁷.

Σύμφωνα με τις ανάγκες μας έχουμε κάνει 4 ζυμώσεις του κότζι κάθε φορά ακολουθώντας το ίδιο το πρωτόκολλο:

- a) Ενυδάτωση του ρυζιού για 14 ώρες στο ψυγείο (σε θερμοκρασία περίπου 7°C) σε επαρκές σε όγκο πλαστικό δοχείο. Το νερό βρύσης (τοπικής παροχής ΕΥΔΑΠ Αιγάλεω) προστίθεται μέχρι να καλυφθεί το ρύζι,
- b) Το ρύζι ξεπλένεται με νερό βρύσης μέχρι το νερό ξεπλύματος να μην είναι θολό από τα μικρά κομματάκια ρυζιού,
- c) Το ρύζι ατμίζεται πάνω στο νερό που βράζει υπό την ατμοσφαιρική πίεση για 60 λεπτά,
- d) Το ρύζι εξαπλώνεται με μια στρώση 1-2 cm στο ανοξείδωτο ταψί, ψύχεται μέχρι 33-45°C και εμβολιάζεται με τα σπόρια κότζι (βλ. κεφ. 2.2.2). Το ταψί καλύπτεται με άλλο ταψί (για να παραμένει η υγρασία του αέρα ψηλή) και τοποθετείται στο κλίβανο ρυθμισμένο για 35-37°C. Η καλλιέργεια τρυγιέται σε 48-50 ώρες προσέχοντας να μην ξεκινήσει παραγωγή σπορίων. Μερικές ώρες πριν τον τρύγο το ταψί που καλύπτει την καλλιέργεια το βγάζουμε να πέσει η υγρασία της καλλιέργειας,
- e) Το τρυγημένο κότζι συντηρείται στην κατάψυξη (-15°C).

⁶⁷ Το ρύζι υπό το εμπορικό σήμα “Kotobuki” προμηθεύτηκε από το ηλεκτρονικό κατάστημα wokshop.gr.



Εικ. 3.1 Ατμιση του ρυζιού στο εργαστήριο



Εικ. 3.2 Πλύσιμο ενυδατωμένου ρυζιού



Εικ. 3.3 Καλλιέργεια κότζι καλυμμένη με νάilon

Πίνακας 3.1. Αλλαγή μάζας ρυζιού κατά την παραγωγή κότζι.

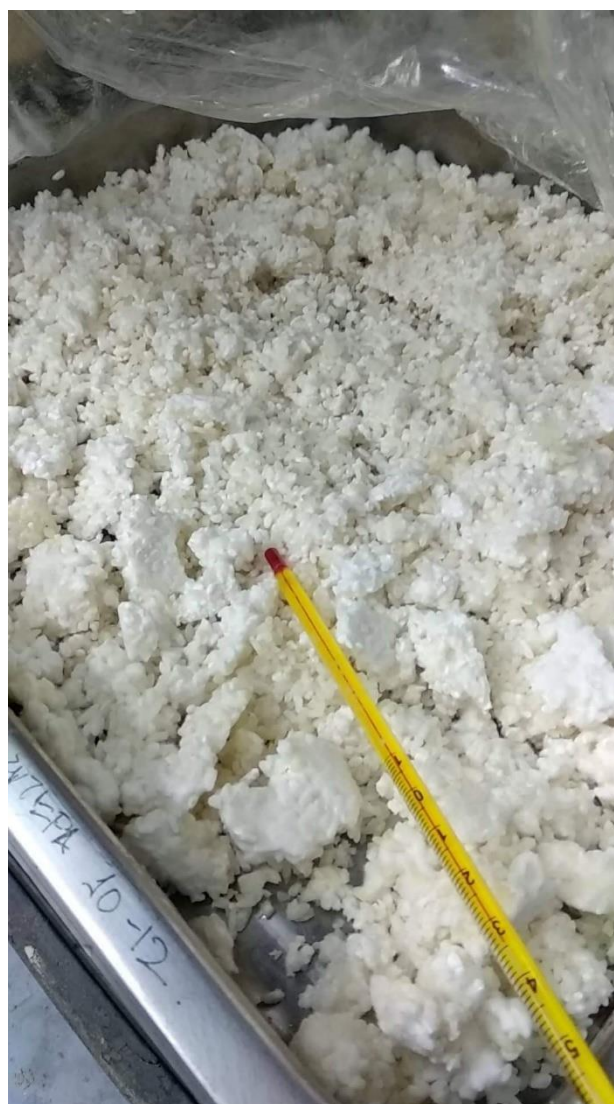
Κότζι batch #	Αρχική μάζα ξηρού ρυζιού, g	Τελική μάζα του κότζι, g
1	1300	1423
2	1300	1525
3	1063	1202
4	600	697

Πρέπει να σημειωθεί ότι η μάζα μετράται “όπως είναι” και δηλαδή στο αποτέλεσμα συμπεριλαμβάνονται όλες η μεταβολές λόγω δράσης του μύκητα και η προστιθέμενη υγρασία.

3.5 Moto.

Επόμενο στάδιο παραγωγής είναι το *moto*, μια καλλιέργεια ζύμης σχετικά μικρού όγκου, η οποία χρησιμοποιείται ως εμβόλιο για την κύρια ζύμωση. Κατά τη διάρκεια του πειράματος έχουμε κάνει 3 φορές *moto*, κάθε *moto* συνδέεται με το αντίστοιχο *moromi*, και το *moto* VIN13b εξυπηρετεί τις ανάγκες των ζυμώσεων VIN13b και Kast (με κάστανα).

Όπως έχουμε περιγράψει στη θεωρία, ο κύριος σκοπός της προετοιμασίας του *moto* είναι να εξασφαλιστεί υγιές και ασφαλές εμβόλιο. Σε κάθε από τα τρία batch ακολουθούμε το ίδιο πρωτόκολλο προετοιμασίας:



Εικ. 3.4 Το κότζι έτοιμο για τρύγο

- a) Προετοιμάζονται και ζυγίζονται οι απαιτούμενες ποσότητες του ρυζιού και του κότζι. Σημειώνεται ότι η αναλογία του κότζι σε αυτό το στάδιο μπορεί να αυξηθεί για την πιο αποτελεσματική δράση των ενζύμων, γι’ αυτό το λόγο ακολουθούμε γενικές αναλογίες με αυξημένη όμως αναλογία

του κότζι (κότζι:ρύζι:νερό 1:3:5.5) το οποίο αντιστοιχεί σε θεωρητικό δυναμικό αλκοολικό τίτλο ~18% Vol,

- b) Το ρύζι ατμίζεται όπως και στην διαδικασία παραγωγής του κότζι και ψύχεται,
- c) Το νερό απαλλασσόμενο χλωρίου μαζί με το κότζι τοποθετείται στο πλαστικό σκεύος στο οποίο και θα πραγματοποιείται ζύμωση. Στο μείγμα αυτό προστίθεται γαλακτικό οξύ 88% μέχρι να διορθωθεί το pH να είναι κάτω από 4 (3.9-3.6). Πρακτικά στις δικές μας περιπτώσεις χρειαζόταν 3.3-6.8 ml/L γαλακτικού οξέος (βλ. Πίνακα 3.2),
- d) Προστίθεται αζωτούχα προσθήκη Nutristart SP σε ποσότητα 0.4 g/L του τελικού όγκου ζύμωσης (δηλαδή μετά την τελευταία προσθήκη νερού στο στάδιο *moromi*),
- e) Στο μείγμα προστίθεται το ατμισμένο ρύζι,
- f) Το μείγμα εμβολιάζεται με τη ζύμη της επιλογής προετοιμασμένη σύμφωνα με τις προδιαγραφές του παραγωγού.

Πίνακας 3.2. Ζυμώσεις *moto*.

Batch #	Κότζι, g	Ατμ. ρύζι “επί ξηρού”, g	Νερό, ml	Γαλακτικό οξύ 88%, ml	pH πριν το εμβολιασμό	Στέλεχος ζύμης
1 (VIN13a)	195	350	590	4	3.6	VIN13
2 (VIN13b)	484	1224	2120	7	3.6	VIN13
3 (W34/70)	126	317	550	3.5	3.8	W34/70

Οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (24-27°C) με διάρκεια 7 μέρες. Στη συνέχεια οι καλλιέργειες τοποθετούνται στο ψυγείο ρυθμιζόμενο σε θερμοκρασία 12-14°C και σε λίγες μέρες χρησιμοποιούνται ως εμβόλια για τα *moromi*.

3.6 *Moromi*.

Κύριες ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε συνθήκες χαμηλής θερμοκρασίας (13-15°C). Το αμυλούχο υλικό προσθέταμε με παραδοσιακό τρόπο σε τρία στάδια: την 1^η μέρα, την 3^η και την 4^η. Κάθε προσθήκη ακολουθεί το ίδιο πρωτόκολλο

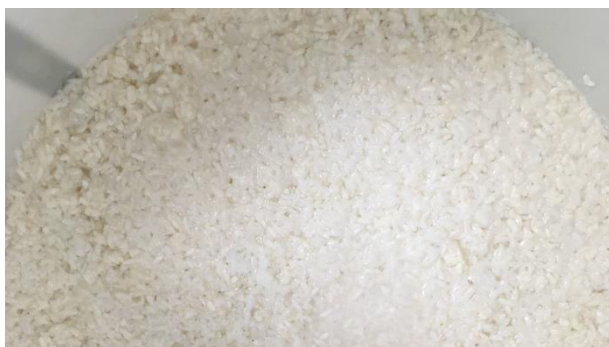
- a) προετοιμάζεται το ατμισμένο ρύζι όπως περιγράφηκε νωρίτερα,
- b) προστίθεται η απαιτούμενη ποσότητα του ατμισμένου ρυζιού μαζί με το κότζι και κατάλληλο νερό⁶⁸ στο κύριο σκεύος ζύμωσης.

Πίνακας 3.3. Προσθήκες *moromi*.

Batch #	1η μέρα			3η μέρα			4η μέρα		
	Κότζι, g	Ρύζι, g	Νερό, ml	Κότζι, g	Ρύζι, g	Νερό, ml	Κότζι, g	Ρύζι, g	Νερό, ml
VIN13a	240	570	525	376	1500	2270	809	2100	3800
VIN13b	544	1291	1500	504	1800	2760	774	3000	5000
W34/70	125	317	550	223	532	605	903	3390	5470
Kast	320	435 + 1190g κάστανα	1150	352	1200	2000	647	1584 + 1720g κάστανα	3540

Στη συνέχεια αφήσαμε τα *moromi* για ζύμωση και αποζύμωση στη θερμοκρασία 13-15°C. Συνολικός χρόνος ζύμωσης για το μορόμι ήταν περίπου 40 μέρες, τα πιο αναλυτικά νούμερα θα αναφερθούν στα αποτελέσματα.

Τα κάστανα πριν τη προσθήκη τα ψήσαμε⁶⁹ στο φούρνο ρυθμιζόμενο σε θερμοκρασία 200°C για 30 λεπτά, ξεφλουδίσαμε και κόψαμε με μπλέντερ σε κομμάτια περίπου 2-3 χιλιοστά σε διάμετρο. Ως *moto* για τη ζύμωση Kast χρησιμοποιήθηκε ένα μέρος του *moto* VIN13b.



Εικ. 3.5 Ζύμωση *moromi*

⁶⁸ Χρησιμοποιήσαμε το ίδιο νερό με το *moto*.

⁶⁹ Για να επιτευχθεί ζελατινοποίηση του αμύλου. Στο (Murado 2008) αναφέρεται μόνο η χρήση “μαγειρεμένων κάστανων” χωρίς λεπτομέρειες.

3.7 Μεταζυμωτικές κατεργασίες.

Μετά τη ζύμωση κάθε batch φιλτραρίστηκε με ένα πανί. Το βρεγμένο σε σάκε ρύζι που έμεινε μέσα στο πανί πατήθηκε με τα χέρια. Προστίθεται μπεντονίτης σε ποσότητα 1g/L του φιλτραρισμένου σάκε. Ο μπεντονίτης ενεργοποιήθηκε σύμφωνα με τις προδιαγραφές του παραγωγού. Στη συνέχεια σάκε μεταφέρεται στο ψυγείο ρυθμισμένο σε 4°C για τη στατική απολάσπωση. Το απολασπώμενο προϊόν εμφιαλώθηκε σε μπουκάλια μύρας 0.33 ml και παστεριώθηκε. Για την παστερίωση τα μπουκάλια τοποθετήθηκαν σε μια κατσαρόλα με νερό σταθερής θερμοκρασίας 63°C για 20 λεπτά από την ώρα τοποθέτησης των μπουκαλιών μέσα. Μετά τα μπουκάλια συντηρήθηκαν στο ψυγείο 4°C για τις περιόδους 2-3 βδομάδες μέχρι να ανοιχτούν για τη γευστική αξιολόγηση και τις φυσικοχημικές αναλύσεις.



Εικ. 3.6 Φιλτράρισμα του σάκε (ζύμωση με κάστανα)



Εικ. 3.7 Παστερίωση του εμφιαλωμένου σάκε

3.8 Αναλυτικές μεθόδους.

3.8.1 Σχετική υγρασία.

Η σχετική υγρασία μετρήθηκε για ρύζι σε διαφορετικά στάδια της προετοιμασίας και για τα κάστανα. Ακολουθήσαμε το εξής πρωτόκολλο:

- a) Παίρνουμε ένα δείγμα περίπου 10g και το τοποθετούμε στο προζυγισμένο κομμάτι αλουμινόχαρτου,
- b) Ζυγίζεται το δείγμα,
- c) Κάθε δείγμα τοποθετείται στον κλίβανο στο οποίο τηρείται σταθερά θερμοκρασία περίπου 110°C,
- d) Τα δείγματα ζυγίζονται τακτικά μέχρι τη σταθεροποίηση του βάρους,
- e) Η σχετική υγρασία υπολογίζεται από την αλλαγή βάρους δείγματος.

3.8.2 Παρακολούθηση της ζύμωσης.

Η πορεία της ζύμωσης παρακολούθηθηκε με τις τακτικές μετρήσεις θερμοκρασίας, pH και περιεκτικότητας σε αιθανόλη. Η θερμοκρασία και το pH μετρήθηκε με τη χρήση αντίστοιχων οργάνων τηρώντας τις προδιαγραφές χρήσης τους.

3.8.3 Πυκνότητα.

Η μέτρηση της πυκνότητας στο σάκε πραγματοποιείται συνήθως με τη κλασική μέθοδο πυκνομετρίας παρόμοια με τη μέθοδο της OIV OIV-MA-AS2-01A (OIV 2016). Η πυκνότητα συνήθως εκφράζεται ως ειδικό βάρος 15°C/4°C⁷⁰ ή ως υπολογισμένο *SMV*⁷¹, το οποίο υπολογίζεται ως

$$SMV=1443/SG-1443,$$

⁷⁰ Δηλαδή η πυκνότητα του δείγματος στους 15°C προς την πυκνότητα νερού στους 4°C, και η πυκνότητα νερού στους 4°C θεωρείται να ισούται με 0.99997 g/cm³ (NTA 2020).

⁷¹ *Sake Meter Value*, 日本酒度, “βαθμός του σάκε”.

όπου SG - ειδικό βάρος (15°C/4°C) του σάκε. Στη περίπτωση που το ειδικό βάρος ισούται με 1, το SMV=0, το αρνητικό SMV θεωρείται μια ένδειξη ξηρού στη γεύση σάκε, και αντίστοιχα θετικό - γλυκού σάκε.

Κατά την παρούσα έρευνα οι μετρήσεις της πυκνότητας πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο της OIV OIV-MA-AS2-01A⁷².

3.8.4 Περιεκτικότητα σε αιθανόλη.

Η περιεκτικότητα σε αιθανόλη μετρήθηκε με τη χρήση δύο μεθόδους.

Ως βασική μέθοδος αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος πυκνομετρίας της OIV (OIV-MA-AS312-01A) όπως περιγράφεται στο (OIV 2016): απόσταξη απαερωμένου και εξουδετερωμένου δείγματος και μέτρηση της περιεκτικότητας της αλκοόλης στο απόσταγμα με τη χρήση διακριβωμένου αλκοολομέτρου.

Ως καθημερινή μέθοδος χρησιμοποιήθηκε μια καινούργια πρακτική απλοποιημένη μέθοδος βασισμένη στη χρήση ψηφιακού διαθλασίμετρου:

- a) Παίρνουμε 25ml φιλτραρισμένου δείγματος σε μια ογκομετρική φιάλη, και το μεταφέρουμε σε μια σφαιρική της αποστακτικής,
- b) Εξουδετερώνεται το δείγμα με τη χρήση NaOH (να αποφευχθεί η απόσταξη τυχόν παρόντων πτητικών οργανικών οξέων), και προστίθενται λίγο νερό (περίπου 15ml) να εξασφαλιστεί μια ομαλή απόσταξη,
- c) Το απόσταγμα (περίπου 18-20ml) μαζεύεται στην ίδια ογκομετρική των 25ml,
- d) Μετράται δείκτης διάθλασης, και μετατρέπεται στην περιεκτικότητα σε αλκοόλ με χρήση της μαθηματικής συσχέτισης του δείκτη διάθλασης και περιεκτικότητας σε αλκοόλη μετρημένη με τη χρήση της μεθόδου αναφοράς (της πυκνομετρίας της OIV)⁷³.

Με τη χρήση της μεθόδου αυτής επιτυγχάνεται η εξοικονόμηση του όγκου των δειγμάτων κατά τις ζυμώσεις εργαστηριακού κλίμακα (όγκου 5-10L).

Η μέθοδος εκτίμησης περιεκτικότητας του κρασιού σε αιθανόλη με βάση το δείκτη διάθλασης προτείνεται και από την OIV (η μέθοδος OIV-MA-AS312-01B του καταλόγου), αλλά χρησιμοποιούνται πιο μεγάλοι, πιο βολικοί για την βιομηχανία όγκοι (200ml). Σημειώνεται,

⁷² Δηλαδή μετρήθηκε η πυκνότητα όπως ορίζεται από την OIV, μάζα ανά μονάδα όγκου στους 20°C.

⁷³ Σημειώνεται, ότι πρόκειται για μια απλοποιημένη μέθοδο. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιούνται στη θερμοκρασία δωματίου, το δείγμα κατά τη μέτρηση των 25ml επίσης βρίσκεται σε θερμοκρασία δωματίου, χωρίς όμως ιδιαίτερο έλεγχο της θερμοκρασίας. Η μέθοδος έδειξε καλή επαναληψιμότητα αποτελεσμάτων και αποδεκτή ακεραιότητα. Τα αποτελέσματα αυτά σχολιάζονται στο αντίστοιχο μέρος της παρούσας εργασίας.

ότι ο δείκτης διάθλασης του πραγματικού αποστάγματος διαφέρει από το δείκτη διάθλασης απλού μείγματος νερού και αιθανόλης λόγω άλλων παρόντων στο απόσταγμα ουσιών, κυρίως μεθανόλης και ανώτερων αλκοολών⁷⁴.

Μια εργαστηριακή παραλλαγή της μεθόδου προτείνεται στο (Gerogiannaki-Christopoulou 2003), χωρίς όμως λεπτομερή περιγραφή. Η γραμμική συσχέτιση συγκέντρωσης αιθανόλης και δείκτη διάθλασης παρατηρείται για συγκεντρώσεις αιθανόλης 0-40% (Gerogiannaki-Christopoulou 2003). Αξιοσημείωτο είναι ότι αν η καμπύλη αναφοράς χαράσσεται με δεδομένα των καθαρών μειγμάτων αιθανόλης και νερού, τα καλύτερα αποτελέσματα ως προς τη ακεραιότητα δείχνουν δείγματα βότκας, η οποία χαρακτηρίζεται από πιο απλό χημικό προφίλ σε σύγκριση με τζιν, τσίπουρο και άλλα ποτά που χρησιμοποιήθηκαν στην έρευνα (Gerogiannaki-Christopoulou 2003).

3.8.5 Οξύτητα.

Σύμφωνα με τις προδιαγραφές της Εθνικής Φορολογικής Αρχής της Ιαπωνίας η οξύτητα στο σάκε μετράται ως ο όγκος σε ml του διαλύματος NaOH 0.1M, ο οποίος χρειάζεται για την εξουδετέρωση των 10ml σάκε (Furukawa 2012). Η οξύτητα επίσης μπορεί να εκφραστεί ως προς το ηλεκτρικό οξύ σε g/100ml του σάκε. Στη περίπτωση χρήσης pH-μέτρου η τιτλοδότηση πραγματοποιείται μέχρι το pH=7.2 (NTA 2020).

Οι μετρήσεις κατά την παρούσα έρευνα πραγματοποιήθηκαν με χρήση του pH-μέτρου ακολουθώντας τις παραπάνω προδιαγραφές. Το δείγμα 10ml προς τιτλοδότηση αραιώθηκε με 10ml απιονισμένου νερού για την διευκόλυνση των μετρήσεων. Πριν τη μέτρηση το δείγμα υφίσταται απαέρωση (βλ. και τη μέθοδο OIV-MA-AS313-01 της OIV (OIV 2016)).

3.8.6 Συγκέντρωση αμινοξέων.

Η τιτλοδοτούμενη συγκέντρωση αμινοξέων παρουσιάζει ένα σημαντικό χαρακτηριστικό του σάκε. Σύμφωνα με τις προδιαγραφές της Εθνικής Φορολογικής Αρχής της Ιαπωνίας, η επίσημη μέθοδος προσδιορισμού βασίζεται στη μέθοδο του Σόρενσεν (Sørensen)⁷⁵:

⁷⁴ Γι' αυτό το λόγο για να βρεθεί μια αξιόπιστη μαθηματική συσχέτιση είναι σημαντικό να μετρηθούν με τη μέθοδο αναφοράς παρόμοια δείγματα με υποθετικά παρόμοιο προφίλ των πηκτικών προσμίξεων στο απόσταγμα

⁷⁵ Η λεγόμενη "Τιτλοδότηση της φορμόλης". Για αυτή τη μέθοδο υπάρχει πλούσια βιβλιογραφία, στην οποία αναφέρονται και πλεονεκτήματά του και μειονεκτήματά του (βλ. και French 1945; Gump 2002). Για τα σημερινά δεδομένα η μέθοδος αυτή μπορεί να κριθεί μέτριας αποδοτικότητας, αλλά μπορούμε να υποθέσουμε, ότι τα διαφορετικά σάκε θα έχουν πάνω κάτω παρόμοια σύσταση ως προς τα ποσοστά αμινοξέων, και επομένως το πιθανό σφάλμα της μεθόδου θα παραμένει σταθερό. Μια οινολογική εφαρμογή της μεθόδου για την εκτίμηση του YAN στο μούστο βλ. στο (Zoecklein 1999: 445).

- a) 10ml δείγματος εξουδετερώνονται μέχρι pH=8.2 με διάλυμα NaOH N/10,
- b) Προστίθενται 5ml υδατικού διαλύματος μεθανάλης⁷⁶,
- c) Πραγματοποιείται τιτλοδότηση με διάλυμα NaOH N/10 μέχρι pH=8.2. Το αποτέλεσμα μπορεί να εκφραστεί και ως προς τη γλυκίνη σε g/100ml (NTA 2020).

Κατά την παρούσα έρευνα η μετρήσεις αμινοξύτετητας πραγματοποιήθηκαν ακολουθώντας το πρωτόκολλο της τιτλοδότησης φορμόλης, όπως περιγράφεται στο (Zoecklein 1999: 445).

3.8.7 Χρώμα.

Η χρώμα του σάκε μετριέται με χρήση του φασματοφωτόμετρου ως απορρόφηση στα 430nm (NTA 2020). Κατά την παρούσα έρευνα μετρήθηκε η απορρόφηση στα 430nm των φιλτραρισμένων με φίλτρα σύριγγας μεμβράνης 0,22μm δειγμάτων, όπως και η απορρόφηση στα 700nm για την εκτίμηση της θολότητας σύμφωνα με το (ASBC 1954).

3.8.8 Γευστική αξιολόγηση.

Η γευστική αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε σε ελεύθερη μορφή ως δοκιμή και συζήτηση από τους ίδιους τους ερευνητές και τους συναδέλφους τους με διαφορετική εμπειρία γευσιγνωσίας.

⁷⁶ Το διάλυμα πρέπει να ανταποκρίνεται στις προδιαγραφές του προτύπου JIS K 8872 (π.χ. η συγκέντρωση μεθανάλης πρέπει να είναι 36-38% κ.β., βλ. και <https://kikakurui.com/k8/K8872-2008-01.html> [accessed 28/07/2020])

4 Αποτελέσματα & Συζήτηση.

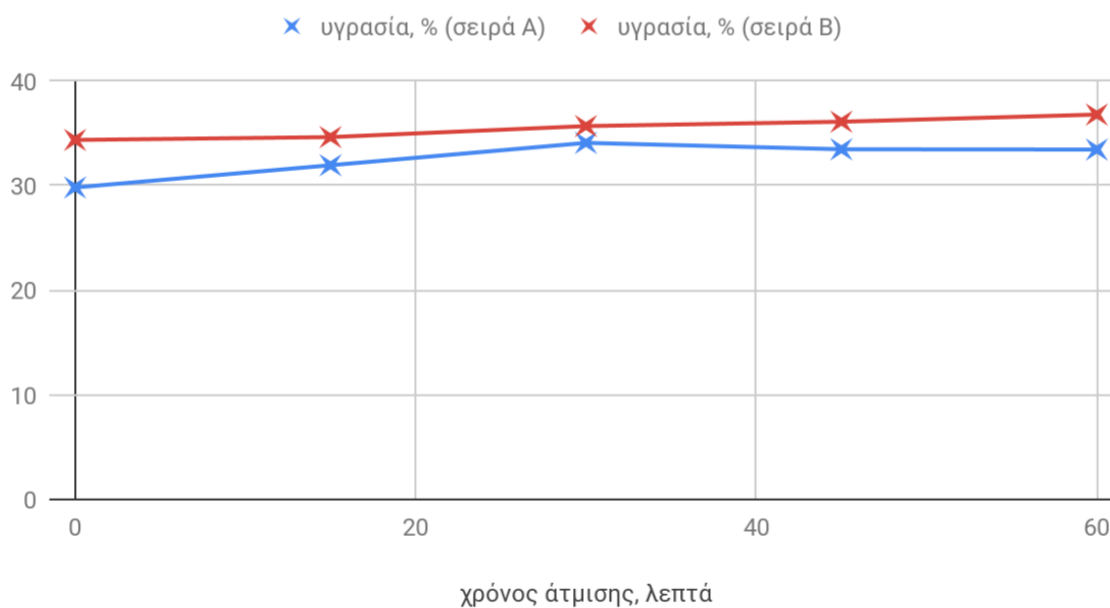
4.1 Μέτρηση σχετικής υγρασίας της πρώτης ύλης.

Μετρήθηκε η σχετική υγρασία της πρώτης ύλης και η αλλαγή της σχετικής υγρασίας κατά την προετοιμασία του ρυζιού για την παραγωγή του σάκε. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν 2 φορές (2 ξεχωριστά πειράματα, παρουσιάζονται ως σειρά A και σειρά B). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 4.1. Τα δείγματα πάρθηκαν ακριβώς πριν ξεκινήσει ενυδάτωση, στην αρχή της άτμισης και στη συνέχεια κάθε 15 λεπτά κατά την άτμιση.

Πίνακας 4.1. Σχετική υγρασία πρώτης ύλης.

Πρώτη ύλη	Σχετική υγρασία, %
Ρύζι πριν την ενυδάτωση	13.11
Ρύζι ενυδατωμένο (σειρά A)	29.81
Ρύζι ενυδατωμένο (σειρά B)	34.36
Ρύζι ατμισμένο (t=15min, σειρά A)	31.94
Ρύζι ατμισμένο (t=15min, σειρά B)	34.63
Ρύζι ατμισμένο (t=30min, σειρά A)	34.08
Ρύζι ατμισμένο (t=30min, σειρά B)	35.69
Ρύζι ατμισμένο (t=45min, σειρά A)	33.47
Ρύζι ατμισμένο (t=45min, σειρά B)	36.10
Ρύζι ατμισμένο (t=60min, σειρά A)	33.44
Ρύζι ατμισμένο (t=60min, σειρά B)	36.79
Έτοιμο κότζι (σειρά A)	30.87
Έτοιμο κότζι (σειρά B)	36.06

Αλλαγή σχετικής υγρασίας κατά την άτμιση

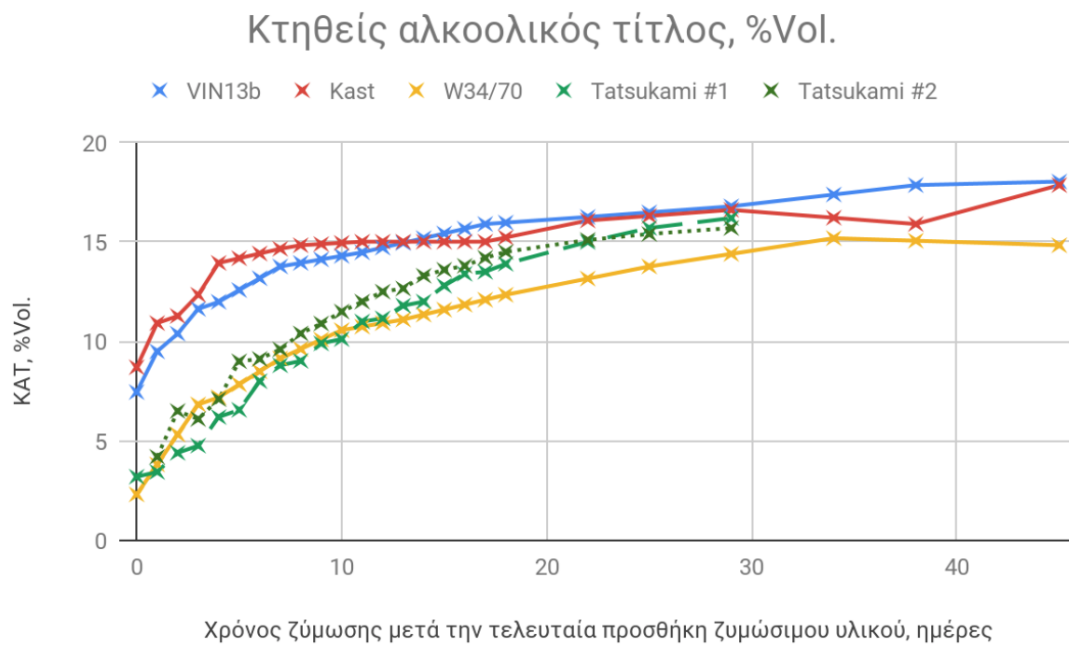


Διάγραμμα 4.1. Αλλαγή σχετικής υγρασίας κατά την άτμιση.

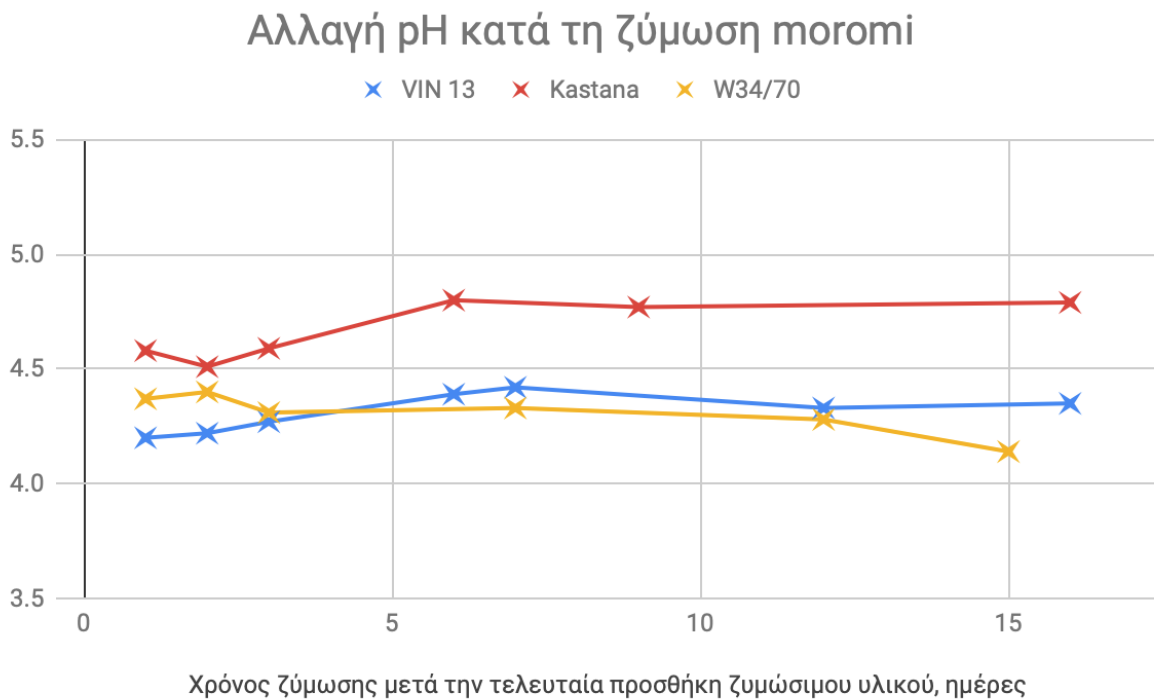
Σημειωτέον ότι η υγρασία του ρυζιού δεν αλλάζει σημαντικά κατά την άτμιση. Η τελική υγρασία του ατμισμένου ρυζιού συμφωνεί με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας (Kitamoto 2002). Αναφέρεται, ότι η δυνατότητα απορρόφησης νερού από το ρύζι είναι αντιστρόφως ανάλογη με το βαθμό λείανσης (*milling rate*), δηλαδή όσο λιγότερα έχει λειανθεί το ρύζι, τόσο χειρότερα απορροφά νερό (Mizuma 2014), το οποίο εξηγεί και χαμηλή απορρόφηση νερού από το ρύζι του πειράματος κατά την άτμιση. Επίσης το ρύζι απορροφά το μεγαλύτερο ποσοστό του νερού κατά την ενυδάτωση, και όχι κατά την άτμιση.

4.2 Πορεία της ζύμωσης.

Η πορεία της αλκοολικής ζύμωσης παρακολούθησε με τις τακτικές μετρήσεις κτηθέντος αλκοολικού τίτλου για τις ζυμώσεις Vin13b, Kast και W34/70. Για τη σύγκριση στο διάγραμμα παρουσιάζονται και τα αποτελέσματα των ζυμώσεων όπως δημοσιεύτηκαν στο (Tatsukami 2018). Σημειωτέον ότι οι καμπύλες σε γενικές γραμμές έχουν ίδια μορφή, με τη καμπύλη της Kast να έχει πιο απότομη κλίση στην εκθετική φάση, πιθανόν λόγω υψηλότερης αρχικής συγκέντρωσης ζυμώσιμων σακχάρων από τα κάστανα.



Διάγραμμα 4.2. Η πορεία της ζύμωσης. Αλλαγή αλκοολικού τίτλου.



Διάγραμμα 4.3. Η αλλαγή του pH κατά τη ζύμωση πορομί

Επίσης μετρήθηκε ο αλκοολικός τίτλος στο *moto*. Για το *moto* του Vin13 βρέθηκε ο τίτλος 12.5%vol, και για το *moto* του W34/70 8.4%vol. Η διαφορά αυτή μπορεί να συσχετίζεται με τη διαφορετική ικανότητα εγκλιματισμού των στελεχών στις συνθήκες του *moto*, όπως και σε πιθανές διαφορές στη θερμοκρασία περιβάλλοντος κατά τη ζύμωση.

4.3 Το τελικό προϊόν και τα χαρακτηριστικά του.

Συνολικά παράχθηκαν και εμφιαλώθηκαν 20 λίτρα σάκε, τα οποία στη συνέχεια αξιολογήθηκαν χημικά και γευστικά. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν με εξαίρεση τις φασματοφωτομετρικές μετρήσεις.

Πίνακας 4.2. Τα χαρακτηριστικά των σάκε.

Ζύμωση	Αλκοολικός Τίτλος, %vol.	Πυκνότητα, g/L	pH	Οξύτητα, ml NaOH 0.1M	Αμινοξέτητα, ml NaOH 0.1M	Χρώμα A ₄₃₀ , AU	Απορρόφηση A ₇₀₀ , AU	Σχετική αποδοτικότητα της ζύμωσης, %
VIN13a	19.0±0.3	986.2±0.2	4.3±0.0	3.4±0.2	3.0±0.3	0.187	0.034	81.1
VIN13b	18.1±0.3	986.9±0.1	4.3±0.0	2.8±0.2	3.3±0.3	0.077	0.004	79.0
W34/70	15.0±0.3	1000.2±0.1	4.1±0.0	2.8±0.0	3.2±0.2	0.059	0.009	65.7
Kast	17.7±0.4	991.1±0.3	4.8±0.2	2.5±0.2	2.1±0.2	1.401	0.318	79.7

Οι ζυμώσεις με χρήση του στελέχους VIN13 απέκτησαν τον αλκοολικό τίτλο συγκρίσιμο με αυτόν της βιβλιογραφίας (Yoshizawa 2004a). Αν και συνήθως το σάκε αραιώνεται μετά τη ζύμωση μέχρι περίπου 15%Vol., στην πράξη αναφέρεται η κυκλοφορία στην αγορά των σάκε έως και 18%Vol. (Yoshizawa 1999:100, Gogami 2011).

Σημειωτέων ότι και τα δύο στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν, έδειξαν την ικανότητα να ζυμώσουν μέχρι πιο ψηλό αλκοολικό τίτλο σε σύγκριση με αυτό των προδιαγραφών των παραγωγών: για το VIN13 αναφέρεται ο υψηλότερος αλκοολικός τίτλος 17%vol.⁷⁷, και για το

⁷⁷ Σύμφωνα με το datasheet διαθέσιμο στο <http://www.oenobrand.com/files/PDF/Anchor/New-World-Wine-Yeasts/Anchor-VIN-13-Product-Data-Sheet-EN.pdf> [accessed 16/08/2020].

W34/70 9-11%vol⁷⁸. Κατά τις ζυμώσεις του σάκε το VIN13 ζύμωσε μέχρι τους 19%vol., και W34/70 μέχρι τους 15%vol.

Συνήθως στη βιβλιογραφία υποστηρίζεται η ειδική ανθεκτικότητα σε αιθανόλη των στελεχών των ζυμών του σάκε είναι μεγαλύτερη, σύμφωνα με την παραδοσιακή κλίμακα ανθεκτικότητας των ζυμών σε αλκοόλη είναι: ζύμες σάκε > ζύμες κρασιού > ζύμες αποσταγματοποιίας >> ζύμες μπίρας (Casey 1986). Αυτή η άποψη όμως δεν μπορεί να υποστηριχθεί. Στις διαφορετικές συνθήκες η ζυμωτική ικανότητα των στελεχών και η ανθεκτικότητα σε αιθανόλη διαφέρει σημαντικά, και στη βιβλιογραφία αναφέρονται και ζυμώσεις στις οποίες τα στελέχη του σάκε έδειξαν πάρα πολύ μικρή ανθεκτικότητα, χαμηλότερη και από την ανθεκτικότητα των στελεχών της μπίρας. Ο υψηλότερος ΚΑΤ για τη ζύμωση της *Saccharomyces cerevisiae* κατά τις συνθήκες του σάκε, ο οποίος αναφέρεται στη βιβλιογραφία, είναι 25.6% και η ζύμωση αυτή πραγματοποιήθηκε με ένα στέλεχος ζυθοποίησης (Casey 1986). Διαφέρει στη βιβλιογραφία και ο ορισμός της ανθεκτικότητας σε αιθανόλη, δηλαδή ο τρόπος της εκτίμησής της. Γενικά, μπορεί να υποστηριχθεί, ότι ο κύριος παράγον της αυξημένης ικανότητας απόκτησης αλκοολικού τίτλο από τις *S. cerevisiae* σε αυτές τις περιπτώσεις είναι οι συνθήκες της ζύμωσης του σάκε (Casey 1986). Τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας συμφωνούν με αυτήν την υπόθεση. Σημειώνεται, ότι πιθανόν σημαντικό ρόλο στην ανθεκτικότητα αυτή παίζουν τα παράγωγα πρωτεολιπιδικής φύσης του μεταβολισμού του *A. oryzae* κατά τη ζύμωση *koji* (Casey 1986).

Οι πυκνότητες των δειγμάτων βρέθηκαν λογικές και αναλογούν στον αλκοολικό τίτλο. Τα pH των δειγμάτων βρίσκονται κοντά στα νούμερα, που αναφέρονται για τα σάκε της γιαπωνέζικης αγοράς⁷⁹. Τα δεδομένα όμως δεν είναι αρκετά να βγάλουμε κάποιο συμπέρασμα με εξαίρεση ότι πιθανόν το υψηλότερο pH του σάκε με κάστανα οφείλεται στη πιο πολύπλοκη χημική σύσταση μίγματος ρύζι-κάστανα και ειδικά στην συνεισφορά των κάστανων σε αυτήν.

Η οξύτητα βρέθηκε να είναι πιο ψηλή από το μέσο όρο των δειγμάτων της αγοράς⁸⁰, ο οποίος για διαφορετικά είδη σάκε κυμαίνεται από 1.18 μέχρι 1.47 (Furukawa 2012), και όμως μερικά δείγματα σάκε που αναφέρονται στο (Gogami 2011, βλ. και Nose 2005) έχουν συγκρίσιμες ή ακόμα και πιο ψηλές οξύτητες. Γενικά, η οξύτητα στο *junmai-shu* (σάκε χωρίς προσθήκες, το

⁷⁸ Σύμφωνα με τις πληροφορίες στην επίσημη ιστοσελίδα του παραγωγού <https://fermentis.com/en/fermentation-solutions/you-create-beer/saflager-w-3470/> [accessed 16/08/2020].

⁷⁹ Π.χ. pH 4.1 (Hashizume 2013: 210), στο (Nose 2005) αναφέρονται τιμές από 4.02 έως 4.58 για διαφορετικά δείγματα εμπορικού σάκε.

⁸⁰ Όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία.

οποίο παράγεται αποκλειστικά από ρύζι, κότζι και νερό) τείνει να είναι πιο ψηλή από τα άλλα είδη (Furukawa 2012).

Η συγκέντρωση των αμινοξέων βρέθηκε να είναι πιο ψηλή του σάκε της αγοράς, εκτός από τα μερικά δείγματα αναφερόμενα στο (Gogami 2011). Σημειωτέον ότι την μεγαλύτερη συγκέντρωση από αυτά τα δείγματα την παρουσιάζει το δείγμα με μεγαλύτερο βαθμό λείανσης (milling rate ~90-93%) δηλαδή παραγμένο με τη χρήση του ρυζιού κατά προσέγγιση με τον ίδιο βαθμό λείανσης με το ρύζι που χρησιμοποιήθηκε κατά την παρούσα έρευνα. Ο κύριος λόγος της υψηλής συγκέντρωσης λογικά θα είναι ο βαθμός λείανσης του ρυζιού. Τη χαμηλότερη συγκέντρωση έχει το σάκε με κάστανα, το οποίο πιθανόν οφείλεται στο χαμηλότερο τελικό ποσοστό του ρυζιού στην πρώτη ύλη.

Το χρώμα των δειγμάτων, το οποίο μετράται ως απορρόφηση στα 430 nm, είναι σημαντικά πιο ψηλή από την τυπική απορρόφηση των σάκε της αγοράς (Ohba 1986). Όμως τα σάκε που παρήχθησαν και αναλύθηκαν είναι αφιλτράριστα. Επίσης, τα σάκε δεν περνάνε το λεγόμενο “τεστ θολότητας”, όπως αναφέρεται στο (ASBC 1954), οπότε οι μετρήσεις δεν μπορεί να κριθούν αξιόπιστες. Οπτικά με γυμνό μάτι τα σάκε φαίνονται διαφανή, με ελάχιστη κιτρινωπή απόχρωση, με εξαίρεση το σάκε με κάστανα, το οποίο ανέπτυξε καστανό χρώμα και ήταν θολό. Για όλες τις ζυμώσεις υπολογίστηκε η σχετική αποδοτικότητα ζύμωσης. Η σχετική αποδοτικότητα της ζύμωσης ορίστηκε ως πηλίκο πραγματικού κτηθέντος αλκοολικού τίτλου προς θεωρητικό. Ο θεωρητικός αλκοολικός τίτλος υπολογίστηκε με χρήση των συντελεστών όπως έχουμε αναφέρει και νωρίτερα. Δηλαδή

$$\Sigma.A.Z. = ((m_{\text{ρύζι}} * 0.85 * 0.6 * 0.95) / (V_{\text{νερό}} * 17)) / ABV,$$

όπου $m_{\text{ρύζι}}$ - συνολική μάζα του ρυζιού το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί κατά την παραγωγή (μαζί με το ρύζι του κότζι) εκφραζόμενη επί ξηρού σε γραμμάρια, $V_{\text{νερό}}$ - όγκος του νερού, το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί κατά την παραγωγή, εκφραζόμενος σε λίτρα, ABV - πραγματικός αλκοολικός τίτλος. Όλες οι ζυμώσεις με χρήση του στελέχους Vin13 (VIN13a, VIN13b και Kast) έδειξαν συγκρίσιμες αποδοτικότητες, ενώ W34/70 – πιο χαμηλή. Με την ίδια μέθοδο υπολογίστηκαν και οι αποδοτικότητες των ζυμώσεων του (Tatsukami 2018). Σημειωτέον, ότι οι αποδοτικότητες αυτών των ζυμώσεων ζυμώσεων βρέθηκαν να είναι συγκρίσιμες με τις αποδοτικότητες των Vin13: 79.4% για Tatsukami #1 και 78.1% για Tatsukami #2.

Σε σύγκριση τα δύο στελέχη (το στέλεχος της οινοποίησης Vin13 και το στέλεχος της ζυθοποίησης W34/70) έδειξαν διαφορετικά αποτελέσματα κατά τις συνθήκες του σάκε. Η ζύμωση W34/70 ξεχωρίζει από πιο χαμηλό pH, πιο υψηλή τελική πυκνότητα και πιο χαμηλό

τελικό αλκοολικό τίτλο. Λόγω της πιο ψηλής τελικής πυκνότητας μπορεί να υποστηριχθεί με μεγάλο βαθμό βεβαιότητας ότι το W34/70 δεν έχει ολοκληρώσει τη ζύμωση.

Όλα τα δείγματα σάκε δοκιμάστηκαν από τους ερευνητές και μερικούς εθελοντές. Οι ζυμώσεις χωρίς κάστανα ανέπτυξαν μια “κλασσική” γεύση απλού σάκε και χαρακτηρίστηκαν από ένα φρουτώδη χαρακτήρα με κυρίαρχο φρούτο άγουρο πεπόνι, και από πλούσια γεύση ουμάμι και πλήρες σώμα. Οι δοκιμάζοντες συμφώνησαν ότι μπορεί να λείπει λίγο σε αυτά μια φινέτσα, αλλά τελικά είναι ένα ευχάριστο ποτό. Οι Vin13a και Vin13b ξεχώριζαν από πιο έντονο πεπόνι με νότες ώριμου πεπονιού και ανανά με το πεπόνι να γίνεται κυρίαρχο κατά την επίγευση. Η οξύτητά τους δεν ήταν ιδιαίτερα εμφανής ίσως και κάπως μειωμένη όπως ανέφεραν κάποιοι από τους δοκιμάζοντες, ενώ το σώμα ήταν πάνω του μέτριου. Η W34/70 είχε μειωμένη τη γεύση του πεπονιού ενώ απουσίαζε τελείως ο ανανάς και γενικότερα δεν υπήρχε κάποια άλλη εύκολα αναγνωρίσιμη γεύση εκτός ίσως από τη γεύση ρυζιού, η οποία παρέμενε και στην επίγευση. Η οξύτητα σε αυτή τη ζύμωση ήταν πιο έντονη από τις προηγούμενες. Επιπλέον το σώμα ήταν πιο ελαφρύ και υπήρχε και μια γλυκύτητα την οποία όμως στο κύριο μέρος της την κάλυπτε η οξύτητα. Το σάκε με κάστανα ανέπτυξε πιο “rustique” χαρακτήρα καθώς τα αρώματα του πεπονιού και του ανανά εξαφανίστηκαν και στη θέση τους αναπτύχθηκαν αρώματα κάστανων και ψωμιού τα οποία παραμένουν και στην επίγευση, ενώ οι δοκιμάζοντες συμφώνησαν, ότι ως ποτό δεν είναι τόσο ευχάριστο και θέλει περαιτέρω πειραματισμό.

4.4 Αξιολόγηση της διαθλασιμετρικής μεθόδου εκτίμησης αλκοολικού τίτλου.

Ένα από τα σημαντικά αποτελέσματα της παρούσας έρευνας είναι η πρακτική εφαρμογή της διαθλασιμετρικής μεθόδου για την παρακολούθηση της ζύμωσης. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη μέτρηση δείκτη διάθλασης του αποστάγματος του δείγματος, ο οποίος αναλογεί στη συγκέντρωση αιθανόλης στο μίγμα νερού και αιθανόλης. Η μέθοδος αυτή έχει αρκετά μειονεκτήματα: είναι χρονοβόρα, απαιτεί εξειδικευμένο εξοπλισμό απόσταξης, ψηφιακό διαθλασίμετρο, και το αποτέλεσμα επηρεάζεται σημαντικά από τις προσμίξεις στο απόσταγμα, επειδή στην πράξη απόσταγμα⁸¹ των πραγματικών δειγμάτων των γλευκών εν ζυμώσει και των ποτών δεν είναι απλό μίγμα αιθανόλης και νερού. Αλλά για τους εργαστηριακούς σκοπούς στη

⁸¹ Υποτίθεται ότι το απόσταγμα παράγεται με την απλή απόσταξη, όπως προβλέπεται από τη μέθοδο της OIV.

περίπτωση ζυμώσεων μικρού όγκου έχει ένα μεγάλο πλεονέκτημα: μικρός απαιτούμενος όγκος δείγματος.

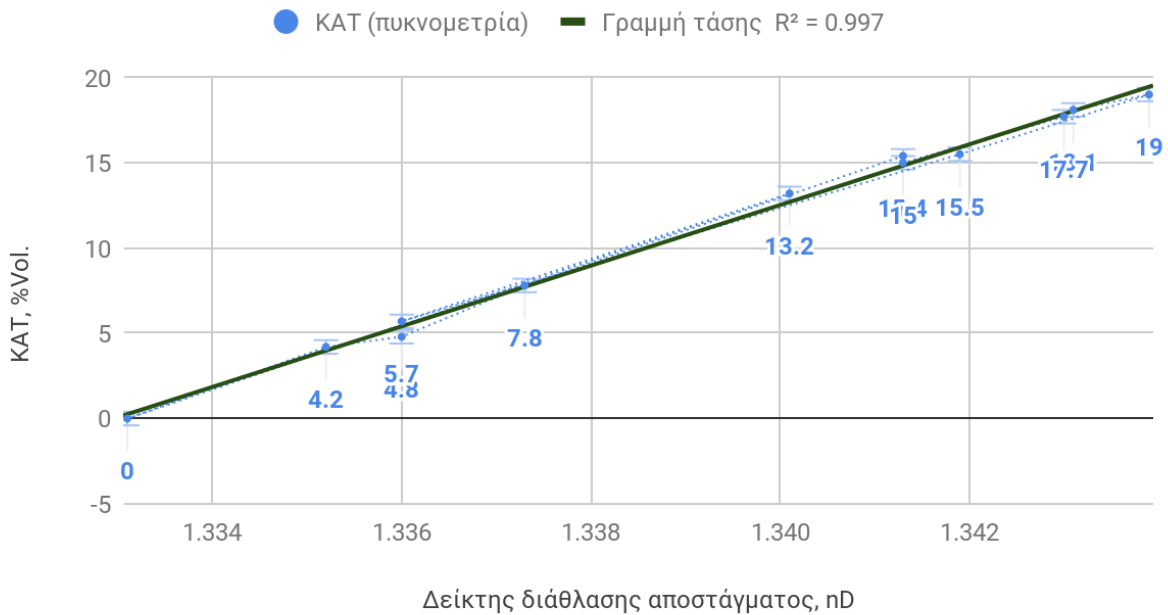
Τα δείγματα του σάκε μετρήθηκαν τακτικά με τη χρήση της μεθόδου αυτής, όπως περιγράφηκε νωρίτερα. Ο υπολογισμός του κτηθέντος αλκοολικού τίτλου πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της καμπύλης αναφοράς η οποία χαράχτηκε με τη χρήση των μετρήσεων του δείκτη διάθλασης διαφορετικών δειγμάτων, ο αλκοολικός τίτλος των οποίων μετρήθηκε με τη χρήση της πυκνομετρικής μεθόδου. Επιβεβαιώθηκε η γραμμική συσχέτιση του ΚΑΤ με το δείκτη διάθλασης αποστάγματος με αποδεκτό R^2 (βλ. αντίστοιχη καμπύλη και πίνακα 4.3, τα δεδομένα συνοδεύονται με την απεικόνιση τυπικού σφάλματος⁸²).

Πίνακας 4.3. Μετρήσεις ΚΑΤ και δείκτη διάθλασης στα δείγματα αναφοράς.

Δείγμα	ΚΑΤ, %Vol.	Δείκτης Διάθλασης Αποστάγματος
Πειραματικό σάκε 1.1.1	15.4	1.3413
Σπιτικός ζύθος Masala IPA	7.8	1.3373
Σπιτικός ζύθος Hot Choco Spec	4.8	1.3360
Σπιτικός ζύθος Strawberry ChocoS	4.2	1.3352
Νερό βρύσης	0	1.3331
Πειραματικός λευκός οίνος	13.2	1.3401
Σπιτικός ζύθος LabLager	5.7	1.3360
Πειραματικό σάκε 1.1.1α	15.5	1.3419
Πειραματικό σάκε VIN13a	19.0	1.3439
Πειραματικό σάκε VIN13b	18.1	1.3431
Πειραματικό σάκε Kast	17.7	1.3430
Πειραματικό σάκε W34/70	15.0	1.3413

⁸² Τυπικό σφάλμα με χρήση λογισμικού Google Sheets εκτιμήθηκε να ισούται με ≈ 0.396 %Vol.

ΚΑΤ (Πυκνομετρία) vs. Δείκτης Διάθλασης



Διάγραμμα 4.4. Συσχέτιση %Vol. και δείκτη διάθλασης.

Στην περιγραφή της μεθόδου του ΟΙV προτείνεται ένας πίνακας αντιστοίχισης του δείκτη διάθλασης αποστάγματος, μίγματος αιθανόλης και νερού και του αλκοολικού τίτλου του κρασιού (Πίνακας IV της μεθόδου⁸³). Ο πίνακας αυτός προτείνει καλύτερη συσχέτιση με $R^2=0.9998$, αλλά βασίζεται στις μετρήσεις αναφοράς οι οποίες πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση αποκλειστικά δειγμάτων του κρασιού ή μούστου. Τα δείγματα αυτά είναι πιο ομοιόμορφα ως προς τη σύσταση, αλλά λογικά θα διαφέρουν από τα δείγματα σάκε. Μπορεί να υποστηριχθεί, ότι η ομοιομορφία δειγμάτων αναφοράς παίζει σημαντικό ρόλο στην αξιοπιστία αποτελεσμάτων της μεθόδου.

⁸³ ΟΙV-MA-AS312-02: R2009.

5 Συμπεράσματα.

Κατά τη διάρκεια του πειράματος κατέστη εφικτό να παραγθαι αποδεκτής ποιότητας ποτό τύπου σάκε με χρήση της διαθέσιμης στην ελληνική αγορά πρώτης ύλης και των στελεχών ζυμών της οινοποίησης και της ζυθοποίησης σε εργαστηριακή κλίμακα. Το σάκε αυτό χαρακτηρίζεται από την αυξημένη περιεκτικότητα σε αμινοξέα λόγω της χρήσης του ρυζιού με υψηλό βαθμό λείανσης. Δείχτηκε και η δυνατότητα παραγωγής σάκε με χρήση της εναλλακτικής αμυλούχου ύλης (κάστανων).

Κατά τη ζύμωση όλα τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν έδειξαν υψηλότερη ζυμωτική ικανότητα κατά τις συνθήκες ζύμωσης του σάκε από αυτή που αναφέρεται στις επίσημες προδιαγραφές των παραγωγών. Αυτό το αποτέλεσμα συμφωνεί με την σύγχρονη βιβλιογραφία. Ο μηχανισμός όμως αυτού του φαινομένου παρουσιάζει ένα ενδιαφέρον πλαίσιο μελλοντικής έρευνας, ειδικά ο ρόλος του *kaji* και *A. oryzae*. Οι μελέτες αυτές θα έχουν σημαντικό ρόλο στην καλύτερη κατανόηση παραγόντων επιτυχούς ζύμωσης στις συνθήκες των υψηλόβαθμων μούστων και ζυθογλεύκων.

Αναπτύχθηκαν 2 βοηθητικές εργαστηριακές μέθοδοι οι οποίες θα μπορέσουν να εφαρμόζονται στις μελλοντικές μελέτες: οικονομικός ως προς τον όγκο δείγματος και τον τρόπο παρακολούθησης της πορείας της ζύμωσης και της αλλαγής του ΚΑΤ, και μία μέθοδος εκτίμησης σχετικής αποδοτικότητας της ζύμωσης σάκε.

Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει και περαιτέρω μελέτη της πορείας της ζύμωσης, π.χ. η αλλαγή της διαστατικής δύναμης της αμυλάσης και οι παράγοντες που την επηρεάζουν. Σημαντική για τη βιομηχανία θα μπορούσε να είναι και μια μελέτη της δυναμικής ενυδάτωσης του ρυζιού, καθώς και των χαρακτηριστικών και της δομής/σύστασης διαφορετικών ποικιλιών που καλλιεργούνται στην Ελλάδα, επειδή με τη μορφή της καμπύλης αλλαγής υδατοπεριεκτικότητας μπορεί να εκτιμηθεί η καταλληλότητα της πρώτης ύλης για την παραγωγή σάκε υψηλής ποιότητας (Mizuma 2007, Mizuma 2014).

6 Βιβλιογραφία.

Abe, K., Gome, K. (2007). Food Products Fermented by *Aspergillus oryzae*. *The Aspergilli: Genomics, Medical Aspects, Biotechnology, and Research Methods*, ed. G.H. Goldman, S.A. Osmani. CRC Press.

Albertin, W., et al. (2019). Chapter 4. New Insights Into Wine Yeast Diversities. *Yeasts in the Production of Wine*, ed. P. Romano, M. Ciani, G.H. Fleet. Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature.

Alva, S., et al. (2007). Production and characterization of fungal amylase enzyme isolated from *Aspergillus* sp. JGI 12 in solid state culture. *African Journal of Biotechnology*, Vol. 6 (5), pp. 576-581, 5 March 2007.

Antoni, K. (1988). *Miwa, der Heilige Trank: Zur Geschichte und religiösen Bedeutung des alkoholischen Getränkes (sake) in Japan. Münchener Ostasiatische Studien 45*. Franz Steiner, Stuttgart.

ASRJ (1988). *Handbook of Amylases and Related Enzymes*, ed. by The Amylase Research Society of Japan. Pergamon Press.

ASBC (1954). Color of Wort, Proceedings. *Annual meeting - American Society of Brewing Chemists*, 12:1, pp. 168-170.

Ayabe, S., et al. (2009). Textural Properties and Structures of Starches from Indica and Japonica Rice with Similar Amylose Content. *Food Science and Technology Research*, Vol. 15 (2009), Issue 3, pp. 299-306.

Baker, S.E., Bennett, J.W. (2007). An Overview of the Genus *Aspergillus*. *The Aspergilli: Genomics, Medical Aspects, Biotechnology, and Research Methods*, ed. G.H. Goldman, S.A. Osmani. CRC Press.

- Battaglino, R.A., et al. (1991). Culture requirements for the production of protease by *Aspergillus oryzae* in solid state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 35, pp. 292-296.
- Bhattacharya, K.R. (2004). 13. Parboiling of Rice. *Rice: Chemistry and Technology*, ed. E.T. Champagne, 3rd edition, pp. 329-405. American Association of Cereal Chemists.
- Bokulich, N.A., et al. (2014). Indigenous Bacteria and Fungi Drive Traditional Kimoto Sake Fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 80, No. 17 (September 2014).
- Boulton, C., Quain, D. (2001). *Brewing Yeast and Fermentation*. Blackwell Science Ltd.
- Bredholt, S., et al. (2001). Industrial application of an antilisterial strain of *Lactobacillus sakei* as a protective culture and its effect on the sensory acceptability of cooked, sliced, vacuum-packaged meats. *International Journal of Food Microbiology* 66 (2001), pp. 191-196.
- Cardona, F., et al. (2007). A novel approach for the improvement of stress resistance in wine yeasts. *International Journal of Food Microbiology* 114 (2007), pp. 83–91.
- Carlsen, M., et al. (1996). Morphology and Physiology of an α -Amylase Producing Strain of *Aspergillus oryzae* during Batch Cultivations. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 49, No. 3 (Feb. 5, 1996).
- Casey, G.P., et al. (1986). Ethanol Tolerance in Yeasts. *Critical Reviews in Microbiology*, 1986, 13(3):219-280.
- Champagne, E.T., et al. (2004). Chapter 4. The Rice Grain and its Gross Composition. *Rice: Chemistry and Technology*, ed. E.T. Champagne, 3rd edition, pp. 77-108. American Association of Cereal Chemists.
- CGJS (2020). *A Comprehensive Guide to Japanese Sake by Japan Sake and Shochu Makers Association*, available on <https://www.nrib.go.jp/English/sake/pdf/guidesse01.pdf> [accessed 14/07/2020].

Chung, H.-J. (2011). Relationship between the structure, physicochemical properties and in vitro digestibility of rice starches with different amylose contents. *Food Hydrocolloids*, 25 (2011), pp. 968-975.

Cruz, B.R., et al. (2013). Chemical composition and functional properties of native chestnut starch (*Castanea sativa* Mill). *Carbohydrate Polymers*, 94 (2013), pp. 594-602.

Demiante, I.M., et al. (2001). Characterization of Chestnut (*Castanea sativa*, Mill) Starch for Industrial Utilization. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Vol. 44, N. 1 (March, 2001), pp. 69 - 78.

Erdoğan, Ö., Azirak, S. (2004). Review of the studies on the Red Yeast Rice (*Monascus purpureus*). *Turkish Electronic Journal of Biotechnology*, Vol 2 (2004), pp. 37-49.

Eriksen, S.H., et al. (1998). Effect of N-Linked Glycosylation on Secretion, Activity, and Stability of α -Amylase from *Aspergillus oryzae*. *Current Microbiology* Vol. 37 (1998), pp. 117–122.

Fitzgerald, M. (2004). 5. Starch. *Rice: Chemistry and Technology*, ed. E.T. Champagne, 3rd edition, pp. 109-143. American Association of Cereal Chemists.

French, D., Edsall, J.T. (1945). The Reactions of Formaldehyde with Amino Acids and Proteins. *Advances in Protein Chemistry*, Vol. 2 (1945), pp. 277-335.

Furukawa, S. (2012). 8 - Sake: quality characteristics, flavour chemistry and sensory analysis. *Alcoholic Beverages. Sensory Evaluation and Consumer Research*, ed. John Piggott, pp. 180-195. Woodhead Publishing Ltd.

Garris, A.J., et al. (2005). Genetic Structure and Diversity in *Oryza sativa* L. *Genetics*, March 1 2005, Vol. 169, No. 3, pp. 1631-1638.

Gauntner, J. (2002). *The saké handbook*. Tuttle Publishing.

Gerogiannaki-Christopoulou, M., et al. (2003). New refractive index method for measurement of alcoholic strength of small volume samples. *Journal of AOAC International*, Vol. 86, No.6 (2003), pp. 1232-1235.

Gogami, Y., et al. (2011). High-performance liquid chromatography analysis of naturally occurring d-amino acids in sake. *Journal of Chromatography B*, 879 (2011) 3259–3267.

Goto, T., et al. (1987). Production of cyclopiazonic acid by koji molds and possibility of cyclopiazonic acid contamination of Japanese fermented foods. *Shokuhin Sōgō Kenkyūjo kenkyū hōkoku (食品総合研究所研究報告)*, 51, pp. 23-28.

Gump, B.H., et al. (2002). Comparison of Analytical Methods for Prediction of Prefermentation Nutritional Status of Grape Juice. *American Journal of Oenology and Viticulture*, January 2002 53: 325-329.

Hashizume, K., et al. (2013). Formation of ethyl ferulate by rice *koji* enzyme in sake and mirin mash conditions. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 116, No. 2 (2013), pp. 209-213.

Hayashi, Y., et al. (2005). Cyclopiazonic acid contamination in Japanese commercial rice koji. *Mycotoxins*, vol. 55 (1), 2005, pp. 9-15.

Hong, S.-B., et al. (2013). *Aspergillus luchuensis*, an industrially important black *Aspergillus* in East Asia. *PLoS ONE* 8(5): e63769, 2013.

Huang, H.T. (2000). *Science and Civilisation in China. Vol. 6, Biology and Biological Technology. Part V - Fermentations and Food Science*. Joseph Needham series, Cambridge University Press

Huang, C.-H., et al. (2009). The β -tubulin gene as a molecular phylogenetic marker for classification and discrimination of the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Antonie van Leeuwenhoek*, vol. 95, issue 2, Feb. 2009, pp. 135-142.

- Ichikawa, E., et al. (1991). Breeding of a Sake Yeast with Improved Ethyl Caproate Productivity. *Agricultural and Biological Chemistry*, 55:8, pp. 2153-2154.
- Ichishima, E. (2012). *Unique Enzymes of Aspergillus Fungi Used in Japanese Bioindustries*. Nova Science Publishers, Inc.
- Iemura, Y. (2002). Liberation of Amino acid and Peptide from Rice Protein in *Kimoto* and *Sokujo-moto*. *Journal of the Brewing Society of Japan (日本醸造協会誌)*, Vol. 97, Issue 2 (2002), pp. 90-98.
- Isogai, A., et al. (2005). Changes in the Aroma Compounds of Sake during Aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (2005), pp. 4118–4123.
- Isoda, Y., et al. (1992). Mechanism of Hydrolyses of Phenyl α -Maltosides Catalyzed by Taka-Amylase A. *The Journal of Biochemistry*, Vol. 111, Issue 2 (1992), pp. 204-209.
- Ito, K., et al. (1990). Volatile Compounds Produced by the Fungus *Aspergillus oryzae* in Rice Koji and Their Changes during Cultivation. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, Vol. 70, No. 3 (1990), pp. 169-172.
- Ito, T., et al. (2014). Factors affecting phenolic acid liberation from rice grains in the sake brewing process. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 118, No. 6 (2014), pp. 640-645.
- Jackson, R.S. (2008). *Wine Science. Principles and Applications* (3rd ed.). Elsevier.
- Kan, L., et al. (2016). Effect of thermal processing on the physicochemical properties of chestnut starch and textural profile of chestnut kernel. *Carbohydrate Polymers* 151 (2016), pp. 614–623.
- Kanno, Y., et al. (2018). Visualization of Flavor of Sake by Sensory Evaluation and Statistical Method. *Sensors and Materials*, Vol. 30, No. 5 (2018), pp. 1197-1206.

Kanoh, S. (1962a). Studies on Sake Brewing Water. Part VI. Inorganic Substances throughout the Process of Sake Brewing. Inorganic Contents of Raw Materials and Changes of them during the Washing of Rice. *Nippon Nōgeikagaku Kaishi* (日本農芸化学会誌), Vol. 36, No. 5 (1962). Cited in: Abstracts of Articles Printed in Nippon Nogeikagaku Kaishi (in Japanese). *Agricultural and Biological Chemistry*, 26:6, pp. 35-39.

Kanoh, S. (1962b). Studies on Sake Brewing Water. Part VII. Inorganic Substances throughout the Process of Sake Brewing. Analysis of Inorganic Components in Sokujo-Moto. *Nippon Nōgeikagaku Kaishi* (日本農芸化学会誌), Vol. 36, No. 5 (1962).

Kanoh, S. (1962c). Studies on Sake Brewing Water. Part IX. 4. Analysis of Inorganic Components in Moromi. *Nippon Nōgeikagaku Kaishi* (日本農芸化学会誌), Vol. 36, No. 6 (1962).

Karri, S., et al. (2014). Screening and production optimisation of alpha amylase from *Aspergillus* strains by using solid state fermentation. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, vol. 3, no. 4 (2014), pp. 623-631.

Kim, J.-S., et al. (2013). The Quality Characteristics of Rice Mash by Mixing Ratios of Rice and Rice Koji. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 42(12), pp. 2035-2041.

Kitamoto, K. (2002). Molecular Biology of the Koji Molds. *Advances in Applied Microbiology*, 51, pp. 129-153.

Kitano, H., et al. (2002). Specific Expression and Temperature-Dependent Expression of the Acid Protease-Encoding Gene (PepA) in *Aspergillus oryzae* in Solid-State Culture (Rice-Koji). *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 93, No. 6, 563-567.

Koser, S., et al. (2014) Utilization of *Aspergillus oryzae* to produce pectin lyase from various agro-industrial residues. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, XXX (2014), pp. 1-6.

- Koyanagi, T., et al. (2016). Tracing microbiota changes in yamahai-moto, the traditional Japanese sake starter. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 80:2, 399-406.
- Lin, J.T., et al. (1993). Structures of genes nasA and nasB, encoding assimilatory nitrate and nitrite reductases in *Klebsiella pneumoniae* M5a1. *Journal of Bacteriology*, Vol. 175, No.8, Apr. 1993, pp. 2370-2378.
- Lin, Y., et al. (2014). Optimization of conditions for glucoamylase, α -amylase and acidic protease production by *Aspergillus Oryzae* Koji. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 2014, 6(9), pp. 360-364.
- Liu, K. (1997). *Soybeans. Chemistry, Technology and Utilization*. Springer Science+Business Media Dordrecht.
- Machida, M., et al. (2008). Genomics of *Aspergillus oryzae*: Learning from the History of Koji Mold and Exploration of Its Future. *DNA Research*, 15, pp. 173–183
- Maeda, Y., et al. (2011). Analyses of peptides in sake mash: Forming a profile of bitter-tasting peptides. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 112 No. 3, 238–246.
- Markides, A. (2020). Lallemand Australia Technical Note 803A: Sugar to ethanol conversion by wine yeast, διαθέσιμο στο <http://wineindustrynetwork.com/uploads/tips/gqRwa10bvFXsGDBIHfLKmE7A9yjiCt.pdf> [accessed 16/07/2020]
- Matsubara, S., et al. (1959). Studies on Taka-Amylase A. VI. On the α -maltosidase Activity of Taka-Amylase A. *The Journal of Biochemistry*, Vol. 46, No. 4, pp. 425-432
- Matsuura, K., et al. (1992). Thermal control strategy for isoamylacetate formation in sake brewed with a saccharified rice solution. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, Volume 74, Issue 2, 1992, pp. 112-116.

Mitsue, T., et al. (1979). Glucoamylase of *Aspergillus oryzae* cultured on steamed rice. *Journal of Applied Biochemistry*, 1:5-6.

Mizuma, T., et al. (2007). Water-Absorption Rate Equation of Rice for Brewing Sake. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 103, No. 1, pp. 60–65.

Mizuma, T. (2014). Effects of the rice polishing ratio on water absorption of rice. *Journal of Kansai University of Welfare Sciences (関西福祉科学大学紀要第)*, Vol. 18.

Moldenhauer, K.A.K., et al. (2004). 3. Rice Varieties. *Rice: Chemistry and Technology*, ed. E.T. Champagne, 3rd edition, pp. 49-77. American Association of Cereal Chemists.

Morita, Y., et al. (1966). Studies on Amylases of *Aspergillus oryzae* Cultured on Rice. *Agricultural and Biological Chemistry*, 30:2, pp. 114-121.

Moulavi, M.H., et al. (2018). pH Metric Method For Detection of Cooked Rice Adulteration. *International Journal of Chemical and Physical Sciences*, Vol 7, Special Issue 13 RTCS, April 2018.

Murado, M.A., et al. (2008). Alcoholic chestnut fermentation in mixed culture. Compatibility criteria between *Aspergillus oryzae* and *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Bioresource Technology*, 99 (2008), pp. 7255–7263.

Nakamura, Y., et al. (2002). The fine Structure of Amylopectin in Endosperm from Asian Cultivated Rice can be largely Classified into two Classes. *Starch*, Vol. 54, Issue 3-4 (April 2002), pp. 117-131.

Narita, K., et al. (1966). Reinvestigation on the Amino Acid Composition and C-Terminal Group of Taka-Amylase A. *The Journal of Biochemistry*, Vol. 59, No.2.

Nishibori, N., et al. (2014). Yeast cell lysis enhances dimethyl trisulfide formation in sake. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 118, No. 5, pp. 526-528

Nose, A., et al. (2005). Proton Nuclear Magnetic Resonance and Raman Spectroscopic Studies of Japanese Sake, an Alcoholic Beverage. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 99, No. 5, pp. 493–501.

NTA (2020). *National Tax Administration of Japan prescript analysis methods with note* (国税庁所定分析法). *Sake (清酒)*.

Διαθέσιμο στο <https://www.nta.go.jp/law/tsutatsu/kobetsu/sonota/070622/pdf/03.pdf> (στα γαπωνέζικα) [accessed 26/07/2020].

Nukonawa, Y. (1973). Study on persimmon tannin for refining of sake. VI. Interaction of tannin and protein. *Journal of the Brewing Society of Japan (日本醸造協会誌)*, Vol. 68 (1973), pp. 851-855.

Ogawa, Y., et al. (2000). Tolerance Mechanism of the Ethanol-Tolerant Mutant of Sake Yeast. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 90, No. 3, pp. 313-320

Ohba, T., Sato, M. (1986). Chapter 16. Sake. *Handbook of Food and Beverage Stability. Chemical, Biochemical, Microbiological and Nutritional Aspects*. Ed. G. Charalambous. Academic Press.

OIV (2016). *Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis*, ed. 2016.

Oka, S., et al. (1969). Contributions of Amino-carbonyl Reaction, Caramelization and Some Other Reaction to Browning of Sake. *Agricultural and Biological Chemistry*, 33:4, pp 565-571.

Okuda, M., et al. (2006). Structural and Retrogradation Properties of Rice Endosperm Starch Affect Enzyme Digestibility of Steamed Milled-Rice Grains Used in Sake Production. *Cereal Chemistry*, Vol. 83, Issue 2 (March/April 2006), pp. 143-151.

Okuda, M. (2019). Rice used for Japanese sake making. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, Vol. 83, Issue 8 (2019), pp. 1428-1441.

Omar, K.A., et al. (2016). Evaluation of Starch and Sugar Content of Different Rice Samples and Study their Physical Properties. *Indian Journal Of Natural Sciences*, Vol.6, Issue 36, June 2016.

O'toole, D.K. (2019). Chapter Two - The role of microorganisms in soy sauce production. *Advances in Applied Microbiology*, Vol. 108 (2019), pp. 45-113.

Oyashiki, H., et al. (1989). Evaluation of Koji Prepared with Various Molds for Mirin-Making. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, Vol. 67, No. 3 (1989), pp. 163-168.

Pascual, O., at al. (2017). Study of the effectiveness of a strain of *Saccharomyces cerevisiae* selected for the production of wines with higher acidity and lower alcoholic strength. *BIO Web of Conferences* 9, 02002 (2017).

Procopio, S., et al. (2011). Function and regulation of yeast genes involved in higher alcohol and ester metabolism during beverage fermentation. *European Food Research and Technology*, 233, Article number: 721

Puri, S. (2013). Production and optimization of amylase and glucoamylase using *Aspergillus oryzae* under solid state fermentation. *International Journal of Research in Pure and Applied Microbiology*, 3 (2013), pp. 83-88

Rahardjo, Y.S.P., et al. (2005). Effect of low oxygen concentrations on growth and α -amylase production of *Aspergillus oryzae* in model solid-state fermentation systems. *Biomolecular Engineering*, 21 (2005), pp. 163–172.

Rees, E.M.R., Stewart, G.G. (1997). The effects of increased magnesium and calcium concentrations on yeast fermentation performance in high gravity worts. *Journal of the Institute of Brewing*, Sept.-Oct. 1997, vol. 103, pp. 287-291.

Rodriguez, J., et al. (2014). α -Amylase *Aspergillus oryzae* Immobilized on Modified Expanded Perlite. *International Journal of Chemical Reactor Engineering* 2014; 12(1), pp. 587–596.

Rokas, A. (2009). The effect of domestication on the fungal proteome. *Trends in Genetics*, vol. 25, issue 2 (feb. 2009), pp. 60-63.

Sahnoun, M., et al. (2015). *Aspergillus oryzae* S2 alpha-amylase production under solid state fermentation: Optimization of culture conditions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 75 (2015), pp. 73–80.

Sampaio, J.P., et al. (2017). Chapter 5. Biogeography and Ecology of the Genus *Saccharomyces*. *Yeasts in Natural Ecosystems: Ecology*, ed. P. Buzzini, M.-A. Lachance, A. Yurkov. Springer International Publishing AG.

Sato, S., et al. (1971). Photochemical Colouring Reaction of Sake. Presence of Kunerinic Acid as Photosensitizer in Sake. *Agricultural and Biological Chemistry*, 35:3, pp. 308-313.

Schomburg, D., et al. (1991a). Alpha-amylase (3.2.1.1). *Enzyme Handbook vol. 4. Class 3: Hydrolases*. Springer.

Schomburg, D., et al. (1991b). Glucan 1,4-alpha-glucosidase (3.2.1.3). *Enzyme Handbook vol. 4. Class 3: Hydrolases*. Springer.

Schutyser, M.A.I., et al. (2003). Substrate Aggregation Due to Aerial Hyphae During Discontinuously Mixed Solid-State Fermentation With *Aspergillus oryzae*: Experiments and Modeling. *Biotechnology and Bioengineering*, 83(5), pp. 503-513.

Shafique, S., et al. (2009). Screening of *Aspergillus niger* and *A. flavus* strains for extracellular alpha-amylase activity. *Pakistan Journal of Botany*, 41(2), pp. 897-905.

Shah, N.N., et al. (2013). Changes in physicochemical characteristics of ozone-treated raw white rice. *Journal of Food Science and Technology*, 23 Aug 2013, 52(3):1525-1533.

Shiraishi, Y., et al. (2016). Characteristic odour compounds in shochu derived from rice koji. *Journal of the Institute of Brewing*, Vol. 122, Issue 3, pp. 381-387.

Shurtleff, W., Aoyagi, A. (2012). *History of Koji - Grains and/or Soybeans Enrobed with a Mold Culture (300 BCE to 2012): Extensively Annotated Bibliography and Sourcebook*. Soyinfo Center.

Siebert, K.J. (2009). Chapter 2. Haze in Beverages. *Advances in Food and Nutrition Research*, vol. 57. Elsevier, 2009.

Silva, A.P., et al. (2016). Starch characterization in seven raw, boiled and roasted chestnuts (*Castanea sativa* Mill.) cultivars from Portugal. *Journal of Food Science and Technology*, January 2016, Volume 53, Issue 1, pp 348–358.

Sosa, A., et al. (2013). Mycotoxicological studies of an *Aspergillus oryzae* strain. *Journal of Yeast and Fungal Research*, Vol. 4(3), pp. 26-32, May, 2013.

Stein, E.A., et al. (1960). The Amino Acid Composition of α -Amylase from *Aspergillus oryzae*. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 235, No. 2, Feb. 1960.

Steinkraus, K. (1995). *Handbook of Indigenous Fermented Foods*. CRC Press.

Sugimoto, M., et al. (2010). Correlation between Sensory Evaluation Scores of Japanese Sake and Metabolome Profiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58, pp. 374–383.

Sugimoto, M., et al. (2012). Changes in the Charged Metabolite and Sugar Profiles of Pasteurized and Unpasteurized Japanese Sake with Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60, pp. 2586–2593.

Suzuki, M., et al. (1956). The relation of the temperature and time of incubation of “koji” to the powers of its enzymes as studied with flasks in a laboratory. *Journal of the Brewing Society of Japan* (日本醸造協会誌), Vol. 51(1956), Issue 5, pp. 318-322.

Tadenuma, M., et al. (1967). Studies on the Colorants in Saké. *Agricultural and Biological Chemistry*, 31:12, pp. 1482-1489, (1967).

Takahashi, M., et al. (2006). GC-Olfactometry analysis of the aroma components in sake koji. *Journal of the Brewing Society of Japan (日本醸造協会誌)*, Vol. 101, No. 12, pp. 957-963.

Takahashi, K., et al. (2016). Different Polar Metabolites and Protein Profiles between High- and Low-Quality Japanese *Ginjo* Sake. *PLoS ONE* 11(3): e0150524, 2016.

Takayama, T., et al. (1989). A New Assay Method and Evaluation of Removal of Protein in *Mirin*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, Vol. 68, No. 1, 49-51 (1989).

Tanimoto, S., et al. (2008). Enzyme Inactivation and Quality Preservation of Sake by High-Pressure Carbonation at a Moderate Temperature. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72 (1), 22–28, 2008.

Tatsukami, Y., et al. (2018). Metabolite profiling of the fermentation process of "yamahai-ginjo-shikomi" Japanese sake. *PLoS ONE* 13(1): e0190040 (2018).

Tomiya, S., et al. (2013). Geochemical, stable isotope, and numerical modeling studies of sake and groundwater for identification of the location of sake production: A case study from Hakusan City, Japan. *Geochemical Journal*, Vol. 47, pp. 591-608, 2013.

Torres, S., et al. (2011). Banana flavor: Insights into isoamylacetate production. *Bananas: Nutrition, Diseases and Trade Issues*, ed. A.E. Cohen, Nova Science Publishers, Inc.

Tsuji, A., et al. (2018). Robust Domination of *Lactobacillus sakei* in Microbiota During Traditional Japanese Sake Starter Yamahai-Moto Fermentation and the Accompanying Changes in Metabolites. *Current Microbiology*, Vol. 75, pp. 1498–1505 (2018).

Udeh, H.O., et al. (2013). Role of magnesium ions on yeast performance during very high gravity fermentation. Review. *Journal of Brewing and Distilling*, Vol. 4(2), pp. 19-45, September 2013.

Udeh, H.O., et al. (2014). Effect of Mineral Ion Addition on Yeast Performance during Very High Gravity Wort Fermentation. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, Vol:8, No:11, 2014.

de Vasconcelos, M. do C. B.M., et al. (2009a). Industrial processing effects on chestnut fruits (*Castanea sativa* Mill.). 1. Starch, fat, energy and fibre. *International Journal of Food Science and Technology* 2009, 44, pp. 2606–2612.

de Vasconcelos, M. do C. B.M., et al. (2009b). Industrial processing effects on chestnut fruits (*Castanea sativa* Mill.). 2. Crude protein, free amino acids and phenolic phytochemicals. *International Journal of Food Science and Technology* 2009, 44, pp. 2613–2619.

de Vasconcelos, M. do C. B.M., et al. (2010). Industrial processing effects on chestnut fruits (*Castanea sativa* Mill.). 3. Minerals, free sugars, carotenoids and antioxidant vitamins. *International Journal of Food Science and Technology* 2010, 45, pp. 496–505.

Vaughan-Martini, A., et al. (1993). A Taxonomic Key for the Genus *Saccharomyces*. *Systematic and Applied Microbiology*, 16, pp. 113-119.

Watanabe, M., et al. (2009). Overexpression of MSN2 in a sake yeast strain promotes ethanol tolerance and increases ethanol production in sake brewing. *Journal of Bioscience and Biotechnology*, Vol. 107, No. 5, 516 – 518, 2009.

Watanabe, D., et al. (2015). Chapter 4. Mechanism of High Alcoholic Fermentation Ability of Sake Yeast. *Stress Biology of Yeasts and Fungi, Application for Industrial Brewing and Fermentation*, ed. H. Takagi, H. Kitagaki. Springer Japan.

Wu, S.Q., et al. (1999). General Nitrogen Regulation of Nitrate Assimilation Regulatory Gene *nasR* Expression in *Klebsiella oxytoca* M5al. *Journal of Bacteriology*, Vol. 181, No. 23, December 1999, pp. 7274-7284.

Yamamoto, K. (1957). Studies on Koji. Part II. Effects of Some Conditions of Medium on the Production of Mold Protease. *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, Vol. 21, No. 5, pp. 313-318.

Yoshizaki, Y., et al. (2010). Analysis of Volatile Compounds in Shochu Koji, Sake Koji, and Steamed Rice by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of the Institute of Brewing*, 116(1), 49–55, 2010.

Yoshizawa, K. (1999). Sake: Production and flavor. *Food Reviews International*, 15:1, pp. 83-107.

Yoshizawa, K., et al. (2004a). Industrialization of Sake Manufacture. *Industrialization of Indigenous Fermented Foods, Revised and Expanded*, ed. Keith Steinkraus. 2nd edition. CRC Press, pp. 149-192.

Yoshizawa, K., et al. (2004b). 18. Rice in Brewing. *Rice: Chemistry and Technology*, ed. E.T. Champagne, 3rd edition. American Association of Cereal Chemists, pp. 541-568.

Yasui, M., et al. (2020). Invasive growth of *Aspergillus oryzae* in rice koji and increase of nuclear number. *Fungal Biology and Biotechnology*, 7:8.

Yu, K.-W., et al. (2012). Optimization for Rice Koji Preparation Using *Aspergillus oryzae* CJCM-4 Isolated from a Korean Traditional *Meju*. *Food Science Biotechnology* 21(1): 129-135 (2012).

Zheng, Y., et al. (2014). Strain development and optimized fermentation conditions for blood meal using *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* // *Journal of Microbiological Methods*, 101 (2014), pp. 70-80.

Zoecklein, B.W., et al. (1999). *Wine Analysis and Production*. Springer AScience+Business Media.