



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

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Η ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΤΗΣ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΑΦΟΜΟΙΩΣΙΜΟΥ ΑΖΩΤΟΥ ΣΤΗ ΖΥΜΩΣΗ ΥΔΡΟΜΕΛΟΥ



ΦΟΙΤΗΤΕΣ:

**ΑΛΕΞΙΟΣ ΓΚΙΝΗΣ
ΑΜ: 171128**

**ΑΧΙΛΛΕΑΣ ΡΙΖΟΣ
ΑΜ : 161091**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ : ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΤΑΤΑΡΙΔΗΣ,
ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ**

Αθήνα, Ιούλιος 2023



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

THESIS

**THE MANAGEMENT OF ASSIMILABLE
NITROGEN ADDITIONS IN MEAD
FERMENTATIONS**



STUDENTS:

ALEXIOS GKINIS

AM: 171128

ACHILLES RIZOS

AM: 161091

**SUPERVISOR PROFESSOR: PANAGIOTIS TATARIDIS,
ASSISTANT PROFESSOR**

Athens, July 2023



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

ΔΗΛΩΣΗ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Οι υπογράφωντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη διπλωματική εργασία με τίτλο:
**«Η ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΤΗΣ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΑΦΟΜΟΙΩΣΙΜΟΥ
ΑΖΩΤΟΥ ΣΤΗ ΖΥΜΩΣΗ ΥΔΡΟΜΕΛΟΥ»**

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 ΣΥΓΓΡΑΦΕΩΝ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Οι κάτωθι υπογεγραμμένοι Γκίνης Αλέξιος του Ιωάννη, με αριθμό μητρώου (171128), & Ρίζος Αχιλλέας του Βασιλείου, με αριθμό μητρώου (161091), φοιτητές του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστημών 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 κάναμε 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, βεβαιώνουμε ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από εμάς αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μας, όσο και του Ιδρύματος.

Ρίζος Αχιλλέας



Γκίνης Αλέξιος



ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΕΛΛΗΝΙΚΑ

Στην παρούσα εργασία, η οποία αποτελεί κατά βάση μια βιβλιογραφική έρευνα για την παραγωγή υδρόμελου, αρχικά παρουσιάζουμε την ιστορία, τους τρόπους παραγωγής και την σύσταση του μελιού και του υδρόμελου. Το μέλι είναι το αποτέλεσμα της επεξεργασίας του νέκταρος των φυτών από τις μέλισσες του είδους *Apis mellifera*. Το μέλι και τα παράγωγα του αποτελούν πολύ σημαντικό κομμάτι της διατροφικής αλυσίδας του ανθρώπου και έχει πολλές χρήσεις από την αρχαιότητα έως σήμερα. Η υψηλή περιεκτικότητα του σε σάκχαρα χρησιμοποιείται για την παραγωγή αλκοολούχων ποτών, με κυριότερο προϊόν της αλκοολικής ζύμωσης το υδρόμελο.

Για την παραγωγή του υδρόμελου απαιτείται μέλι, νερό, μαγιά και κάποιο αζωτούχο σκεύασμα καθώς η περιεκτικότητα του μελιού σε άζωτο είναι χαμηλή. Η χαμηλή περιεκτικότητα σε άζωτο είναι και το κυριότερο πρόβλημα στην παραγωγή υδρόμελου, καθώς δυσκολεύει τη ζύμωση. Σημαντικό μέρος της παρούσας εργασίας διερευνά τον ρόλο του αζώτου, πρωτίστως στην παραγωγή του υδρόμελου, και έπειτα στον οίνο και στην μπίρα. Ακολούθως, αναλύονται οι μέθοδοι προσδιορισμού αφομοιώσιμου αζώτου και ερευνώνται οι απαιτήσεις του γλεύκους σε άζωτο σύμφωνα με επίσημες έρευνες αλλά και μέσα από συνταγές παραγωγών και μεθοδολογίες προσθήκης. Τέλος, η εργασία ολοκληρώνεται με την ανάλυση των σκευασμάτων που κυκλοφορούν στο εμπόριο.

Λέξεις κλειδιά: Αφομοιώσιμο άζωτο, αμμωνιακό άζωτο, YAN, FAN, PAN, μέτρηση αζώτου, μέλι, υδρόμελο, ζύμωση

ABSTRACT

In this present work, which is mostly a literature review for mead production, we start by presenting the history, the ways of producing and the composition of honey and mead. Honey results from the *Apis mellifera* bees' processing of the plants' nectar. Honey and its derivatives represent a vital part of the human food chain and its uses from ancient times since today vary significantly. Due to its high concentration in sugar, it is used for the production of alcoholic beverages, with mead being the main product to result from alcoholic fermentation.

For the production of mead, honey, water, yeast and some kind of nitrogenous preparation is required, as honey is low in nitrogen. This low concentration in nitrogen is the main problem in the production of mead, because the process of fermentation is difficult at low concentrations of assimilable nitrogen. A significant part of this paper studies the role of nitrogen, mainly in the production of mead, and secondly of wine and beer. Afterwards, the methods of measuring yeast assimilable nitrogen are analyzed and the demands in nitrogen are examined according to official research but also through the recipes from producers and addition methodologies. Finally, the work presents a number of commercial preparations used for nitrogen supplementation.

Keywords: Assimilable Nitrogen, Ammonium Nitrogen, YAN, FAN, PAN, Nitrogen measurement, Fermentation, Honey, Mead,

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε θερμά τον καθηγητή μας κ. Ταταρίδη Παναγιώτη για την υποστήριξη του, τις ανεκτίμητες υποδείξεις του και την υπομονή που έδειξε καθόλη την διάρκεια της συγγραφής της παρούσας εργασίας.

Ευχαριστούμε επίσης θερμά τα μέλη της τριμελούς επιτροπής καθώς και την εταιρία Technovin και ιδιαίτερα τον κο Καρδάτο για την δωρεά των σκευασμάτων αζώτου.

Τέλος, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε τις οικογένειες μας για την στήριξη και την εμπιστοσύνη που μας δείχνουν όλα αυτά τα χρόνια.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

α/α	Συντόμευση	Επεξήγηση
1	YAN	Αφομοιώσιμο άζωτο ζύμης- Yeast Assimilable Nitrogen
2	FAN	Ελεύθερο α-αμινο άζωτο - Free amino nitrogen
3	PAN	Πρωτεύον αμινο άζωτο - Primary Amino Nitrogen
4	NOPA	Nitrogen by o-phthaldialdehyde (μέτρηση του Alpha Amino Nitrogen , που αναφέρεται επίσης ως Nitrogen από το OPA, ή NOPA, μετρά την ποσότητα των πρωτογενών αμινοξέων που είναι διαθέσιμα για χρήση από τη ζύμη κατά τη διάρκεια της ζύμωσης.
5	HPLC	Υγρή χρωματογραφία Υψηλής απόδοσης - High performance liquid chromatography
6	OIV	Διεθνής Οργανισμός Αμπέλου και Οίνου- International Organisation of Vine and Wine
7	SNA	Σταδιακή προσθήκη θρεπτικών ουσιών Staggered Nutrient Additions
8	TOSNA	Προσαρμοσμένες κλιμακωτές προσθήκες θρεπτικών οργανικών συστατικών Tailored Organic Staggered Nutrient Additions
9	ANOVA	Analysis of variance-Ανάλυση της διακύμανσης
10	RSM	Response Surface Methodology
11	ASBC	American Society of Brewing Chemists

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΔΗΛΩΣΗ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ	3
ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΩΝ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΕΛΛΗΝΙΚΑ	5
ABSTRACT	6
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	7
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	9
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ.....	11
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	12
ΚΕΦ.1: ΜΕΛΙ.....	13
1.1 Ορισμός.....	13
1.2 Ιστορική αναδρομή.....	13
1.3 Τρόποι Παραγωγής	15
1.4 Σύσταση και χαρακτηριστικά μελιού	16
1.4.1. Σύσταση του μελιού	16
1.4.2 Αναλύσεις μελιού κατά IHC	17
1.4.3 Χαρακτηριστικά του μελιού.....	27
ΚΕΦ.2: ΥΔΡΟΜΕΛΟ.....	30
2.1.Ορισμός και ονομασία υδρόμελου.....	30
2.2 Ιστορική αναδρομή.....	31
2.3 Διαδικασία Παραγωγής	31
2.4 Σύσταση και χαρακτηριστικά υδρόμελου	33
2.5 Νομοθεσία υδρόμελου στην Ελλάδα	38
2.6 Στατιστικά παραγωγής υδρόμελου	38
ΚΕΦ.3: ΑΖΩΤΟ ΣΤΑ ΓΛΕΥΚΗ	41
3.1. Μορφές αζώτου	41
3.2 Συγκεντρώσεις αζώτου στα διάφορα γλεύκη	44

3.2.1	Οίνος	44
3.2.2	Μπύρα	46
3.2.3	Υδρόμελο	47
3.3	Μέθοδοι – Τεχνικές μέτρησης.....	49
3.4	Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των μεθόδων μέτρησης αζώτου	63
ΚΕΦ.4: ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΑΖΩΤΟΥ ΣΤΗ ΖΥΜΩΣΗ.....		67
4.1	Απαιτήσεις των ζυμών σε άζωτο	67
4.1.1	Έλλειψη αζώτου στη ζύμωση.....	67
4.1.2	Περίσσεια αζώτου	68
4.2	Μεταβολισμός του αζώτου και κινητική της ζύμωσης	69
4.2.1	Μεταβολισμός του αζώτου.....	69
4.2.2	Κινητική της ζύμωσης.....	70
4.3	Απαιτήσεις αζώτου ανά γλεύκος	73
4.4	Μορφές αζώτου που χρησιμοποιούνται στο εμπόριο	75
4.5	Τρόποι προσθήκης	78
ΚΕΦ. 5 :ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΩΝ ΑΡΘΡΩΝ ΓΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΥΔΡΟΜΕΛΟΥ		81
.....		
ΚΕΦ. 6 : ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ		84
ΚΕΦ. 7 : ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....		85
Ξενογλώσση Βιβλιογραφία.....		85
Ελληνική Βιβλιογραφία		92
Διαδικτυακές πηγές.....		93

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Μέση σύσταση μελιού Πηγή: (Suarez et al., 2010)	17
Πίνακας 2. Εύρος τιμών pH μελιού σε σχέση και με το χρώμα.....	22
Πίνακας 3 : Αντιοξειδωτική δράση βιταμινών.....	23
Πίνακας 4: Είδη ενζύμων και ο ρόλος τους	24
Πίνακας 5: Περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και πρωτεολυτική δράση σε διαφορετικά μέλια (Larocca et al., 2012).....	25
Πίνακας 6: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των κρασιών μήλου με ζάχαρη και μέλι από διαφορετικές πηγές ανθέων.	36
Πίνακας 7: Επίδραση του τύπου μαγιάς που χρησιμοποιείται για την παρασκευή υδρομελιού(Perreira et al. 2019).	37
Πίνακας 8: Περιεκτικότητα αζώτου	45
Πίνακας 9 : Στοιχεία προσδιορισμού αμινοξέων μελιού :(Schwartz et al., 2020)	47
Πίνακας 10 : Προσθήκη Fermaid O	80

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1: Εκατοστιαία σύνθεση του μελιού (Jaganathan και Mandal, 2009).....	18
Διάγραμμα 2 : Διαγραμματική απεικόνιση της αφυδρογόνωσης των σακχάρων (Choudhary et al., 2020).....	20
Διάγραμμα 3: Διακυμάνσεις παραγωγής υδρόμελου στην Πολωνία (Sas 2022).....	39
Διάγραμμα 4 : Παγκόσμια αγορά ποτών – Ποσοστιαία γεωγραφική κατανομή (%) (2021)..	39
Διάγραμμα 5: Εγγεγραμμένες μονάδες παραγωγής υδρόμελου παγκοσμίως.	40
Διάγραμμα 6: Κατηγοριοποίηση μορφών αζώτου	432
Διάγραμμα 7: Κινητική αλλαγή ελεύθερου αμινο αζώτου σε 5 διαφορετικές μπύρες .(Cortese et al. 2019)	46
Διάγραμμα 8: Απεικόνιση συγκέντρωσης αζώτου κατά την έναρξη της ζύμωσης	70
Διάγραμμα 9 : Ταχύτητα έκλυσης διοξειδίου του άνθρακα (Seguinot et al. 2018)	71
Διάγραμμα 10: Σύγκριση ρυθμού ζύμωσης τριών σκευασμάτων	72
Διάγραμμα 11: Κατηγοριοποίηση εμπορικών σκευασμάτων	75

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το μέλι αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά τρόφιμα στην διατροφή του ανθρώπου καθώς από την αρχαιότητα, είχαν ανακαλυφθεί οι ευεργετικές ιδιότητες του τόσο στην υγεία του ανθρώπου όσο και στην παραγωγή δευτερογενών προϊόντων. Το μέλι, που παράγεται και αποθηκεύεται από τις μέλισσες ως πηγή τροφής, περιλαμβάνει περίπου 80% ζάχαρη, 17% νερό και ένα μείγμα ιχνοστοιχείων, ζωτικής σημασίας για τις ποικίλες γεύσεις και χρώματα του μελιού (Petkewich, 2007). Οι χρήσεις του μελιού για την παραγωγή αλκοολούχων ποτών είναι γνωστές και αυτές από την αρχαιότητα, και εφαρμόζονται μέχρι σήμερα. Το υδρόμελο αποτελεί αλκοολούχο ποτό το οποίο έχει ως βάση παραγωγής το μέλι. Βασικό πρόβλημα για την παραγωγή αλκοολούχων ποτών είναι η χαμηλή διαθεσιμότητα σε αφομοιώσιμο άζωτο, τόσο σε οργανικό όσο και σε ανόργανο (Pereira et al.015).

Στο πλαίσιο αυτό η παρούσα πτυχιακή εργασία εξετάζει αρχικά την σύσταση και τις ιδιότητες του μελιού και στη συνέχεια πραγματοποιείται βιβλιογραφική ανασκόπηση στην παραγωγή του υδρόμελου. Έπειτα, η ανασκόπηση συνεχίζεται με ανάλυση της περιεκτικότητας και των μορφών του αζώτου σε γλεύκη και πραγματοποιείται εκτενής ανάλυση στην επίδραση της παρουσίας του αζώτου στην ζύμωση. Τέλος, ολοκληρώνεται με την παρουσίαση εμπορικών σκευασμάτων αζώτου και την σύνθεσή τους.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση του ρόλου του αζώτου στην αλκοολική ζύμωση και ειδικότερα στην παραγωγή υδρόμελου. Μέσω της βιβλιογραφικής ανασκόπησης θα αναζητηθούν τα κατάλληλα όρια προσθήκης αζώτου για την πραγματοποίηση μιας αλκοολικής ζύμωσης χωρίς προβλήματα, με απαραίτητη προϋπόθεση την παραγωγή ενός ποιοτικού προϊόντος.

ΚΕΦ.1: ΜΕΛΙ

1.1 Ορισμός

Σύμφωνα με την νομοθεσία, το μέλι είναι η φυσική γλυκιά ουσία που παράγουν οι μέλισσες του είδους *Apis mellifera* από το νέκταρ των φυτών ή από ζώντα μέρη αυτών, τα οποία οι μέλισσες συλλέγουν, μετατρέπουν αναμειγνύοντάς τα με ειδικές ύλες του σώματος τους, αποθέτουν, αφυδατώνουν, εναποθηκεύουν και φυλάσσουν στις κηρήθρες της κυψέλης, προκειμένου να ωριμάσουν.

Το μέλι κατηγοριοποιείται σε :

- Μέλι ανθέων, το οποίο προέρχεται από το νέκταρ των ανθών
- Μέλι από μελιτώματα, το οποίο προέρχεται από τις εκκρίσεις των εντόμων

Στις δύο αυτές κατηγορίες υπάγονται όλα τα είδη μελιού, με το μέλι των ανθέων να θεωρείται ποιοτικότερο, καθώς η προέλευση του του δίνει ένα λεπτό χρώμα, ιδιαίτερο άρωμα, αλλά και γεύση.

1.2 Ιστορική αναδρομή

Η ιστορία του μελιού στην Ελλάδα ξεκινά από τα αρχαία χρόνια, κατά τα οποία το μέλι αποτελούσε αναπόσπαστο κομμάτι της διατροφής, της ιατρικής, αλλά και της μυθολογίας. Συγκεκριμένα, η μέλισσα συμβολιζόταν ως άγγελος, με το μέλι να αποτελεί το θεϊκό δώρο το οποίο ανέθρεψε θνητούς και αθάνατους, με σημαντικότερη αναφορά την χρήση του στην ανατροφή του Δία.

Αναλυτικά, στην αρχαία Σπάρτη αποτελούσε αναπόσπαστο κομμάτι της διατροφής των νεαρών Σπαρτιατών, με την κατανάλωση του να είναι απαραίτητη μετά την σκληρή εκπαίδευση. Το μέλι αποτελούσε την βασική τροφή τους για ένα μήνα κατά τη διάρκεια της εκγύμνασης, εξού και η φράση «μήνας του μέλιτος» (Μαναβή et.al., 2019). Η υψηλή περιεκτικότητα του σε γλυκόζη αλλά και σε σάκχαρα έδινε ενέργεια στους νέους, ενώ με την μικρή υγρασία που περιείχε δεν ευνοούσε την ανάπτυξη μικροοργανισμών.

Επιπρόσθετα, ο Ιπποκράτης έδωσε τη συγκατάθεσή του ώστε το μέλι να χρησιμοποιηθεί ως αντίδοτο για τον βήχα, αλλά και αντισηπτικό για τις πληγές.

Συγκεκριμένα, το μέλι χορηγούνταν είτε με την φυσική μορφή του είτε με διάφορες μορφές, όπως το μελίκρατο, το μηλόμελο, το οινόμελο, το υδρόμελο κ.α. Πλέον, είναι γνωστό ότι το μέλι αποτελεί φάρμακο για τους καταπονημένους μύες και το πεπτικό σύστημα, συμβάλλει στην ενίσχυση των καρδιοπαθών, και χρησιμεύει ως ασπίδα έναντι των λοιμώξεων που οφείλονται σε μύκητες και βακτήρια.

Στην παγκόσμια ιστορία, το μέλι πρωτοεμφανίστηκε στην Ισπανία σε τοιχογραφίες που χρονολογούνται από το 6.000 π.Χ. και απεικόνιζαν τον άνθρωπο σε θέση συλλογής μελιού, ενώ αντίστοιχες τοιχογραφίες ανακαλύφθηκαν και στην Ινδία. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, το μέλι ήταν στο επίκεντρο της διατροφής κατά την αρχαιότητα και θεωρείτο βασιλικό προνόμιο ή θεϊκό ιατρικό. Στην αρχαία Αίγυπτο, ο μύθος έλεγε ότι ήταν τμήμα των δακρύων του θεού Ρα, ενώ οι μέλισσες ήταν ο οδηγός για το ταξίδι στον άλλο κόσμο.

Οι μελισσοπαραγωγοί τελούσαν υπό την προστασία του βασιλιά και διέθεταν ιδιαίτερα προνόμια, ενώ το κυνήγι του άγριου μελιού ήταν διαδεδομένο και ήταν υπό την προστασία των στρατιωτών του βασιλιά. Στον μεσαίωνα, αναβαθμίζεται η διαδικασία παραγωγής, καθώς η υψηλή ζήτηση του μελιού και του κεριού, έχουν ως αποτέλεσμα την δημιουργία νέων κυψελών αλλά και συνταγών, καθώς η σύνδεση με τις θρησκευτικές ανάγκες έχει ως αποτέλεσμα την κατακόρυφη αύξηση της ζήτησής του.

Στη σημερινή εποχή, η τεχνολογική επανάσταση και η πρόοδος των επιστημών δίνει νέα πνοή στην όλη διαδικασία, καθώς αναπτύσσονται πολλά νέα είδη μελιού, βελτιώνεται η ποιότητα και η καθαρότητα του προϊόντος και δημιουργούνται νέες κηρήθρες που εξοικονομούν νέκταρ από τις μέλισσες. Ταυτόχρονα, εμφανίζονται προϊόντα ανταγωνιστικά του μελιού (πχ. ζάχαρη) που έχουν ως αποτέλεσμα τη σχετική μείωση της ζήτησής του. Με την πάροδο των χρόνων η ζήτηση παρουσιάζει ανοδική τάση, καθώς οι ιδιότητές του, όπως η φαρμακευτική δράση αλλά και η διατροφική του αξία, το καθιστούν μοναδικό στην κατηγορία του και προτιμάται περισσότερο από τους καταναλωτές (Bogdanov et al., 2009).

1.3 Τρόποι Παραγωγής

Η διαδικασία παραγωγής του μελιού είναι μια σύνθετη διαδικασία η οποία απαιτεί την συνεργατική δράση όλων των μελισσών ανεξάρτητα από τις παρεμβάσεις του ανθρώπου. Καμία μέλισσα δεν θα μπορούσε να παράξει μέλι μόνη της, καθώς απαιτείται συνεργασία και διαδικασίες πολλών ειδών από κοινού, ώστε το νέκταρ των λουλουδιών να μετατραπεί σε μέλι. Υπάρχει ανάθεση καθηκόντων και ρόλων μεταξύ τους έως την τελική παραγωγή του προϊόντος.

Συγκεκριμένα, οι μέλισσες εργάτριες οι οποίες αποτελούν την πλειοψηφία του πληθυσμού, συλλέγουν το νέκταρ των λουλουδιών και το μεταφέρουν στην κυψέλη, όπου αναλαμβάνει δράση ένα άλλο είδος μέλισσας για να επεξεργαστεί το νέκταρ. Στη συνέχεια, με την βοήθεια των ενζύμων, σχηματίζεται ένα μείγμα μελιού και νερού. Κατόπιν, οι μέλισσες εργάτριες συλλέγουν το μείγμα και το τοποθετούν στις κηρύθρες, ώστε να απομακρυνθεί το νερό και να απομονώσουν ένα παχύρρευστο και πυκνό μέλι. Ένα άλλο είδος μέλισσας σφραγίζει τις κυψελίδες της κηρήθρας για να προστατευτεί το μέλι, καθώς μαζί με τον πολτό, την γύρη και άλλα παράγωγα θα αποτελέσουν την βασική διατροφή κατά τον χειμώνα.

Τέλος, η συλλογή του μελιού γίνεται με μια σειρά εργαλείων με τα οποία αφαιρούνται οι κηρήθρες που έχουν σφραγιστεί καλά, εξασφαλίζοντας πρώτα την απομάκρυνση των μελισσών. Η παρατήρηση και κατανόηση αυτής της διαδικασίας από τον άνθρωπο, οδήγησε σε στοχευμένες παρεμβάσεις ώστε να αυξηθεί η παραγωγή αλλά και να βελτιωθεί η ποιότητα, διευκολύνοντας παράλληλα και το έργο των μελισσών. Για παράδειγμα, δημιούργησε νέες κυψέλες, με ειδικά διαμορφωμένο περιβάλλον για κάθε περίπτωση και έτσι πλέον υπάρχουν κυψέλες που χαρακτηρίζονται από:

- 1 Την ικανότητα τους να διατηρούν σταθερή θερμοκρασία.
- 2 Την ικανότητα ύπαρξης κινητών ή ακίνητων κηρηθρών.
- 3 Τη δυνατότητα της περαιτέρω επέκτασής τους.
- 4 Την ικανότητα μεταφοράς των κυψελών σε περίπτωση που υπάρξει αλλαγή στο περιβάλλον.
- 5 Ευελιξία σχετικά με το είδος του τελικού προϊόντος που ζητείται να παραχθεί.

Με γνώμονα τη συνεχή αναζήτηση και προσπάθεια για το βέλτιστο, ο άνθρωπος εξέλιξε την διαδικασία της παραγωγής και στη συνέχεια, με την ταυτοποίηση των στοιχείων που αποτελούν το μέλι, διαμόρφωσε τις συνθήκες για την παραγωγή υψηλής ποιότητας αλκοολούχων ποτών που έχουν ως κύριο ή δευτερεύων συστατικό το μέλι. Επιπρόσθετα, κατόρθωσε να λαμβάνει και άλλα προϊόντα από την κυψέλη, όπως είναι η γύρη, ο βασιλικός πολτός, η πρόπολη, το κερί και το δηλητήριο της μέλισσας (Nanda et al., 2003).

1.4 Σύσταση και χαρακτηριστικά μελιού

1.4.1. Σύσταση του μελιού

Το μέλι είναι ένα πυκνό, παχύρευστο διάλυμα που διαθέτει σημαντικά πλεονεκτήματα. Αρχικά, έχουν ταυτοποιηθεί οι ουσίες που μπορεί να περιέχει με αποτέλεσμα να καθίσταται ευκολότερος ο έλεγχος της νοθείας του και να διασφαλίζεται η ποιότητα του. Οι ουσίες αυτές διαφέρουν ανάλογα με το είδος, αλλά και τους παράγοντες που επηρέασαν την μέλισσα κατά την παραγωγή του μελιού.

Το είδος τροφής της μέλισσας, το περιβάλλον ανάπτυξης του φυτού, οι συνθήκες αποθήκευσης και οι συνθήκες συγκομιδής, είναι παράγοντες που επηρεάζουν σε σημαντικό βαθμό την περιεκτικότητα του μελιού. Ταυτόχρονα, η μικροσκοπική δράση της ζάχαρης σε συνδυασμό με την παρουσία του υπεροξειδίου του υδρογόνου και το χαμηλό pH, εγγυώνται τη διατήρηση της κατάστασης του μελιού (Alvarez-Suarez et. al., 2010). Ακολουθεί, η μέση σύσταση του μελιού όπως διατυπώνεται στην παρακάτω ανάλυση:

Σύμφωνα με την ανάλυση, το μέλι διαθέτει τεράστια ποικιλία ζαχάρων, όπως είναι η γλυκόζη, η φρουκτόζη, η σουκρόζη, η μαλτόζη κ.α., ενώ πολύ σημαντικό για την ικανότητα του να διατηρείται είναι η μικρή περιεκτικότητα σε άζωτο.

Πίνακας 1: Μέση σύσταση μελιού (Πηγή: Suarez et al., 2010)

Component	Average (%)
Water	17,2
Fructose	38,19
Glucose	31,28
Sucrose	1,31
Disaccharides, calculated as maltose	7,31
Higher sugars	1,5
Free acid as gluconic	0,43
Lactone as gluconolactone	0,14
Total acid as gluconic	0,57
Ash	0,169
Minerals	0,2
pH value	3,9
Nitrogen	0,0141
Amino acids, proteins	0,3

1.4.2 Αναλύσεις μελιού κατά IHC

Για να διακινηθεί το μέλι στην αγορά και, ιδιαίτερα, για να χρησιμοποιηθεί ως βασικό συστατικό στην παραγωγή ενός προϊόντος, απαιτούνται έλεγχοι και μετρήσεις, ώστε να εξασφαλιστεί η καταλληλότητά του και να προσδιοριστούν όλοι αυτοί οι παράγοντες που θα βελτιώσουν την ποιότητα του τελικού προϊόντος. Σύμφωνα με την νομοθεσία (Οδηγία 2001/110/EK), υπάρχουν συγκεκριμένες αναλύσεις που πρέπει να πραγματοποιηθούν πριν διατεθεί το μέλι στην αγορά με σκοπό να διασφαλιστεί η ασφάλεια των καταναλωτών, αλλά και να αξιολογηθούν τα ποιοτικά χαρακτηριστικά.

Ειδικότερα, οι αναλύσεις αυτές είναι :

1. Γυρεοσκοπική εξέταση
2. Δείκτης διάστασης
3. Σάκχαρα
4. Υδροξυμεθυλοφουρουράλης (HMF)
5. Αγωγιμότητα
6. Υγρασία
7. Φωσφοροθειϊκός διαιθυλεστέρας -Φλουβανιλικό οξύ
8. Αντιβιοτικά

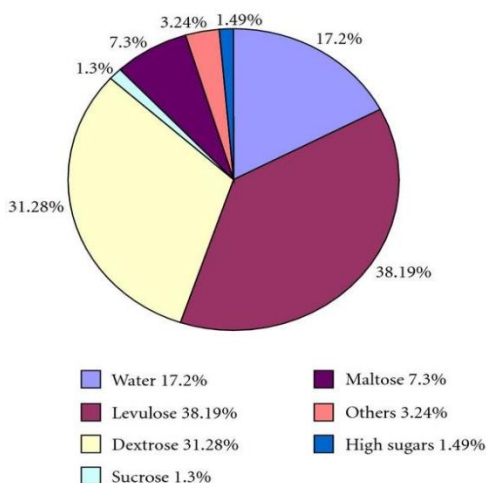
Σε περίπτωση που χρησιμοποιηθεί ένα τυποποιημένο μέλι του εμπορίου, ένα μέρος αυτών των αναλύσεων έχει ήδη πραγματοποιηθεί. Έτσι, πριν ξεκινήσει η προετοιμασία του μελιού για την αλκοολική ζύμωση πρέπει να μετρηθούν:

1. Υγρασία
2. pH και οξύτητα
3. Ηλεκτρική αγωγιμότητα
4. Θολερότητα
5. Άζωτο-α-αμινοξέα
6. Χρώμα
7. Δείκτης φαινολικών ουσιών (Folin – Ciocalteu)

Οι παραπάνω παράγοντες είναι απαραίτητο να προσδιοριστούν, καθώς μέσω των τιμών τους θα καθοριστούν περαιτέρω οι τιμές των θρεπτικών στοιχείων, των ζυμών και όσων πρόσθετων χρησιμοποιηθούν.

Σάκχαρα

Τα σάκχαρα είναι ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά στοιχεία του μελιού, καθώς σε κάποιες ποικιλίες αποτελούν κριτήριο για την καθαρότητα του προϊόντος. Η αναλογία τους βρίσκεται περίπου στο 83%, ενώ έπειτα από ανάλυση έχει βρεθεί ότι υπάρχουν πάνω από 20 κατηγορίες σακχάρων. Η κυρίαρχη ομάδα είναι η φρουκτόζη και ακολουθεί η γλυκόζη και άλλα ανώτερα σάκχαρα.



Διάγραμμα 1: Εκατοστιαία σύνθεση του μελιού (Jaganathan και Mandal, 2009)

Η σύσταση των δύο κύριων σακχάρων είναι η σουκρόζη η οποία δεν εμφανίζεται στο τελικό προϊόν, καθώς κατά την παραγωγή οι μέλισσες εκκρίνουν το ένζυμο ιμπερτάση το οποίο διασπά την σουκρόζη σε φρουκτόζη και γλυκόζη. Αυτό αποτελεί ένδειξη για την ύπαρξη νοθείας στο μέλι, καθώς σε περίπτωση που παρατηρηθεί χαμηλή συγκέντρωση σουκρόζης τότε σημαίνει ότι ο τρύγος πραγματοποιήθηκε πρόωγα και ελλοχεύει ο κίνδυνος της νοθείας με ζάχαρη (Doner, 1977).

Αζωτούχες Ενώσεις

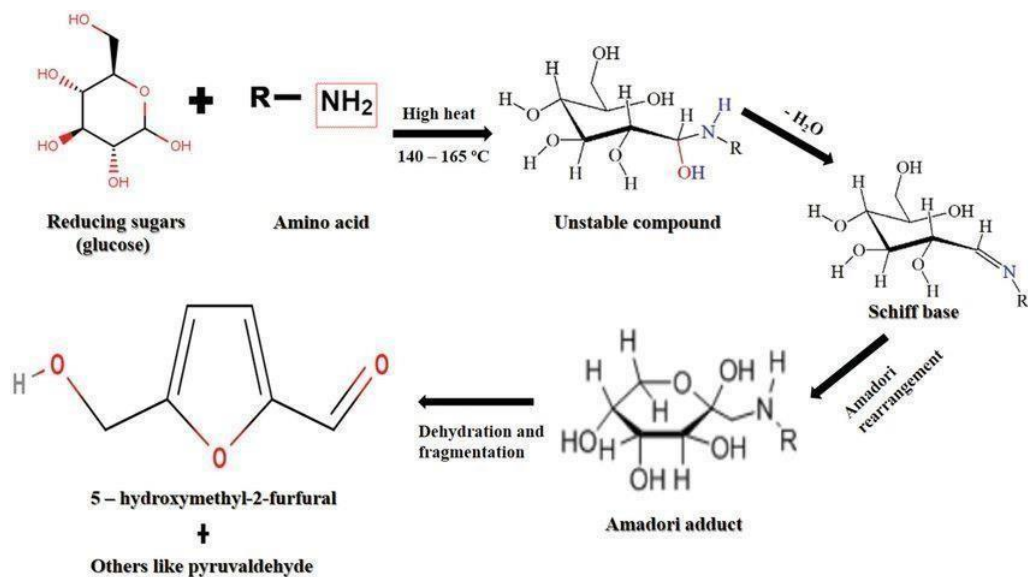
Ένα από τα βασικά προβλήματα στην παραγωγή αλκοολούχων ποτών από μέλι είναι η χαμηλή περιεκτικότητα σε άζωτο που έχει ως αποτέλεσμα την αδυναμία πραγματοποίησης της ζύμωσης. Οι κύριες πηγές αζώτου είναι τα ελεύθερα αμινοξέα και οι πρωτεΐνες με την μέση περιεκτικότητα να υπολογίζεται κοντά στο 0,04% (αμινοξέα και άζωτο) και να διαφέρει ανάλογα με το είδος του μελιού. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η συγκέντρωση των πρωτεϊνών στο μέλι ανθέων που ποικίλλει από 0,1% - 1,5%, ενώ στο μέλι μελιτωμάτων η συγκέντρωση αυτή υπολογίζεται στο 3%. Έτσι, εφόσον το μέλι χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή υδρόμελου, το ποσοστό του αζώτου είναι ακόμα μικρότερο και ιδιαίτερα το ποσοστό του αφομοιώσιμου αζώτου είναι συνήθως ανεπαρκές.

Στην περίπτωση των αμινοξέων, το κυρίαρχο αμινοξύ (50-85%) είναι η προλίνη, η οποία έχει έναν ξεχωριστό ρόλο στο μέλι, καθώς χρησιμοποιείται ως κριτήριο για την ωρίμανση του μελιού, ενώ πρέπει να τονιστεί ότι τα αμινοξέα του μελιού προέρχονται από την γύρη. Εκτός από την προλίνη, υπάρχουν άλλα 26 αμινοξέα που περιέχονται στο μέλι με τις αναλογίες τους να εξαρτώνται από το είδος του μελιού και αυτό να αποτελεί στοιχείο το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της ποικιλίας. Άλλα σημαντικά αμινοξέα είναι η φαινυλαλανίνη, το γλουταμινικό οξύ, η γλουταμίνη, η σερίνη κ.α. (Κυσ, 2020)

HMF ή Υδροξυμεθυλοφουρουράλη

Η ένωση υδροξυμεθυλοφουρουράλη είναι μία ετεροκυκλική οργανική ένωση έξι ανθράκων που περιέχει- ως λειτουργικές ομάδες- και αλδεΐδη και αλκοόλη. Είναι προϊόν της διάσπασης των σακχάρων (ινουλίνη, κυτταρίνη, γλυκόζη, φρουκτόζη και σακχαρόζη) υπό την παρουσία οξέος (eurolab, 2017). Αποτελεί δείκτη φρεσκάδας του μελιού, καθώς το φρέσκο μέλι έχει μικρή συγκέντρωση HMF, αλλά με την πάροδο του χρόνου και λόγω της θέρμανσης, η συγκέντρωση αυξάνεται.

Η συγκέντρωσή της κυμαίνεται μεταξύ 10mg/kg έως και 40mg/kg, που αποτελεί το ανώτατο όριο της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Imperiale et al., 2022), καθώς μπορεί να έχει δυσάρεστες συνέπειες έως και κίνδυνο για την υγεία του καταναλωτή. Έχει παρατηρηθεί ότι τα όρια κατανάλωσης HMF είναι μεταξύ 30 και 150 mg για καθημερινή χρήση και καλό είναι να μην υπερβαίνονται, καθώς η ένωση είναι τοξική (Bogdanov et.al., 2009).



Διάγραμμα 2 : Διαγραμματική απεικόνιση της αφυδρογόνωσης των σακχάρων και του σχηματισμού της υδροξυμεθυλοφουρουράλης (Choudhary et al., 2020)

Παρατηρείται η προσθήκη του R υποκαταστάτη σε θερμοκρασία 140-165°C και η μετέπειτα αφαίρεση ενός μορίου νερού, οπότε με την ανακατάταξη του μορίου προκύπτει το μόριο HMF.

Γυρεόκοκκοι

Ως γυρεόκοκκοι ορίζονται τα απλοειδή κύτταρα που προκύπτουν από τις μειωτικές διαιρέσεις που πραγματοποιούνται στους ασκούς των ανθήρων. Αποτελούνται από το εξώστρωμα, το ενδόστρωμα, τον βλαστικό πυρήνα και τον γενετήσιο πυρήνα, με την μορφολογία τους να καταδεικνύει πολλές φορές την προέλευση τους. Αυτή η ιδιότητα τους χρησιμοποιείται για να υπολογισθεί η καθαρότητα του μελιού, καθώς με βάση την συγκέντρωση των γυρεόκοκκων μπορεί να χαρακτηριστεί ως θυμαρίσιο, ελάτης κ.α. Ταυτόχρονα, μέσω γυρεολογικών χαρτών, προσδιορίζονται γυρεόκοκκοι που είτε δεν υπάρχουν στις περιοχές προέλευσης των μελιών, είτε βρίσκονται σε διάφορες συγκεντρώσεις, κάτι το οποίο αποτελεί ένδειξη για πιθανή νοθεία.

Η γύρη είναι ένα πλούσιο φυτικό προϊόν, καθώς περιέχει πρωτεΐνες, αμινοξέα, υδατάνθρακες, λιπίδια, λιπαρά οξέα, φαινολικές ενώσεις, βιταμίνες και βιοστοιχεία. Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη υπολογίζεται σε 22,7% - κατά μέσο όρο- και συμπεριλαμβάνει αμινοξέα, όπως είναι η λυσίνη, η θρεονίνη, η ιστιδίνη, σε ποσοστό 10,4%. Σε υψηλό ποσοστό συναντώνται και οι εύπεπτοι υδατάνθρακες που αποτελούν το 30,8% κατά μέσο όρο. Τέλος, παρατηρείται και η ύπαρξη φρουκτόζης και γλυκόζης σε ποσοστό 25,7% κατά μέσο όρο (Murray, 2020; Δήμου, 2019).

Η γύρη είναι σημαντική για τις θεραπευτικές ιδιότητες (Γκακνή & Σταθακάρου, 2019) της καθώς:

1. Ενισχύει την αντιοξειδωτική δύναμη του οργανισμού
2. Βελτιώνει την υγεία της καρδιάς
3. Έχει αντιφλεγμονώδη δράση
4. Ενισχύει την άμυνα του οργανισμού
5. Επουλώνει τις πληγές
6. Βοηθά την καλή λειτουργία του ήπατος

pH

Το pH του υδρόμελου είναι μια κρίσιμη παράμετρος κατά την παραγωγή του. Το σωστό pH όχι μόνο διασφαλίζει ότι το υδρόμελο έχει γεύση και εμφάνιση, αλλά διασφαλίζει επίσης ότι είναι ασφαλές για κατανάλωση. Ένα χαμηλό pH (<pH 4,6) θα αποτρέψει την ανάπτυξη ανεπιθύμητων μικροοργανισμών και θα προστατεύσει το υδρόμελο από βακτηριακή αλλοίωση. Ωστόσο, εάν το pH είναι πολύ χαμηλό, τότε η μαγιά θα καταπονηθεί, με αποτέλεσμα την αργή ή κολλημένη ζύμωση και ανεπιθύμητα υποπροϊόντα ζύμωσης (Bouacha et al., 2018).

Πίνακας 2. Εύρος τιμών pH μελιού σε σχέση και με το χρώμα

pH	Color
3,4	Light brown
4,5	Dark brown
3,9	Brown
3,2	Dark brown
3,5	Brown
4	Light brown

Πηγή: (Bouacha et al., 2018)

Το μέλι έχει συνήθως pH περίπου 3,9, αλλά το εύρος των τιμών του είναι από 3,4 έως 6,1 ενώ το επιθυμητό εύρος του pH για το υδρόμελο κατά τη ζύμωση είναι μεταξύ 3,7 και 4,0.

Βιταμίνες

Όπως φαίνεται και παρακάτω, το μέλι περιέχει μια σειρά από βιταμίνες με αντιοξειδωτική δράση, με την βιταμίνη B3 να βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση (Ajibola et. al., 2012).

Πίνακας 3 : Αντιοξειδωτική δράση βιταμινών

Vitamins	Amount (mg/100g)
Thiamine (B1)	0,00-0,01
Riboflavin (B2)	0,01-0,02
Niacin (B3)	0,10-0,20
Pantothenic acid (B5)	0,02-0,11
Pyridoxine (B6)	0,01-0,32
Folic acid (B9)	0,002-0,01

Πηγή: (Erlwanger, 2012)

Ένζυμα

Το μέλι περιέχει διάφορες κατηγορίες ενζύμων οι οποίες οφείλουν την προέλευση τους στη μέλισσα. Τα τρία κύρια ένζυμα του μελιού είναι η αμυλάση, η ιμπερτάση και η οξειδάση γλυκόζης. Η κύρια δράση τους συνίσταται στην αποσύνθεση του αμύλου ή του γλυκογόνου σε μικρότερες μονάδες σακχάρων. Η κύρια αποσύνθεση είναι η διάσπαση της σακχαρόζης σε γλυκόζη και φρουκτόζη, με ταυτόχρονη οξείδωση της γλυκόζης, που έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου και γλυκονικού οξέος.

Ταυτόχρονα, τα ένζυμα χρησιμοποιούνται και ως δείκτες παλαίωσης ή νοθείας, καθώς οι δραστηριότητες μειώνονται σε αυξημένη θερμοκρασία και όξινο περιβάλλον. Συγκεκριμένα, η τιμή του ενζύμου της διάστασης σε συνδυασμό με την τιμή της σακχαρόζης και της τιμής HMF, αποτελούν δείκτες νοθείας, καθώς η τιμή του δείκτη διάστασης θα πρέπει να είναι >8, με εξαίρεση το μέλι πορτοκαλιάς (>3). Σε περίπτωση που εντοπιστεί μέλι με τιμή χαμηλότερη από το όριο, τότε οι πιθανότητες να έχει νοθευτεί ή να έχει παλαιωθεί είναι υψηλές και απαιτείται περαιτέρω έλεγχος (Gilliam & Jackson, 1972).

Πίνακας 4: Είδη ενζύμων και ο ρόλος τους

Ένζυμα από τους υποφαρυγγικούς αδένες των μελισσών	
Ιμβερτάση	Διασπά τη σουκρόζη σε γλυκόζη και φρουκτόζη, είναι πιο θερμοευαίσθητη από την αμυλάση
Γλυκοξειδάση	Οξειδώνει τη γλυκόζη σε γλουκονικό οξύ και υπεροξειδίο του υδρογόνου παρουσία νερού, πιο θερμοευαίσθητη από την ιμβερτάση
Διαστάση (Αμυλάση)	Διασπά το άμυλο, θερμοευαίσθητη, δεν έχει βρεθεί ο ρόλος της στην παραγωγή μελιού-πιθανόν να βοηθά στην πέψη της γύρης από τις μέλισσες
Ένζυμα από τα φυτά (νέктar-μελιτώματα)	
Καταλάση	Ρυθμίζει τη δράση της γλυκοξειδάσης με το να ελέγχει την ισορροπία του H ₂ O ₂
Οξική φωσφατάση	Υπάρχει στη γύρη, στο νέктar και το μέλι
Διαστάση (Αμυλάση)	Ένα μικρό ποσό αυτής προέρχεται από τα φυτά

Πηγή:(Rossano et al., 2012)

Πρωτεολυτικά Ένζυμα Μελιού

Μέσω της δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης, οι πρωτεάσες του μελιού είναι σε θέση να αποικοδομούν τις κύριες πρωτεΐνες του Βασιλικού Πολτού και ειδικότερα την MRPJ-1, την πρωτεΐνη που προάγει τη διαφοροποίηση της βασίλισσας στις μέλισσες. Τα ευρήματα αυτά βοηθούν στην καλύτερη κατανόηση της ανάπτυξης των μελισσών, της κοινωνικής συμπεριφοράς και του ρόλου τους στην παραγωγή μελιού.

Οι πρωτεάσες μελιού μπορεί να επηρεάσουν τις ιδιότητες και την ποιότητα του μελιού. Τα δισδιάστατα ζυμογράμματα μπορεί να είναι χρήσιμα για τη διάκριση μεταξύ διαφορετικών τύπων μελιού, για τον προσδιορισμό της ηλικίας και της ανθικής τους προέλευσης και για την πιστοποίηση του μελιού (Rossano et. al., 2012).

Σε αυτή τη μελέτη, αναλύθηκαν τέσσερα εμπορικά μονοάνθινα μέλια: Πορτοκαλιού (*Citrus* sp), Καστανιάς (*Castanea sativa* Miller.), Ευκάλυπτου (*Eucalyptus* sp) και Ιταλικού σκαρίφου (*Hedysarium coronarium* L.), γνωστό στην Ιταλία ως «Sulla». Τα μέλια παρασκευάζονταν σε δύο διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές της Περιφέρειας Basilicata (Νότια Ιταλία).

Για κάθε τύπο μελιού αναλύθηκαν τέσσερα δείγματα: δύο από την επαρχία της Matera (MT) (honeyMT1 και honeyMT2) και δύο από την επαρχία της Potenza (PZ) (honeyPZ1 και honeyPZ2). Συνολικά, αναλύθηκαν 16 δείγματα εις διπλούν. Για την ανάλυση,

εφάρμοσαν διδιάστατη ζυμογραφία (2-DZ), μια τεχνική που επιτρέπει την ανίχνευση ολόκληρου του πρωτεολυτικού δικτύου που υπάρχει σε ένα βιολογικό δείγμα, συμπεριλαμβανομένων ισόμορφων και μετα-μεταφραστικών παραλλαγών.

Η υψηλότερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες βρέθηκε στο μέλι ευκαλύπτου, ενώ οι υψηλότερες τιμές ολικής πρωτεολυτικής δραστηριότητας εντοπίστηκαν στα εκχυλίσματα που ελήφθησαν από μέλι καστανιάς. Δε βρέθηκαν διαφορές μεταξύ των πρωτεολυτικών δράσεων των μελιών πορτοκαλιού και sulla στα αντίστοιχα δείγματα που έχουν την ίδια βοτανική προέλευση, αλλά παρασκευάζονται σε διαφορετικές περιοχές. Αντίθετα, τα μέλια καστανιάς από την Potenza (honeysPZ) εμφάνισαν χαμηλότερη δράση σε σύγκριση με αυτά από τη Matera (honeysMT).

Τέλος, τα δείγματα ευκαλύπτου από την Potenza εμφάνισαν υψηλότερες πρωτεολυτικές δραστηριότητες σε σύγκριση με εκείνα της Matera.

Πίνακας 5: Περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και πρωτεολυτική δράση σε διαφορετικά μέλια (Larocca et al., 2012)

Sample	Honey samples	Protein (mg prot g honey ⁻¹)	Total proteolytic activity (mU mg prot ⁻¹)
1	Orange _{MT1} - (<i>Citrus</i>)	0.62 ^c ±0.07	14.47 ^e ±1.05
2	Orange _{MT2} (<i>Citrus</i>)	0.58 ^c ±0.08	14.80 ^e ±1.16
3	Orange _{PZ1} (<i>Citrus</i>)	0.66 ^c ±0.11	15.05 ^e ±1.31
4	Orange _{PZ2} (<i>Citrus</i>)	0.72 ^d ±0.10	15.23 ^e ±0.44
5	Eucalyptus _{MT1} (<i>Eucalyptus</i> sp)	0.91 ^d ±0.13	15.96 ^e ±0.95
6	Eucalyptus _{MT2} (<i>Eucalyptus</i> sp)	0.93 ^d ±0.15	14.97 ^e ±1.08
7	Eucalyptus _{PZ1} (<i>Eucalyptus</i> sp)	1.24 ^d ±0.14	21.36 ^f ±1.27
8	Eucalyptus _{PZ2} (<i>Eucalyptus</i> sp)	1.24 ^d ±0.14	19.06 ^f ±0.88
9	Sulla _{MT1} (<i>Hedysarium coronarium</i>)	0.70 ^c ±0.12	15.22 ^e ±0.48
10	Sulla _{MT2} (<i>Hedysarium coronarium</i>)	0.84 ^c ±0.22	16.40 ^e ±1.21
11	Sulla _{PZ1} (<i>Hedysarium coronarium</i>)	0.68 ^c ±0.11	15.53 ^e ±0.09
12	Sulla _{PZ2} (<i>Hedysarium coronarium</i>)	0.78 ^c ±0.91	16.03 ^e ±0.68
13	Chestnut _{MT1} (<i>Castanea sativa</i>)	0.71 ^c ±0.09	32.49 ^g ±1.21
14	Chestnut _{MT2} (<i>Castanea sativa</i>)	0.60 ^c ±0.06	36.43 ^g ±2.05
15	Chestnut _{PZ1} (<i>Castanea sativa</i>)	0.69 ^c ±0.16	25.29 ^h ±3.11
16	Chestnut _{PZ2} (<i>Castanea sativa</i>)	0.59 ^c ±0.10	27.61 ^h ±1.89

Υγρασία μελιού

Η υγρασία μελιού έχει φυσική προέλευση, καθώς είναι υπόλειμμα του νερού που υπήρχε στο νέκταρ προ της έναρξης της διαδικασίας της ωρίμανσης. Οι τιμές που κυμαίνονται από 13% έως 25% είναι ένας από τους καθοριστικούς παράγοντες για την διατήρηση του μελιού, καθώς οι υψηλές τιμές ευνοούν την ξινή ζύμωση του μελιού. Παρ' όλα αυτά πρέπει να υπάρχει μια ισορροπία, καθώς χαμηλές τιμές προκαλούν την αδιαλυτοποίηση των σακχάρων, ενώ, όπως αναφέρθηκε, οι υψηλές τιμές ευνοούν την ξινή ζύμωση (Yanniotis et al., 2006).

Ως εκ τούτου, η ευρωπαϊκή ένωση έχει θεσπίσει ως ανώτερο όριο το 20% για την προστασία του προϊόντος. Αυτό το όριο μπορεί να θεωρηθεί αρκετά ελαστικό, καθώς η ξινή ζύμωση ξεκινά με υγρασία 17-18% και θερμοκρασία 11-21° C, με αποτέλεσμα ο κίνδυνος να ελλοχεύει τον χειμώνα και όχι το καλοκαίρι. Για να πραγματοποιηθεί αυτό το φαινόμενο απαιτείται έκθεση του μελιού σε κακές συνθήκες αποθήκευσης, επαφή με οξυγόνο, υψηλή υγρασία αποθήκευσης και, φυσικά, μεγάλος αριθμός του πληθυσμού των ζυμών. Για την μείωση της υγρασίας του μελιού χρειάζεται θέρμανση στους 70° C για 5-10 λεπτά που επιτυγχάνει και την μείωση του πληθυσμού των ζυμών, αλλά και μείωση της αντιοξειδωτικής και θρεπτικής αξίας του μελιού.

Το μέλι το οποίο δεν θερμαίνεται και δεν υφίσταται καμία διεργασία από την στιγμή που εξάγεται από την κηρύθρα, ονομάζεται άθερμο και έχει υψηλή θρεπτική αξία, καθώς περιέχει ένζυμα και άλλες ενώσεις οι οποίες καταστρέφονται λόγω της θερμικής επεξεργασίας. Τα επιτραπέζια μέλια στην πλειοψηφία τους είναι άθερμα, καθώς τα θερμασμένα χρησιμοποιούνται είτε στην βιομηχανία τροφίμων είτε στην ζαχαροπλαστική (Θρασυβούλου, 2012). Το μέλι έχει αντιοξειδωτική δράση η οποία όμως είναι εξαιρετικά μεταβλητή. Επιπλέον, η θερμότητα η οποία απαιτείται για την παστερίωση μπορεί να μειώσει το ποσοστό των αντιοξειδωτικών του ιδιοτήτων έως και 30%.

1.4.3 Χαρακτηριστικά του μελιού

Ηλεκτρική αγωγιμότητα

Η αγωγιμότητα χρησιμοποιείται τακτικά για τον έλεγχο της ποιότητας του μελιού, καθώς μέσω αυτής μπορεί να αξιολογηθεί η βοτανική προέλευση και η καθαρότητά του. Η περιεκτικότητα του μελιού σε μέταλλα, οργανικά οξέα και άλλες ενώσεις που έχουν την ικανότητα διάσπασης ή ένωσης με τα ιόντα, έχει ως αποτέλεσμα την συσχέτιση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας με αυτά.

Ως ηλεκτρική αγωγιμότητα ορίζεται η αγωγιμότητα ενός διαλύματος βάρους 20% σε νερό στους 20 βαθμούς κελσίου όπου το 20% αναφέρεται στην ξηρή ύλη του μελιού (Ρούσης & Μπαδέκα, 2020). Η αγωγιμότητα του μελιού σχετίζεται με την συγκέντρωση μεταλλικών αλάτων, οργανικού οξέος και πρωτεϊνών κάτι το οποίο δίνει και την δυνατότητα της εύρεσης της ανθικής προέλευσης. Υπάρχουν θεσμοθετημένα όρια για την τιμή της ηλεκτρικής αγωγιμότητας και εξαρτώνται από το είδος του μελιού, αφού ο γενικός κανόνας είναι ότι το μέλι από μελιτώματα πρέπει να έχει αγωγιμότητα μεγαλύτερη από 0,8mS/cm, ενώ το μέλι από άνθη πρέπει να έχει αγωγιμότητα μικρότερη από 0,8 mS/cm. Στη πραγματικότητα όμως, εξαρτάται από το εκάστοτε είδος, καθώς το μέλι πεύκου πρέπει να έχει αγωγιμότητα >0,9 mS/cm, το μέλι ελάτης >1.0 Ms/cm, το μέλι καστανιάς >1.1mS/cm, το μέλι θυμαριάς <0,6 mS/cm και τέλος το μέλι πορτοκαλιάς <0,45 mS/cm (Baloš et al., 2018).

Ιξώδες

Το ιξώδες είναι ένα φυσικό μέγεθος που χαρακτηρίζει την εσωτερική τριβή ενός ρευστού, μας δείχνει δηλαδή την αντίσταση που παρουσιάζει το ρευστό κατά τη ροή του. Όσο μεγαλύτερο είναι το ιξώδες, τόσο μεγαλύτερη είναι η αντίσταση του ρευστού, κάτι το οποίο ισχύει στην περίπτωση του μελιού. Το ιξώδες είναι αντιστρόφως ανάλογο της ρευστότητας, καθώς αύξηση του ιξώδους σημαίνει μείωση της ρευστότητας και αντίστροφα. Βέβαια, με την ύπαρξη υψηλού ιξώδους διαπιστώνεται και η υψηλή περιεκτικότητα σακχάρων με αποτέλεσμα - υπό προϋποθέσεις- να αποτρέπεται η ανάπτυξη μικροοργανισμών.

Η τιμή του διαφέρει από μέλι σε μέλι ανάλογα με την φυτική προέλευση, την σύνθεσή του, την περιεκτικότητα σε υγρασία και την θερμοκρασία διατήρησης. Η τιμή μπορεί να αποτελέσει δείκτη νοθείας. Συγκεκριμένα, η βοτανική προέλευση δίνει πληροφορίες για το ιξώδες και σε περίπτωση που έχει πραγματοποιηθεί νοθεία με την προσθήκη νερού, θα παρατηρηθεί διαφορά της τιμής του ιξώδους.

Ένας παράγοντας που επηρεάζει το ιξώδες είναι η θερμοκρασία, καθώς σε περίπτωση αύξησής της, παρατηρείται μείωση του ιξώδους και άρα αύξηση της ρευστότητας. Αυτή η ιδιότητα χρησιμοποιείται ιδιαίτερα κατά τα διάφορα στάδια της παραγωγής, καθώς επισπεύδονται ορισμένες διαδικασίες και ταυτόχρονα διευκολύνονται αρκετές διεργασίες (Tensiska et al., 2019).

Ξίνισμα

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, θεωρητικά το μέλι μπορεί να διατηρηθεί για πάντα εφόσον έχει μια καλή σύσταση και δεν έρχεται σε επαφή με το οξυγόνο. Παρ' όλα αυτά, με την πάροδο του χρόνου μπορεί να εμφανίσει κάποια είδους αλλοίωση ή να κρυσταλλωθεί και να χάσει την αρχική του σύσταση. Ένα από αυτά τα προβλήματα είναι η ανάπτυξη οσμόφιλων ζυμομυκήτων, η οποία ευνοείται από την υψηλή περιεκτικότητα του μελιού σε υγρασία σε μία μέση θερμοκρασία των 11° -21° C.

Το φαινόμενο αυτό δεν εμφανίζεται συχνά στις ελληνικές ποικιλίες μελιού (Atagün & Aalbayrak, 2021).

Κρυστάλλωση

Η κρυστάλλωση αποτελεί ένα φαινόμενο το οποίο προκαλεί σύγχυση στους καταναλωτές, καθώς η πλειοψηφία θεωρεί πως ένα κρυσταλλωμένο μέλι είναι και ένα νοθευμένο μέλι, κάτι το οποίο δεν ευσταθεί. Η κρυστάλλωση είναι μια φυσιολογική διαδικασία για το μέλι για την οποία ευθύνεται μία σειρά παραγόντων όπως:

- Τα επίπεδα των σακχάρων
- Το ποσοστό του νερού
- Η παρουσία παραγόντων κρυστάλλωσης
- Η θερμοκρασία αποθήκευσης
- Ο χρόνος αποθήκευσης

Άλλος λόγος πρόκλησης του φαινομένου, είναι η αφυδάτωση των μορίων της γλυκόζης που έχει ως αποτέλεσμα την κρυστάλλωση τους και κατ' επέκταση την κρυστάλλωση του μελιού. Αρχικά καταβυθίζονται στον πυθμένα με την μορφή μικρών κρυστάλλων και στην πορεία σχηματίζουν συσσωματώματα κάνοντας το φαινόμενο ορατό στο μάτι. Οι σχετικές μελέτες δείχνουν ότι δεν έχουν όλα τα μέλια την ίδια πιθανότητα να κρυσταλλωθούν.

Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι η υψηλή συγκέντρωση σε γλυκόζη (πάνω από 35%), η υψηλή σχέση γλυκόζης- υγρασίας και η χαμηλή σχέση φρουκτόζης-γλυκόζης έχουν ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό κρυστάλλων στο μέλι. Επιπλέον, παρατηρούνται δύο κατηγορίες κρυστάλλωσης:

Η ανομοιόμορφη κρυστάλλωση η οποία πραγματοποιείται αργά με αποτέλεσμα να καταβυθίζονται οι κρύσταλλοι και να σχηματίζεται ένα στρώμα γλυκόζης. Ως εκ τούτου, η υγρασία αυξάνεται με αποτέλεσμα να αυξάνεται ο κίνδυνος πραγματοποίησης ξινή ζύμωσης. **Η ομοιόμορφη κρυστάλλωση** η οποία πραγματοποιείται γρήγορα και έτσι δεν κινδυνεύουν με αλλοίωση τα υπόλοιπα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του.

Η θέρμανση συμβάλλει στην αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος, καθώς με ήπια θέρμανση και αποθήκευση σε θερμοκρασία 14^o C ,το μέλι επανέρχεται στην αρχική του μορφή. Ωστόσο, απαιτείται προσοχή κατά τη διαδικασία, καθώς η ανεξέλεγκτη θέρμανση θα έχει ως αποτέλεσμα την αδρανοποίηση ή την καταστροφή των ενζύμων του μελιού (Ji et al., 2023).

ΚΕΦ.2: ΥΔΡΟΜΕΛΟ

2.1.Ορισμός και ονομασία υδρόμελου

Το υδρόμελο είναι ένα παραδοσιακό αλκοολούχο ποτό που παράγεται κυρίως στην Πολωνία από παλαιότερες εποχές και αποτελείται από μέλι και νερό με διάφορες προσθήκες, όπως βότανα και χυμοί φρούτων, ενώ το είδος ζύμης *Saccharomyces cerevisiae* χρησιμοποιείται για τη διαδικασία της ζύμωσης (Śmigielska, 2017).

Σύμφωνα με την νομοθεσία, το υδρόμελο είναι το αλκοολούχο ποτό που λαμβάνεται με αρωμάτιση μείγματος ως εξής:

α) Ζυμωθέν γλεύκος μελιού και προϊόντος απόσταξης μελιού ή/και αιθυλικής αλκοόλης γεωργικής προέλευσης, το οποίο περιέχει τουλάχιστον 30% (σε όγκο) ζυμωθέν γλεύκος μελιού.

β) Ο ελάχιστος κατ' όγκος αλκοολικός τίτλος του νέκταρος μελιού ή υδρομελιού είναι 22%.

γ) Για την παρασκευή νέκταρος μελιού ή υδρομελιού επιτρέπεται να χρησιμοποιούνται μόνο φυσικές αρτυματικές ουσίες και αρτυματικά παρασκευάσματα, όπως αυτά ορίζονται με την οδηγία 88/388/Ε.Ο.Κ, η οποία καταργήθηκε και αντικαταστάθηκε από τον Κανονισμό 1334/2008.

δ) Το απόσταγμα μελιού επιτρέπεται να γλυκαίνεται μόνο με μέλι (Καν. (Ε.Κ.) αριθ. 110/2008, (παράρτημα ΙΙ, παράγραφος 11), ο οποίος αντικαταστάθηκε από τον Κανονισμό (ΕΕ) 2019/787).

Το υδρόμελο ανάλογα με την περιεκτικότητά του σε σάκχαρα διακρίνεται σε ξηρό, ημίγλυκο και γλυκό, ενώ υπάρχουν και υδρόμελα τα οποία μπορεί να είναι αφρώδη.

2.2 Ιστορική αναδρομή

Το υδρόμελο είναι ένα από τα αρχαιότερα αλκοολούχα ποτά. Κατείχε πολύ σημαντική θέση στην αρχαιότητα και υπάρχουν αναφορές για αυτό σχεδόν από όλο τον κόσμο. Η παλαιότερη καταγεγραμμένη αναφορά για το υδρόμελο εντοπίζεται μεταξύ του 1700-1100 π.Χ. στους αρχαίους ινδικούς ύμνους του Ριγκβέδα, ενώ αξιοσημείωτη είναι η αναφορά του και στην αρχαία Ελλάδα λόγω της προτίμησης του από τον Αριστοτέλη. Ανάλογες αναφορές υπάρχουν στην σκανδιναβική μυθολογία, καθώς ήταν πολύ διαδεδομένο, και αναφέρεται στην μυθολογία των Κελτών, των Βίκινγκ και των Αγγλοσαξόνων

Η μεγάλη φήμη του οφείλεται στις δυσμενείς συνθήκες ανάπτυξης της αμπελοκαλλιέργειας που είχαν ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση των αλκοολούχων ποτών που προέρχονται από φρούτα με υδρόμελο. Με το πέρασμα των χρόνων, και συγκεκριμένα κατά των Μεσαίων, παρατηρείται για πρώτη φορά η προσθήκη διάφορων μυρωδικών στο υδρόμελο, κάτι το οποίο αποτελεί πρόδρομο για την δημιουργία άλλων αλκοολούχων ποτών.

Με το πέρασμα των αιώνων, η ζήτηση του υδρόμελου μειώθηκε, καθώς αντικαταστάθηκε από το κρασί, την μπύρα και άλλα αλκοολούχα ποτά, μέρος των οποίων είχε παρόμοια συνταγή με το υδρόμελο. Θα μπορούσαν να χωριστούν σε αυτά που έχουν ως κύριο συστατικό κάποιο αλκοολούχο ποτό και σ' εκείνα που το κύριο συστατικό τους είναι κάποιο φρούτο. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι το οινόμελο, το ρακόμελο και το μηλόμελο.

2.3 Διαδικασία Παραγωγής

Σύμφωνα και με τον νομοθετικό ορισμό του υδρόμελου, για την παραγωγή του απαιτείται η αλκοολική ζύμωση ενός υδατικού διαλύματος μελιού, κατά την οποία θα προκύψει ένα αλκοολικό διάλυμα. Για να πραγματοποιηθεί αυτό, απαιτείται η προσθήκη θρεπτικών στοιχείων για να ολοκληρωθεί η σύσταση, ώστε να είναι εφικτή η ζύμωση.

Αρχικά, θα πρέπει να προστεθούν κλιμακωτά θρεπτικά στοιχεία, ταυτόχρονα με την ανάπτυξη των ζυμών. Θα πρέπει να αποφευχθεί η ολική προσθήκη των θρεπτικών στοιχείων, καθώς κάτι τέτοιο θα έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη όλων των ζυμών με μειωμένη την συγκέντρωση της πρωτεΐνης. Έτσι, θα προκύψει ένας μεγάλος δυσλειτουργικός αριθμός ζυμών και ενδέχεται να προκαλέσει προβλήματα κατά την διάρκεια της ζύμωσης, καθώς ανεπιθύμητοι οργανισμοί θα καταναλώσουν τα θρεπτικά

στοιχεία και ενδεχομένως να παράξουν ανεπιθύμητες ενώσεις που θα επηρεάσουν το άρωμα και την γεύση.

Συγκεκριμένα, η ανάπτυξη ανεπιθύμητων κυττάρων ζύμης, δίνει ανώτερες αλκοόλες που αρχικά δίνουν δυσάρεστη γεύση, αλλά μέσω της παλαίωσης μετατρέπονται σε εστέρες δίνοντας άρωμα στο τελικό προϊόν.

Ενώ η διαδικασία παραγωγής του υδρόμελου είναι σχετικά απλή, απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή, καθώς είναι πολύ εύκολο να επιμολυνθεί το προϊόν και να παραχθεί ξύδι.

Σημαντικά προβλήματα για την παραγωγή υδρόμελου είναι η απολύμανση του δείγματος και η αποφυγή επιμόλυνσής του.

Η διαδικασία ξεκινά με την απολύμανση του μελιού, κάτι που επιτυγχάνεται με διάφορους τρόπους όπως:

- Βράσιμο του μελιού με νερό στους 66°C για 5 λεπτά και μετέπειτα ψύξη του σε θερμοκρασία δωματίου για να προφυλαχθεί ο αρωματικός χαρακτήρας.
- Χρήση θειώδους ανυδρίτη.

Η χαμηλή περιεκτικότητα του μελιού σε άζωτο είναι το κύριο πρόβλημα για την διεξαγωγή οποιασδήποτε ζύμωσης. Η διαδικασία προσθήκης του θειώδους είναι προτιμητέα, καθώς κατά τον βρασμό καταστρέφονται τα αρώματα του μελιού και αυτό αποδυναμώνει τον αρωματικό χαρακτήρα του τελικού προϊόντος. Ακόμα, απαραίτητη είναι η χρήση μαγιάς, θρεπτικών συστατικών και ενός μείγματος οξέος για την εκκίνηση και την πραγματοποίηση της ζύμωσης.

Όπως γίνεται αντιληπτό, μαγιά και θρεπτικά στοιχεία είναι απαραίτητα για την εκκίνηση και ομαλή ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης, ενώ απαιτείται οξύ (π.χ. κιτρικό οξύ) για την δημιουργία ενός φιλικού περιβάλλοντος για τις ζύμες. Στη συνέχεια, ακολουθείται ίδια με την αλκοολική ζύμωση οίνου διεργασία (Iglesias et al., 2019).

2.4 Σύσταση και χαρακτηριστικά υδρόμελου

Υπάρχουν διάφορα κριτήρια τα οποία διαχωρίζουν σε κατηγορίες το υδρόμελο. Κάποια από αυτά είναι η μέθοδος με την οποία προετοιμάζεται το γλεύκος με το μέλι (κορεσμένο, μη κορεσμένο), η αναλογία νερού προς μέλι, η επιπλέον προσθήκη ενισχυμένου γλεύκους (φυσικό, φυτικό, με λυκίσκο, φρούτα), όπως και η διαδικασία ωρίμανσης και παλαίωσης. Όλα αυτά τα είδη υδρόμελου έχουν ελάχιστα διαφορετικές ιδιότητες και διαφορετική χημική σύσταση (Śmigielska & Lewandowicz, 2017).

ΟΡΓΑΝΙΚΑ ΟΞΕΑ

Τα οργανικά οξέα είναι μια σημαντική κατηγορία ενώσεων που επηρεάζουν τις οργανοληπτικές ιδιότητες των ποτών ζύμωσης, συμπεριλαμβανομένων και των κρασιών (Mato et al., 2005). Επιπλέον, επηρεάζουν την εξέλιξη της ζύμωσης και συχνά τη διακόπτουν. Τα αποτελέσματα των ερευνών των Sroka και Tuszyński (2007), υποστηρίζουν ότι η συγκέντρωση των οργανικών οξέων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του γλεύκους του υδρόμελου μεταβάλλεται.

Πιο συγκεκριμένα, σε έρευνα στα Πολωνικά υδρόμελα (αναλογία μέλι/νερό 1:2), στην πρώτη εβδομάδα της ζύμωσης εντοπίστηκαν υψηλές συγκεντρώσεις καπριλικού οξέος και λαυρινικού οξέος. Μετέπειτα, οι συγκεντρώσεις αυτών των οργανικών οξέων μειώθηκαν σημαντικά. Σε υδρόμελα με αναλογίες μέλι/νερό 1:2 και 1:3, το οξικό οξύ και το φορμικό οξύ ήταν τα κύρια οξέα σε μεγάλες συγκεντρώσεις στο γλεύκος και περισσότερο στις 1:2 από τις 1:3 αναλογίες υδρόμελου.

Τα αποτελέσματα αυτών των ερευνών έχουν παρόμοια αποτελέσματα με αυτά των ερευνητών Šmogroničová et al. (2012), για τα Σλοβάκικα και τα Νοτιοαφρικανικά υδρόμελα. Σε αναφορές των Hernández et al., (2015), στο σχηματισμό του οξικού οξέος, φορμικού οξέος και του ηλεκτρικού οξέος στην ζύμωση του υδρόμελου, παρατηρήθηκε ότι το ηλεκτρικό οξύ βρίσκονταν σε αφθονία στο γλεύκος, σε όλα τα δείγματα.

Συνεπώς, ο έλεγχος της συγκέντρωσης του ηλεκτρικού οξέος οφείλει να είναι ένα σημαντικό βήμα στην παραγωγή του υδρόμελου. Σε άλλη έρευνα σχετική με τα οργανικά οξέα οι Mendes- Ferreira et al. (2010), παρατήρησαν ότι τα κυρίαρχα οξέα στην αύξηση της τιτλοδοτούμενης οξύτητας του υδρόμελου ήταν το ηλεκτρικό οξύ και το οξικό οξύ. Όμως, σε έρευνα που διεξήχθη από τους Švecová et al. (2015), το γλυκονικό οξύ (περίπου 29 g/L), ήταν το οργανικό οξύ που βρισκόταν σε αφθονία σε όλα τα Τσέχικα

δείγματα υδρόμελου και οι συγκεντρώσεις των άλλων οργανικών οξέων ήταν σημαντικά χαμηλότερες σε σχέση με το γλυκονικό οξύ. Ο σχηματισμός τους είχε εξάρτηση κυρίως από τον τύπο του μελιού που χρησιμοποιήθηκε.

Τέλος, έχει παρατηρηθεί ότι η συγκέντρωση του οξικού οξέος στα Τσέχικα υδρόμελα είχε αυξηθεί σημαντικά μετά από 24 ώρες κατά τη διάρκεια της ζύμωσης σε αντίθεση με τις συγκεντρώσεις των άλλων οργανικών οξέων που παρέμειναν σταθερές (Starowicz & Granvogl, 2020).

Το γλεύκος του υδρόμελου περιέχει λιπαρά οξέα μέσης αλυσίδας, τα οποία εντοπίζονται κατά τη ζύμωση. Οι κυρίαρχες ενώσεις είναι δεκανοϊκές (42 mg/l) δωδεκανοϊκές (31 mg/l) και οκτανοϊκές (26 mg/l). Στη αρχή της ζύμωσης παρατηρείται ότι τα κυρίαρχα οξέα είναι το οξικό οξύ και το ηλεκτρικό οξύ, τα οποία μειώνουν το pH του γλεύκους και παράλληλα την συγκέντρωση των λιπαρών οξέων κατά 70-80% (Pawel et al., 2007).

pH

Η μελέτη της γίνεται καθόλη τη διάρκεια της ζύμωσης για να προσδιοριστεί η εξέλιξή της. Οι ερευνητές Akalin et al., (2016), σημείωσαν ότι οι τιμές του pH στο υδρόμελο που παράχθηκε με διαφορετικά είδη μελιού ήταν και εκείνες διαφορετικές.

Ένα σχετικό παράδειγμα είναι ότι η τιμή του pH του υδρόμελου από άνθη ήταν 2.74 και του blossom-honey dew υδρόμελου ήταν 3.10. Σε μια διαφορετική έρευνα παρατηρήθηκε ότι η τιμή του pH του υδρόμελου σόγιας ήταν 2.74 χαμηλότερο από αυτό του υδρόμελου φαγόπυρου (3.23) του οποίου την τιμή μπορούμε να την συγκρίνουμε με το ευρείας κατανάλωσης κόκκινο κρασί (Wintersteen et al., 2005).

Χρήσιμο είναι να αναφερθεί ότι διαφορετικά στελέχη του *S. cerevisiae* δεν επηρέασαν τις τιμές του pH σύμφωνα με μελέτες των Bénes et al. (2015), και Hernández et al. (2015). Επιπλέον, η ενίσχυση του γλεύκους με γύρη, υδροκολλοειδή, ανόργανα άλατα (K_2HPO_4 , $MgSO_4$, and $CaCl_2$) και βιταμίνες (B1, B2, B3, and B5–B8) δεν είχε κάποια επίδραση στις τιμές του pH του υδρόμελου (Roldán et al., 2011, p. 169, Pereira et al., 2015; Sroka & Satora, 2017). Μόνο στην περίπτωση του υδρόμελου “Kuri” σημειώθηκαν υψηλές τιμές pH (3.02 to 4.9) οι οποίες ενδεχομένως να είναι και αποτέλεσμα οικιακής παραγωγής υδρόμελου (Bahiru et al., 2006).

ΑΦΟΜΙΩΣΙΜΟ ΑΖΩΤΟ

Οι ζύμες για να πραγματοποιήσουν σωστά και αποτελεσματικά την διαδικασία της ζύμωσης χρησιμοποιούν το άζωτο ως το βασικό συστατικό για την ανάπτυξη τους. Επειδή το μέλι είναι μια φτωχή πηγή αζώτου, οι ζυμώσεις του υδρόμελου με ανεπαρκή πηγή αζώτου αντιμετωπίζουν διάφορα προβλήματα, αφού διαρκούν πολλές μέρες ανάλογα με τον τύπο του μελιού και το είδος της ζύμης. Τέτοια προβλήματα, όπως ανομοιομορφία στο τελικό προϊόν, άσχημες οσμές και ζυμώσεις, σταματούν να παρατηρούνται, κυρίως στις παραδοσιακές μεθόδους παραγωγής υδρόμελου.

Έρευνες σχετικές με τη ζύμωση του υδρόμελου, έχουν δείξει ότι η προσθήκη αφομοιώσιμου αζώτου αυξάνει σημαντικά την ταχύτητα της ζύμωσης και το ποσοστό απόδοσης βιομάζας. Σημαντικό είναι να ληφθεί υπόψη η νομοθεσία σχετικά με την προσθήκη του αφομοιώσιμου αζώτου. Η μέση τιμή των 140mg/l αμμωνιακού αζώτου έχει προταθεί ως επαρκής προσθήκη για τη διεκπεραίωση μιας ζύμωσης από ώριμα σταφύλια με ιδανική τιμή τα 400mg/l.

Για την μέτρηση του αφομοιώσιμου αζώτου γίνεται προσδιορισμός των ελεύθερων α-αμινοξέων με την μέθοδο (FAN) ή την μέθοδο της o-phthaldialdehyde/N-acetyl-L-cysteine (NOPA), όπως επίσης πραγματοποιείται μέτρηση και για αφομοιώσιμο άζωτο υπό την μορφή αμμωνιακών αλάτων όπως το φωσφορικό διαμμώνιο (Κυύ, 2014).

ΣΑΚΧΑΡΟ -ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ

Τα υπολειμματικά/αναγωγικά σάκχαρα στο υδρόμελο έχουν ως αποτέλεσμα γλύκα, παραγωγή αλκοόλης και αποδοχής του προϊόντος από τον καταναλωτή (Gomes et al., 2015). Ανάλογα με το είδος του υδρόμελου και το μέλι που χρησιμοποιήθηκε υπάρχει διαφορετική περιεκτικότητα σε υπολειμματικά/αναγωγικά σάκχαρα. Για παράδειγμα, στην περίπτωση του υδρόμελου από σόγια υπάρχει μεγαλύτερη σακχαροπεριεκτικότητα από ό,τι στο υδρόμελο από είδος σίκαλης (Wintersteen et al., 2005). Με βάση την κινητική της ζύμωσης, τα σάκχαρα του γλεύκους καταναλώνονται από το υπόστρωμα και κατά τη διαδικασία της αλκοολικής ζύμωσης παράγεται αλκοόλη.

Στις πρώτες έξι μέρες της ζύμωσης υπάρχει σημαντική μείωση των σακχάρων, κατά το διάστημα της στατικής φάσης παραμένουν σταθερά, και μετά υπάρχει μια μικρή μείωση (Kim et al., 2005). Η περιεκτικότητα του γλεύκους σε σάκχαρα επηρεάζεται από το στέλεχος της ζύμης.

Πίνακας 6: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των κρασιών μήλου με ζάχαρη και μέλι από διαφορετικές πηγές ανθέων.

Treatment	pH	Acidity(%)	Alcohol (v/v%)	Residual sugar
Sucrose	3.86	0.56	10.5	0.1
Clover honey	3.57	0.59	9.8	0.4
Buckwheat honey	3.59	0.62	9.8	0.4

Πηγή: Gupta & Sharma, (2009)

ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ

Οι φαινολικές ενώσεις στο υδρόμελο παράγονται ως δευτερογενείς μεταβολίτες από τα φυτά και μεταφέρονται από τις μέλισσες στο μέλι. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η χημική σύσταση του μελιού να επηρεάζει την σύσταση σε φαινολικά στο υδρόμελο. Υπάρχουν διαφορετικές φαινολικές ενώσεις στο μέλι, όπως κινναμωμικά οξέα, βενζοϊκά οξέα και φλαβανοειδή με τα φλαβανοειδή να είναι τα πιο σύνηθες στα ανθικά μέλια. Τα φλαβανοειδή του μελιού μπορούν να προέρχονται από το νέκταρ, την γύρη και την πρόπολη. Η μέθοδος HPLC είναι η πιο κατάλληλη μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των φαινολικών τόσο στο μέλι όσο και στο υδρόμελο (Akalin et al., 2017). Ορισμένοι παραγωγοί προσθέτουν τανίνες για τη βελτίωση της γεύσης κάτι το οποίο αυξάνει την συγκέντρωση των φαινολικών και πρέπει να ληφθεί υπόψιν κατά τον προσδιορισμό.

ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΑΛΚΟΟΛΗΣ

Η συγκέντρωση της αλκοόλης η οποία παράγεται, εξαρτάται από την αρχική συγκέντρωση σακχάρων στο γλεύκος, το στέλεχος ζύμης, το χρόνο και τη θερμοκρασία ζύμωσης (Lin et al., 2012). Διάφορες έρευνες κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι και τα διαφορετικά είδη του μελιού επηρεάζουν την τελική συγκέντρωση των αλκοολών στο γλεύκος. Ως ενδεικτικά παραδείγματα αναφέρονται το υδρόμελο-σόγιας - 6.4%, υδρόμελο φαγόπυρου - 11.5% (παρόμοιο με εμπορικά κόκκινα κρασιά (Wintersteen et al., 2005)).

Επιπλέον, υδρόμελο μελιτώματος-9.2%, ενώ το ανθόμελο-11.4% (Akalin et al., 2017). Οι Sroka and Satora (2016) υπέδειξαν ότι η προσθήκη υδροκολλοειδών, όπως κόμμεα, κόμμεα ghatti, Αραβικό κόμμι και κόμμεα είχαν επίδραση στη τελική συγκέντρωση αιθανόλης στο υδρόμελο και συγκεκριμένα την αύξησή της στο 12.4%, 12.8%, 13.1%, και 13.9%. Όμως καμία αλλαγή δεν παρατηρήθηκε όταν προστέθηκε carob bean κόμμι (10.9%). Παρόμοια έρευνα διεξήχθη από τους ερευνητές Roldán et al., (2011), οι οποίοι προσέθεσαν 10 g/L γύρης και αυτό είχε ως συνέπεια την αύξηση στην συγκέντρωση αλκοόλης από 9% σε 12.4%. Τέλος, από τα πειράματα των Hernández et al., (2015); Bénes et al., (2015) και Ukrabi (2006), προκύπτει το συμπέρασμα ότι η τελική συγκέντρωση αλκοόλης επηρεάζεται από το στέλεχος της ζύμης, την πηγή του αζώτου και τη θέρμανση του γλεύκους κατά τα αρχικά στάδια προετοιμασίας του υδρόμελου.

ΟΛΙΚΗ ΟΓΚΟΜΕΤΡΟΥΜΕΝΗ ΚΑΙ ΠΤΗΤΙΚΗ ΟΞΥΤΗΤΑ

Η οξύτητα στα κρασιά μετρείται σε ισοδύναμα τρυγικού οξέος και είναι ο βασικός παράγοντας για το χρώμα και τη γεύση του κρασιού (Czibulya et al., 2015). Συνεπώς και η πτητική οξύτητα στο υδρόμελο παίζει σημαντικό ρόλο στο τελικό προϊόν και επηρεάζεται ανάλογα με το είδος του μελιού που χρησιμοποιήθηκε (Pereira et al., 2014), όπως και το στέλεχος της ζύμης (Pereira et al., 2019).

Το οξικό οξύ είναι ένα από τα πιο σημαντικά πτητικά οξέα και ο ρόλος του είναι ουσιαστικός στο υδρόμελο. Παρατηρήθηκε επίσης, ότι όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση των σακχάρων, τόσο μεγαλύτερη είναι και η πτητική οξύτητα στο τέλος της ζύμωσης του υδρόμελου (Wintersteen, et al., 2005). Μετά από τις έρευνες των Sroka & Satora (2017), εξάγεται το συμπέρασμα ότι η προσθήκη υδροκολλοειδών μειώνει την πτητική οξύτητα.

Πίνακας 7: Επίδραση του τύπου μαγιάς που χρησιμοποιείται για την παρασκευή υδρομελιού (Perreira et al. 2019).

	Ethanol (final) v/v(%)	Aromatic components
ET99	16.5	Higher level of propan-1-ol and acetaldehyde
W4	17.5	Higher level of 2-methyl propanol, ethyl acetate and iso- amyl-acetate
K7	17.5	Higher level of 3-methyl-butanol

2.5 Νομοθεσία υδρόμελου στην Ελλάδα

Σύμφωνα, με την ελληνική νομοθεσία (Α.Υ.Ο. 30/003/000/2030/2018- ΦΕΚ Β 2161/12.06.2018) «Υδρόμελι», είναι το ποτό από ζύμωση που παράγεται αποκλειστικά με αλκοολική ζύμωση υδατικού διαλύματος μελιού, το οποίο:

- α) έχει ελάχιστο αποκτημένο κατ' όγκο αλκοολικό τίτλο 1,2% vol και μέγιστο 15% vol,
- β) έχει πτητική οξύτητα (εκφρασμένη σε οξικό οξύ) που δεν υπερβαίνει τα 1,2 gr/l,
- γ) έχει ολική οξύτητα (εκφρασμένη σε τρυγικό οξύ) 3 gr/l κατ' ελάχιστο,
- δ) έχει στερεό υπόλειμμα, μετά την αφαίρεση των τυχόν ενεχόμενων σακχάρων, 20 gr/l κατ' ελάχιστο,
- ε) έχει αποτελέσει αντικείμενο γλύκανσης αποκλειστικά με τη χρήση μελιού,
- στ) έχει, ενδεχομένως, αποτελέσει αντικείμενο αρωματισμού με αρωματικά φυτά, καρπούς, φρούτα κ.λπ., σύμφωνα με τα οριζόμενα στις ισχύουσες σχετικές ενωσιακές διατάξεις,
- ζ) έχει, ενδεχομένως, αποτελέσει αντικείμενο των λοιπών επεξεργασιών, πρακτικών, εκτός του εμπλουτισμού και της γλύκανσης, ως και προσθηκών, σύμφωνα με το παράρτημα Α της παρούσας.

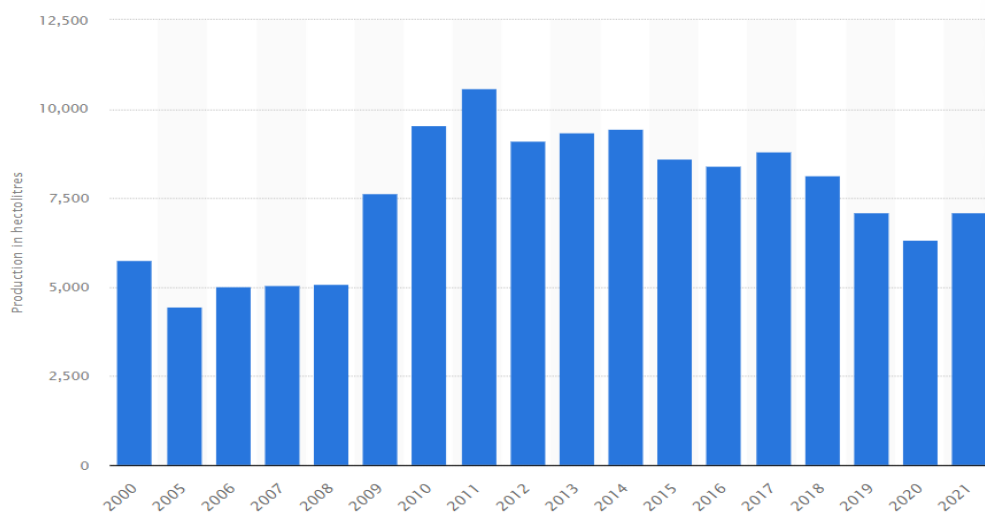
Το υδρόμελι, ανάλογα με την περιεκτικότητα του σε υπολειμματικά σάκχαρα και υπό την αποκλειστική προϋπόθεση ότι δεν έχει αποτελέσει αντικείμενο προσθήκης γλυκαντικών υλών, μπορεί να χαρακτηρίζεται ως:

- ξηρό, όταν περιέχει υπολειμματικά σάκχαρα έως 10 gr/l,
- ημίξηρο/ημίγλυκο, όταν περιέχει υπολειμματικά σάκχαρα από 10 gr/l έως 30 gr/l
- γλυκό, όταν περιέχει υπολειμματικά σάκχαρα περισσότερα από 30 gr/l. 6.

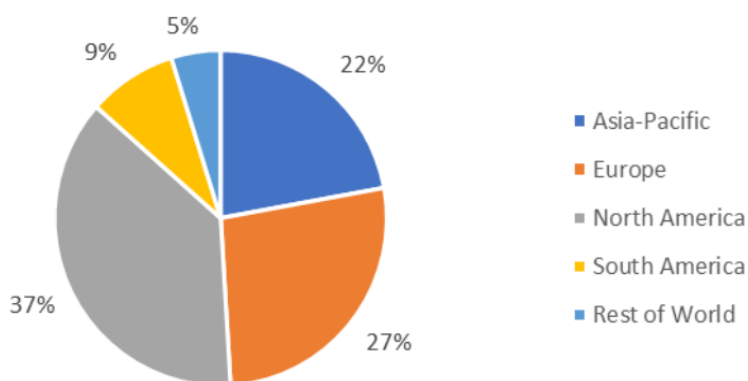
2.6 Στατιστικά παραγωγής υδρόμελου

Το υδρόμελο αποτελεί ένα ανερχόμενο προϊόν στην βιομηχανία των αλκοολούχων ποτών, με την άνοδο του να παρατηρείται κυρίως στην Αμερική, καθώς και σε ορισμένες άλλες ευρωπαϊκές χώρες όπως για παράδειγμα η Πολωνία. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το παρακάτω διάγραμμα 3 στο οποίο παρατηρείται για την Πολωνία η υψηλότερη παραγωγή κατά την πενταετία 2009-2014, ενώ την διετία 2018-2020 παρατηρείται μια πτώση στην παραγωγή η οποία μπορεί να συσχετισθεί με τα γεγονότα του κορωνοϊού.

Αντίστοιχα, στην Αμερική ο κλάδος δείχνει σημάδια διαρκής ανάπτυξης με την αρχή της ανάπτυξης του να παρατηρείται το 2012 όπου οι πωλήσεις αυξήθηκαν κατά 130%, και ώθησαν πολλούς επιχειρηματίες να επενδύσουν στον κλάδο. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα την βελτίωση του κλάδου, καθώς η αξία του κλάδου της παγκόσμιας αγοράς υδρόμελου υπολογιζόταν σε 408,45 εκατομμύρια το 2018. Νέες μελέτες δείχνουν πως εκτιμάται νέα εκτίναξη του κλάδου στα 27,5 δισεκατομμύρια έως το 2027 με τις προβλέψεις να παρουσιάζουν ισχυρές τάσεις ανάπτυξης σε ασιατικές χώρες όπως η Ινδία και η Κίνα.



Διάγραμμα 3: Διακυμάνσεις παραγωγής υδρόμελου στην Πολωνία (Sas 2022)



Διάγραμμα 4: Παγκόσμια αγορά ποτών – Ποσοστιαία γεωγραφική κατανομή (%) (2021)

Πηγή: <https://www.industryarc.com/Research/Global-Mead-Beverages-Market-Research-513219>

Όπως φαίνεται και στο παραπάνω διάγραμμα συνοπτικά παρατηρείται πως η Αμερική κατέχει τα ηνία στην παγκόσμια παραγωγή με 46%, ακολουθεί η Ευρώπη με 27% και οι Ασιατικές χώρες με 22% ενώ το διάγραμμα ολοκληρώνεται με την παραγωγή στον υπόλοιπο κόσμο με 5%. Ενώ, στο παρακάτω διάγραμμα απεικονίζονται οι μονάδες που παράγουν υδρόμελο και είναι εγγεγραμμένες στον παγκόσμιο οργανισμό υδρόμελου.



Διάγραμμα 5: Εγγεγραμμένες μονάδες παραγωγής υδρόμελου παγκοσμίως.

Πηγή : Meaderies (meadworld.com)

ΚΕΦ.3: ΑΖΩΤΟ ΣΤΑ ΓΛΕΥΚΗ

3.1. Μορφές αζώτου

Το υδρόμελο είναι ένα αλκοολούχο ποτό το οποίο δημιουργείται μέσω της αλκοολικής ζύμωσης από τα σάκχαρα του μελιού με υπόστρωμα το νερό. Το υδρόμελο σαν γλεύκος δεν περιέχει μεγάλες ποσότητες αζώτου. Οι μορφές αζώτου που μπορούν να βρεθούν σε αυτό είναι ουσιαστικά διάφορα-ανόργανα άλατα, όπως το αμμωνιακό, το νιτρικό-και διάφορες μορφές οργανικού αζώτου όπως πρωτεϊνικό, πεπτιδικό, και αμινοξέων όπως και νουκλεϊκά οξέα και τα νουκλεοτίδια.

Το άζωτο διακρίνεται σε οργανικό άζωτο – άζωτο αμινοξέων (αφομοιώσιμο) και άζωτο πολυπεπτιδίων/πρωτεϊνών (μη αφομοιώσιμο). και ανόργανο άζωτο – αμμωνιακά ιόντα. Τα αμινοξέα -οργανικό άζωτο-, τα αμμωνιακά ιόντα- ανόργανο άζωτο- και μερικά μικρά πεπτίδια αποτελούν το άζωτο που μπορεί να αφομοιωθεί από τη ζύμη. Μεταξύ των αμινοξέων, ορισμένα αφομοιώνονται κατά προτεραιότητα (Crépin et al., 2012), ενώ η προλίνη χρησιμοποιείται ελάχιστα από τη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* στις διαδικασίες οινοποίησης.

Αφομοιώσιμο άζωτο:

Το αφομοιώσιμο άζωτο στα γλεύκη αναφέρεται στη συγκέντρωση του αζώτου που είναι διαθέσιμη για απορρόφηση από τους μικροοργανισμούς κατά την διάρκεια της ζύμωσης, το οποίο είναι το άθροισμα του αμμωνιακού και των α-αμινοξέων (εκτός ορισμένων αμινοξέων, όπως της προλίνης). Η συγκέντρωση του αφομοιώσιμου αζώτου στα γλεύκη εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως την ωρίμανση της πρώτης ύλης και την επεξεργασία της. Το αφομοιώσιμο άζωτο συναντάται με τον όρο YAN και συχνά συνδέεται με τον όρο PAN. Το PAN αποτελεί το άζωτο των πρωτογενών αμινοξέων που αφομοιώνουν οι ζύμες, ενώ το YAN αποτελεί το συνολικό άζωτο που αφομοιώνουν οι ζύμες, με την μορφή αμινοξέων και αμμωνιακών ενώσεων. Ακόμα, ένας όρος που χρησιμοποιείται για το αφομοιώσιμο άζωτο είναι ο όρος FAN, στον όρο αυτό περιλαμβάνονται τα άλφα-αμινοξέα τα οποία απορροφούν οι ζύμες κατά την αλκοολική ζύμωση. Ονομάζονται άλφα-αμινοξέα λόγω της σύνδεσης των τμημάτων των αμινοξέων με τον άλφα άνθρακα (ομάδες R).

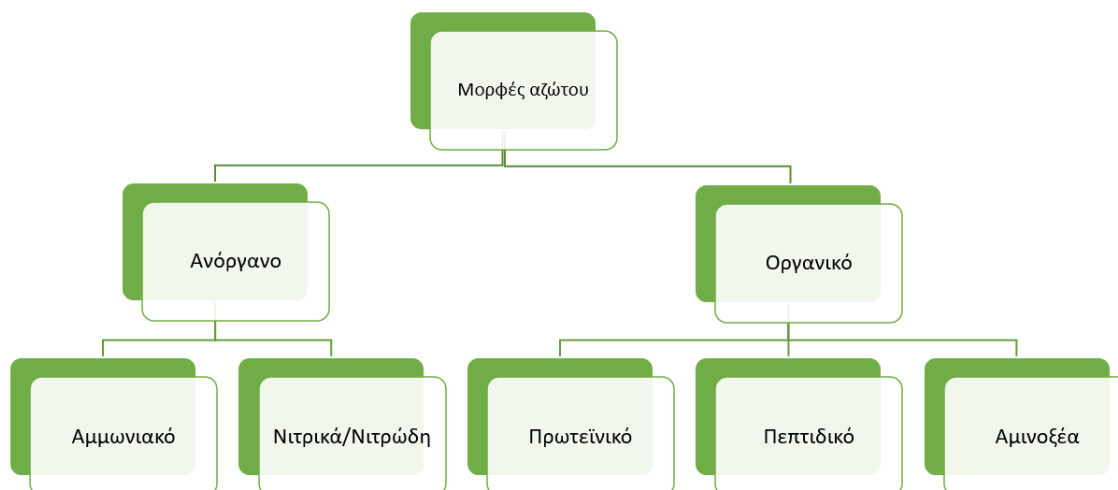
Πολλά γλεύκη σταφυλιών θεωρούνται ότι είναι ανεπαρκή στο άζωτο βάσει της εκτιμώμενης ελάχιστης απαίτησης των 140 έως 150 mg N / L. Τα χαμηλά επίπεδα αφομοιώσιμου αζώτου μπορούν να θεωρηθούν ως η κύρια αιτία των λεγόμενων αργών ζυμώσεων, επειδή αυτή η ανεπάρκεια μειώνει τον ρυθμό ζύμωσης και αυξάνει τη διάρκεια της ζύμωσης (Sablayrolles and Barre, 1993). Για να αντισταθμιστούν οι ελλείψεις αζώτου στα γλεύκη, η προσθήκη αλάτων αμμωνίου όπως το φωσφορικού διαμμώνιου (DAP) στο αρχικό γλεύκος είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται συνήθως στην οινολογία για την προώθηση ενός κατάλληλου ρυθμού ζύμωσης (Malherbe et al., 2004).

Οργανικό άζωτο

Το άζωτο καθώς και άλλα στοιχεία, μετά από αποσύνθεση του εδάφους από τα μικρόβια και υπό τις ευνοϊκές συνθήκες, μέσω αυτής της διαδικασίας θα απελευθερωθούν και θα μετατραπούν σε μορφές κατάλληλες και αφομοιώσιμες από τα φυτά. Η διαδικασία ονομάζεται ανοργανοποίηση (ή αμμωνιοποίηση), και πραγματοποιείται σε μεγαλύτερους και ταχύτερους ρυθμούς κατά τους θερινούς μήνες, σε υγρά και ζεστά εδάφη. Η οργανική μορφή του αζώτου αποτελείται από τα α-αμινοξέα, τα ολιγοπεπτίδια και πρωτεϊνών. Οι ζύμες βρίσκουν την παροχή αζώτου απαραίτητη για την ανάπτυξή τους στο γλεύκος σταφυλιών. Το κατιόν αμμωνίου μπορεί εύκολα να αφομοιωθεί και μπορεί να ικανοποιήσει ανάγκες αζώτου ζυμομυκήτων, ειδικότερα για τη σύνθεση αμινοξέων.

Ανόργανο άζωτο

Οι ανόργανες μορφές του εδαφικού αζώτου περιλαμβάνουν το αμμώνιο (NH_4^+), τα νιτρώδη (NO_2^-), τα νιτρικά (NO_3^-) και τα οξείδια του αζώτου N_2O και το ίδιο το μοριακό άζωτο N_2 , το οποίο είναι αδρανές και γίνεται διαθέσιμο για ενσωμάτωση στο έδαφος μόνο μετά από την δέσμευσή του από αζωτοδεσμευτικούς και αζωτοπαραγωγούς μικροοργανισμούς (Ough., Bell., 1980).



Διάγραμμα 6: Κατηγοριοποίηση μορφών αζώτου

3.2 Συγκεντρώσεις αζώτου στα διάφορα γλεύκη

3.2.1 Οίνος

Το άζωτο στην οινοποίηση, αποτελεί πολύτιμο θρεπτικό στοιχείο για τις ζύμες καθώς είναι απαραίτητο για τον πολλαπλασιασμό και την σωστή ανάπτυξη των ζυμομυκήτων (Βέκιος et al., 2011). Χωρίζεται σε δύο κατηγορίες :

- Στο οργανικό άζωτο, το οποίο περιέχει το άζωτο με την μορφή αμινοξέων, πεπτιδίων και πρωτεϊνών.
- Στο ανόργανο άζωτο, το οποίο περιέχει το άζωτο με την μορφή των αμμωνιακών ανιόντων.

Παρόλο, όμως, τον μεγάλο αριθμό των πηγών αζώτου, ένα μεγάλο μέρος του δε μπορεί να αξιοποιηθεί, καθώς δεν είναι κατάλληλο για τα κύτταρα των ζυμών. Συγκεκριμένα, το άζωτο κατηγοριοποιείται σε :

- Αφομοιώσιμο άζωτο, το οποίο περιλαμβάνει τα περισσότερα αμινοξέα (εκτός της προλίνης, κ.α.), και τα αμμωνιακά άλατα όπως, το φωσφορικό διαμμώνιο και το θειικό αμμώνιο.
- Μη αφομοιώσιμο άζωτο, στο οποίο περιλαμβάνονται οι πρωτεΐνες και τα πεπτίδια (μεγάλο μοριακό βάρος), αλλά και η προλίνη.

Η ύπαρξη επαρκούς συγκέντρωσης αφομοιώσιμου αζώτου είναι απαραίτητη παράμετρος για την επιτυχημένη ολοκλήρωση της ζύμωσης καθώς το άζωτο είναι καθοριστικό για τον σχηματισμό της βιομάζας που εν συνεχεία θα ρυθμίσει την διάρκεια και την κινητική της ζύμωσης (Τσακίρης, 2021). Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι απαιτούνταν τουλάχιστον 120–140 mg YAN/L για να αποδοθεί η βέλτιστη κινητική ζύμωσης (Sablayrolles et al. 1996).

Συγκεκριμένα, το άζωτο στον οίνο βρίσκεται σε ανόργανη μορφή σε ποσοστό 5%, ενώ σε οργανική 95%. Αναλυτικότερα, το 45% της οργανικής μορφής αντιπροσωπεύεται από τα ελεύθερα αμινοξέα όπως είναι η προλίνη (300 mg/L), το γλουταμινικό οξύ (100 mg/L), η θρεονίνη και αργινίνη (50 mg/L) και άλλα αμινοξέα σε χαμηλότερες τιμές. Ένας παράγοντας που μπορεί να επηρεάσει την περιεκτικότητα του οίνου σε άζωτο είναι το είδος του οίνου που θα παραχθεί, καθώς στους λευκούς οίνους περιέχεται άζωτο σε

συγκεντρώσεις 70-200 mg/L, ενώ στους ερυθρούς οίνους σε συγκεντρώσεις 100-700 mg/L. (Childs et al., 2015) (Chiva et al., 2012)

Πίνακας 8: Περιεκτικότητα αζώτου

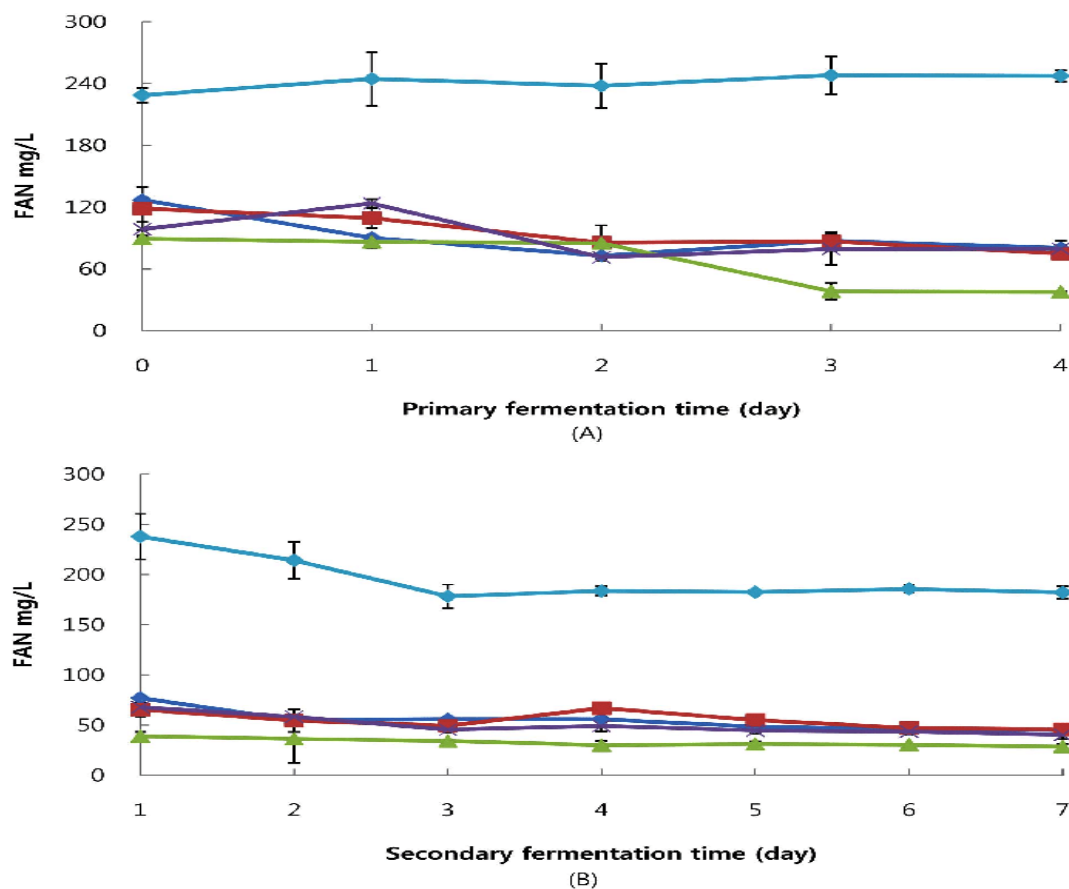
	Hours to 50% depletion		Final utilization (%)		Accumulation group
	-	+	-	+	
Ammonium	-	+	-	+	
Nitrogen compound					
Alanine	32	>50	79	19	B
Ammonium	-	16	-	100	A
Arginine	15	21	100	76	A
Asparagine	19	18	98	90	A
Aspartate	17	17	99	90	A
Glutamate	21	23	96	68	B
Glutamine	18	19	99	89	A
Glycine	>50	>50	50	16	C
Histidine	29	25	87	60	B
Ileucine	20	20	99	88	A
Leucine	20	19	98	86	A
Lysine	15	15	100	99	A
Methionine	18	18	100	89	A
Phenylalanine	23	23	91	73	B
Serine	17	17	97	95	A
Threonine	16	16	100	99	A
Tryptophan	25	24	78	57	C
Tyrosine	35	>50	61	34	C
Valine	25	9	90	62	B

Πηγή: (Jiranek, et al., 1995)

3.2.2 Μπύρα

Στη ζυθοποίηση αντίστοιχα, η σχέση με το άζωτο είναι αρκετά σύνθετη καθώς εμπλέκεται τόσο κατά την διάρκεια της ζύμωσης όσο και στα χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος (θολερότητα, αφρός, κ.α.). Οι πηγές αζώτου στην μύρα αποτελούνται από πρωτεΐνες, πεπτίδια, αμινοξέα, νουκλεικά οξέα, αμίνες και αμίδια τα οποία εξαρτώνται άμεσα από την περιεκτικότητα του κριθαριού σε πρωτεΐνες. Κατά τη διάρκεια της βυνοποίησης του κριθαριού θα υδρολυθεί ένα μέρος των πρωτεϊνών και τα αμινοξέα που θα προκύψουν θα αποτελέσουν πηγή αφομοιώσιμου αζώτου για τις ζύμες (Νεραντζής et al., 2014).

Κατά την αντίδραση αυτή τα ένζυμα πρωτεάσες αποικοδομούν τις πρωτεΐνες, παράγοντας διάφορα αζωτούχα συστατικά τα οποία θα χρησιμοποιηθούν στην διαδικασία της ζύμωσης.



Διάγραμμα 7: Κινητική αλλαγή ελεύθερου αμινο αζώτου σε 5 διαφορετικές μπίρες .(Cortese et al. 2019)

Όπως στην οينوποίηση, έτσι και στην ζυθοποίηση δεν χρησιμοποιούνται στην ζύμωση όλες οι αζωτούχες ενώσεις που προκύπτουν από την πρωτεόλυση καθώς ορισμένες θα χρησιμοποιηθούν για να δώσουν διαλυτές μεγαλομοριακές αζωτούχες ενώσεις που θα χρησιμοποιηθούν για την σύσταση του αφρού και την βελτίωση της γεύσης (Zarnkow, 2014).

3.2.3 Υδρόμελο

Στο υδρόμελο τα πράγματα είναι πιο σύνθετα, καθώς το υδρόμελο προέρχεται από ένα διάλυμα μελιού με νερό στο οποίο προστίθενται θρεπτικά στοιχεία με σκοπό την όσο το δυνατόν καλύτερη αλκοολική ζύμωση. Συγκεκριμένα, υδρόμελα στα οποία δεν έχει πραγματοποιηθεί προσθήκη θρεπτικών στοιχείων, παρουσιάζουν προβληματικές ζυμώσεις με ανεπιθύμητα αρώματα και την παραγωγή του τελικού προϊόντος με ανεπιθύμητα χαρακτηριστικά. Ένας από αυτούς τους παράγοντες είναι η χαμηλή περιεκτικότητα του μελιού σε αζωτούχες ενώσεις, καθώς καθίσταται ένα περιβάλλον ακατάλληλο για τον πολλαπλασιασμό των ζυμομυκήτων, όπως φαίνεται και στις παρακάτω αναλύσεις:

Πίνακας 9 : Στοιχεία προσδιορισμού αμινοξέων μελιού :(Schwartz et al., 2020)

	Χημική ένωση	t _R (λεπτά)	UV _{max} (nm)	[M + H] ⁺	Τύπος	Σφάλμα (ppm)
1	Αδενίνη	1.17	263	136.0621	C ₅ H ₅ N ₅	1.62
2	Ουριδίνη	1.72	262	245,0764	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆	3,93
3	Ξανθίνη	1,78	268	153,0405	C ₅ H ₄ N ₄ O ₂	4.91
4	Τυροσίνη	2.21	224, 275	182.0812	C ₉ H ₁₁ NO ₃	2,75
5	Γουανοσίνη	3.10	254, 274	284.0989	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₅	2.09
6	Φαιτυλαλανίνη	3.41	258	166,0864	C ₉ H ₁₁ NO ₂	2.41

Πίνακας 10 Μέση σύσταση μελιού σε αμινοξέα (Schwartz et al., 2020)

	Αδενίνη (mg/kg)	Ξανθίνη (mg/kg)	Ουριδίνη (mg/kg)	Τυροσίνη (mg/kg)	Γουανοσίνη (mg/kg)	Φαινυλαλανίνη (mg/kg)
Ερείκη (n = 10)	11,8 ^a ± 2,9	nd	30,7 ^{π.X.} ± 9,9	35,8 ^a ± 28,9	3,4 ^{ab} ± 1,1	17,1 ^{abc} ± 4,0
Είδος σίκαλης (n = 10)	11,6 ^a ± 4,4	nd	40,2 ^{cd} ± 13,6	263,9 ^b ± 91,6	nd*	34,6 ^c ± 17,1
Μαύρη ακρίδα (n = 10)	11,1 ^a ± 1,5	3,3 ^b ± 0,8	51,2 ^d ± 7,8	12,1 ^a ± 5,2	2,6 ^a ± 0,3	11,3 ^{ab} ± 5,5
Goldenrod (n = 10)	14,0 ^{ab} ± 2,7	1,2 ^a ± 0,6	24,6 ^{ab} ± 2,7	44,9 ^a ± 25,1	2,5 ^a ± 1,3	64,1 ^d ± 20,3
Canola (n = 10)	8,9 ^a ± 1,4	3,0 ^b ± 0,6	17,5 ^a ± 3,9	7,8 ^a ± 3,3	2,0 ^a ± 0,7	9,5 ^a ± 3,6
Ελατο (n = 10)	nd*	nd	32,5 ^{π.X.} ± 12,8	31,6 ^a ± 17,9	nd*	18,1 ^{abc} ± 13,3
Φιλύρα (n = 15)	18,4 ^b ± 6,5	1,7 ^a ± 0,9	28,6 ^{ab} ± 10,6	21,8 ^a ± 12,3	4,1 ^b ± 1,5	28,4 ^{π.X.} ± 20,6

Όπως φαίνεται και στις αναλύσεις, η συγκέντρωση των ενώσεων που περιέχουν άζωτο είναι ιδιαίτερα χαμηλή με αποτέλεσμα την ανάγκη προσθήκης αφομοιώσιμου αζώτου μέσω σκευασμάτων. Τα σκευάσματα αυτά είναι αντίστοιχα με αυτά που χρησιμοποιούνται για την αλκοολική ζύμωση του οίνου, δηλαδή χρησιμοποιείται είτε φωσφορικό διαμμώνιο, είτε θειικό αμμώνιο, είτε μείγματα αμινοξέων (Pereira et al., 2015).

3.3 Μέθοδοι – Τεχνικές μέτρησης

ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ – ΑΖΩΤΟΥ

Μέθοδος Kjeldahl

Η μέθοδος Kjeldahl χρησιμοποιείται για την μέτρηση της συνολικής περιεκτικότητας σε άζωτο, με δυνατότητα υπολογισμού της περιεκτικότητας των πρωτεϊνών, σύμφωνα με τον ΟΙΥ.

Προσδιορισμός αζώτου κατά Kjeldahl

Η μέθοδος Kjeldahl αναπτύχθηκε το 1883 και είναι γνωστή για την ακρίβεια μέτρησης αλλά και το εύρος της εφαρμογής της, καθώς μέσω αυτής γίνεται προσδιορισμός του αζώτου σε ουσίες όπως οι πρωτεΐνες, το γάλα, τα δημητριακά κ.α. Η μέθοδος ξεκινά με την χώνευση του στερεού παρουσία καταλύτη (υδράργυρος, χαλκός, σελήνιο) σε θειικό οξύ εν βρασμό, ώστε να μετατρέψει το άζωτο σε ιόν αμμωνίου (NH_4^+) αλλά και για να οξειδωθούν οι υπόλοιπες ουσίες στο δείγμα. Κατά την χώνευση, το σημείο βρασμού του πυκνού θειικού οξέος βρίσκεται στους 338 βαθμούς Κελσίου λόγω της παρουσίας του K_2SO_4 , που έχει ως σκοπό την μείωση του συνολικού χρόνου της αντίδρασης.

Αφού ολοκληρωθεί η χώνευση, το διάλυμα που περιείχε NH_3 γίνεται βασικό και πραγματοποιείται απόσταξη (με μεγάλη περίσσεια ατμού) σε δοχείο με γνωστή ποσότητα υδροχλωρίου, για να συλλεχθεί η NH_3 που απελευθερώθηκε. Τέλος, η περίσσεια του υδροχλωρίου που δεν αντέδρασε, τιτλοδοτείται με πρότυπο διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου για να προσδιοριστεί η ποσότητα του υδροχλωρίου που δεν αντέδρασε με την αμμωνία.

Προσδιορισμός πρωτεϊνών κατά Kjeldahl

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών, ο υπολογισμός γίνεται μέσω της σχέσης : Πρωτεΐνες (% w/w) = N(% w/w) x 6,38.

Για δείγματα για τα οποία δεν είναι γνωστό το προφίλ των πρωτεϊνών, μπορεί να εφαρμοστεί συντελεστής 6,25 αντί για 6,38.

Μέθοδος Lowry

Η μέθοδος Lowry χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό πρωτεΐνης σε ένα διάλυμα στο οποίο η συγκέντρωση κυμαίνεται από 0,01-1 mg πρωτεΐνης ανά ml, σύμφωνα με τα πρωτόκολλα του ΟΙV. Βασίζεται στην αντιδραστικότητα του αζώτου και των πεπτιδίων, με τα ιόντα δισθενή χαλκού υπό αλκαλικές συνθήκες και με την αναγωγή του φωσφομολυβδοβολφραμικό οξέος σε μπλε ετεροπολυμολυβδαίνιο με την αντίδραση να καταλύεται από το χαλκό και να συνοδεύεται από οξείδωση των αρωματικών αμινοξέων (Πουλάς, Κ., & Σιδέρης, Σ., (2015).

Ενδεικτικό πρωτόκολλο σύμφωνα με INTERNATIONAL GENOLOGICAL CODEX-Yeast protein extracts COEI-1-EPLEV: 2012

Αντιδραστήρια

- i. 48 ml 2% Na₂CO₃ in NaOH
- ii. 1 ml 1% NaK in H₂O
- iii. 1 ml 0,5% CuSO₄.5H₂O in H₂O
- iv. Αναλογία 1 Folin-Phenol (2N) : 1 Νερού
- v. Πρότυπο BSA – 1 mg / ml

Μέθοδος Bradford

Η μέθοδος Bradford αποτελεί μια γρήγορη και αξιόπιστη μέθοδο για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης πρωτεΐνης/ών σε ένα διάλυμα. Χρησιμοποιείται η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250, η οποία έχει αρνητικό φορτίο. Η χρωστική, στην ελεύθερή της μορφή έχει χρώμα κόκκινο και μέγιστο απορρόφησης στα 465 nm. Όταν η χρωστική αλληλεπιδράσει σε όξινες συνθήκες με τα θετικά φορτία μιας πρωτεΐνης δίνει ένα σύμπλοκο μπλε χρώματος με μέγιστο απορρόφησης στα 595 nm. Ένας μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών έχει παραπλήσιο τρόπο αλληλεπίδρασης με τη χρωστική αυτή, οπότε τα αποτελέσματα της μεθόδου αυτής είναι επαναλήψιμα.

Για την εφαρμογή της μεθόδου Bradford απαιτείται ο σχεδιασμός και η χρήση καμπύλης αναφοράς. Η καμπύλη κατασκευάζεται ως εξής: Παρασκευάζεται μια σειρά διαλυμάτων με διαφορετικές, αλλά γνωστές ποσότητες μιας πρότυπης πρωτεΐνης (Bovine Serum Albumin, Bovine γ-globulin). Στη συνέχεια υπολογίζεται η απορρόφηση καθενός από τα δείγματα και κατασκευάζεται η γραφική παράσταση της απορρόφησης A προς την

ποσότητα πρωτεΐνης. Η πρωτεΐνη μπορεί να εκφράζεται είτε σε μονάδες μάζας (όπως μg ή mg), είτε σε μονάδες συγκέντρωσης (όπως μM ή mM). Η καμπύλη αναφοράς χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του αγνώστου δείγματος.

Ενδεικτικό πρωτόκολλο (2019)

<https://goldbio.com/documents/3604/Bardford%20Protein%20Assay.pdf>

Αντιδραστήρια

- i. Χρωστική Serva Blue G
- ii. 1mg/ml αλβουμίνη από ορό βοδιού (BSA)
- iii. 95% αιθανόλη
- iv. 88% φωσφορικό οξύ

Απαιτούμενη ποσότητα πρωτεΐνης για την εφαρμογή της μεθόδου: 25-200 $\mu\text{g/ml}$ πρωτεϊνικού διαλύματος

Διαλύματα

- i. Stock διάλυμα Bradford
- ii. 100ml 95% αιθανόλη
- iii. 200ml 88% φωσφορικό οξύ
- iv. 350mg χρωστική Serva Blue G

Το διάλυμα Serva Blue G παραμένει σταθερό για πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα σε θερμοκρασία δωματίου. Από αυτό πραγματοποιείται αραίωση για την παρασκευή του επόμενου διαλύματος το οποίο προστίθεται στις αντιδράσεις.

Διάλυμα Bradford

- i. 425ml νερό
- ii. 15ml 95% αιθανόλη
- iii. 30ml 88% φωσφορικό οξύ
- iv. 30ml stock διάλυμα Bradford

Μετά την παρασκευή, το διάλυμα φιλτράρεται και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου σε σκούρο μπουκάλι. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για αρκετές εβδομάδες, αλλά πιθανόν να ξαναχρησιαστεί φιλτράρισμα πριν τη χρήση του.

Πηγή: Copeland, R.A. (1994)

Καμπύλη αναφοράς

1. Μια καμπύλη αναφοράς από πρωτεϊνικό δείγμα γνωστής συγκέντρωσης, που κατασκευάζεται ταυτόχρονα με τα διαλύματα άγνωστης, είναι απαραίτητη για τον ποσοτικό προσδιορισμό της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης. Πρέπει να μετρηθούν τουλάχιστον δυο δείγματα για κάθε συγκέντρωση. Αν στόχος είναι η ακρίβεια, παίρνουμε το μέσο όρο των δυο απορροφήσεων. Είναι προφανές πως οι τιμές των απορροφήσεων που αντιστοιχούν στην ίδια συγκέντρωση πρέπει να είναι παραπλήσιες. Εάν χρησιμοποιηθεί η ίδια κυψελίδα πολυστυρενίου για τη μέτρηση όλων των δειγμάτων, τότε πρέπει να μετρηθούν πρώτα τα δείγματα με το μικρότερο πρωτεϊνικό περιεχόμενο για την αποφυγή λανθασμένων μετρήσεων λόγω κακού καθαρισμού της κυψελίδας.
2. Επειδή το χρώμα που οφείλεται στο σχηματισμό του συμπλόκου πρωτεΐνης-χρωστικής συνεχίζει να αναπτύσσεται, το διάλυμα Bradford πρέπει να προστίθεται σε όλα τα δείγματα (γνωστής και άγνωστης συγκέντρωσης) ταυτόχρονα. Αντίστοιχα, ταυτόχρονα πρέπει να σημειώνεται και η απορρόφηση των δειγμάτων αυτών. Κάθε φορά που πρέπει να υπολογιστεί η συγκέντρωση ενός πρωτεϊνικού διαλύματος πρέπει να φτιάχνεται και καινούργια καμπύλη αναφοράς.
3. Είναι σημαντικό η καμπύλη να παραμένει γραμμική στην περιοχή των απορροφήσεων που δίνουν τα διαλύματα άγνωστης συγκέντρωσης, αλλιώς η απόκλιση μεταξύ της πραγματικής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης και αυτής που μετρείται μπορεί να είναι πολύ μεγάλη.
4. Αφού μετρηθεί η απορρόφηση, σχεδιάζεται η καμπύλη αναφοράς με χρήση του μέσου όρου των τιμών απορρόφησης.

Η καμπύλη αναφοράς για τη μέθοδο Bradford παραμένει γραμμική συνήθως από 2,5 έως 15 μg BSA. Για το λόγο αυτό, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, οι απορροφήσεις των δειγμάτων άγνωστης συγκέντρωσης πρέπει να μην ξεφεύγουν από τα όρια αυτά και η ευθεία της καμπύλης πρέπει να σχεδιάζεται δίνοντας μεγαλύτερη έμφαση στα σημεία που βρίσκονται στο εσωτερικό παρά στα άκρα. Σε πολλές περιπτώσεις το ποσό της BSA (άξονας x) εκφράζεται ως συγκέντρωση (mg/ml).

Μέθοδος FAN

Οι μετρήσεις ελεύθερου αμινοαζώτου (FAN), αξιολογούν την συγκέντρωση των αμινοξέων και αμμωνίας σε ένα διάλυμα, σύμφωνα με τα πρωτόκολλα του ΟΙV. Το σύνολο της τιμής του FAN υποδεικνύει τη βιοδιαθεσιμότητα του αζώτου στα γλεύκη. Ως διαγνωστικό τεστ, χαμηλή συγκέντρωση FAN αποτελεί ένδειξη για αργή ή ατελή ζύμωση (Geisler & Weiß, 2015).

Αρχή μεθόδου ASBC για ζύθο

Αυτή είναι μια μέθοδος με βάση τη νινυδρίνη όπου η απορρόφηση μετράται στα 570 nm έναντι προτύπου διαλύματος γλυκίνης.

Υλικό και μέθοδοι

Πρωτόκολλο

1 mL μύρας αραιώνεται σε 49 mL (ή 1 mL μύρας σε 99 mL) απεσταγμένου νερού. Και χρησιμοποιούνται 50 mL απεσταγμένου νερού για ένα τυφλό.

1. Πραγματοποιείται ανάλυση του δείγματος, του προτύπου διαλύματος και H₂O (κενή τιμή) εις τριπλούν.
2. Μεταφορά με σιφόνιο 2 mL του αραιωμένου δείγματος, το πρότυπο διάλυμα και το H₂O, το καθένα σε χωριστούς δοκιμαστικούς σωλήνες.
3. Προσθήκη 1 mL από το αντιδραστήριο της νινυδρίνης και ανακάτεμα.
4. Κλείστε χαλαρά κάθε δοκιμαστικό σωλήνα για να αποφύγετε την εξάτμιση-απώλειες και θερμάνετε τα διαλύματα στους 100 °C για 16 λεπτά.
5. Ψύξτε τα διαλύματα στους 20 °C για 20 λεπτά.
6. Προσθέστε 5 mL Διαλύματος Αραίωσης και μετρήστε μέσα σε 30 λεπτά την απορρόφηση σε κυβελίδα 10 mm στα 570 nm έναντι απεσταγμένου νερού.
7. Μεταφέρετε το τυφλό (απεσταγμένο νερό) στην κυβέτα, τοποθετήστε το δείγμα σε κυβέτα και μετρήστε πατώντας το στρογγυλό πλήκτρο Blank.
8. Δείγματα ανάλυσης μεταφοράς (μύρα, πρότυπο γλυκίνης, H₂O) στην κυβέτα, τοποθετήστε την κυβέτα στον ίδιο προσανατολισμό με το κενό και μετρήστε πατώντας το στρογγυλό πλήκτρο SAMPLE.

Προαιρετικό:

Διόρθωση για δείγματα σκουρόχρωμα και μύρας (> 100 EBC) μονάδες:

> Μεταφέρετε 2 mL του αραιωμένου δείγματος σε δοκιμαστικό σωλήνα.

> Στη θέση του αντιδραστηρίου νινυδρίνης, προσθέστε 1 mL απεσταγμένο νερό και συνεχίστε με τα βήματα 5-7.

Υπολογισμός ανεμιστήρα:

Ελεύθερο αμινοάζωτο [mg/L] = $\times 2 \times F$

AS = μέση απορρόφηση του δείγματος

AG = μέση απορρόφηση του προτύπου διαλύματος γλυκίνης

AB = μέση απορρόφηση της τιμής τυφλού (H₂O)

AC = μέση απορρόφηση της διόρθωσης για σκουρόχρωμο και μύρα

F = συντελεστής αραίωσης του δείγματος 2 = συγκέντρωση του προτύπου διαλύματος γλυκίνης σε mg/L.

ΜΕΘΟΔΟΣ ΝΟΡΑ (PAN)

Η προλίνη είναι ένα αμινοξύ που δεν χρησιμοποιείται από τη μαγιά *Saccharomyces* επειδή χρειάζεται οξυγόνο για να διασπαστεί, όμως η ζύμωση αποτελεί μια αναερόβια διαδικασία και έτσι η προλίνη δεν χρησιμοποιείται κατά την ζύμωση. Ένα μεγάλο μέρος της συγκέντρωσης των αμινοξέων περιλαμβάνει την προλίνη, η οποία μπορεί να είναι πάνω από το 50% της περιεκτικότητας των αμινοξέων, υπερεκτιμώντας έτσι την ποσότητα αζώτου που είναι διαθέσιμη στη μαγιά.

Η μέτρηση του primary amino nitrogen (PAN) με το αντιδραστήριο OPA είναι μια δοκιμή δέσμευσης και χρώσης που μετράει τα primary αμινοξέα εκτός από την προλίνη (Crépin et al., 2012). Αυτό καθιστά την μέθοδο ένα ακριβές μέτρο του πραγματικά διαθέσιμου αφομοιώσιμου αζώτου αμινοξέων, σύμφωνα με τα πρωτόκολλα του OIV.

Με τη μέτρηση του επιπέδου αμμωνίας και του επιπέδου αμινοαζώτου με το OPA (NOPA) γίνεται ακριβής παρουσίαση της περιεκτικότητας του αφομοιώσιμου αζώτου του γλεύκους. Γνωρίζοντας την περιεκτικότητα αζώτου ενός γλεύκους, μπορούν να γίνουν πιο ακριβείς ρυθμίσεις για να συμπληρωθεί κατάλληλα το γλεύκος.

Προσθήκες αμμωνίας, ως φωσφορικό διαμμώνιο (DAP), και σύνθετων σκευασμάτων αμινοξέων (νόμιμα προστίθενται ως εγκεκριμένα σκευάσματα), μπορεί να εξισορροπήσουν και να βελτιστοποιήσουν την αρχική περιεκτικότητα σε άζωτο ενός συγκεκριμένου γλεύκους σταφυλιού πριν από τη ζύμωση. Το αμμωνιακό άζωτο μετράτε και με τιτλοδότηση και με ενζυμικό kit ή με ηλεκτρόδιο ISE ενώ το αμινοάζωτο μετράτε, όπως έχει προαναφερθεί, με τη μέθοδο NOPA. Και τα δύο αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mg αζώτου ανά λίτρο (ppm). Το άθροισμα του αφομοιώσιμου αζώτου αμινοξέων και του αμμωνιακού αζώτου είναι το συνολικό άζωτο που είναι διαθέσιμο σε ζύμες ως mg αζώτου ανά λίτρο (YAN). Ακολουθεί ενδεικτικό πρωτόκολλο, από τους Butzke & Dukes (1998).

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ – ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Αρχικά, πραγματοποιείται διαύγαση του δείγματος με φυγοκέντρηση ή με ψύξη ώστε να καταβυθιστούν τυχόν αιωρήματα. Στην συνέχεια, παρασκευάζονται δύο αντιδραστήρια :

2. ΔΙΑΛΥΜΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ Α, που αποτελείται από 0,671 g OPA, διαλύεται σε 100 mL με διάλυμα αιθανόλης 95 % vol. Αυτό το διάλυμα OPA προστίθεται στη συνέχεια σε ογκομετρική φιάλη 1000 mL που περιέχει υδατικό διάλυμα 3,837 g NaOH (s), 8,468 g βορικού οξέος (s) και 0,816 g NAC (s). Η συμπλήρωση του όγκου του δείγματος γίνεται με απιονισμένο νερό.

3. ΤΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ Β αποτελείται από 100 mL 95 %vol αιθανόλης που προστίθεται σε υδατικό διάλυμα 3,837 g NaOH (s), 8,468 g βορικού οξέος (s) και 0,816 g NAC (s). Η συμπλήρωση του όγκου του δείγματος γίνεται με απιονισμένο νερό. Τα δύο διαλύματα αντιδραστηρίων μπορούν να αποθηκευτούν στο ψυγείο για έως και δύο εβδομάδες ενώ, όταν χρησιμοποιούνται, τα διαλύματα πρέπει να είναι σε θερμοκρασία δωματίου.

Κενό δείγμα

1. 50 μ L νερού μεταφέρονται με πιπέτα σε μια τυπική κυψελίδα ακρυλικού μεθυλεστέρα ή χαλαζία ποιότητας UV χρησιμοποιώντας ψηφιακή πιπέτα.
2. 3000 μ L ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ Α προστίθενται χρησιμοποιώντας μια μικροπιπέτα.
3. Μηδενίστε το φασματοφωτόμετρο υπεριώδους στα 335 nm με αυτό το κενό δείγμα.

Δείγμα

4. 50 μ L του δείγματος χυμού μεταφέρονται με πιπέτα σε κυψελίδα. Μπορεί να χρειαστεί αραιώση του χυμού εάν η συγκέντρωσή του σε άζωτο υπερβαίνει κατά πολύ το εύρος της τυπικής καμπύλης (>200 N mg/L).
5. Προστίθενται 3000 μ L ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ Α.
6. Ανακατεύουμε καλά το μείγμα.
7. Καταγράφουμε τη μικτή απορρόφηση δείγματος A335 του δείγματος μετά από 10 λεπτά στα 335 nm.

Κενό χυμό

8. 50 μ L του (αραιωμένου) δείγματος χυμού μεταφέρονται με πιπέτα σε κυψελίδα.
9. Προστίθενται 3000 μ L ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ Β.
10. Ανακατεύουμε καλά το μείγμα.
11. Καταγράψτε την απορρόφηση A335 του δείγματος μετά από 10 λεπτά στα 335 nm.

Υπολογίστε την καθαρή απορρόφηση αφαιρώντας την απορρόφηση του κενού χυμού από την απορρόφηση του δείγματος, δηλαδή :

Απορρόφηση = A δείγματος – A κενού χυμού

Στην συνέχεια, πραγματοποιείται ο σχηματισμός μιας πρότυπης καμπύλης με ένα διάλυμα ισολευκίνης, όπου στους άξονες τοποθετούνται οι τιμές των απορροφήσεων των δειγμάτων. Η συγκέντρωση του διαλύματος της ισολευκίνης ισούται με 10M και παρασκευάζεται με διάλυση 0,328 g ισολευκίνης σε απιονισμένο νερό σε ογκομετρική φιάλη 250 mL. Οι συγκεντρώσεις κυμαίνονται από 2 έως 10 mM ισολευκίνης, που αντιστοιχεί σε 28 – 140 mg Αζώτου/L. Εάν η συγκέντρωση του δείγματος υπερβαίνει αυτό το εύρος, προτείνεται αραιώση του δείγματος. Οποιαδήποτε αραιώση αντισταθμίζεται αργότερα με πολλαπλασιασμό με συντελεστή αραιώσης.

Χρησιμοποιώντας την απορρόφηση που βρέθηκε προηγουμένως υπολογίζεται η συγκέντρωση των αζωτούχων αμινοξέων μέσω του τύπου:

$\text{mg/L αζωτούχων αμινοξέων δείγματος} = (\text{Απορρόφηση} * \text{Κλίση} + \text{Σημείο τομής}) * \text{συντελεστή αραιώσης}.$

ΜΕΘΟΔΟΣ SORESSEN

Μια απλή μέθοδος μέτρησης του αζώτου αμινοξέων, χωρίς φασματοφωτόμετρο, που χρησιμοποιείται από παλαιότερα στην οινολογία είναι η μέθοδος του Sorensen (1907) με τη χρήση φορμόλης (φορμαλδεϋδης). Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στο μπλοκάρισμα των αμινομαδών των αμινοξέων του γλεύκους ή του οίνου με την προσθήκη διαλύματος φορμαλδεϋδης σε ορισμένο όγκο πλήρως εξουδετερωμένου γλεύκους ή οίνου (pH 7). Στη συνέχεια τιτλοδοτούμε με NaOH την εμφανιζόμενη οξύτητα που οφείλεται στα αμινοξέα. Παρακάτω παρατίθεται ένα ενδεικτικό πρωτόκολλο σύμφωνα με τον Ακαρέπη, (2007):

Αντιδραστήρια-Διαλύματα

Διάλυμα NaOH 0,1N

Διάλυμα NaOH 0,01N

Φορμόλη 37%

Υλικά και όργανα

Πεχάμετρο

Μαγνητικός αναδευτήρας

Ποτήρι ζέσεως 200ml

Προχοίδα

Ογκομετρική φιάλη 100ml

Εκτέλεση της μεθόδου

Σε ποτήρι ζέσεως 200ml τοποθετημένο πάνω σε μαγνητικό αναδευτήρα, προσθέτονται 50 ml δείγματος και εμβαπτίζεται το ηλεκτρόδιο του πεχάμετρου, Εξουδετερώνετε πλήρως το δείγμα μέχρι pH=7 με NaOH 0,1N. Μεταφέρετε σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml και συμπληρώνουμε με απεσταγμένο νερό, Στη συνέχεια, επαναφέρετε στο ποτήρι ζέσεως και προστίθενται 20 ml φορμόλης και σημειώνεται το pH (pH1).

Το δείγμα ογκομετρείται με NaOH 0,1N μέχρι να επανέλθει το pH στο 7. Έστω n τα ml του NaOH 0,1N.

Καμπύλη τιτλοδότησης φορμόλης

Σε κωνική φιάλη τοποθετούμε 20ml φορμόλη και 100ml νερό. Στη συνέχεια, με την βοήθεια πεχαμέτρου, ακολουθεί τιτλοδότηση με NaOH 0,01N, ρίχνοντας κάθε φορά όγκους των 0,5ml, μέχρι pH 7,5. Καταγράφεται η καμπύλη μεταβολής του pH της φορμόλης συνάρτηση των τοποθετημένων ml του NaOH 0.01N.

Υπολογισμοί

Διόρθωση οφειλόμενη στη φορμόλη

Από την καμπύλη της τιτλοδότησης της φορμαλδεΰδης υπολογίζεται ο όγκος του NaOH 0,01N που καταναλώθηκε από την φορμόλη από το αρχικό pH(pH1) μέχρι τα το pH 7. Τα ml αυτά του NaOH 0,01N καταναλώθηκαν για την εξουδετέρωση του ενυπάρχοντος μυρμηγκικού οξέος στην φιάλη της φορμόλης, Άρα η κατανάλωση θα ισούται με:

C ml : εκφρασμένη σε ml NaOH 0,01N ή σε $c=C \times 0,1$ ml : εκφρασμένη σε ml NaOH 0,1N

Μέτρηση αζώτου

Ο όγκος του NaOH 0,1N που χρησιμοποιήθηκε για την τιτλοδότηση των αμινοξέων είναι :

(n-c) ml

Επειδή το δείγμα του κρασιού είναι 50ml, ισχύει:

$(n-c) \times 0,1/50 \times 1000$ σε meq/l ή $(n-c) \times 2 \times 14 = 28(n-c)$ σε mgr/lit N₂

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΜΜΩΝΙΑΚΩΝ ΑΛΑΤΩΝ

Τα αμμωνιακά βρίσκονται στον οίνο σε μορφή αλάτων της βάσης NH_4OH . Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην αντικατάσταση της βάσης αυτής από μια ισχυρότερη βάση, όπως το MgO , και στη συλλογή της απελευθερούμενης NH_3 σε γνωστή περίσσεια θεικού οξέος ύστερα από απόσταξη. Στη συνέχεια, ογκομετρούμε την περίσσεια του θεικού οξέος με NaOH 0,1N παρουσία δείκτη πράσινο της βρωμοκρεζόλης.

Παρακάτω παρατίθεται ένα ενδεικτικό πρωτόκολλο σύμφωνα με Ακαρέπη, (2007) :

Αντιδραστήρια-Διαλύματα

Οξείδιο του μαγνησίου (MgO)

Διάλυμα H_2SO_4 0,1N

Διάλυμα NaOH 0,1N

Δείκτης πράσινο της βρωμοκρεζόλης

Υλικά-Όργανα

Συσκευή απόσταξης μεθ' υδρατμών

Κωνική φιάλη των 250ml

Εκτέλεση της μεθόδου

Απόσταξη μεθ' υδρατμών

Στη φιάλη απόσταξης τοποθετείστε 50 ml δείγματος, 150 ml νερό και περίπου 2 g MgO . Αποστάζεται και το απόσταγμα συλλέγεται σε κωνική φιάλη των 250ml που περιέχει 20ml H_2SO_4 0,1N. Η απόσταξη συνεχίζεται μέχρι την συμπλήρωση του όγκου στα 250ml . Κατά την απόσταξη το άκρο του ψυκτήρα πρέπει να είναι εμβαπτισμένο μέσα στο διάλυμα του οξέος.

Βρασμός

Στη συνέχεια ακολουθεί βρασμός του αποστάγματος για 10 min περίπου, Ο βρασμός είναι απαραίτητος για την αφαίρεση του διοξειδίου του άνθρακα από το δείγμα και της αλκοόλης αν πρόκειται για κρασί.

Ογκομέτρηση

Ψύξη και ογκομέτρηση με NaOH 0,1N και δείκτη πράσινο της βρωμοκρεζόλης. Έστω n τα ml της κατανάλωσης. Η αλλαγή του χρώματος είναι από κίτρινο σε μπλε INDIGO.

Λευκός προσδιορισμός

Τοποθέτηση σε κωνική φιάλη 50ml απεσταγμένο νερό και 20ml H_2SO_4 0,1N, και ογκομέτρηση με NaOH 0,1N και δείκτη πράσινο της βρωμοκρεζόλης. Έστω n' τα ml της κατανάλωσης.

Υπολογισμοί : $\text{Meq/l} = (n' - n) \times 0,1/50 \times 1000$ ή N_2 (mgr/l) = $(n' - n) \times 2 \times 14$

Μέτρηση αμμωνιακού αζώτου με επιλεκτικά ηλεκτρόδια ιόντων (ISE - ion selective electrodes)

Μια ακόμα τεχνική που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της αμμωνίας/αμμωνιακού αζώτου είναι με τη χρήση επιλεκτικών ηλεκτροδίων ιόντων ISE (ion selective electrodes) με μηχανήμα μέτρησης pH/ISE, τα οποία μπορούν να δεχτούν και άλλα ηλεκτρόδια για τη μέτρηση επιπλέον ιόντων. Η τεχνική αυτή βρίσκει μεγάλη εφαρμογή στη μέτρηση του νερού και άλλων υδατικών διαλυμάτων.

Για να πραγματοποιηθεί μια ακριβή μέτρηση χρησιμοποιώντας ένα ISE, μια κατάλληλη μέθοδος ISE θα πρέπει να επιλεγεί σύμφωνα με συγκεκριμένες συνθήκες δείγματος.

Συγκεκριμένα :

Αραιωμένα υδατικά (νερό) δείγματα:

- Τυπικά αραιά υδατικά (νερό) δείγματα μπορούν να ελεγχθούν με απλή, άμεση δοκιμή. Η άμεση δοκιμή περιλαμβάνει την προσθήκη διαλύματος ρυθμιστή ιοντικής ισχύος (ISA) στα πρότυπα και τα δείγματα, τη βαθμονόμηση με τα πρότυπα και τη δοκιμή των δειγμάτων.
- Δείγματα σύνθετων ή υψηλής ιοντικής ισχύος: Ορισμένοι τύποι δειγμάτων δεν είναι αραιά υδατικά διαλύματα. Τα δείγματα που είναι πολύπλοκα ή έχουν υπόβαθρο υψηλής ιοντικής ισχύος ενδέχεται να απαιτούν διαφορετική προσέγγιση από την άμεση μέθοδο δοκιμής για να επιτευχθούν τα καλύτερα αποτελέσματα. Γενικά, δείγματα υψηλής ιοντικής ισχύος είναι δείγματα συγκέντρωσης $>0,1$ M διαλυμένων ιόντων ή δείγματα που μπορεί να έχουν ένδειξη αγωγιμότητας μεγαλύτερη από περίπου 10 mS/cm.

ΜΕΤΡΗΣΗ ΑΜΜΩΝΙΑΚΩΝ ΙΟΝΤΩΝ

Η μέτρηση των αμμωνιακών ιόντων πραγματοποιείται και με την χρήση ενός ενζυμικού κιτ. Χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της αμμωνίας σε τρόφιμα και βιολογικά δείγματα. Ο προσδιορισμός βασίζεται στην αντίδραση της αμμωνίας με το κετογλουταρικό οξύ και το NADPH παρουσία α-L-γλουταμινικής αφυδρογονάσης για να σχηματίσει L-γλουταμινικό και NADPH⁺. Η μείωση της απορρόφησης στα 340 nm, λόγω της οξείδωσης του NADPH, είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση αμμωνίας. Η L-γλουταμινική αφυδρογονάση αντιδρά με την αμμωνία και επιτρέπει τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων αμμωνίας από 0,2–15 g/ml. Παρατίθεται, ένα πρωτόκολλο από την εταιρία SIGMA_ALDRICH :

Αντιδραστήρια

Το ξηρό αντιδραστήριο περιέχει -κετογλουταρικό οξύ, NADPH, ρυθμιστικά διαλύματα, σταθεροποιητές και μη αντιδραστικά πληρωτικά. Το αντιδραστήριο θα πρέπει να φυλάσσεται στους 2–8 C. Θα πρέπει να απορριφθεί εάν τα φιαλίδια παρουσιάζουν σχηματισμό πηκτώματος λόγω πιθανής διείσδυσης υγρασίας, εάν το περιεχόμενο του φιαλιδίου δεν διαλύεται πλήρως κατά την ανασύσταση ή εάν το ανασυσταθέν διάλυμα εμφανίζεται θολό ή κίτρινο. Το ένζυμο παρέχεται ως διάλυμα σε 50% γλυκερίνη. Το ενζυμικό διάλυμα πρέπει να φυλάσσεται στους 2–8 C, δεν πρέπει να καταψυχθεί και επαρκεί για 100 μετρήσεις. Ορισμός μονάδας: Μία μονάδα θα μειώσει 1,0 mmole α-κετογλουταρικό οξύ σε L-γλουταμινικό ανά λεπτό σε pH 7,3 και 25 °C παρουσία ιόντων αμμωνίου.

Απαιτούμενος εξοπλισμός

- Φασματοφωτόμετρο κατάλληλο για μέτρηση απορρόφηση στα 340 nm
- Κυβέτες
- Πιπέτες με δυνατότητα ακριβούς διανομής 10 ml έως 1 ml

Ανασυστήστε κάθε φιαλίδιο με 10 ml νερό. Μετά την προσθήκη του νερού, πωματίστε το φιαλίδιο και αμέσως ανακατεύετε πολλές φορές με αναστροφή και ποτέ με κούνημα.

Το παρασκευασμένο Αντιδραστήριο Δοκιμασίας Αμμωνίας πρέπει να φυλάσσεται καλυμμένο για να αποφευχθεί πιθανή αμμωνιακή πρόσληψη. Το παρασκευασμένο Αντιδραστήριο Δοκιμασίας Αμμωνίας περιέχει ~3,4 mM α-κετογλουταρικό οξύ και ~0,23 mM NADPH. Είναι σταθερό για την απουσία ανάπτυξης μικροβίων, για τουλάχιστον 1 ημέρα στους 18–26 °C και για 2 εβδομάδες σε 2–8 °C. Το ανασυσταθέν αντιδραστήριο μπορεί να κατανεμηθεί σε κλάσματα και φυλάσσεται στους –20 °C για 6 μήνες. Αποφύγετε τους κύκλους κατάψυξης/απόψυξης.

Το διάλυμα αφυδρογονάσης L-γλουταμινικής και η Το Ammonia Standard Solution παρέχονται έτοιμο προς χρήση.

Έναρξη μεθόδου

Ο όγκος του δείγματος μπορεί να κυμαίνεται από 10–200 ml όπως απαιτείται. Εάν αλλάξει ο όγκος του δείγματος, κάντε τις κατάλληλες προσαρμογές στους υπολογισμούς.

2. Ρυθμίστε το φασματοφωτόμετρο στα 340 nm και την απορρόφηση στο μηδέν χρησιμοποιώντας νερό ως αναφορά.

3. Ανακατέψτε τα περιεχόμενα σε κάθε κυβέτα και επώαστε για ~5 λεπτά στους 18–35 °C. Μετρήστε την απορρόφηση κάθε διαλύματος στα 340 nm.

4. Προσθέστε 10 ml διαλύματος L-Glutamate Dehydrogenase σε κάθε κυβέτα.

5. Αναμείξτε τα περιεχόμενα κάθε κυβέτας και επώαστε για ~5 λεπτά στους 18–35 °C. Στη συνέχεια μετρήστε την απορρόφηση κάθε διαλύματος στα 340 nm.

Σημείωση: Η αντίδραση αφυδρογονάσης L-γλουταμινικού συνήθως ολοκληρώνεται σε πέντε λεπτά. Εάν η απορρόφηση στα 340 nm συνεχίζει να μειώνεται μετά από πέντε λεπτά, επηρεάζεται από μια ανταγωνιστική αντίδραση που περιλαμβάνει την οξείδωση του NADPH. Συνεχίστε να μετράτε την απορρόφηση σε διαστήματα 1 λεπτού μέχρι ο ρυθμός της μείωσης να είναι σταθερός για 2 λεπτά. Από αυτό τον σταθερό ρυθμό μείωσης, υπολογίστε τη μεταβολή της απορρόφησης για 5 λεπτά λόγω του ανταγωνιστικής αντίδρασης.

Υπολογισμός:

Προσδιορίστε το DA340 για το Reagent Blank, Test και

Πρότυπο. Για κάθε: $DA_{340} = A_{Initial} - A_{Final}$

$D(DA_{340})_{\text{Δοκιμή ή Τυπικό}} = DA_{340} (\text{Δοκιμαστικό ή Τυπικό}) - DA_{340} (\text{Κενό})$

mg NH₃/ml αρχικού δείγματος

$$= (A) (TV) (MW \text{ αμμωνίας}) (F) / (e) (d) (SV) (\text{Συντελεστής μετατροπής για mg σε mg})$$

$$= (A) (TV) (17) (F) / (6.22) (1) (SV) (1.000)$$

$$= (A) (TV) (F) / (SV) \times 0,00273$$

$A = D(DA_{340})_{\text{Δοκιμή ή Τυπικό}}$

TV = Συνολικός όγκος ανάλυσης σε ml

SV = Όγκος δείγματος σε ml

MW αμμωνίας = 17 g/mole ή ισοδύναμα 17 mg/mmole

F = Συντελεστής αραίωσης από την προετοιμασία του δείγματος

e = Χιλιοστογραμμομοριακός Συντελεστής Εξάλειψης για NADPH στο 340 nm [mM⁻¹cm⁻¹ ή ισοδύναμα (ml/mmole) (1/cm)]

d = Διαδρομή φωτός (cm) = 1 cm

3.4 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των μεθόδων μέτρησης αζώτου

Η πληθώρα επιλογών εργαστηριακών μεθόδων για τον προσδιορισμό του αζώτου είναι απαραίτητη για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του αφομοιώσιμου αζώτου, ώστε να πραγματοποιηθεί μια ζύμωση χωρίς προβλήματα. Το κρίσιμο σκεπτικό για την επιλογή της κατάλληλης μεθόδου, είναι η επιλογή μιας η οποία να μετρά το αφομοιώσιμο άζωτο από τα αμινοξέα, τα ιόντα αμμωνίου και τα μικρά πεπτίδια (δι- και τριπεπίδια).

Οι παραπάνω ενώσεις περιλαμβάνονται στο FAN (Free Amino Nitrogen) και είναι αυτό που θα καθορίσει την επιτυχία της ζύμωσης. Μέθοδοι οι οποίες υπολογίζουν και την συγκέντρωση των πρωτεϊνών δίνουν εσφαλμένα αποτελέσματα, καθώς αφενός οι πρωτεΐνες δεν θα αποτελέσουν πηγή κατά την ζύμωση, αφετέρου θα δημιουργήσουν θολώματα τα οποία θα πρέπει να ληφθούν υπόψιν κατά την διαδικασία του κολλαρίσματος.

Συνοπτικά, οι παρακάτω μέθοδοι έχουν τα παρακάτω πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα:

Μέθοδοι μέτρησης πρωτεϊνών:

Μέθοδος Lowry

Πλεονεκτήματα

1. Είναι πολύ ευαίσθητη.
2. Επηρεάζεται λιγότερο εάν το δείγμα είναι θολό σε σχέση με άλλες μεθόδους.
3. Είναι αρκετά ακριβής.
4. Είναι απλή μέθοδος με διάρκεια περίπου 1-1,5 ώρα.

Μειονεκτήματα

1. Το χρώμα δεν είναι αυστηρά ανάλογο με την συγκέντρωση της πρωτεΐνης.
2. Η αντίδραση μπορεί να παρεμποδιστεί σε διάφορους βαθμούς από την σακχαρόζη, τα λιπίδια, τα ρυθμιστικά διαλύματα φωσφορικών, τους μονοσακχαρίτες και τις εξοαμίνες.
3. Υψηλές συγκεντρώσεις αναγωγικών σακχάρων, θειικού αμμωνίου και ενώσεων σουλφρυδρυλίου παρεμβαίνουν στην αντίδραση.
4. Είναι ευαίσθητη στην αλλαγή pH. Το pH πρέπει να κυμαίνεται από 10,0-10,5 (Shen, 2019; Sharma, 2022).

Μέθοδος Bradford

Βασικά πλεονεκτήματα της μεθόδου:

1. Είναι γρήγορη (ο χρόνος που απαιτείται για την επώαση της αντίδρασης είναι 2').
2. Είναι ευαίσθητη (δεν απαιτείται μεγάλη ποσότητα πρωτεΐνης).

Στα μειονεκτήματα περιλαμβάνονται τα παρακάτω:

1. Ο τρόπος αλληλεπίδρασης χρωστικής-πρωτεΐνης μπορεί να διαφοροποιείται από δείγμα σε δείγμα (εξαρτάται από τα αμινοξέα των πρωτεϊνών).
2. Οι πρωτεΐνες που χρησιμοποιούνται στη μέθοδο αυτή υφίστανται μη αντιστρεπτή μετουσίωση.
3. Το αντιδραστήριο χρωστικής Bradford είναι πολύ όξινο, επομένως πρωτεΐνες με χαμηλή διαλυτότητα σε οξύ δεν μπορούν να προσδιοριστούν με αυτό το αντιδραστήριο.
4. Τα αντιδραστήρια Bradford έχουν ως αποτέλεσμα περίπου διπλάσια διακύμανση πρωτεΐνης προς πρωτεΐνη από τα αντιδραστήρια προσδιορισμού που βασίζονται σε χηλική ένωση χαλκού.
5. Ο προσδιορισμός Bradford είναι γραμμικός σε μικρό εύρος συγκεντρώσεων, τυπικά από 0 µg/mL έως 2000 µg/mL, καθιστώντας συχνά τις αραιώσεις ενός δείγματος απαραίτητες πριν από την ανάλυση. Κατά την πραγματοποίηση αυτών των αραιώσεων, το σφάλμα σε μία αραιώση επιδεινώνεται σε περαιτέρω αραιώσεις με αποτέλεσμα μια γραμμική σχέση που μπορεί να μην είναι πάντα ακριβής (Becker et al.,1996; Pokhrel, 2020).

Μέθοδος Kjeldahl:

Πλεονεκτήματα

Η μέθοδος Kjeldahl χρησιμοποιείται ευρέως διεθνώς και εξακολουθεί να είναι η τυπική μέθοδος σύγκρισης με όλες τις άλλες μεθόδους. Η καθολικότητα, η υψηλή ακρίβεια και η καλή επαναληψιμότητα την έχουν καταστήσει ως τη βασική μέθοδο για την εκτίμηση της πρωτεΐνης στα τρόφιμα.

Μειονεκτήματα

Δεν δίνει ένα μέτρο της πραγματικής πρωτεΐνης, αφού όλο το άζωτο στα τρόφιμα δεν είναι σε μορφή πρωτεΐνης. Διαφορετικές πρωτεΐνες χρειάζονται διαφορετικούς παράγοντες διόρθωσης, επειδή έχουν διαφορετικές αλληλουχίες αμινοξέων. Η χρήση συμπυκνωμένου θεικού οξέος σε υψηλές θερμοκρασίες αποτελεί σημαντικό κίνδυνο, όπως και η χρήση ορισμένων από τους πιθανούς καταλύτες. Η τεχνική είναι χρονοβόρα για να πραγματοποιηθεί (Kerr, 2011; Sarpota, 2022).

Μέθοδοι μέτρησης μορφών αφομοιώσιμου αζώτου:

Μέθοδος Sorensen

Πλεονεκτήματα

1. Απλή μέθοδος
2. Σχετικά γρήγορη, αλλά για ένα δείγμα τη φορά
3. Φτηνός εξοπλισμός

Μειονεκτήματα

1. Ανακρίβειες λόγω της σταθερότητας της φορμαλδεΐδης
2. Μερική αντίδραση των μονοβασικών αμινοξέων με την φορμαλδεΐδη

Μέθοδοι FAN & NOPA

Πλεονεκτήματα μεθόδου

1. Αποτελεί αναλυτική διαδικασία για ποσοτική εργασία.
2. Απαιτεί μικρό μέγεθος δείγματος.
3. Απαιτεί εξοπλισμό που διατίθεται συνήθως σε ένα αναλυτικό εργαστήριο.
4. Είναι γρήγορη και ακριβής μέθοδος και μπορεί να εφαρμοστεί σε πολλαπλά δείγματα.

Μειονεκτήματα

Απαιτούν φασματοφωτόμετρο.

Ένα από τα μειονεκτήματα της εφαρμογής νινυδρίνης είναι ότι μπορεί να πάρει πολύτιμο χρόνο. Σε θερμοκρασία δωματίου, η αντίδραση μεταξύ της νινυδρίνης και των λανθανόντων αμινοξέων μπορεί να διαρκέσει έως και αρκετές ημέρες. Όμως η εφαρμογή θερμότητας και υγρασίας μπορεί να επιταχύνει σημαντικά αυτή τη διαδικασία (Lekkas et al., 2005).

Η NOPA απαιτεί ποιο εξιδεικευμένα αντιραστήρια.

Ενζυμικά kit αμμωνίας

Πλεονεκτήματα

1. Γρήγορη μέθοδος
2. Οικονομική
3. Πληθώρα επιλογών

Μειονεκτήματα

1. Δεν ανιχνεύουν πολύ μικρές συγκεντρώσεις
2. Κίνδυνος επιμόλυνσης
3. Απαιτεί φασματοφωτόμετρο

Μέθοδος ηλεκτρόδιου ISE

Πλεονεκτήματα

1. Γρήγορη και εύκολη
2. Οικονομική μέθοδος
3. Αποτελεσματική σε απλά διαλύματα με μικρές συγκεντρώσεις
4. Δεν καταναλώνεται δείγμα

Μειονεκτήματα

1. Η ακρίβεια είναι χαμηλή (συχνά χειρότερη από 1%)
2. Οι οργανικές διαλυμένες ουσίες μπορούν να οδηγήσουν τα ηλεκτρόδια σε λανθασμένες τιμές.
3. Μερικά ηλεκτρόδια είναι εύθραυστα.
4. Μετρά μόνο τη δραστηριότητα των ελεύθερων ιόντων

Πίνακας 10: Μέθοδοι Ποσοτικοποίησης Πρωτεϊνών.

Protein Quantification Methods

Assay method	Useful range	Comments
NanoOrange assay	100ng/ml to 10ug/ml	<ul style="list-style-type: none">•Samples can be read up to six hours later without any loss in the sensitivity•Low protein to protein signal variability•Detection not influenced by reducing agents or nucleic acid
BCA method (Cu reduction)	0.5ug/ml to 1.5mg/ml	<ul style="list-style-type: none">•Samples must be read within 10 mins•Not compatible with reducing agents
Bradford assay (dye binding)	1ug/ml to 1.5 mg/ml	<ul style="list-style-type: none">•Protein precipitates over time•High protein to protein signal variability•Not compatible with detergents
Lowry assay	1ug/ml to 1.5mg/ml	<ul style="list-style-type: none">•Lengthy, multi-step procedure•Not compatible with detergents, carbohydrates or reducing agents
Absorbance at 280nm	50ng/ml to 2mg/ml	<ul style="list-style-type: none">•High protein to protein signal variability•Detection influenced by nucleic acids and other UV absorbing contaminants

Πηγή: Copeland, R.A. (1994)

ΚΕΦ.4: ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΑΖΩΤΟΥ ΣΤΗ ΖΥΜΩΣΗ

4.1 Απαιτήσεις των ζυμών σε άζωτο

Η ανάπτυξη και ο πολλαπλασιασμός των ζυμών αποτελούν πολύ σημαντικό στάδιο στην παραγωγή ενός αλκοολούχου ποτού. Ο σχηματισμός των βέλτιστων συνθηκών ανάπτυξης καθώς και η παροχή όλων των απαραίτητων θρεπτικών συστατικών θα καθορίσουν την ποιότητα του αλκοολούχου ποτού. Οι ανάγκες των ζυμών για θρέψη καλύπτεται από συστατικά τα οποία μπορεί να είναι είτε ελεύθερα είτε ενωμένα, με έναν μεγάλο αριθμό στοιχείων να απαιτείται για την ομαλή εξέλιξη της ζύμωσης, με το άζωτο να έχει πολύ σημαντικό ρόλο.

Η κάλυψη των αναγκών σε άζωτο γίνεται με την πρόσληψη είτε ανόργανων ιόντων είτε οργανικού αζώτου. Ανόργανες ενώσεις οι οποίες χρησιμοποιούνται για την πρόσληψη είναι τα αμμωνιακά άλατα, συνήθως το θειικό αμμώνιο καθώς και το φωσφορικό διαμμώνιο, ενώ όσον αφορά τις οργανικές ενώσεις η πρόσληψη γίνεται με εκχυλίσματα από μίγμα αμινοξέων, ορισμένα αμίδια (ασπαραγίνη, γλουταμίνη), ολιγοπεπτίνες (αφομοιώσιμες ανάλογα το pH), από πυριδίνες και πυριμιδίνες που έχουν ανοιχτές αλυσίδες.

Η συγκέντρωση του αφομοιώσιμου κυμαίνεται μεταξύ αρκετών τιμών αλλά δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 400 mg/L (ανάλογα με τη σακχαροπεριεκτικότητα) ούτε να είναι μικρότερη των 150 mg/L. Οι τιμές αυτές είναι καθοριστικές για την πορεία της ζύμωσης, καθώς σε τιμές υψηλότερες ή χαμηλότερες υπάρχει κίνδυνος για την παραγωγή ανεπιθύμητων προϊόντων με μεγαλύτερο κίνδυνο την διακοπή της ζύμωσης (Sablayrolles et al., 2003; Ferreira et al., 2011).

4.1.1 Έλλειψη αζώτου στη ζύμωση

Η επάρκεια σε θρεπτικά στοιχεία είναι καθοριστική για την ομαλή διεξαγωγή της ζύμωσης καθώς κάθε ένωση αποτελεί κλειδί για την ομαλή εξέλιξη των βιοχημικών αντιδράσεων. Μια ενδεχόμενη έλλειψη αζώτου μπορεί να προκαλέσει πολλά και μεγάλα προβλήματα στην ζύμωση καθώς το άζωτο καθορίζει τον ρυθμό ζύμωσης. Το άζωτο επηρεάζει τον ρυθμό ζύμωσης άμεσα, ελέγχοντας την διαθεσιμότητα των πρόδρομων αμινοξέων για την βιοσύνθεση των πρωτεϊνών της γλυκόλυσης και της βιομάζας των κυττάρων του ζυμομύκητα, και επηρεάζοντας τη ροή μέσω της γλυκολυτικής οδού.

Ακόμα, ο περιορισμός του αζώτου έχει ως αποτέλεσμα την επιταχυνόμενη μεταβολή των πωρμεασών της γλυκόζης, μειώνοντας την ζυμωτική ικανότητα, με αποτέλεσμα στη συνέχεια να επιβραδύνεται ο ρυθμός ζύμωσης και να προκύπτει μια αργή ή ελλιπή ζύμωση (Brice et al., 2014).

Άλλο ένα σημάδι για την έλλειψη αζώτου είναι η παραγωγή υδρόθειου και ανώτερων αλκοολών, με τις δεύτερες να έχει αποδειχθεί πως παράγονται όταν η αμμωνία είναι η μοναδική πηγή ζύμωσης. Ο συνδυασμός αυτός θα δώσει βαριά αρώματα τα οποία σε συνδυασμό με την οσμή του αυγού από το υδρόθειο θα καταστήσουν το προϊόν της ζύμης ακατάλληλο. Επιπλέον, ένα ακόμα χαρακτηριστικό είναι η εμφάνιση -στο τέλος της ζύμωσης- υπολειμματικών σακχάρων κάτι το οποίο υποδηλώνει την αδυναμία ανάπτυξης και ομαλής λειτουργίας των ζυμομυκήτων υπό συνθήκες έλλειψης αζώτου (Barre et al., 1990; Varela et al., 2004).

4.1.2 Περίσσεια αζώτου

Υψηλή συγκέντρωση YAN μπορεί να προσφέρει υπερπλούσια το άζωτο στις ζύμες και να οδηγεί σε αυξημένη βιομάζα με υψηλή απόδοση θερμότητας, αλλά ταυτόχρονα οδηγεί και στην αύξηση των συγκεντρώσεων ανεπιθύμητων ουσιών, όπως είναι το οξικό οξύ (αύξηση πτητικής οξύτητας) και ο αιθυλεστέρας του (Tesniere et al., 2013). Ταυτόχρονα, ενώσεις που προκαλούν θόλωμα (πρωτεΐνες) συνδέονται στενά με τις υψηλές συγκεντρώσεις YAN. Σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις υπάρχει κίνδυνος παραγωγής ουρίας, καρβαμικού αιθυλεστέρα και βιογενών αμινών. Τέλος, υπάρχουν αυξημένες πιθανότητες για μικροβιακή αστάθεια λόγω επιμολύνσεων των τελικών ζυμωμένων προϊόντων και των ευνοϊκών συνθηκών ανάπτυξης για μικροοργανισμούς επιμόλυνσης (Tesniere et al., 2013).

Ακόμα, έχει μελετηθεί πως το FAN (αμινοξέα) επιδρά σημαντικά στον σχηματισμό γευστικών και αρωματικών ενώσεων στη διάρκεια της ζύμωσης. Συγκεκριμένα, η περιεκτικότητα του FAN επιδρά σημαντικά στον σχηματισμό εστέρων, αλδεϋδών, ανώτερων αλκοολών και οξέων με αποτέλεσμα να επηρεάζει σημαντικά την γεύση του προϊόντος. Ενώσεις όπως η ισοαμυλική αλκοόλη, η προπανόλη και η ισοβουτανόλη είναι χαρακτηριστικά συνδεδεμένες με την υψηλή ποσότητα FAN αλλά και με τις ανεπιθύμητες γεύσεις (Sablayrolles & Guillamón, 2012; Pradal et al., 2013).

4.2 Μεταβολισμός του αζώτου και κινητική της ζύμωσης

4.2.1 Μεταβολισμός του αζώτου

Οι αζωτούχες ενώσεις που βρίσκονται στο μούστο του σταφυλιού και στο γλεύκος της μύρας είναι τα καθοριστικά θρεπτικά συστατικά για την ανάπτυξη των ζυμών και της διεκπεραίωσης μια σταθερής ζύμωσης. Τα βασικά αμινοξέα του σταφυλιού είναι η προλίνη, η αργινίνη, η αλανίνη, η γλουταμίνη, η σερινίνη και η θεονίνη. Κατά την διάρκεια του μεταβολισμού του αζώτου οι ζύμες αξιοποιούν τις ενώσεις που περιέχουν άζωτο με τους εξής τρόπους:

- Παραλαμβάνονται και χρησιμοποιούνται κατευθείαν στην διαδικασία της βιοσύνθεσης.
- Μετατρέπονται και σε κάποια άλλη μορφή και χρησιμοποιούνται στην διαδικασία της βιοσύνθεσης.
- Αποδομούνται για να απελευθερώσουν άζωτο, το οποίο στην συνέχεια χρησιμοποιείται για την κάλυψη των μεταβολικών αναγκών του κυττάρου (Dharmadhikari, 2016).
- Τα αμινοξέα μετατρέπονται από τις ζύμες σε ανώτερες αλκοόλες με σειρά προτίμησης, όπως φαίνεται και στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας11: Σειρά προτίμησης αμινοξέων από τις ζύμες

Group A Fast Absorption	Group B Intermediate Absorption	Group C Slow Absorption	Group D Little or No Absorption
Glutamic acid	Valine	Glycine	Proline
Aspartic acid	Methionine	Phenylalanine	
Asparagine	Leucine	Tyrosine	
Glutamine	Isoleucine	Tryptophan	
Serine	Histidine	Alanine	
Threonine		Ammonia	
Lysine			
Arginine			

^a Source: Jones and Pierce (3).

Πηγή : Lekkas et. al., 2005

4.2.2 Κινητική της ζύμωσης

Κατά την αλκοολική ζύμωση υπό οινολογικές συνθήκες, οι παράγοντες που έχουν μελετηθεί εκτενώς στο παρελθόν και έχουν σημαντική επίδραση στην ζύμωση είναι:

- Το άζωτο στην σύνθεση των ζυμών κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης και η ενεργοποίηση του μεταβολισμού των ζυμών κατά την στατική φάση ανάπτυξης.
- Το pH του γλεύκους στα στάδια ανάπτυξης της ζύμης και η επίδραση του.
- Η θερμοκρασία κατά την ζύμωση συμπεριλαμβανομένων των ανισόθερων συνθηκών, που είναι πολύ κοινές στην οινοποίηση.
- Ο χρόνος, δηλαδή η διάρκεια της ζύμωσης και πιο συγκεκριμένα της κάθε φάσης της κινητικής μίας ζύμωσης, όσο και ο χρόνος έναρξης και λήξης της.
- Η αναστολή της αιθανόλης και η συγκέντρωσή της στο γλεύκος.
- Η συγκέντρωση της γλυκόζης στα κύτταρα.
- Η παραγωγή βιομάζας.

Το άζωτο είναι ένα από τα σημαντικότερα στοιχεία του υποστρώματος για την ανάπτυξη των ζυμών (Papapetridis et al., 2018). Στο πρώτο διάγραμμα παρατηρείται η επίδραση της προσθήκης του αζώτου, τόσο οργανικού όσο και ανόργανου, κατά την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης.

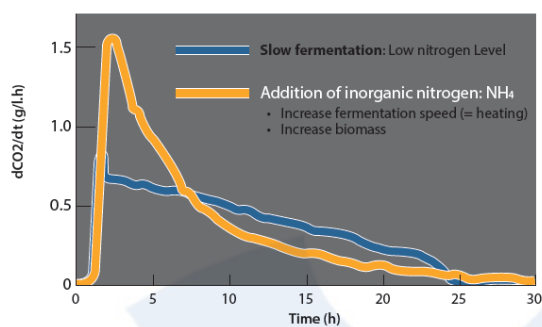


Figure 2: Impact of **inorganic** nutrition added at beginning on alcoholic fermentation

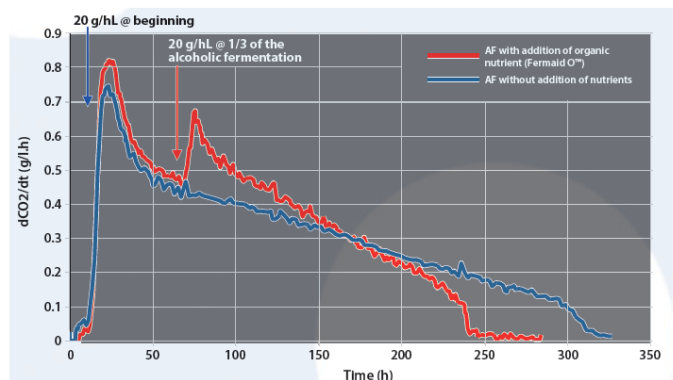


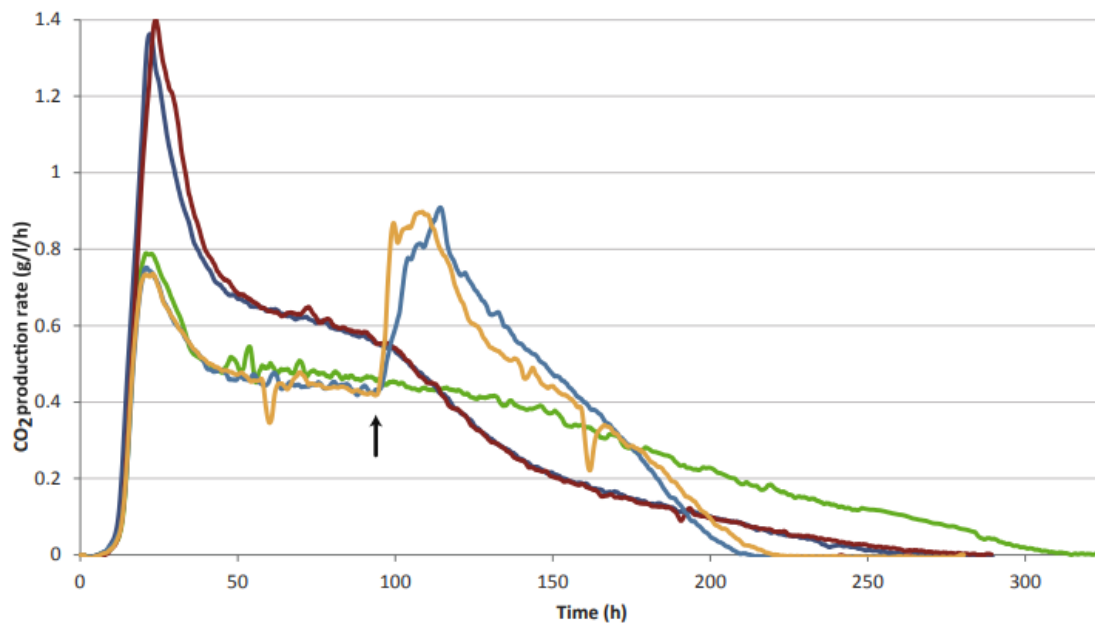
Figure 3: Impact of organic nutrition addition on alcoholic fermentation. 20g/hl (8mg/l of YAN) of organic nitrogen added at the beginning of the fermentation, and another 20g/hl (8mg/l of YAN) at 1/3 of the AF.

Διάγραμμα 8: Απεικόνιση συγκέντρωσης αζώτου κατά την έναρξη της ζύμωσης

Πηγή: <https://www.winemak-in.com/en/publications/the-many-roles-of-nitrogen-in-alcoholic-fermentation>

Στο δεύτερο διάγραμμα παρατηρούνται οι αλλαγές στην κινητική της ζύμωσης ανάλογα με την προσθήκη αζώτου.

Διάγραμμα 9: Ταχύτητα έκλυσης διοξειδίου του άνθρακα



Διάγραμμα 9: : Ταχύτητα έκλυσης διοξειδίου του άνθρακα (Seguinot et al. 2018)

Πράσινη καμπύλη : έλεγχος χωρίς προσθήκη

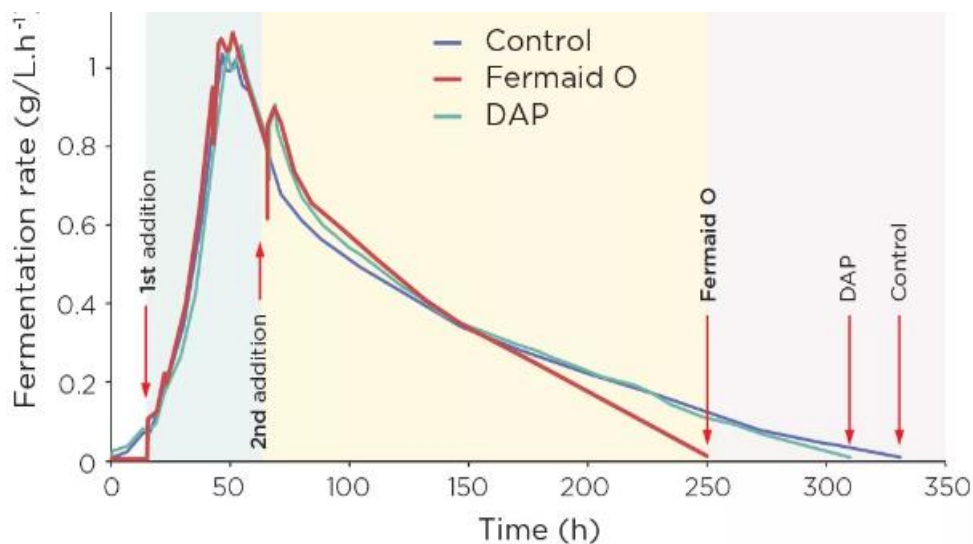
Σκούρο μπλε : Προσθήκη DAP στην αρχή της ζύμωσης

Κόκκινη καμπύλη: Προσθήκη αμινοξέων στην αρχή της ζύμωσης

Ανοιχτό μπλε : Προσθήκη DAP κατά την διάρκεια της στατικής φάσης

Πορτοκαλί καμπύλη : Προσθήκη αμινοξέων κατά την διάρκεια της στατικής φάσης

Όπως, προκύπτει και από το διάγραμμα, στις ζυμώσεις στις οποίες προστέθηκε άζωτο παρατηρείται καλύτερος ρυθμός ζύμωσης, ενώ σε αυτές που πραγματοποιήθηκε δεύτερη προσθήκη κατά την στατική φάση ολοκληρώθηκαν ακόμα πιο γρήγορα.



Διάγραμμα 10: Σύγκριση ρυθμού ζύμωσης τριών σκευασμάτων

Πηγή: <https://scottlab.com/yeast-nutrition-inorganic-vs-organic-nitrogen>

Στο τρίτο διάγραμμα παρατηρούμε την προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων αζώτου σκευασμάτων στην ζύμωση. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις στις οποίες προστέθηκε μόνο DAP ή μόνο Fermaid O ή συνδυασμός αυτών των δύο. Παρατηρείται πως η προσθήκη δεύτερης δόσης Fermaid O, είχε ως αποτέλεσμα να ολοκληρωθεί γρηγορότερα η ζύμωση.

4.3 Απαιτήσεις αζώτου ανά γλεύκος

Με παρόμοια επίπεδα (200–250 mg FAN/L) που θεωρούνται ως βέλτιστα για τυπικές ζυμώσεις ζυθοποιίας. Υπάρχουν διαφορές στις απαιτήσεις μεταξύ των στελεχών ζύμης. Η περιεκτικότητα σε FAN που απαιτείται από τη μαγιά υπό κανονική ζύμωση είναι απαραίτητο να υπολογιστεί και για αυτόν τον σκοπό έχουν αναπτυχθεί πολλά εργαλεία για τη χρήση σε οίνους, ζύθους και υδρόμελα.

Πίνακας 10 : Υπολογισμός αζώτου

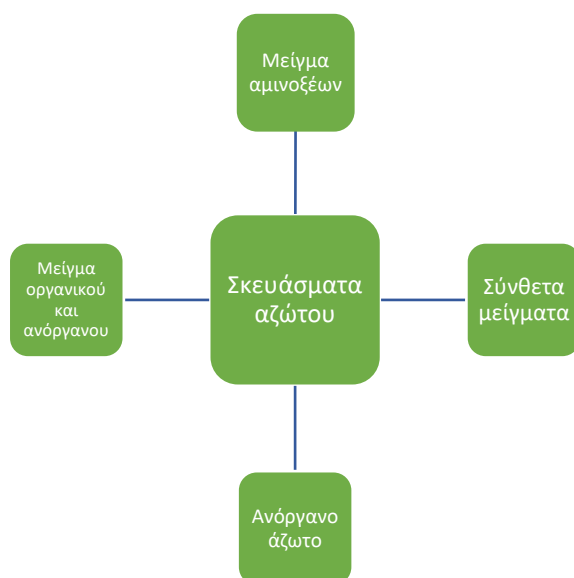
BIBΛΙΑ	ΠΙΝΑΚΕΣ
https://fermcalc.com/yan/	https://en.az3oeno.com/tools/calculation/calculation-yeast-assimilable-nitrogen
http://nanaimowinemakers.com/adding-nitrogen-fermentations/	https://www.winebusiness.com/calculator/winemaking/calc/12/
https://scottlab.com/fermentation-nutrition-planning	https://nmicht.github.io/mead-nutrient-calculator/
https://www.awri.com.au/industry_support/winemaking_resources/wine_fermentation/yan/	TOSNA CALCULATOR Mead Made Right
	https://www.meadmakr.com/batch-buildr/ http://www.meadmakr.com/advanced-sna-calculator/
	Mead Nutrient Calculator (nmicht.github.io)

Για την ταχεία ζύμωση του ζυθογλεύκου υψηλής πυκνότητας (16°P), αυξημένα επίπεδα FAN είναι απαραίτητα. Στη ζυθοποιία, η ανάπτυξη της ζύμης είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση FAN προς τα πάνω σε τιμή 100 mg/l. Τέτοιες παρατηρήσεις οδήγησαν σε συνιστώμενες ελάχιστες ποσότητες FAN 140-150 mg/l για την επαρκή ζύμωση της κανονικής πυκνότητας.

Οι ελάχιστες απαιτήσεις για άζωτο επομένως υπαγορεύονται από την σακχαροπεριεκτικότητα και τις απαιτήσεις σε άζωτο του στελέχους της ζύμης. Ο γραμμικός ρυθμός ανάπτυξης, η αύξηση της μάζας ζύμης, ο τελικός αριθμός κυττάρων και ο ρυθμός καταβολισμού του σακχάρου στο γλεύκος σταφυλιών επηρεάζεται άμεσα από την

περιεκτικότητα σε αμινοάζωτο ενός γλεύκους περιορισμένου σε άζωτο. Οι ελάχιστες απαιτήσεις για αφομοιώσιμο άζωτο είναι αίτιο για μια αργή αλκοολική ζύμωση, ενώ η περίσσεια αζώτου επιταχύνει τον ρυθμό ζύμωσης (Briskin et al., 2000).

4.4 Μορφές αζώτου που χρησιμοποιούνται στο εμπόριο



Διάγραμμα 11: Κατηγοριοποίηση εμπορικών σκευασμάτων

Τα σκευάσματα αζώτου μπορούν να χωριστούν σε 4 κατηγορίες σύμφωνα με την περιεκτικότητά τους σε :

- Ανόργανο άζωτο, το οποίο συναντάται με την μορφή ανόργανων ουσιών.
- Οργανικό άζωτο, το οποίο αποτελείται από μίγματα αμινοξέων που έχουν προκύψει από υδρόλυση.
- Μείγμα οργανικού και ανόργανου αζώτου
- Σύνθετα μίγματα, τα οποία περιέχουν οργανικό ή/και ανόργανο άζωτο και άλλα συστατικά με σκοπό την ικανοποίηση και άλλων αναγκών του γλεύκους (π.χ. θειώδες, βιταμίνες, αδρανή κύτταρα-κυτταρικά τοιχώματα ζυμών).

Κάθε σκεύασμα έχει κάποια ιδιαίτερα χαρακτηριστικά τα οποία ευνοούν την ανάπτυξη συγκεκριμένων χαρακτηριστικών, όπως την ενίσχυση της παραγωγής αρωματικών ενώσεων, ή προετοιμάζουν το περιβάλλον του γλεύκους για την προσθήκη των ζυμών, ενώ υπάρχουν και σκευάσματα τα οποία μπορούν να εξασφαλίσουν την ομαλή ολοκλήρωση της ζύμωσης και την βελτίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών. Η επιλογή του σκεύους εξαρτάται από την σύσταση του γλεύκους καθώς και από τις προσθήκες που έχουν προηγηθεί αλλά κυρίως από το προϊόν που θα παραχθεί. Τα επιθυμητά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος είναι αυτά που θα καθορίσουν το σκεύασμα που θα χρησιμοποιηθεί καθώς για

παράδειγμα στην λευκή οινοποίηση θα χρησιμοποιηθεί ένα σκεύος που ενισχύει την παραγωγή αρωματικών ενώσεων ενώ στην ερυθρή οινοποίηση θα χρησιμοποιηθεί ένα σκεύος το οποίο ενδεχομένως θα ενισχύει το χρώμα του προϊόντος.

Ένας άλλος λόγος για τον οποίο είναι πολύ σημαντική η προτίμηση του κατάλληλου σκεύους, είναι ότι η κατανάλωση των αμινοξέων είναι αλληλένδετη με την παραγωγή ανώτερων αλκοολών. Οι ανώτερες αλκοόλες σχετίζονται με το αντίστοιχο αμινοξύ από το οποίο σχηματίζονται, όπως ισολευκίνη προς 2- μεθυλοβουτανόλη, θρεονίνη προς προπανόλη, βαλίνη προς 2-μεθυλοπροπανόλη, φαινυλαλική ανίνη με 2- φαινυλαιθανόλη και λευκίνη προς 3-μεθυλοβουτανόλη.

Οι διαφορές στην παραγωγή αλκοόλης θα μπορούσαν να σχετίζονται με διακυμάνσεις στην ενδοκυτταρική σύνθεση των υποστρωμάτων και των ενδιάμεσων ενώσεων που εμπλέκονται στη σύνθεσή τους. Η ποσότητα των υψηλότερων αλκοολών που παράγονται από τη ζύμωση εξαρτάται επίσης από το γένος, το είδος και το στέλεχος του ζυμωτικού μικροοργανισμού και την ποσότητα των διαθέσιμων θρεπτικών συστατικών (αμινοξέα και άζωτο). Τα σκευάσματα που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι :

1. DAP, Το D.A.P. περιέχει άζωτο με τη μορφή του όξινου φωσφορικού διαμμώνιου. Αφομοιώνεται εύκολα από τις ζύμες ικανοποιώντας τις ανάγκες για άζωτο κατά την διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης.. Το D.A.P. δημιουργεί το κατάλληλο περιβάλλον για την ανάπτυξη των ζυμομυκήτων χωρίς να ευνοεί τις συνθήκες παραγωγής ακεταλδεΐδης και κετονοξέων. Βοηθά στην πρόληψη του σχηματισμού υδρόθειου και είναι ευδιάλυτο στο νερό ενώ μπορεί να προστεθεί απευθείας ή ως υδατικό διάλυμα. Η προσθήκη 100g/hL αυξάνουν την συγκέντρωση του αζώτου κατά περίπου 200mg στο λίτρο.
2. Fermaid O, είναι μια οργανική πηγή αζώτου που καταναλώνεται εύκολα από τις ζύμες και διευκολύνει την ανάπτυξη του αρωματικού χαρακτήρα αλλά και τον καλό έλεγχο της ζύμωσης. Ταυτόχρονα, δεν αυξάνει την θερμοκρασία ζύμωσης με την σταδιακή προσθήκη του, βελτιώνει τον ρυθμό ζύμωσης και αναπτύσσονται μικρότερες συγκεντρώσεις H₂S. Η προσθήκη του αυξάνει την συγκέντρωση του αζώτου κατά 0,25 g/L με την μορφή οργανικών ενώσεων.
3. Fermaid K, είναι ένα σύνθετο θρεπτικό συστατικό μαγιάς που βοηθά στην ομαλή πραγματοποίηση της ζύμωσης, ειδικά σε καταστάσεις χαμηλής συγκέντρωσης YAN. Είναι ένα σύνθετο μίγμα το οποίο μπορεί να

χρησιμοποιηθεί σε αργές ή κολλημένες ζυμώσεις καθώς μια σειρά από αζωτούχες ενώσεις όπως το φωσφορικό αμμώνιο και η θειαμίνη αλλά και η ύπαρξη θειώδους με την μορφή της θειαμίνης και του θειικού μαγνησίου, μπορούν να εκκινήσουν μια σταματημένη ζύμωση ή να αυξήσουν τον ρυθμό ζύμωσης σε μια αργή ζύμωση. Σύμφωνα με την εταιρία Scottlabs Ltd, το σκεύασμα περιέχει μικρές συγκεντρώσεις DAP και η προσθήκη του σκευάσματος στην ζύμωση απελευθερώνει 50mg/L ανόργανο άζωτο.

4. GoFerm, Το Go-Ferm είναι ένα προϊόν μαγιάς 100%, που παράγεται μέσω μιας ειδικής διαδικασίας αυτόλυσης σε βιομάζα ζυμομύκητα για να ληφθούν υψηλά επίπεδα ορισμένων απαραίτητων βιταμινών (π.χ. παντοθενικό οξύ και βιοτίνη) και μέταλλα όπως το μαγνήσιο και ο ψευδάργυρος, αλλά και αμινοξέα. Η προσθήκη βιταμινών και μετάλλων στο νερό αυξάνει τη συγκέντρωση και τη βιοδιαθεσιμότητα τους, με αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη απορρόφηση από τα κύτταρα της ζύμης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα έναν υγιέστερο πληθυσμό κυττάρων ζυμομύκητα, επομένως μειώνει τον κίνδυνο κολλημένης ή αργής ζύμωσης. Σύμφωνα με την εταιρία Eaton, η προσθήκη 30g/hl από το σκεύασμα τροφοδοτεί την ζύμωση με 10 mg/L άλφα αμινοξέων δημιουργώντας ένα περιβάλλον κατάλληλο για ζύμωση.

4.5 Τρόποι προσθήκης

Η προσθήκη του αζώτου κατά την ζύμωση έχει πολύ σημαντικό ρόλο στην διαμόρφωση του τελικού προϊόντος. Συγκεκριμένα, μελέτες έδειξαν την σημασία της σταδιακής προσθήκης του αζώτου στο γλεύκος σε κάθε φάση της ζύμωσης έχει σημαντικά οφέλη στο τελικό προϊόν.

Μελέτες έδειξαν πως η προσθήκη αζώτου κατά την έναρξη της ζύμωσης δρα υποστηρικτικά στην ανάπτυξη ανώτερων αλκοολών καθώς και εστέρων που δίνουν στο γλεύκος αρώματα ζυμωτικού χαρακτήρα. Ταυτόχρονα, η προσθήκη αζώτου κατά την στατική φάση ανάπτυξης προσφέρει υψηλότερες ταχύτητες ζύμωσης καθώς και αποζύμωσης.

Αντίθετα, η προσθήκη της απαιτούμενης ποσότητας αζώτου στην αρχή της ζύμωσης θα επιδράσει αρνητικά στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος. Η προσθήκη ολόκληρης της ποσότητας θα επιφέρει αύξηση της θερμοκρασίας ζύμωσης καθώς με τον τρόπο αυτό αυξάνεται ραγδαία η ταχύτητα ζύμωσης. Αυτό, θα προκαλέσει την αύξηση της ταχύτητα έκλυσης του CO₂ με αποτέλεσμα την πρόκληση στρες στα κύτταρα των ζυμομυκήτων κάτι το οποίο θα επιδράσει αρνητικά τόσο στον ρυθμό της ζύμωσης όσο και στον οργανοληπτικό χαρακτήρα του τελικού προϊόντος.

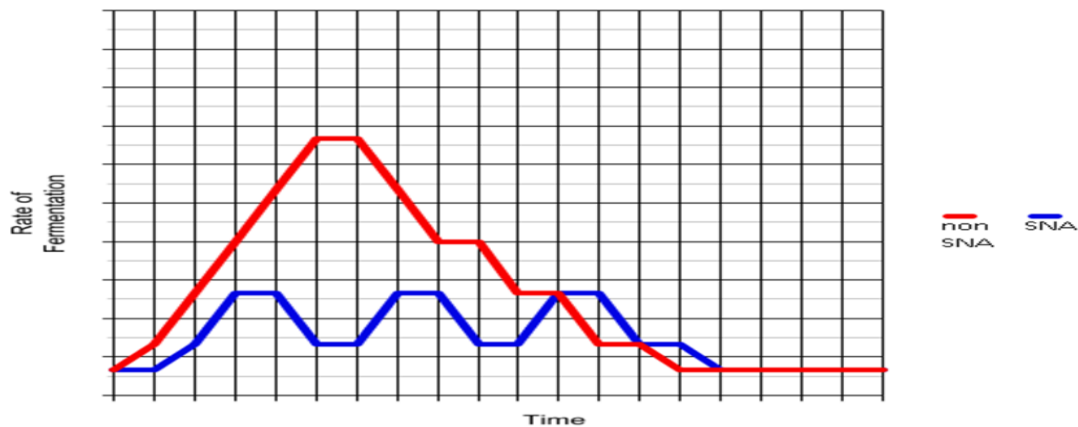
Έτσι, ο τρόπος προσθήκης και η δοσολογία είναι απαραίτητοι παράμετροι που πρέπει να προσδιοριστούν ή να πραγματοποιηθούν με τον βέλτιστο δυνατό τρόπο. Για την διευκόλυνση των παραγωγών υδρόμελου έχουν δημιουργηθεί πρωτόκολλα, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την πρόβλεψη αυτών των παραμέτρων. Συγκεκριμένα :

- **Μέθοδος All Up Front**

Κατά την μέθοδο για την αντιμετώπιση του ελλείμματος θρεπτικών συστατικών είναι η προσθήκη όλων των θρεπτικών συστατικών εκ των προτέρων. Το μεγαλύτερο πρόβλημα με την προσθήκη όλων των θρεπτικών συστατικών είναι η μεγάλη αύξηση βιομάζας. Τα κύτταρα ζύμης καταναλώνουν τα θρεπτικά συστατικά γρήγορα και αναπαράγονται γρήγορα. Αυτό προσθέτει πολλή θερμότητα στο σύστημα, η οποία μπορεί να προκαλέσει ζητήματα θερμής ζύμωσης, ιδίως την παραγωγή ανώτερων αλκοολών. Οι παραπάνω αλκοόλες θεωρούνται ανεπιθύμητες στην παραγωγή υδρόμελου και σημαίνουν επίσης ότι υπάρχουν μεγάλες πιθανότητες κολλημένης ζύμωσης, αφήνοντας το υδρόμελο πιο γλυκό από το προβλεπόμενο καθώς και αφήνοντας ενδιάμεσα υποπροϊόντα μαγιάς. Τα υδρόμελα που παρασκευάζονται με αυτή τη μέθοδο τείνουν να χρειάζονται αρκετό χρόνο για να χάσουν τα χαρακτηριστικά της μαγιάς τους και να κυριαρχήσουν τα χαρακτηριστικά του μελιού.

- **Staggered Nutrient Additions (SNA)**

Κατά αυτό το πρωτόκολλο, οι απαιτήσεις σε θρεπτικές ουσίες υπολογίζονται και η προσθήκη γίνεται σε μικρότερες δοσολογίες ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Κατά αυτόν τον τρόπο, αποφεύγεται το στρεσάρισμα των ζυμών και η παραγωγή ανεπιθύμητων αρωμάτων.



Διάγραμμα 10: Κλιμακωτές προσθήκες θρεπτικών ουσιών (SNA)

Πηγή: process/staggered_nutrient_additions - mead (reddit.com)

- **Tailored Organic Staggered Nutrient Additions (TOSNA)**

Σύμφωνα με αυτό το πρωτόκολλο, πραγματοποιείται προσθήκη Fermaid O, ενός σκευάσματος με υψηλή συγκέντρωση οργανικού αζώτου με την μορφή αμινοξέων, σε 4 δόσεις κατά την πρώτη εβδομάδα ζύμωσης. Οι πρώτες τρεις δόσεις προστίθενται στις 24 ώρες, στις 48 ώρες και τέλος στις 72 ώρες. Η τελική δόση προστίθεται όταν έχει καταναλωθεί το 1/3 της συγκέντρωσης των ζυμώσιμων σακχάρων ή διαφορετικά μετά από 7 ημέρες από την έναρξη της ζύμωσης, και εξαρτάται από όποιο από τα δύο συμβεί πρώτο.

- **Balathustrius**

Σύμφωνα με αυτό το πρωτόκολλο, χρησιμοποιούνται Fermaid O, Fermaid K, DAP ενώ προαιρετικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί και GoFerm. Μετά από 24 ώρες γίνεται προσθήκη Fermaid O είτε σε 1 είτε σε 2 δόσεις, και στην περίπτωση που πραγματοποιηθούν μέσω δύο δόσεων είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθεί κενό 24 ωρών μεταξύ των προσθηκών. Στη συνέχεια, αναμιγνύονται οι απαιτούμενες ποσότητες DAP και Fermaid K, και προστίθενται σε 2-3 στάδια. Τέλος, προστίθενται η τελική ποσότητα Fermaid O ύστερα από 24 ώρες. Ο αριθμός των προσθηκών θα εξαρτηθεί από την πρόοδο της ζύμωσης, ενώ ο στόχος είναι να προστεθεί το τελευταίο μίγμα DAP και Fermaid K όταν η συγκέντρωση της αλκοόλης είναι στο 9%.

- **Bray Denard**

Το πρωτόκολλο αυτό είναι ένα από τα πιο χρήσιμα καθώς επιτυγχάνεται εξαιρετική κινητική ζύμωσης δίχως την παραγωγή ανεπιθύμητων προϊόντων με απαραίτητη προϋπόθεση την σωστή εφαρμογή των μέτρων για τα υπόλοιπα στάδια της ζύμωσης. Για την εφαρμογή του πρωτοκόλλου, απαιτούνται Fermaid O, ανθρακικό κάλιο, Fermaid K (για υγρές ζύμες) και GoFerm (για ξηρές ζύμες). Για την χρήση ξηρών ζυμών απαιτείται προσθήκη GoFerm και ακολουθεί η προσθήκη 0,4 g/L ανθρακικού καλίου. Μέσω της προσθήκης ανθρακικού καλίου εξασφαλίζεται η παρουσία καλίου για τις ζύμες, ενώ η παρουσία του ανθρακικού έχει ρυθμιστικό χαρακτήρα στο pH.

Τέλος, προστίθενται Fermaid O κατά την δεύτερη και τέταρτη μέρα ζύμωσης σύμφωνα με τον πίνακα 10:

Πίνακας 10 : Προσθήκη Fermaid O

Αρχική πυκνότητα (g/mL)	Fermaid O g/US gal	Fermaid O g/L
1.090 ή χαμηλότερη	2.72g	0.72g
1.100	1.20g	0.32g
1.110	1.51g	0.40g
1.120	1.97g	0.52g
1.130	2.12g	0.56g
1.140	2.42g	0.64g
1.150	2.72g	0.72g

Πηγή: process/nutrient_schedules - mead (reddit.com)

Για υγρές ζύμες απαιτείται η προετοιμασία της υγρής μαγιάς και στην συνέχεια η προσθήκη 0,4 g/L ανθρακικού καλίου. Στη συνέχεια προστίθενται 0,378 g/L Fermaid K και τέλος προστίθενται Fermaid O την δεύτερη και τέταρτη ημέρα της ζύμωσης. Ο υπολογισμός της δόσης πραγματοποιείται με την χρήση του παραπάνω πίνακα.

ΚΕΦ. 5 :ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΩΝ ΑΡΘΡΩΝ ΓΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΥΔΡΟΜΕΛΟΥ

Η παραγωγή υδρόμελου είναι ευρέως διαδεδομένη στους ερασιτέχνες και υπάρχει πληθώρα συνταγών αλλά και συμβουλών για την δημιουργία ενός ποιοτικού προϊόντος. Η πραγματοποίηση ζυμώσεων από ερευνητές δίνει την δυνατότητα της καταγραφής και σύγκρισης παραμέτρων της ζύμωσης, που δεν είναι εφικτό να μετρηθούν από ερασιτέχνες παραγωγούς. Οι μελέτες αυτές μπορούν να δώσουν πολύτιμα δεδομένα τα οποία θα βοηθήσουν στην ποιοτική αναβάθμιση του υδρόμελου.

Κατά την πρώτη έρευνα του Mendes-Ferreira et al.(2013), δόθηκαν στοιχεία τα οποία οδήγησαν στο συμπέρασμα πως η προσθήκη οργανικών οξέων στην ζύμωση του υδρόμελου δεν επίδρασε καθόλου στο προφίλ ανάπτυξης αλλά και στην ζύμωση. Αντίθετα, η προσθήκη DAP μείωσε το χρόνο ζύμωσης, βελτίωσε τη διάσπαση των σακχάρων και οδήγησε στην δημιουργία αρωματικών ενώσεων.

Κατά την δεύτερη έρευνα του Paruga et al. (2022), ο σκοπός της έρευνας ήταν η δημιουργία μαθηματικών μοντέλων που σχετίζονται με την επίδραση της αρχικής περιεκτικότητας σε ξηρή ύλη, σε ζυμομύκητα και σε θρεπτικά στοιχεία στον ρυθμό ζύμωσης, την περιεκτικότητα σε αλκοόλ και την περιεκτικότητα σε ξηρή ύλη στο τελικό προϊόν, το υδρόμελο. Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι η αρχική περιεκτικότητα σε ξηρή ουσία και η συγκέντρωση σε θρεπτικά στοιχεία είχε σημαντική επίδραση στον ρυθμό ζύμωσης αλλά και στην περιεκτικότητα σε αλκοόλη.

Σε άλλη έρευνα του Mendes-Ferreira et al. (2019), ο σκοπός της έρευνας ήταν η αξιολόγηση του αρωματικού προφίλ και της ποιότητας του υδρόμελου που παράχθηκε από αλκοολική ζύμωση με την χρήση ακινητοποιημένων κυττάρων ζυμομυκήτων σε μονοστρωματικό αλγινικό ασβέστιο ή σε διπλό στιβάδα αλγινικής χιτοσάνης. Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι η χρήση ακινητοποιημένων ζυμών δεν επηρέασε αρνητικά την διαδικασία της ζύμωσης, και ώθησε την παραγωγή αρωματικών ενώσεων που εμπλούτισαν το αρωματικό προφίλ του υδρόμελου. Παρ' όλα αυτά, η έρευνα δεν προσδιορίζει την καταλληλότητα για την χρήση ακινητοποιημένων ζυμών σε εμπορική παραγωγή καθώς δεν έχει ληφθεί υπόψιν το κόστος για την αγορά μηχανημάτων που απαιτούνται, καθώς και ο κίνδυνος για την αρνητική επίδραση στην ζύμωση ή στο τελικό προϊόν από μεταβολικές διεργασίες που πραγματοποιούνται από αλλοιωμένη μαγιά.

Στην έρευνα των Starowicz και Granvogl (2020), πραγματοποιήθηκε ανάλυση της ζύμωσης του υδρόμελου η οποία χωρίζεται σε δύο σκέλη. Κατά το πρώτο σκέλος, αναλύονται γενικές πτυχές για την παραγωγή υδρόμελου και χαρακτηριστικές παράμετροι της ζύμωσης όπως η παραγόμενη αιθανόλη, το pH, τα υπολειμματικά σάκχαρα, η περιεκτικότητα σε άζωτο κ.α. Στο δεύτερο σκέλος της έρευνας, αναλύονται το αρωματικό προφίλ καθώς και παράγοντες που μπορεί να το επηρεάσουν. Στο τέλος της εργασίας τους, μετά από ζυμώσεις διαφόρων μελιών, κατέληξαν στο συμπέρασμα η επιλογή του είδους μελιού που θα χρησιμοποιηθεί είναι ένας από τους βασικούς παράγοντες που θα καθορίσουν το αρωματικό προφίλ και την επιτυχία της ζύμωσης.

Ακόμα μια έρευνα για την παραγωγή υδρόμελου, είναι αυτή της Gomes et al. (2019), οι οποίοι εξέτασαν την βελτιστοποίηση της παραγωγής υδρόμελου μέσω της μεθόδου RSM (Response Surface Methodology) και την χρήση του στατιστικού μοντέλου ANOVA. Κατά την μεθοδολογία RSM περιλαμβάνονται διαδικασίες βελτιστοποίησης και ρυθμίσεις παραγοντικών μεταβλητών, έτσι ώστε η απόκριση να φτάσει σε μια επιθυμητή μέγιστη ή ελάχιστη τιμή. Επίσης, μέσω του στατιστικού μοντέλου ANOVA πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος για την ανίχνευση διαφορών στις μέσες τιμές των πειραματικών δεδομένων. Πραγματοποιήθηκε ζύμωση σε θερμοκρασία 24°C, ενώ προστέθηκαν θρεπτικά στοιχεία σε συγκέντρωση 0,88 g/L σε αραιωμένο μέλι Τα αποτελέσματα του πειράματος έδειξαν, μετά από την σύγκριση με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας, πως δεν υπήρχαν διαφορές και οι τιμές ήταν αρκετά παρόμοιες, με την μελέτη να καθίσταται χρήσιμη καθώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την βελτιστοποίηση της παραγωγής.

Στην έρευνα των Carneiro e Silva (2022), διαπιστώθηκε ότι η ανακύκλωση κυττάρων είναι μια σημαντική στρατηγική μηχανικής διαδικασίας για τη μείωση του κόστους που σχετίζεται με τη βελτίωση της απόδοσης του προϊόντος και την εξοικονόμηση ενέργειας. Η χρήση της ανακύκλωσης κυττάρων σε τρεις διαδοχικές παρτίδες ζύμωσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην παραγωγή υδρομελιού. Η χρήση μικρότερων χρόνων ζύμωσης σε κάθε παρτίδα, καθώς και υψηλότερη συγκέντρωση κυττάρων στη δεύτερη παρτίδα, θα μπορούσε να βοηθήσει στην αύξηση των παραμέτρων ζύμωσης, στη μείωση του κόστους διεργασίας και στην τυποποίηση των τελικών προϊόντων.

Σύμφωνα με την έρευνα των Schwarz, et. al. (2020), η επιλογή των στελεχών ζυμομύκητα με βάση τη χαμηλή τους ζήτηση αζώτου και την παραγωγή πτητικών ενώσεων μπορεί να διερευνηθεί από τους παρασκευαστές υδρομελιού προκειμένου να αποφευχθούν προβλήματα ζύμωσης και να ληφθούν χαρακτηριστικά προϊόντα και από τους εκτροφείς ζυμομύκητες να επιλέξουν ζυμομύκητες (εμπορικά ή γηγενή) για να ληφθούν υψηλής ποιότητας υδρόμελια χαμηλής εισροής.

Πειραματικά δεδομένα της μελέτης των Schwarz et. al. (2021), έδειξαν ότι για να βελτιστοποιηθεί η ζύμωση του μούστου μελιού και η παραγωγή υδρομελιού, το μέλι-μούστος θα πρέπει να συμπληρωθεί με άζωτο προκειμένου να ληφθούν τουλάχιστον 150 mg/L YAN, που σχετίζονται με ένα συμπλήρωμα μετάλλων για την επίτευξη 465 mg/L καλίου (K⁺). Επιπλέον, η προσθήκη βιταμινών μπορεί να επηρεάσει σημαντικά τον ρυθμό ζύμωσης και την πτητική οξύτητα και να επηρεάσει τη ζύμωση και την ποιότητα του υδρομελιού.

ΚΕΦ. 6 : ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Το υδρόμελο αποτελεί ένα από τα αρχαιότερα αλκοολούχα ποτά το οποίο όπως αποδείχθηκε, αποτελούσε τον αντικαταστάτη του οίνου στις χώρες που δεν ήταν ευνοϊκή η καλλιέργεια της αμπέλου. Η διάδοση του στην Αμερική, αλλά και στις υπόλοιπες χώρες του κόσμου αποδεικνύουν ότι είναι ένα πότο το οποίο αρχίζει να κερδίζει ξανά την θέση του στις διεθνείς αγορές.

Σκοπός αυτής της μελέτης ήταν ο προσδιορισμός του ρόλου του αζώτου στην παραγωγή του υδρόμελου, αλλά και ο εντοπισμός των παραμέτρων που επηρεάζει τόσο η παρουσία όσο και η απουσία του. Η προσθήκη ποσότητας αζώτου για την πραγματοποίηση της αλκοολικής ζύμωσης είναι απαραίτητη, καθώς η συγκέντρωση του αφομοιώσιμου αζώτου στο μέλι είναι σε πολύ χαμηλά επίπεδα κάτι το οποίο δεν επιτρέπει την ομαλή διεξαγωγή της.

Για την επιλογή της ποσότητας και του σκευάσματος θα πρέπει να ληφθούν υπόψη απαραίτητα η μορφή και ο τρόπος προσθήκης, καθώς καθορίζουν σημαντικά την κινητική της ζύμωσης αλλά και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος. Η ενασχόληση πολλών παραγωγών και ερευνητών έχει οδηγήσει στη δημιουργία ηλεκτρονικών εργαλείων τα οποία χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της απαιτούμενης ποσότητας, των χρόνων προσθήκης και ταυτόχρονα προτείνουν το κατάλληλο σκεύασμα συνυπολογίζοντας το είδος του υδρόμελου που πρόκειται να παραχθεί. Θα είναι χρήσιμο να γίνουν επιπλέον μελέτες με σκευάσματα διαφορετικών εταιρειών για τη διαπίστωση της επίδρασης τους στη ζύμωση και στα χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος.

Τέλος, απαραίτητη προϋπόθεση για τον υπολογισμό της απαιτούμενης ποσότητας είναι η επιλογή του κατάλληλου στελέχους ζυμομύκητα, ανάλογα με τις απαιτήσεις του σε αφομοιώσιμο άζωτο, καθώς στον μεγαλύτερο βαθμό είναι αυτό που θα καθορίσει την τελική σύσταση του προϊόντος τόσο οργανοληπτικά όσο και ποσοτικά και ποιοτικά.

ΚΕΦ. 7 : ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξενογλώσση Βιβλιογραφία

- Ajibola, A., Chamunorwa, J.P. & Erlwanger, K.H. (2012). Nutraceutical values of natural honey and its contribution to human health and wealth. *Nutr Metab (Lond)* 9, 61 <https://doi.org/10.1186/1743-7075-9-61>
- Akalin H., Bayram M., Anli R., (2017) Determination of some individual phenolic compounds and antioxidant capacity of mead produced from different types of honey (2017) *Journal of the Institute of Brewing* Volume 123, Issue 1 p. 167-174 <https://doi.org/10.1002/jib.396>
- Akalin, P., Bucak M., Gungor S., Baspinar S., Cuyan K., Dursun S., İli P., Aksoy A., Karasor O.F., Bilgili A., Sariozkan S., Deniz Yeni S.D (2016). Influence of lycopene and cysteamine on sperm and oxidative stress parameters during liquid storage of ram semen at 5°C. *Small Ruminant Research*, Vol. 137, pp 117-123, ISSN 0921-4488, <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.03.017>.
- Alvarez-Suarez, José & Tulipani, Sara & Romandini, Stefania & Bertoli, Enrico & Battino, Maurizio. (2010). Contribution of honey in nutrition and human health: A review. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*. 3. 15-23. DOI:10.1007/s12349-009-0051-6.
- Arranz S, Chiva-Blanch G, Valderas-Martínez P, Medina-Remón A, Lamuela-Raventós RM, Estruch R. (2012). Wine, Beer, Alcohol and Polyphenols on Cardiovascular Disease and Cancer. *Nutrients*. 2012; 4(7):759-781. <https://doi.org/10.3390/nu4070759>
- Atagun E., Aalbayrak A., (2021) Analysis of Honey Production with Environmental Variables DOI:10.1109/UBMK52708.2021.9558933
- Bahiru, B, Tetemke Mehari, Mogessie Ashenafi, (2006). Yeast and lactic acid flora of tej, an indigenous Ethiopian honey wine: Variations within and between production units, *Food Microbiology*, Vol. 23, Issue 3, pp 277-282, ISSN 0740-0020, <https://doi.org/10.1016/j.fm.2005.05.007>.
- Benes, V., Collier, P., Kordes, C. *et al.* Identification of cytokine-induced modulation of microRNA expression and secretion as measured by a novel microRNA specific qPCR assay. *Sci Rep* 5, 11590 (2015). <https://doi.org/10.1038/srep11590>

- Blateyron-Pic L., Julien-Ortiz A., Sablayrolles J.M., (2003). Stuck fermentations: Oxygen and nitrogen requirements - Importance of optimising their addition.
- Bogdanov, Stefan & Jurendic, Tomislav & Sieber, Robert & Gallmann, Peter. (2009). Honey for Nutrition and Health: A Review. *Journal of the American College of Nutrition*. DOI: [10.1080/07315724.2008.10719745](https://doi.org/10.1080/07315724.2008.10719745)
- Bouacha, Mabrouka & Ayed, Hayette & Grara, Nedjoud. (2018). Honey Bee as Alternative Medicine to Treat Eleven Multidrug-Resistant Bacteria Causing Urinary Tract Infection during Pregnancy. *Scientia Pharmaceutica*. <https://doi.org/10.3390/scipharm86020014>
- Brice C., Sanchez I., Tesniere C., Blondin B. (2014) Assessing the Mechanisms Responsible for Differences between Nitrogen Requirements of *Saccharomyces cerevisiae* Wine Yeasts in Alcoholic Fermentation doi: [10.1128/AEM.03856-13](https://doi.org/10.1128/AEM.03856-13)
- Briskin D., Leroy A., Briskin M.(2000) Influence of nitrogen on the production of hypericins by St. John's wort DOI: [10.1016/S0981-9428\(00\)00754-3](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(00)00754-3)
- Silva A., Anunciação A., Canettieri E., Bispo J., Martinez E., (2022) Reuse of cells in mead production using *Tamarindus indica* pulp as an unconventional supplement. <https://doi.org/10.1007/s00217-022-04068-x>
- Childs, B. C., Bohlscheid, J.C., Edwards, C G.(2015). Impact of available nitrogen and sugar concentration in musts on alcoholic fermentation and subsequent wine spoilage by *Brettanomyces bruxellensis*, *Food Microbiology*, Vol. 46, pp 604-609, <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.10.006>
- Copeland, R.A. (1994). Methods for Protein Quantitation. In: *Methods for Protein Analysis*. Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-1505-7_3
- Cortese M., Gigliobianco M., Peregrina D., Di Martino P., Campisi B., Censi R., Khamitova., Angeloni S., Caprioli G., Zannoti M., Ferraro S., Giovannetti R., Angeloni C., Lupidi G., Pruccoli L., Tarozzi A., Voinovich D., Martino P., (2019) Optimization of the Extraction from Spent Coffee Grounds Using the Desirability Approach doi: 10.3390/antiox9050370
- Cortese M., Gigliobianco M., Peregrina D., Sagratini G., Censi R., Martino P. Quantification of phenolic compounds in different types of craft beers, worts, starting and spent ingredients by liquid chromatography-tandem mass spectrometry DOI: [10.1016/j.chroma.2019.460622](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460622)

- Czibulya Z., Horváth I., Kollár L., Nikfardjam M., Kunsági-Máté S., (2015). The effect of temperature, pH, and ionic strength on color stability of red wine. *Tetrahedron*. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2015.01.036>
- Doner, L. W. (1977). The sugars of honey—A review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 28(5), 443-456. doi:10.1002/jsfa.2740280508
- Ferreira A., Barbosa C., Lage P., Faia-Mendes A., (2011) The impact of nitrogen on yeast fermentation and wine quality : <https://www.researchgate.net/publication/285948336>
- Fornairon-Bonnefond,C., Aguera E., Deytieux C., Sablayrolles J.M., Salmon, J.M.(2003) Impact of oxygen addition during enological fermentation on sterol contents in yeast lees and their reactivity towards oxygen. *Journal of Bioscience and Bioengineering* Volume 95, Issue 5, 2003, Pages 496-503 [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(03\)80051-8](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(03)80051-8)
- Geisler J., & Weiß N., (2015). Free Amino Nitrogen (FAN) Measurement in Beer using an Eppendorf BioSpectrometer. SHORT PROTOCOL No. 09 I June 2015 Eppendorf North America
- Gilliam M., Jackson K.K. (1972) Enzymes in honey bee (*Apis mellifera* L.) hemolymph. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* Volume 42, Issue 3, Pages 423-427. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(72\)90258-1](https://doi.org/10.1016/0305-0491(72)90258-1)
- Godillot J., Sanchez I., Perez M., Picou C., Galeote V., Sablayrolles J., Farines V., Mouret J. (2022), The Timing of Nitrogen Addition Impacts Yeast Genes Expression and the Production of Aroma Compounds During Wine Fermentation. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.829786>
- Gomes T., Barradas C., Dias T., Verdial J., Morais J., Ramalhosa E., Estevinho L. (2013) Optimization of mead production using Response Surface Methodology. *Food and Chemical Toxicology* pp 680-686 <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.06.034>
- Hermosin I., Chicon R., Cabezudo M.D.(2003) Free amino acid composition and botanical origin of honey. *Food Chemistry* Volume 83, Issue 2, November 2003, Pages 263-268 [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00089-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00089-X)
- Hernandez R, Kershaw KN, Siddique J, Boehm JK, Kubzansky LD, Diez-Roux A, Ning H, Lloyd-Jones DM. (2015). Optimism and Cardiovascular Health: Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Health Behav Policy Rev.* Jan;2(1):62-73. DOI: [10.14485/HBPR.2.1.6](https://doi.org/10.14485/HBPR.2.1.6)
- Hill A., Stewart G., (2019) Free Amino Nitrogen in Brewing <https://doi.org/10.3390/fermentation5010022>

- Iglesias A., Pascoal A., Choupina A., Carvalho C., Feas., Estevinho L. (2014) Developments in the fermentation process and quality improvement strategies for mead production DOI: [10.3390/molecules190812577](https://doi.org/10.3390/molecules190812577)
- Imperiale S., Morozova K., Ferrentino G., Alam M., Scampicchio M., Fast Detection of 5-Hydroxymethylfurfural in Dulce de Leche by SPE-LC– MS, Food Analytical Methods volume 15, pages1–9 (2022) <https://doi.org/10.1007/s12161-021-02093-2>
- Jaganathan S., Mandal M. (2009) Antiproliferative effects of honey and of its polyphenols: a review DOI: [10.1155/2009/830616](https://doi.org/10.1155/2009/830616)
- Jiranek V., Langridge P., Henschke P.A. (1995) Amino Acid and Ammonium Utilization by Kerr N., (2011) Advantages and Limitations of the Ninhydrin Test for Analysis of Historic DOI: [10.1128/AEM.61.2.461-467.1995](https://doi.org/10.1128/AEM.61.2.461-467.1995)
- Kumar V., Choudhary A., Suri S., Kumar S. (2020) 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) formation, occurrence and potential health concerns: recent developments DOI: [10.1080/15569543.2020.1756857](https://doi.org/10.1080/15569543.2020.1756857)
- Kuś M.P. (2020) Honey as Source of Nitrogen Compounds: Aromatic Amino Acids, Free Nucleosides and Their Derivatives <https://doi.org/10.3390/molecules25040847>
- Lekkas C., Stewart G., Hill A., Taidi B., Hodgson J., (2005) The Importance of Free Amino Nitrogen in Wort and Beer DOI: [10.1094/TQ-42-0113](https://doi.org/10.1094/TQ-42-0113)
- Lin N., Yu X. (2021) Overview of yeast environmental stress response pathways and the development of tolerant yeasts. Systems Microbiology and Biomanufacturing volume 2, pp 232–245 DOI: [10.1007/s43393-021-00058-4](https://doi.org/10.1007/s43393-021-00058-4)
- Lowry, OH; Rosebrough, NJ; Farr, AL; Randall, RJ (1951). “Protein measurement with the Folin phenol reagent”. Journal of Biological Chemistry. 193 (1): 265–75. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)
- Luisa Vivian Schwarz, Angela Rossi Marcon, Ana Paula Longaray Delamare & Sergio Echeverrigaray (2021) Influence of nitrogen, minerals and vitamins supplementation on honey wine production using response surface methodology, Journal of Apicultural Research, 60:1, 57-66, DOI: [10.1080/00218839.2020.1793277](https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1793277)
- Malherbe S., Fromion V., Hilgert N., Sablayrolles J-M (2004) Modeling the effects of assimilable nitrogen and temperature on fermentation kinetics in enological conditions, Biotechnology and Bioengineering Volume 86, Issue 3 p. 261-272 <https://doi.org/10.1002/bit.20075>

- Mate A., Osés S., Fernández-Muiño M., Sancho T. (2017) Analysis of Polyphenols in Honey: Extraction, Separation and Quantification Procedures DOI: 10.1080/15422119.2017.1354025
- Mate A., Osés S., Fernández-Muiño M., Sancho T. (2018) Methods of analysis of honey <https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1411178>
- Mendes-Ferreira, A. F. Cosme, C. Barbosa, V. Falco, A. Inês, A. Mendes-Faia, (2010). Optimization of honey-must preparation and alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* for mead production, *International Journal of Food Microbiology*, Volume 144, Issue 1. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.016>
- Nurhadi B., Ikhsan M, Tensiska T (2019) Rheological Properties of Honey and its Application on Honey Flow Simulation through Vertical Tube DOI: [10.1088/1755-1315/334/1/012041](https://doi.org/10.1088/1755-1315/334/1/012041)
- Ough, C.S. and A.A. Bell. (1980). Effects of nitrogen fertilization of grapevines on amino acids metabolism and higher-alcohol formation during grape juice fermentation. DOI: 10.5344/ajev.1980.31.2.122
- Papuga S., Pećanac I., Stojkovic M, Savic A., Velemir A.,(2022) Mead fermentation parameters: Optimization by response surface methodology <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2022-1-137-147>
- Perreira A., Ferreira, Oliveira J., Estevinho L., Mendes A., (2015) Mead production: effect of nitrogen supplementation on growth, fermentation profile and aroma formation by yeasts in mead fermentation *Journal of the Institute of Brewing* Volume 121, Issue 1 p. 122-128 <https://doi.org/10.1002/jib.184>
- Pereira A., Ferreira A, Dias L., Oliveira J., Estevinho L.M., Mendes-Faia A., (2019). Volatile Composition and Sensory Properties of Mead. *Microorganisms*. 7. DOI: [10.3390/microorganisms7100404](https://doi.org/10.3390/microorganisms7100404)
- Roldán, S., Blanco C.; Granda M.; Menéndez R.; Santamaria R (2011) Towards a further generation of high-energy carbon-based capacitors by using redox-active electrolytes. DOI: [10.1002/anie.201006811](https://doi.org/10.1002/anie.201006811)
- Romandini S., Tulipani S., Alvarez-Suarez J., Battino M. (2010) Contribution of honey : a review <http://dx.doi.org/10.1007/s12349-009-0051-6>
- Rossano R, Larocca M, Polito T, Perna AM, Padula MC, Martelli G, Riccio P. (2012). What are the proteolytic enzymes of honey and what they do tell us? A fingerprint analysis by 2-D zymography of unifloral honeys. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049164>

- Sablaylorles J., Barre P., (1993) Kinetics of Alcoholic Fermentation Under Anisothermal Enological Conditions. I. Influence of Temperature Evolution on the Instantaneous Rate of Fermentation DOI:[10.5344/ajev.1993.44.2.127](https://doi.org/10.5344/ajev.1993.44.2.127)
- Seguinot P., Rollero S., Sanchez I., Sblayrolles J., Ortiz-Julien A., Camarasa C., Mouret J.(2018) Impact of the timing and the nature of nitrogen additions on the production kinetics of fermentative aromas by *Saccharomyces cerevisiae* during winemaking fermentation in synthetic media, *Food Microbiology* pp 29-39 <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.04.005>
- Schwartz L., Marcon A., Delamare A., Agostini F., Moura S., Echeverrigaray S. (2020) Selection of low nitrogen demand yeast strains and their impact on the physicochemical and volatile composition of mead. *J Food Sci Technol* **57**, 2840–2851. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04316-6>
- Śmigielska, H, & Lewandowicz, J. (2017). Current Trends in Commodity Science Food safety and analysis of bioactive substances.
- Smogrovicova, Daniela & Nadasky, Pavol & Lich, R.T. & Wilhelmi, Brendan & Cambray, Garth. (2012). Analytical and Aroma Profiles of Slovak and South African Meads. *Czech Journal of Food Sciences* DOI: 10.17221/113/2011-CJFS
- Sroka, Paweł & Satora, Paweł. (2016). The influence of hydrocolloids on mead wort fermentation. *Food Hydrocolloids*. Volume 63, February 2017, Pages 233-239 <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.08.044>
- Sroka, Paweł & Tuszyński, Tadeusz. (2007). Changes in organic acid contents during mead wort fermentation. *Food Chemistry - FOOD CHEM.* 104. 1250-1257. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.046>
- Starowicz, M. and M. Granvogl, (2020). Trends in food science & technology an overview of mead production and the physicochemical, toxicological, and sensory characteristics of mead with a special emphasis on flavor, *Trends in Food Science & Technology*, Vol. 106, pp 402-416, ISSN 0924-2244, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.09.006>.
- Švecová, B., Miroslava Bordovská, Dagmar Kalvachová, Tomáš Hájek, (2015). Analysis of Czech meads: Sugar content, organic acids content and selected phenolic compounds content. *Journal of Food Composition and Analysis*, Vol. 38, pp 80-88, ISSN 0889-1575, <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2014.11.002>.
- Tesfaye B, Begna D, Eshetu M (2016). Evaluation of Physico-Chemical Properties of Honey Produced in Bale Natural Forest, Southeastern Ethiopia. *Int J Agricultural Sci Food Technology* 2(1): 021-027 <http://dx.doi.org/10.17352/2455-815X.000010>

- Tesniere C., Delobel P., Pradal M., Blondin B. (2013) Impact of nutrient imbalance on wine alcoholic fermentations : Nitrogen excess enhances yeast cell death in lipid-limited must <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061645>
- Ukpabi U., (2006). Quality evaluation of meads produced with cassava (*Manihot esculenta*) floral honey under farm conditions in Nigeria. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 6. 37-41.
- Varela C., Pizarro F., Agosin E. (2004) Biomass Content Governs Fermentation Rate in nitrogen-deficient wine musts. *Applied and Environmental Microbiology* <https://doi.org/10.1128/AEM.70.6.3392-3400.2004>
- Wintersteen, C.L., Andrae, L.M. and Engeseth, N.J. (2005), Effect of Heat Treatment on Antioxidant Capacity and Flavor Volatiles of Mead. *Journal of Food Science*, 70: C119-C126. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb07071.x>
- Wool Fibers. *MRS Online Proceedings Library (OPL)* , Volume 352: Symposium – Materials Issues in Art and Archaeology IV , 1995, 233. DOI: <https://doi.org/10.1557/PROC-352-233>
- Yanniotis S., Skaltsi S., Karaburnioti S., (2006) Effect of moisture content on the viscosity of honey at different temperatures. *Journal of Food Engineering* Volume 72, Issue 4, Pages 372-377. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.12.017>
- Zoecklein, B. W., Fugelsang, K. C., Gump, B. H., & Nury, F. S. (1999). *Wine Analysis and Production*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4757-6967-8>

Ελληνική Βιβλιογραφία

- Ακαρέπης, Εργαστηριακές ασκήσεις για το μάθημα Βασικές Τεχνικές Οινοποίησης (2007)
- Βέκιος Γ. Κουκής Δ., Τσακίρης Α. (2011) Το βιβλίο του κρασιού, Εκδόσεις Ψυχάλου.
- Θρασυβούλου Α. (2012). *Πρακτική Μελισσοκομία. Προβλήματα, αιτίες και λύσεις.* Μελισσοκομική Επιθεώρηση. Αθήνα.
- Μαναβή Χ., Παπαδόπουλος Α., Μήτσιου-Πολυχρονίδου, Γ. (2019). *Το μέλι στην τοπική οικονομία από την αρχαιότητα ως σήμερα. Οι εφαρμογές στην καθημερινή ζωή και τον τουρισμό.* Θεσσαλονίκη, Αμερικάνικη Γεωργική Σχολή.
- Νεραντζής Η., Ταταρίδης Π., Κεχαγιά Δ.. (2014) *Τεχνολογίες Βύνης & Ζύθου.* Βιβλιοθήκη του Ζύθου.
- Πουλάς, Κ., & Σιδέρης, Σ. (2015). *Εργαστηριακές μέθοδοι ανάλυσης πρωτεϊνών* [Εργαστηριακός Οδηγός]. Κάλλιπος, Ανοικτές Ακαδημαϊκές Εκδόσεις. <https://hdl.handle.net/11419/2578>
- Τσακίρης Α. (2021) Ελληνική οινογνωσία, Εκδόσεις Ψυχάλου.

Διαδικτυακές πηγές

- [https://www.eurolab.com.tr/el/sektorel-test-ve-analizler/gida-testleri/hmf-hidroksmetilfurfural-analizi.\(2017\)](https://www.eurolab.com.tr/el/sektorel-test-ve-analizler/gida-testleri/hmf-hidroksmetilfurfural-analizi.(2017))
- <https://www.aua.gr/fasseas/Kefalaio7.pdf>
- Δήμου, Μ. (2019) Ανακτήθηκε από: <https://www.iama.gr/ethno/arta/pollen.pdf>
- Γκακνή, Δ και Σταθακάρου, Μ. Ε., (2019). Ανακτήθηκε από <https://www.mednutrition.gr/portal/efarmoges/leksiko-diatrofis/16137-gyri>
- <https://www.legislation.gov.uk/uksi/2015/1348/made>
- Ρούσης, Ι., και Μπαδέκα, Α., (2020). Ανακτήθηκε από <https://chem.uoi.gr/wp-content/uploads/2021/05/simeioseis-eatt-2020.pdf>
- <http://www.hoap.co.uk/mead.pdf>
- Ανακτήθηκε από <https://www.nhb.org/> (2023)
- Sharma K., (2022) ανακτήθηκε από <https://thechemistrynotes.com/protein-assay-methods-principle-advantages-uses/>
- Sablayrolles J. & Guillaumon ανακτήθηκε από <https://www.lallemandwine.com/wp-content/uploads/2015/07/WE8-The-many-roles-of-nitrogen-in-alcoholic-fermentation.pdf>
- Dharmadhikari M. ανακτήθηκε από <https://www.extension.iastate.edu/wine/wp-content/uploads/2021/09/nitrogenmetabolismduringfermentation.pdf>
- Tesfaye B., Begna D. & Eshetu M. ανακτήθηκε από <https://www.peertechzpublications.com/articles/evaluation-of-physico-chemical-properties-of-honey-produced-in-bale-natural-forest-southeastern-ethiopia.pdf>
- INTERNATIONAL ORGANISATION OF VINE AND WINE 2022 <https://www.oiv.int/sites/default/files/publication/2022-10/Compendium%20Methods%20of%20Analysis%20of%20Wine%20and%20Musts%20Vol1%20and%20Vol2.pdf>
- <https://www.asor.org/anetoday/2020/05/ancient-lands-honey/> ανακτήθηκε στις 19/4/23
- <https://www.statista.com/statistics/1140781/poland-mead-production/>
- <https://meadist.com/mead-articles/mead-fastest-growing-segment-us-alcohol-industry/>
- <https://www.industryarc.com/Research/Global-Mead-Beverages-Market-Research-513219>
- <https://usabeerratings.com/en/blog/news-3/mead-an-ancient-drink-of-the-gods-makes-a-comeback-163.htm>
- <https://www.winemak-in.com/en/publications/the-many-roles-of-nitrogen-in-alcoholic-fermentation>
- [process/nutrient_schedules - mead \(reddit.com\)](https://www.reddit.com/r/beer/comments/10j8k1g/process/nutrient_schedules_-_mead/)
- [process/staggered_nutrient_additions - mead \(reddit.com\)](https://www.reddit.com/r/beer/comments/10j8k1g/process/staggered_nutrient_additions_-_mead/)

- <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/189/953/aa0100bul.pdf>
- https://en.wikipedia.org/wiki/S%C3%B8rensen_formol_titration
- [BT 0413 – Bioseparation Technology Laboratory Department of Biotechnology SRM *University* I.ESTIMATION OF PROTEIN BY LOWRY’S METHOD](#)
- <https://goldbio.com/documents/3604/Bardford%20Protein%20Assay.pdf>
- https://ag.purdue.edu/department/foodsci/extension/winegrapeteam/_docs/nopa98.pdf
- <https://atpgroup.com/product/diammonium-phosphate-dap/>
- <https://shop.scottlab.com/fermaid-o-fermo>
- <https://catalogapp.lallemandwine.com/uploads/nutrient/docs/1b340d1ae3fc0a693339355555cdfcfa4971a1e4.pdf>
- <https://catalogapp.lallemandwine.com/uploads/nutrient/docs/fa50e483a6ddb708bb223aa8ef6218c5be03ba00.pdf>
- <https://www.thermofisher.com/gr/en/home/life-science/lab-equipment/ph-electrochemistry/ion-concentration-measurement-ise.html>
- <https://www.hannainstruments.co.uk/electrodes-and-probes/2059-ammonia-combination-ise-electrode>
- https://img.en25.com/Web/ThermoFisherScientificLPG/%7B334674b9-fe2e-4a8b-bdec-eb0c5c3614b4%7D_WBM_Monitoring_nitrogen_levels_in_wine.pdf
- <https://brainly.in/question/14015319>