

Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Καλαμάτας  
Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας  
Τμήμα Τεχνολογίας Γεωργικών Προϊόντων

Βιολογία  
Νέο

## ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Αλκοολική ζύμωση στην παραγωγή της μπύρας –  
Νέες τάσεις»



Αλέξανδρος Κοψαχείλης

Καλαμάτα 2005

Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Καλαμάτας  
Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας  
Τμήμα Τεχνολογίας Γεωργικών Προϊόντων

## ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Αλκοολική ζύμωση στην παραγωγή της μπύρας –  
Νέες τάσεις»



Αλέξανδρος Κοψαχείλης

Εισηγήτρια: Μαρίνα Παπαδέλλη

Καλαμάτα 2005

## Περίληψη

Παρόλο που η ζυθοποιία έχει μια μακρά παράδοση, βρίσκεται στο επίκεντρο πολλών επιστημονικών ερευνών που στοχεύουν στη περαιτέρω ανάπτυξη της ζυθοποιίας και βελτίωση της ποιότητας του παραγόμενου προϊόντος.

Οι έρευνες που γίνονται μέχρι σήμερα επικεντρώνονται κυρίως σε θέματα όπως: α) Η γενετική τροποποίηση των ζυμών ζυθοποιίας, δημιουργώντας ζύμες με τα επιθυμητά χαρακτηριστικά, β) η γενετική τροποποίηση του κριθαριού, δημιουργώντας ποικιλίες κριθαριού με τα επιθυμητά χαρακτηριστικά για τη βυνοζυθοποιία, γ) βελτιωμένοι και οικονομικότεροι τρόποι διήθησης και δ) χρήση νέων τεχνολογιών κατά το στάδιο της αλκοολικής ζύμωσης.

Οι δύο πρώτες βιοτεχνολογικές τεχνικές δεν έχουν σοβαρές προοπτικές βιομηχανικής ανάπτυξης για την ώρα, λόγω της δυσπιστίας και του φόβου των καταναλωτών απέναντί τους.

Η ακόλουθη διπλωματική εργασία ασχολείται με το στάδιο της αλκοολικής ζύμωσης της μπίρας δίνοντας έμφαση στη χρήση ακινητοποιημένων κυττάρων ζύμης κατά το στάδιο αυτό. Η χρήση ακινητοποιημένων κυττάρων στη παραγωγή μπίρας βρίσκεται ακόμα σε ερευνητικό επίπεδο, έχει όμως σοβαρές προοπτικές εφαρμογής στη βιομηχανία λόγω των καλών αποτελεσμάτων που έχουν εξαχθεί εργαστηριακά και εικάζεται ότι η χρήση αυτής της τεχνολογίας θα επικρατήσει στο μέλλον.

## **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>1</b>
----------------------	----------

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup>**

#### **Πρώτες ύλες στη παραγωγή μπίρας**

1.1. Η μπίρα.....	5
1.2. Οι πρώτες ύλες.....	5
1.2.1. Το κριθάρι.....	5
1.2.2. Το νερό.....	6
1.2.2. Ο λυκίσκος.....	7
1.2.3. Οι ζύμες.....	9

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup>**

#### **Μεθοδολογία παρασκευής της μπίρας**

2.1. Αλκοολούχα ποτά.....	12
2.2. Βυνοποίηση του κριθαριού.....	13
2.3. Παραγωγή του ζυθογλεύκου.....	14
2.4. Αλκοολική ζύμωση του ζυθογλεύκου.....	16
2.5. Κατεργασίες της μπίρας.....	17

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup>

### Η αλκοολική ζύμωση και οι σακχαρομύκητες

3.1. Αλκοολική ζύμωση.....	19
3.2. Ο μηχανισμός.....	20
3.3. Παραπροϊόντα αλκοολική ζύμωσης.....	21
3.3.1. Μεθανόλη.....	21
3.3.2. Οξικός αιθυλεστέρας.....	22
3.3.3. Ακεταλδεΐδη.....	23
3.3.4. Ανώτερες αλκοόλες.....	23
3.3.5. Άλλα παραπροϊόντα.....	25
3.4. Οι σακχαρομύκητες.....	26
3.4.1. Χρήσεις των σακχαρομυκητών.....	27
3.4.1.1. Οι ζύμες στη παραγωγή μπύρας.....	28
3.4.2. Εξωτερικοί παράγοντες που επηρεάζουν την αλκοολική ζύμωση και την ανάπτυξη των σακχαρομυκήτων.....	29
3.4.2.1. Πηγές άνθρακα.....	29
3.4.2.2. Θερμοκρασία.....	29
3.4.2.3. pH.....	30
3.4.2.4. Οξυγόνο.....	30
3.4.2.5. Αλκοόλη.....	31
3.4.2.6 Αζωτούχα συστατικά.....	31
3.4.2.7. Φαινόλες.....	31
3.4.2.8. SO <sub>2</sub> .....	31
3.4.2.9. CO <sub>2</sub> .....	32
3.4.2.10. Βιταμίνες.....	32
3.4.2.11. Ανόργανα συστατικά.....	33

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup>**

### **Η σύσταση της μπίρας**

<b>4.1. Αιθανόλη.....</b>	<b>34</b>
<b>4.2. Αζύμωτο σάκχαρο.....</b>	<b>34</b>
<b>4.3. Πικραντικές ύλες λυκίσκου.....</b>	<b>35</b>
<b>4.4. Πολυφαινόλες.....</b>	<b>35</b>
<b>4.5. Δικετόνες.....</b>	<b>36</b>
<b>4.6 Άλλα συστατικά της μπίρας.....</b>	<b>37</b>

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5<sup>ο</sup>**

### **Νέες τάσεις στη παραγωγή μπίρας**

<b>5.1. Κατευθυνόμενη ζύμωση.....</b>	<b>40</b>
<b>5.1.1. Επιλογή του κατάλληλου μικροοργανισμού για την πραγματοποίηση κατευθυνόμενων ζυμώσεων.....</b>	<b>41</b>
<b>5.2. Γενετικά τροποποιημένες ζύμες.....</b>	<b>42</b>
<b>5.3. Ακίνητοποίηση κυττάρων.....</b>	<b>43</b>
<b>5.3.1. Μέθοδοι ακίνητοποίησης κυττάρων.....</b>	<b>44</b>
<b>5.3.2. Πλεονεκτήματα της χρήσης ακίνητοποιημένων κυττάρων στη παραγωγή αλκοολούχων ποτών.....</b>	<b>46</b>
<b>5.3.3. Υποσχόμενα υποστρώματα για μελλοντική βιομηχανική εφαρμογή.....</b>	<b>47</b>
<b>5.3.3.1 Γλουτένη.....</b>	<b>47</b>

<b>5.3.3.2. Απολιγνινοποιημένα κυτταρινούνα υλικά.....</b>	<b>48</b>
<b>5.3.3.3. Ξερά σύκα.....</b>	<b>49</b>
<b>5.3.3.4. Βυνοϋπολλείματα.....</b>	<b>49</b>
<b>Συμπεράσματα.....</b>	<b>51</b>
<b>Βιβλιογραφία.....</b>	<b>52</b>

# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

### Η Αλκοολική ζύμωση

Η αλκοολική ζύμωση, δηλαδή η φυσική διεργασία κατά την οποία μικροοργανισμοί καταναλώνουν σάκχαρα του μούστου, του κριθαριού και του σιταριού παράγοντας αέριο και μια ουσία με μεθυστικές ιδιότητες, την αλκοόλη, είναι μια διαδικασία γνωστή εδώ και 10.000 χρόνια. Πιστεύεται ότι τα αλκοολούχα ποτά ανακαλύφθηκαν τυχαία στην εποχή των τροφосуλλεκτών όταν ο πρωτόγονος γεωργός έμαθε πώς να μετατρέπει το άμυλο σε ζυμώσιμο σάκχαρο με απλό μάσημα, με τη βοήθεια της αμύλασης που περιέχεται στο σάλιο του.

Οι αναφορές στη βίβλο είναι πάρα πολλές. Αρχαιολογικά ευρήματα από την Αρχαία Ελλάδα, αποδεικνύουν την καθημερινή κατανάλωση του κρασιού από τους θεούς και από τους ανθρώπους όλων των τάξεων. Το 1500 π.Χ. Αιγύπτιοι γιατροί περιλαμβάνουν στις εφαρμογές τους το κρασί και την μπύρα. Την μπύρα συνιστούν και οι Σουμέριοι θεραπευτές (2100 π.Χ.) όπως αναφέρεται σε εγχειρίδιά τους που ανακαλύφθηκαν χαραγμένα σε κεραμικές πλάκες. Σε νεότερες περιόδους, πριν το 1930 μ.Χ., η παραγωγή αιθανόλης γινόταν αποκλειστικά με ζύμωση. Το 1864 μ.Χ. εφαρμόστηκε η παστερίωση στο κρασί από τον *Luis Pasteur*, που όρισε την ζύμωση σαν 'ζωή χωρίς αέρα' και υπέθεσε ότι η διεργασία είναι αποτέλεσμα της πραγματοποίησης των αναπνευστικών λειτουργιών των μικροοργανισμών αξιοποιώντας το οξυγόνο που υπάρχει στο σάκχαρο.

Διάφοροι πολιτισμοί στην ιστορία ανέπτυξαν προκαταλήψεις σχετικά με το οινόπνευμα, με κυριότερο το Ισλάμ που τον 7<sup>ο</sup> αιώνα καταδίκασε το κρασί, με αποτέλεσμα τη συστηματική απαγόρευσή του που ισχύει μέχρι σήμερα. Ο *Hammurabi* της Βαβυλωνίας το 1770 π.Χ ήταν ο πρώτος βασιλιάς που θέσπισε νόμους και κανόνες για την παραγωγή και κατανάλωση των αλκοολούχων ποτών. 1000 χρόνια αργότερα στην Ευρώπη εμφανίζεται ο ίδιος τύπος απαγόρευσης, ενώ στις ΗΠΑ η απαγόρευση αρχίζει το 1919 και αίρεται το 1933 (EAMES, 1995).



## Η μύρα

Για τους ανθρωπολόγους η μύρα αποτελούσε ένα θρεπτικό συμπλήρωμα της διατροφής των τροφοσυλλεκτών που περιπλανιόνταν σε καθημερινή βάση για τη συλλογή τροφής. Λόγω της θρεπτικής της αξίας και της ικανότητας να συντηρείται με τη βοήθεια του οινοπνεύματος, η μύρα άρχισε να χρησιμοποιείται για φαρμακευτικούς σκοπούς, οδήγησε στη βελτίωση της υγείας και της μακροζωίας και μείωσε τις ασθένειες και τις αβιταμινώσεις από κακή διατροφή ( EAMES, 1995).

## Η μύρα στους αρχαίους χρόνους

Ως αρχαιότερη απόδειξη για την παραγωγή μύρας θεωρείται από ορισμένους επιστήμονες η γραφή που υπάρχει σε δύο λίθινες πλάκες που βρίσκονται στο Βρετανικό Μουσείο του Λονδίνου, που το 1926 εκτιμήθηκε ότι ήταν 9000 ετών και πιθανολογείται πως περιγράφουν την άλεση ενός προϊστορικού τύπου δημητριακού, που χρησιμοποιείτο στην παραγωγή μύρας. Τα αρχαιότερα αποδεδειγμένα ευρήματα για την παραγωγή μύρας είναι περίπου 6000 ετών και ανήκουν στους Σουμέριους. Οι Σουμέριοι επανέλαβαν σκόπιμα τη διαδικασία της ζύμωσης που μάλλον ανακάλυψαν εντελώς τυχαία και έτσι θεωρούνται ο πρώτος λαός που παρήγαγε μύρα.

Στο έπος του Gilgamesh γραμμένο την 3<sup>η</sup> χιλιετηρίδα π.Χ. τονίζεται η μεγάλη σημασία του ψωμιού και της μύρας που σηματοδοτεί την εξέλιξη από τον πρωτόγονο στον πολιτισμένο άνθρωπο. Το έπος αυτό αναγνωρίζεται σαν ένα από τα πρώτα μεγάλα έργα της παγκόσμιας λογοτεχνίας.

Οι Βαβυλώνιοι κυριάρχησαν στη Μεσοποταμία κατά την 2<sup>η</sup> χιλιετηρίδα όταν κατέρρευσε η Σουμεριανή αυτοκρατορία και γνώριζαν την τέχνη της ζυθοποιίας αφού ο πολιτισμός τους προήλθε από αυτόν των Σουμέριων. Έχει αποδειχθεί ότι οι Βαβυλώνιοι έφτιαχναν 20 τύπους μύρας, 8 από τους οποίους φτιάχνονταν από καθαρό κριθάρι, και 12 από μίγμα άλλων δημητριακών, ενώ έκαναν εξαγωγή Lager μύρας στην Αίγυπτο, που ήταν 1000 χιλιόμετρα μακριά.

Οι Αιγύπτιοι πρόσθεταν χουρμάδες στην μύρα για να βελτιώσουν τη γεύση και χρησιμοποιούσαν ακόμη και προζύμι ψωμιού για την παραγωγή της. Αυτός ο τρόπος χρησιμοποιείται ακόμα και σήμερα από χωρικούς κατά μήκος του Νείλου. Ο Ραμσής II γύρω στα 1960 π.Χ. θεωρείται ότι καθιέρωσε την παραγωγή της μύρας από κριθάρι. Η σημασία της ζυθοποιίας στην αρχαία Αίγυπτο, φαίνεται από το γεγονός ότι επινοήθηκε ένα ιερογλυφικό που περιγράφει τον "ζυθοποιό", ενώ κατά την ταρίχευση

των νεκρών οι Αιγύπτιοι λίγο πριν την ενταφίαση άνοιγαν το στόμα του νεκρού και έχυναν μέσα μπίρα ή τοποθετούσαν στον τάφο ολόκληρη τη μινιατούρα μιας μπιραρίας επανδρωμένης με μικροσκοπικούς ζυθοποιούς.

Η παραγωγή μπίρας συνεχίστηκε από τους Έλληνες και τους Ρωμαίους. Η ονομασία “Ζύθος” δόθηκε στην μπίρα από τον Αριστοτέλη. Για τους Ρωμαίους το κρασί ήταν το ποτό των Θεών, ενώ η μπίρα θεωρούνταν το απαίσιο βαρβαρικό ποτό που έπιναν οι αρχαίοι Γερμανοί (οι Τεύτονες) και που ζυμώνεται από κριθάρι ή σιτάρι και έχει ελάχιστη ομοιότητα με το κρασί (EAMES, 1995).

### **Η μπίρα το Μεσαίωνα**

Στο μεσαίωνα η παραγωγή της μπίρας άρχισε να διαδίδεται στην Ευρώπη από τα μοναστήρια, και άρχισε να αποκτά νέα χαρακτηριστικά, με την προσθήκη πικρών και αρωματικών βοτάνων, ριζών, λουλουδιών και φρούτων. Ο λόγος που οδήγησε στην εντατική ανάπτυξη της ζυθοποιίας από τους μοναχούς ήταν η κατανάλωση υγρών που ήταν επιτρεπτή σε περιόδους νηστείας. Η εντατική ενασχόληση των μοναστηριών με τη ζυθοποιία οδήγησε στη βελτίωση της ποιότητας της μπίρας και έτσι η ζυθοποιία εξελίχθηκε σε ένα αξιοσέβαστο εμπόριο.

Στους μοναχούς οφείλεται η επιστημονική ανάπτυξη της ζυθοποιίας. Θεωρείται ότι ο λυκίσκος χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά στα μοναστήρια του Brabant στο σημερινό Βέλγιο αν και η πρώτη χρήση του χρονολογείται μεταξύ του 10<sup>ου</sup> και του 7<sup>ου</sup> αιώνα π.Χ. στην Αίγυπτο, δηλαδή 8000 χρόνια μετά την πρώτη παραγωγή μπίρας. Ο λυκίσκος έδωσε στην μπίρα ευχάριστο άρωμα, χαρακτηριστική πικρή γεύση και βελτίωσε τη συντήρησή της.

Ο Δούκας της Βαυαρίας, Wilhelm IV, για τη διαφύλαξη της ποιότητας και σταθερότητας της μπίρας, θέσπισε τον “Γερμανικό Νόμο για την Ποιότητα της Μπίρας” το 1516, που καθόριζε ότι στη ζυθοποιία πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο κριθάρι, λυκίσκος και καθαρό νερό. Η χρήση της ζύμης δεν ήταν τότε γνωστή. Αυτός ο νόμος είναι ο παλαιότερος στον κόσμο που βρίσκεται ακόμη σε ισχύ, αν και διαφωνεί με την αρχή του ανταγωνισμού. Μπίρα που δεν υπακούει στο νόμο αυτό, σύμφωνα με κανονισμό της Ευρωπαϊκής Ένωσης, επιτρέπεται να εισάγεται στη Γερμανία αρκεί αυτό να είναι σαφώς δηλωμένο (MARTINI, 1993).

## Η μπύρα σήμερα

Οι μέθοδοι του μεσαίωνα παρέμειναν μέχρι το 19<sup>ο</sup> αιώνα μέχρι δηλαδή την εφαρμογή νέων επιστημονικών ανακαλύψεων. Στα 1680 ο Antoni van Leeuwenhoek με την εφεύρεση του μικροσκοπίου, έκανε δυνατή την παρατήρηση των ζυμών. Ο Lavoisier το 1789 διατυπώνει ότι τελικά προϊόντα της αλκοολικής ζύμωσης είναι το διοξείδιο του άνθρακα και η αιθανόλη, ενώ ο Gay Lussac το 1810 δίνει την αντίδραση της αλκοολικής ζύμωσης, δηλαδή της μετατροπής των σακχάρων σε διοξείδιο του άνθρακα και αιθανόλη. Ο πρώτος όμως επιστήμονας που έδειξε με βεβαιότητα ότι η ζύμωση πραγματοποιείται από τη δράση ενός καθορισμένου μικροοργανισμού και ότι η μετατροπή αυτή του μούστου σε κρασί είναι μια αυθόρμητη διαδικασία, που πραγματοποιείται από τη μικροχλωρίδα της επιφάνειας του σταφυλιού, ήταν ο Louis Pasteur το 1866, που επιβεβαιώθηκε αργότερα από τα πειράματα του Christian Hansen, που απομόνωσε το κύτταρο της ζύμης και το πολλαπλασίασε σε συνθετικό θρεπτικό μέσο (1890) και πρώτος καθιέρωσε τη χρήση καθαρών καλλιιεργειών στην παραγωγή μπύρας το 1905. Ο μικροοργανισμός αυτός ονομάστηκε *Saccharomyces* από τον Meyen το 1938.

Η βιομηχανοποίηση στην παραγωγή της μπύρας άρχισε με την εφεύρεση της ατμομηχανής από τον James Watt το 1765 και τη χρήση του ατμού στη βιομηχανία. Το 1835 δημιουργείται η πρώτη σιδηροδρομική γραμμή στη Γερμανία και τα πρώτα αγαθά που μεταφέρθηκαν ήταν δύο μπουκάλια μπύρας. Επανάσταση στη ζυθοποιία έφερε η εφεύρεση της ψυκτικής μηχανής από τον Carl Linde με την οποία βελτιώθηκε η ποιότητα της μπύρας και η παραγωγή της ανεξαρτητοποιήθηκε από την εποχή του χρόνου. Το 1876 ο Louis Pasteur γράφει τη μελέτη του πάνω στην μπύρα "Etudes sur la Biere". Το 1883 ο Δανός επιστήμονας Emil Christian Hansen απομόνωσε τις πρώτες καθαρές καλλιέργειες ζύμης και ξεκίνησε τη χρήση τους με ελεγχόμενο τρόπο δίνοντας στην μπύρα μεγαλύτερη σταθερότητα στη γεύση και την ποιότητα. Όλα αυτά τα επιτεύγματα οδήγησαν στη βιομηχανοποίηση της παραγωγής και έβαλαν τις βάσεις για την ανάπτυξη της σύγχρονης βιομηχανίας μπύρας (MARTINI, 1993).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup>

### Πρώτες ύλες στη παραγωγή της μπύρας

#### 1.1. Η μπύρα

Μπύρα είναι το αλκοολούχο ποτό που προκύπτει από την εκχύλιση με νερό βυνοποιημένου κριθαριού ή μίγματος με άλλα δημητριακά, αρωματισμό του εκχυλίσματος αυτού με βότανα (κυρίως λυκίσκο) και αλκοολική ζύμωση από κύτταρα σακχαρομύκητα. Σήμερα στην παραγωγή της μπύρας χρησιμοποιείται κυρίως κριθάρι και σε μικρότερο ποσοστό σόργο (*shorghum halepense*) (AGU και PALMER, 1998), καλαμπόκι, σίκαλη, σιτάρι και ρύζι, ενώ έχει επικρατήσει η χρήση του λυκίσκου που προσδίδει τη χαρακτηριστική υπόπικρη γεύση του προϊόντος.

#### 1.2. Οι πρώτες ύλες

Οι πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή της μπύρας είναι οι ακόλουθες:

##### 1.2.1. Το κριθάρι

Το κριθάρι είναι δημητριακό και ανήκει στην οικογένεια των Graminae. Το κριθάρι που προορίζεται για τη ζυθοποιία περιλαμβάνει ποικιλίες διαφορετικές από εκείνο που προορίζεται για ζωοτροφή και πρέπει να ικανοποιεί συγκεκριμένες προδιαγραφές, οι οποίες είναι καθορισμένες και αφορούν την σύστασή του, τη φυσιολογία του και τις αγρονομικές του ιδιότητες. Έτσι, κατάλληλο για παραγωγή μπύρας είναι το κριθάρι που αποτελείται από τουλάχιστον 96% ζωντανούς σπόρους, έχει 12% μέγιστη υγρασία, είναι ελεύθερο ασθενειών, ζιζανίων, σκόνης και θρυμματισμένων σπόρων. Η περιεκτικότητά του σε άζωτο πρέπει να είναι χαμηλή, ενώ σε άμυλο όσο το δυνατόν μεγαλύτερη. Από φυσιολογικής πλευράς πρέπει να έχει μεγάλη δυνατότητα εκβλάστησης και να παράγει μεγάλες ποσότητες ενζύμων ώστε να δίνει μεγάλες αποδώσεις σε σάκχαρο κατά την βυνοποίηση.

Για τη βελτίωση της ποιότητας της μπύρας η έρευνα σήμερα προσανατολίζεται στην επιλογή νέων ποικιλιών κριθαριού και τη γενετική βελτίωση των ήδη υπάρχοντων. Οι κυριότερες ποικιλίες κριθαριού που καλλιεργούνται στην Ελλάδα είναι

η Rivale (ΥΓ-2966), Beka (ΥΓ-3335) και Clipper (ΥΓ-5753) (McELROY και JACOBSEN 1995).

### 1.2.2. Το νερό

Το νερό αποτελεί περίπου το 92-95% της μπίρας. Έτσι, οι φυσικές ιδιότητες και η σύστασή του σε μεταλλικά στοιχεία, οργανικές ενώσεις και κατάλοιπα άλλων ουσιών, έχουν ιδιαίτερη σημασία για την ποιότητα του προϊόντος. Το νερό της ζυθοποίησης πρέπει να είναι πόσιμο και πολλές φορές υφίσταται φιλτράρισμα, αποστείρωση, αφαλάτωση, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να γίνει προσθήκη αλάτων ή και οργανικών οξέων. Αυτή η τελευταία ρύθμιση της σύστασης του νερού γίνεται από τις βιομηχανίες μπίρας ώστε να διατηρείται σταθερή η ποιότητα της παραγόμενης μπίρας και να πληρούνται οι προδιαγραφές του προϊόντος.

Η περιεκτικότητα του νερού ζυθοποιίας σε ανόργανα συστατικά έχει ιδιαίτερη σημασία για την ενζυμική δραστηριότητα, την εκχύλιση των συστατικών του λυκίσκου, την καταβύθιση των τανινών και των πρωτεϊνών, την ανάπτυξη και καταβύθιση της ζύμης. Επίσης παράμετροι στενά συνδεδεμένοι με την περιεκτικότητα του νερού σε άλατα είναι η σταθερότητα του αρώματος και της γεύσης και η ένταση του αφρισμού. Παρακάτω περιγράφεται η επίδραση των πιο σημαντικών ιόντων στην ποιότητα του προϊόντος (BRIGGS *et al.*, 1981):

- **H<sup>+</sup>, OH<sup>-</sup>**: Η πορεία της αλκοολικής ζύμωσης και η ποιότητα του τελικού προϊόντος εξαρτάται άμεσα από το pH του γλεύκους. Η ζύμη προκαλεί αλλαγές στην τιμή του κατά την πορεία της ζύμωσης, εξαιτίας της πρόσληψης φωσφορικών ιόντων από το γλεύκος ή από την έκκριση οργανικών οξέων και αζωτούχων συστατικών. Η ρύθμισή του pH γίνεται συνήθως με την προσθήκη οξέων ή με την απομάκρυνση των HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Μέγιστο επιτρεπτό pH για την μπίρα είναι το 7,5.
- **Ca<sup>2+</sup>**: Καθοριστικό για την σκληρότητα του νερού και την ποιότητα του προϊόντος. Καταβυθίζει τα φωσφορικά και τους οξαλικούς εστέρες που προκαλούν θολώματα, σταθεροποιεί την α-αμυλάση, μειώνει την ένταση του χρώματος του γλεύκους, περιορίζει την εκχύλιση στυφών συστατικών, και βελτιώνει την καταβύθιση της ζύμης. Συνήθως γίνεται προσθήκη του με μορφή γύψου, έτσι ώστε η περιεκτικότητά του να μην υπερβαίνει τα 25 mg/L.

- **Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>**: Προσδίδουν επιθυμητή αρμυρή γεύση σε συγκεντρώσεις 75-150 και <10 mg/L αντίστοιχα. Το κάλιο πάνω από αυτή τη συγκέντρωση δρα παρεμποδιστικά για πολλά ένζυμα.
- **Fe<sup>+2</sup>, Fe<sup>+3</sup>**: Συγκέντρωση 1 mg/L αποδυναμώνει τη ζύμη και προκαλεί οξείδωση των τανινών που έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία θολώματος.
- **HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>**: Σε συγκεντρώσεις πάνω από 50 mg/L όντας ισχυρό ρυθμιστικό του pH, αλλοιώνει τη γεύση της μπύρας. Η απομάκρυνσή του γίνεται μετά από διάσπαση με θέρμανση και αποτελεί υποχρεωτική κατεργασία του νερού.
- **SO<sub>4</sub><sup>-</sup>**: Προσδίδει ξηρή και πικρή γεύση στην μπύρα ενώ αποτελεί πηγή παραγωγής SO<sub>2</sub> και H<sub>2</sub>S.
- **NO<sub>3</sub><sup>-</sup>**: Πάνω από 10 mg/L αποτελεί ένδειξη ρύπανσης και παρουσία εντεροβακτηρίων. Ανάγεται προς το τοξικό NO<sub>2</sub><sup>-</sup>.
- **Cl<sup>-</sup>**: Προσδίδει σώμα, περιορίζει την καταβύθιση της ζύμης και βελτιώνει τη διαύγηση και τη σταθερότητα των κολλοειδών.

### 1.2.3. Ο λυκίσκος

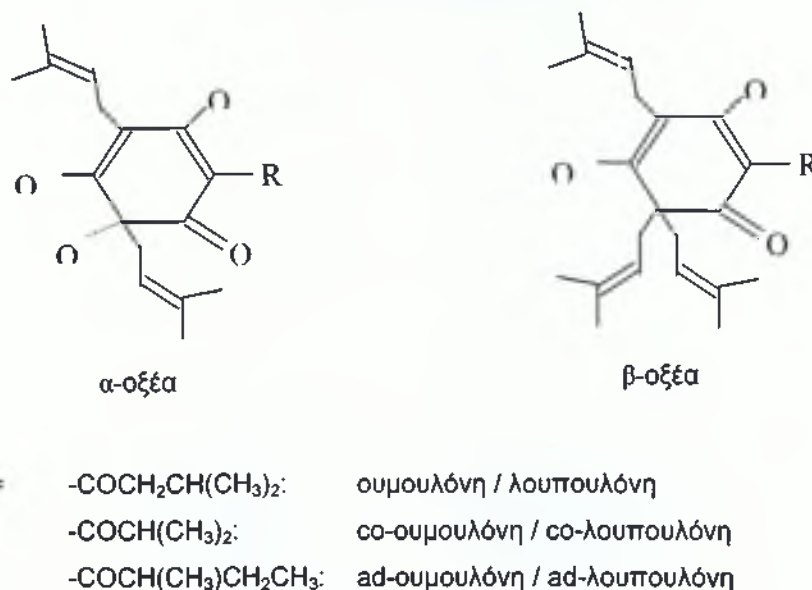
Ο λυκίσκος είναι το πολυετές αναρριχητικό φυτό *Humulus lupulus* που ανήκει στην οικογένεια των Cannabaceae. Στις ρητίνες και τα αιθέρια έλαια που υπάρχουν στο θηλυκό άνθος του φυτού, οφείλεται η χαρακτηριστική πικρή γεύση και το άρωμα της μπύρας. Οι ρητίνες του λυκίσκου αυξάνουν το άφρισμα επειδή προκαλούν τοπικά υψηλό ιξώδες ή και μπορεί να συνδέονται χημικά με ουσίες που βρίσκονται στην επιφάνεια των φουσαλίδων (πρωτεΐνες).

Οι ολικές ρητίνες του λυκίσκου (15% του βάρους του άνθους) είναι το διαλυτό σε μεθανόλη ή διαιθυλαιθέρα κλάσμα και αποτελείται από δύο επιμέρους κλάσματα, τις "μαλακές" (που εκχυλίζονται με εξάνιο) και τις "σκληρές" ρητίνες. Οι μαλακές ρητίνες είναι ένα μίγμα από α-οξέα, που είναι οι κύριες πικραντικές ύλες της μπύρας, β-οξέα και άλλες αππροσδιόριστες ύλες. Οι σκληρές ρητίνες είναι το κλάσμα των ολικών ρητινών που είναι αδιάλυτο σε εξάνιο.

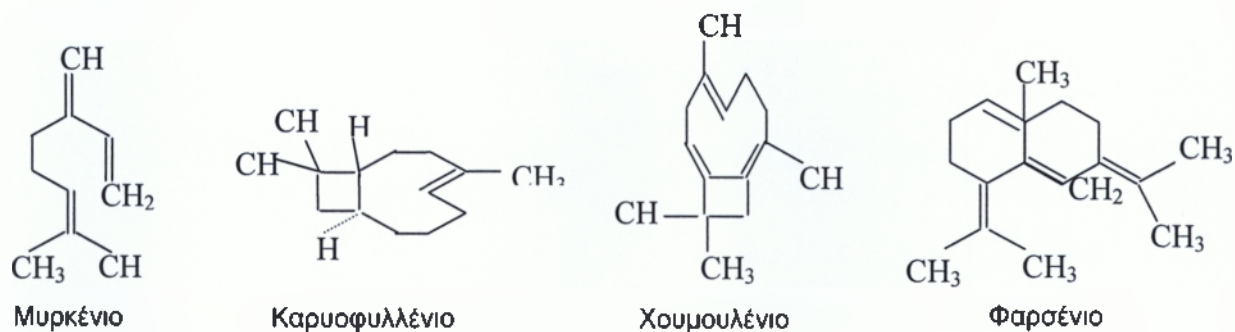
Στα α-οξέα ανήκει η ουμουλόνη, η co-ουμουλόνη, και η ad-ουμουλόνη και στα β-οξέα η λουπουλόνη, co-λουπουλόνη και η ad-λουπουλόνη (Σχήμα 1.).

Τα αιθέρια έλαια του λυκίσκου (Σχήματα 2. και 3.), αποτελούνται από μίγμα υδρογονανθράκων και οξυγονούχων συστατικών. Το κλάσμα των υδρογονανθράκων περιλαμβάνει ουσίες όπως το μυρκένιο, το καρυφυλλένιο, το χουμουλένιο, το φαρνεσένιο και άλλα μονοτερπένια και σεσκιτερπένια, που είναι εξαιρετικά πτητικές

ενώσεις και δεν συνεισφέρουν στο άρωμα της μπίρας, αντίθετα με τις οξυγονούχες ενώσεις που περιλαμβάνουν οξέα, αλκοόλες, εστέρες και αιθέρες.



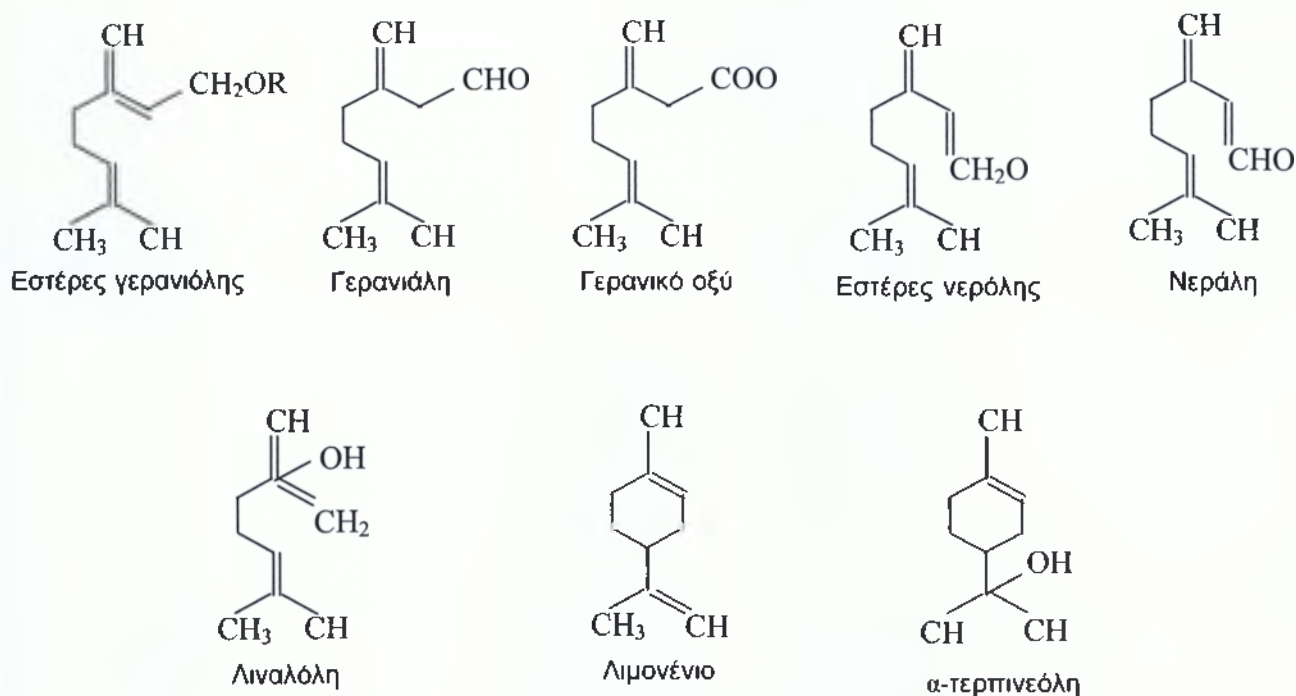
Σχήμα 1. α- και β-οξέα του λυκίσκου



Σχήμα 2. Υδρογονάνθρακες του αιθέριου ελαίου του λυκίσκου

Εκτός από τη συνεισφορά του στον οργανοληπτικό χαρακτήρα της μπίρας, στο λυκίσκο αποδίδονται και αντιμικροβιακές ιδιότητες. Τα gram-θετικά βακτήρια που είναι υπεύθυνα για τις συνηθέστερες αλλοιώσεις της μπίρας είναι ανθεκτικά στις ρητίνες του λυκίσκου.

Μεγάλη σημασία για τη ζυθοποίηση έχουν και οι ταννίνες του λυκίσκου (4% του βάρους του άνθους) που συνεισφέρουν στην απομάκρυνση των πρωτεϊνών της μπίρας με καταβύθιση (LEWIS και YOYNG, 1995).



Σχήμα 3. : Οξυγονούχα συστατικά (πάνω) και ενώσεις με άρωμα ανθέων (κάτω) του αιθέριου ελαίου του λυκίσκου

#### 1.2.4. Οι ζύμες

Η κυριότερη διάκριση μεταξύ των ζυμών ζυθοποιίας είναι η ιδιότητα της καταβύθισης ή επίπλευσής τους μετά το τέλος της ζύμωσης. Η διαφορά ανάμεσα στις δύο κατηγορίες στελεχών δεν εστιάζεται μόνο στις υδρόφιλες ή υδρόφοβες ιδιότητες του κυτταρικού τους τοιχώματος, αλλά και στη θερμοκρασία που πραγματοποιούν τη ζύμωση και στην ποιότητα της παραγόμενης μπίρας (άρωμα και γεύση) (HOUGH, 1985). Έτσι, οι ζύμες ζυθοποιίας διακρίνονται σε αφροζύμες και βυθοζύμες:

**Αφροζύμες (top yeasts)** ονομάζονται εκείνα τα στελέχη των σακχαρομυκητών που στο τέλος της αλκοολικής ζύμωσης έχουν την τάση να επιπλέουν και να συγκεντρώνονται στην κορυφή του δοχείου ζύμωσης. Οι ζύμες αυτές συνήθως χρησιμοποιούνται στην παραγωγή της μπίρας τύπου ale. Οι μπίρες αυτές χαρακτηρίζονται από γεμάτη γεύση και φρουτώδες άρωμα.

Η ικανότητα των ale ζυμών να καταναλώνουν το δισακχαρίτη μελιβιόζη, χρησιμοποιείται πολλές φορές σαν μέσο διάκρισής τους απ' τις lager ζύμες (BRIGGS et al., 1981).



Η τυπική θερμοκρασία ζύμωσης για τις αφροζύμες είναι 15-22 °C (LEWIS και YOYNG, 1995).

**Βυθοζύμες (bottom yeasts)** ονομάζονται εκείνα τα στελέχη που κατά το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης έχουν την τάση να καταβυθίζονται και να συγκεντρώνονται στον πυθμένα του δοχείου ζύμωσης. Οι μύρες που παράγονται με βυθοζύμες ονομάζονται lagers (από το γερμανικό ρήμα lagern, δηλαδή αποθηκεύω). Έχουν διαύγεια, απαλό και κομψό χαρακτήρα. Στις μύρες αυτές πραγματοποιείται και δευτερογενής ζύμωση, ωρίμανση και αποθήκευση και έτσι με τον όρο lager περιγράφεται η ιδιαίτερη τεχνολογική διεργασία παρασκευής των προϊόντων αυτών.

Η τυπική θερμοκρασία ζύμωσης για τις βυθοζύμες είναι 8-15 °C. Και στις δύο περιπτώσεις εφαρμόζεται αυτόματη ψύξη του αντιδραστήρα όταν η ζύμωση φτάνει στη μέγιστη θερμοκρασία που είναι 20-23 °C για τις αφροζύμες και 12-17 °C για τις βυθοζύμες (LEWIS και YOYNG, 1995).

Οι ζύμες που χρησιμοποιούνται στη ζυθοποίηση είναι στελέχη των σακχαρομυκήτων *Saccharomyces cerevisiae* και *Saccharomyces carlsbergensis*. Και τα δύο είδη περιλαμβάνουν στελέχη με ιδιότητες αφροζύμης ή βυθοζύμης, αλλά στις ale ζυμώσεις έχει καθιερωθεί η χρήση στελεχών του *S. cerevisiae*, ενώ στις lager του *S. carlsbergensis*. Στον Πίνακα 1. δίνεται μια απλή διάκριση των ζυμών αυτών ως προς την ικανότητα ζύμωσης διάφορων σακχάρων, τη συνήθη θερμοκρασία και τον τύπο ζύμωσης που πραγματοποιούν.

**Πίνακας 1.:** Μερικά τεχνολογικά χαρακτηριστικά των ζυμών ζυθοποίησης  
(HOUGH *et al.*, 1982)

Είδος	Γαλακτόζη	Γλυκόζη	Σουκρόζη	Μαλτόζη	Μελιβιόζη	Άμυλο	Θερμοκρασία	Τύπος ζύμωσης
<i>S. cerevisiae</i>	+	+	+	+	-	-	15-17 °C	Ale
<i>S. carsbergensis</i>	+	+	+	+	+	-	10-15 °C	Lager

Η εκλογή των κατάλληλων στελεχών για τη παραγωγή μπίρας έχει μεγάλη σημασία και γενικά οι ιδιότητες που ελέγχονται είναι οι ακόλουθες:

- Ικανότητα διάχυσης (η ικανότητα των κυττάρων να διασκορπίζονται στο θρεπτικό υπόστρωμα).
- Ζυμωτική ικανότητα.

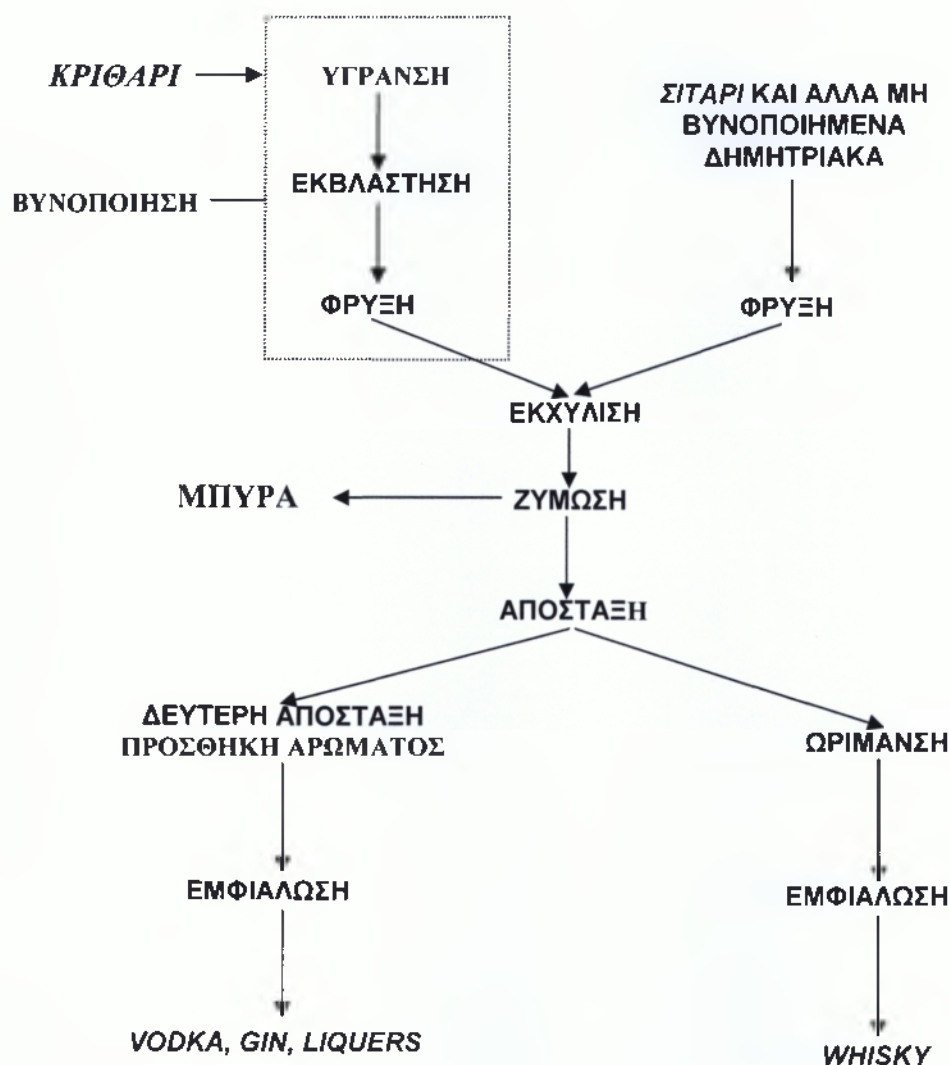
- Ταχύτητα ζύμωσης.
- Παραγωγή προϊόντων που προσδίδουν ευχάριστη γεύση και άρωμα στο προϊόν.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup>

### Μεθοδολογία παρασκευής της μπίρας

#### 2.1. Αλκοολούχα ποτά

Στο παρακάτω σχήμα απεικονίζεται το απλοποιημένο διάγραμμα ροής της παραγωγής μερικών γνωστών αλκοολούχων ποτών:



**Σχήμα 4.** Διάγραμμα ροής για την παρασκευή αλκοολούχων ποτών και αποσταγμάτων από δημητριακά (BROWN *et al.*, 1987).

## 2.2. Βυνοποίηση του κριθαριού

Το στάδιο της βυνοποίησης του κριθαριού αρχίζει με τη **διαβροχή των σπόρων** μέχρι αυτοί να αποκτήσουν υγρασία περίπου 42% και διαρκεί περίπου δύο ημέρες.

Όταν το κριθάρι έχει την απαιτούμενη υγρασία, αρχίζει η **εκβλάστηση**, δηλαδή η εμφάνιση των ριζιδίων και η έναρξη μεταβολικής δραστηριότητας στο σπέρμα. Στις σύγχρονες εγκαταστάσεις ζυθοποιίας η εκβλάστηση πραγματοποιείται σε ορθογώνιες ή κυκλικές δεξαμενές μεγάλης επιφάνειας και μικρού ύψους, στις οποίες διαβιβάζεται από σπές του πυθμένα, αέρας κορεσμένος σε υγρασία, θερμοκρασίας περίπου 15 °C. Παράλληλα το κριθάρι τίθεται σε συνεχή ανατάραξη ώστε ο αέρας να διαβιβάζεται ομοιογενώς σε όλη την ποσότητά του, να απομακρύνεται το παραγόμενο διοξείδιο του άνθρακα και να περιορίζεται η αύξηση της θερμότητας.

Κατά την εκβλάστηση συμβαίνει μια σειρά από βιοχημικές διεργασίες που ονομάζονται τροποποίηση (modification). Αυτές οι διεργασίες περιλαμβάνουν υδρόλυση των πρωτεϊνών από τα πρωτεολυτικά ένζυμα του σπέρματος σε μικρότερα πεπτίδια που χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία των ριζιδίων. Από τη συνολική ποσότητα των αζωτούχων ενώσεων του κριθαριού, το 40% μεταφέρεται στο γλεύκος μετά την εκχύλιση, ως πρωτεΐνες ή αμινοξέα τα οποία αξιοποιούνται για την ανάπτυξη της ζύμης. Το άμυλο υφίσταται υδρόλυση από ένζυμα που το μετατρέπουν σε μικρότερα μόρια δεξτρινών, και σε μικρότερο βαθμό σε ελεύθερα μόρια γλυκόζης. Τα ένζυμα που πραγματοποιούν τις αλλαγές αυτές κατά την εκβλάστηση είναι η φωσφορυλάση, που υδρολύει τους ακραίους α(1-4) δεσμούς παράγοντας 1-φωσφορική-γλυκόζη, η α-γλυκοσιδάση, που υδρολύει τους ακραίους α(1-4) ή β(1-4) δεσμούς παράγοντας γλυκόζη, η α-αμυλάση, που υδρολύει τυχαία τους α(1-4) δεσμούς παράγοντας μίγμα δεξτρινών και λίγων σακχάρων, η β-αμυλάση, που υδρολύει τους δύο ακραίους α(1-4) δεσμούς παράγοντας μαλτόζη και τέλος, ένζυμα που κόβουν τις πλάγιες αλυσίδες της αμυλοπηκτίνης παράγοντας μίγμα δεξτρινών και λίγων σακχάρων.

Τα σημαντικότερα ένζυμα για τη ζυθοποιία είναι οι αμυλάσες. Το βέλτιστο pH δράσης τους είναι 5,5 για την α-αμυλάση (που παράγεται κατά την εκβλάστηση) και 5,2 για την β-αμυλάση (που προϋπάρχει στον καρπό). Οι βέλτιστες θερμοκρασίες δράσης τους είναι 70 και 60 °C αντίστοιχα.

Κατά την εκβλάστηση πραγματοποιείται και μια σειρά άλλων αλλαγών όπως η ενζυμική υδρόλυση των πολυμερών υδατανθράκων του κυτταρικού τοιχώματος του ενδοσπέρματος, που αποτελείται κυρίως από ημικυτταρίνες, και άλλα πολυμερή

μορίων γλυκόζης όπως οι β-γλυκάνες. Η υδρόλυσή τους έχει μεγάλη σημασία για τη ζυθοποιία γιατί πρέπει να γίνεται προς προϊόντα που είναι διαλυτά στο κρύο ή ζεστό νερό για να μην δημιουργούν θολώματα στην μπίρα. Το εκβλαστημένο κριθάρι ονομάζεται βύνη (green malt).

Το επόμενο στάδιο της βυνοποίησης είναι η **φρύξη** που πραγματοποιείται με τη διαβίβαση θερμού αέρα στην ποσότητα της βύνης. Βασική προϋπόθεση είναι η διατήρηση της δραστηρότητας των ενζύμων της βύνης. Κατά το στάδιο αυτό σταματά η εκβλάστηση, απομακρύνεται η υγρασία και αναπτύσσεται το επιθυμητό άρωμα και χρώμα της βύνης.

Η φρύξη αρχίζει με αέρα θερμοκρασίας 50-60 °C. Όταν έχει απομακρυνθεί το 60% της υγρασίας της βύνης, το νερό που απομένει είναι το δεσμευμένο και από το σημείο αυτό η θερμοκρασία του αέρα αυξάνεται και η ροή του γίνεται πιο χαμηλή. Τα ένζυμα σ' αυτό το ποσοστό υγρασίας (περίπου 25%) είναι πιο ανθεκτικά στις υψηλές θερμοκρασίες. Όταν η υγρασία της βύνης γίνει 12%, η θερμοκρασία αυξάνεται στους 65-75 °C και σε υγρασία 5-8% στους 80-100 °C με μείωση της ροής του αέρα, ώσπου η υγρασία φτάσει το 4-5% για τις lager βύνες και 2-3% για τις ale βύνες (HOUGH, 1985).

### 2.3. Παραγωγή του ζυθογλεύκου

Μετά τη φρύξη ακολουθεί η **άλεση** της βύνης. Το μέγεθος των κόκκων του αλέσματος είναι πολύ σημαντικό από τεχνολογικής πλευράς. Μικροί κόκκοι ευνοούν την γρήγορη και πλήρη εκχύλιση των συστατικών της βύνης, αλλά κάνουν την παραλαβή του εκχυλίσματος πολύ δύσκολη. Έτσι, το μέγεθος των κόκκων πρέπει να είναι τέτοιο ώστε να γίνεται εύκολα η εκχύλιση και η παραλαβή του γλεύκου.

Στο στάδιο της **εκχύλισης** (*mashing*) τα ένζυμα της βύνης (αμυλάσες) ενεργοποιούνται ξανά για να υδρολύσουν την *αμυλόζη* και *αμυλοπηκτίνη* σε ζυμώσιμα σάκχαρα και μη ζυμώσιμες δεξτρίνες. Οι συνθήκες της ζυθοποίησης (θερμοκρασία και pH) μπορούν να ρυθμιστούν έτσι ώστε να ευνοείται η δράση της α- και β- αμυλάσης. Γενικά οι συνθήκες επιλέγονται ώστε και τα δύο ένζυμα να έχουν τη μέγιστη δραστηρότητά τους. Παράλληλα με την υδρόλυση του αμύλου, στο στάδιο της εκχύλισης συνεχίζεται και η υδρόλυση των πρωτεϊνών και των υδατανθράκων του τοιχώματος των κυττάρων του ενδοσπέρματος, και η παραλαβή των λιπιδίων που είναι σημαντικά για την ανάπτυξη των κυττάρων της ζύμης.

Η εκχύλιση πραγματοποιείται στις περισσότερες ζυθοποιίες με μια από τρεις κλασικές μεθόδους: τη Βρετανική (*infusion mashing*), τη Γερμανική (*decoction mashing*) και την Αμερικανική (*double mashing*) (LEWIS και YOYNG, 1995).

Κατά τη **Βρετανική μέθοδο** που εφαρμόζεται σε μικρές βιομηχανικές μονάδες, η εκχύλιση γίνεται στους 65 °C, όπου δρουν και οι δύο αμυλάσες, όχι όμως και τα πρωτεολυτικά ένζυμα και γι' αυτό πρέπει να χρησιμοποιείται βυνάλευρο καλά τροποποιημένο. Συνήθως προστίθενται σε ποσοστό <10% νιφάδες ή αλεύρι άλλων δημητριακών. Αν περιέχονται αδιάλυτες β-γλυκάνες τότε προστίθενται και γλυκανάσες.

Κατά τη **Γερμανική μέθοδο** χρησιμοποιείται βυνάλευρο όχι καλά τροποποιημένο, το οποίο εκχυλίζεται αρχικά στους 35-40 °C. Στο στάδιο αυτό πραγματοποιείται η διάλυση όλων των συστατικών της βύνης και αρχίζει η υδρόλυση των πρωτεϊνών και του αμύλου. Στη συνέχεια αφαιρείται το ¼ του εκχυλίσματος, βράζεται και επιστρέφεται στο υπόλοιπο εκχύλισμα για να αυξήσει τη θερμοκρασία του στους 50-54 °C. Στο στάδιο αυτό δρα κυρίως η β-αμυλάση και τα πρωτεολυτικά ένζυμα. Στο επόμενο στάδιο η θερμοκρασία αυξάνεται με τον ίδιο τρόπο, στους 65 °C όπου δρα η α-αμυλάση ενώ όλα τα υπόλοιπα ένζυμα απενεργοποιούνται. Στο τελικό στάδιο η θερμοκρασία αυξάνεται στους 75 °C για την παύση των ενζυμικών δράσεων, τη μείωση του ιξώδους και το διαχωρισμό του γλεύκους.

Κατά την **Αμερικανική μέθοδο** ακολουθείται περίπου η ίδια διαδικασία όπως και στην Γερμανική (*decoction mashing*), με τη διαφορά ότι η θερμοκρασία του κύριου εκχυλίσματος αυξάνεται σταδιακά με την προσθήκη βρασμένου εκχυλίσματος κάποιου δημητριακού (καλαμποκιού, ρυζιού κ.α.), όχι τροποποιημένου.

Η εκχύλιση έχει ολοκληρωθεί όταν η πυκνότητα του γλεύκους αποκτήσει οπτική πυκνότητα 1,060-1,100.

Τελικό στάδιο στην παραγωγή του ζυθογλεύκους είναι το **βράσιμο και η προσθήκη λυκίσκου** και πραγματοποιείται σε ατμοσφαιρική πίεση για 60-90 min. Με την πρακτική αυτή επιτυγχάνεται η απενεργοποίηση των ενζύμων, αποστείρωση του γλεύκους, καταβύθιση των πρωτεϊνών, ταννινών, και ιόντων ασβεστίου, μείωση του pH, συμπύκνωση του γλεύκους, παραγωγή επιθυμητού χρώματος και αρώματος με καραμελοποίηση των σακχάρων και οξειδωση των ταννινών. Παράλληλα, εκχυλίζονται οι πικρές ρητίνες και τα αιθέρια έλαια του λυκίσκου, που δίνουν την επιθυμητή πικρή γεύση και βελτιώνουν τον αφρισμό της μπύρας. Πιο σύγχρονες μέθοδοι προτείνουν βράσιμο του γλεύκους υπό πίεση στους 140 °C για 4 min.

Το γλεύκος που προκύπτει είναι πλούσιο σε υδατάνθρακες, αμινοξέα, αζωτούχες ενώσεις, μεταλλικά στοιχεία, βιταμίνες, καθώς και στερόλες και λιπαρά οξέα που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των κυττάρων της ζύμης (Πίνακας 2.).

#### 2.4. Αλκοολική ζύμωση του ζυθογλεύκου

Η καθαρή καλλιέργεια ζύμης αποστέλλεται στα εργοστάσια είτε σε υδαρή μορφή είτε σαν ξηρή καλλιέργεια. Μετά τη παραλαβή το ζυμοτεχνικό εργαστήριο της ζυθοποιίας μπορεί να προβεί σε ανακαλλιέργεια αυτής, ώστε να ληφθεί η απαιτούμενη ποσότητα εμβολιασμού για τις δεξαμενές ζύμωσης. Η ποσότητα του εμβολίου είναι περίπου 0,4 L πυκνόρρευστης καλλιέργειας ζύμης ανα 100 L ζυθογλεύκου.

Στην παρασκευή των *ale* μπυρών με αφροζύμες, η ζύμωση αρχίζει σε θερμοκρασία 15-16 °C και αυξάνεται σταδιακά (σε 36 ώρες) στους 20-25 °C. Στη συνέχεια το δοχείο ζύμωσης ψύχεται στους 17 °C όπου παραμένει για 72 ώρες. Στο τέλος της ζύμωσης η ζύμη που τείνει να συγκεντρωθεί στην επιφάνεια του δοχείου, συλλέγεται και αποθηκεύεται για να ξαναχρησιμοποιηθεί. Η ζύμωση των *ale* μπυρών διαρκεί 5-8 ημέρες. Γλεύκος πυκνότητας 10 °Plato (μονάδα μέτρησης πυκνότητας) ζυμώνεται μέχρι τελική πυκνότητα 2-2,5 °Plato.

Πίνακας 2. Σύσταση του γλεύκου (HOUGH, 1985)

Συστατικό	Συγκέντρωση (g/L)
Γλυκόζη	9,1
Φρουκτόζη	2,1
Σουκρόζη	2,3
Μαλτόζη	52,4
Μαλτοτριόζη	12,8
Μη ζυμώσιμοι υδατάνθρακες	23,9
Αμινοξέα	1,65
Ισο-α-οξέα	0,035
Φαινολικά συστατικά	0,25

Στη **lager** ζύμωση με βυθοζύμες, η ζύμωση διαρκεί 8-10 μέρες και είναι ατελής. Η αρχική θερμοκρασία είναι 7-11 °C και ανεβαίνει στη μέγιστη θερμοκρασία των 15 °C σε 3-5 μέρες. Στο τέλος της ζύμωσης η ζύμη καταβυθίζεται στον πυθμένα του δοχείου. Ακολουθεί αποθήκευση της μπίρας σε χαμηλή θερμοκρασία (10-0 °C) και δευτερογενής ζύμωση, που διαρκεί παραδοσιακά μέχρι και μερικούς μήνες (*cold conditioning*). Στο διάστημα αυτό ολοκληρώνεται η ζύμωση των σακχάρων, ενώ καταβυθίζεται η ζύμη και τα θολώματα βελτιώνοντας τη διαύγηση. Σήμερα ο χρόνος της δευτερογενούς ζύμωσης έχει μειωθεί στις 7-28 ημέρες.

Σε πολλές περιπτώσεις πριν τη δευτερογενή ζύμωση εφαρμόζεται μια περίοδος μερικών ημερών σε υψηλότερη θερμοκρασία (14-16 °C) προκειμένου να επιταχυνθεί η οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση των α-ακετο-υδροξυοξέων σε δικετόνες (διακετύλια) και στη συνέχεια σε αναγωγή τους στις αντίστοιχες άγευστες διόλες (*worm conditioning* ή *diacetyl rest*) (HOUGH, 1985).

## 2.5. Κατεργασίες της μπίρας

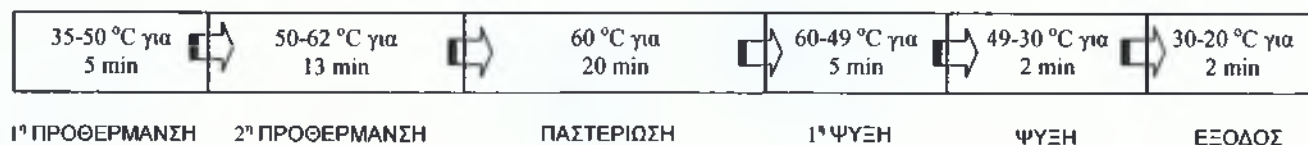
Μετά την ολοκλήρωση της ζύμωσης η νεαρή μπίρα (*green beer*), δεν περιέχει αρκετό διοξείδιο του άνθρακα και δεν έχει αποκτήσει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του ώριμου προϊόντος. Η **ωρίμανση** της μπίρας γίνεται με αποθήκευσή της σε κλειστές δεξαμενές για μερικές εβδομάδες έως μήνες και περιλαμβάνει πολλές φορές και δευτερογενή ζύμωση. Στο διάστημα αυτό η μπίρα εμπλουτίζεται σε διοξείδιο του άνθρακα που παράγεται κατά τη δευτερογενή ζύμωση, ενώ συμβαίνουν βιοχημικές αλλαγές στα συστατικά της, αναπτύσσοντας το χαρακτηριστικό άρωμα και τη γεύση του εμπορικού προϊόντος και επιτυγχάνεται η διαύγηση με την καταβύθιση των ζυμών και των θολωμάτων (HOUGH *et al.*, 1982).

Η **διαύγηση** της μπίρας μπορεί να γίνει: α) με *προσθήκη ουσιών* (κολλαγόνο, ζελατίνη, αλγινικά, καραγενάνη) που δημιουργούν ιζήματα με μεγαλομόρια της μπίρας, β) με *φυγοκέντρωση* και γ) με *φιλτράρισμα*. Τα φίλτρα που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία αποτελούνται από *κυτταρίνη, γη διατόμων, οξειδίου του αργιλίου και οξειδίου του ζirkονίου* και πολυμερή, όπως η *πολυβίνυλ-πυρρολιδόνη* (PVPP) (HOUGH *et al.*, 1982).

Σήμερα γίνεται προσπάθεια από πολλούς ερευνητές για την εισαγωγή νέων τεχνολογιών και εναλλακτικών τρόπων φιλτραρίσματος προκειμένου να αντεπεξέλθει η βιομηχανική ζυθοποίηση στις περιβαλλοντικές απαιτήσεις και τη μείωση του κόστους για νερό και ενέργεια (ANON, 1998).



Ακολουθεί **παστερίωση** (πριν ή μετά την εμφιάλωση ανάλογα με την τυποποίηση) της μπίρας, που στηρίζεται στον κατάλληλο συνδυασμό θερμοκρασίας-χρόνου εφαρμογής της, προκειμένου να θανατωθούν όλες οι βλαστικές μορφές των μικροοργανισμών που έχουν επιμολύνει το προϊόν. Μια τυπική διεργασία παστερίωσης εμφιαλωμένης μπίρας εφαρμόζει το παρακάτω πρόγραμμα θερμοκρασιών (HOUGH *et al.*, 1982):



Η **εμφιάλωση** της μπίρας γίνεται σε γυάλινα μπουκάλια πολλών χρήσεων ή σε κουτιά αλουμινίου που προηγουμένως έχουν αποστειρωθεί με καυτό αέρα και νερό. Το δυνατό τεχνητό ή φυσικό φως αλλοιώνει τη γεύση και το άρωμα της εμφιαλωμένης μπίρας, προκαλώντας φωτόλυση των ισο-α-οξέων προς ισοπεντενυλ-μερκαπτάνη και υδρόθειο. Γι' αυτό χρησιμοποιούνται συνήθως σκούρα καφέ ή πράσινα μπουκάλια (απορροφούν το ορατό φως με μήκος κύματος μικρότερο των 550 nm) (HOUGH, 1985, LEWIS και YOYNG, 1995).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup>

### Η αλκοολική ζύμωση και οι σακχαρομύκητες

#### 3.1. Αλκοολική ζύμωση

Ζύμωση ονομάζεται η διεργασία κατά την οποία ορισμένοι μικροοργανισμοί καταναλώνουν οργανικές ενώσεις για την διεξαγωγή των διαφόρων μεταβολικών μονοπατιών. Με τον όρο αυτόν, μπορεί να περιγραφεί, εκτός από τη μετατροπή των σακχάρων σε αλκοόλη και διοξείδιο του άνθρακα, και η μετατροπή άλλων οργανικών ενώσεων εκτός των υδατανθράκων, όπως οι πρωτεΐνες και τα λίπη, σε διοξείδιο του άνθρακα ή άλλα αέρια.

Ειδικότερα, στην επιστήμη της βιοχημείας η ζύμωση ορίζεται ως "η χημική μεταβολή που οδηγεί στη διάσπαση των υδατανθράκων υπό αναερόβιες συνθήκες". Ο όρος ζύμωση μπορεί να αναφέρεται και σε αερόβια μετατροπή των υδατανθράκων σε ορισμένες περιπτώσεις, όπου δεν ενδιαφέρει τόσο ο μηχανισμός όσο τα τελικά προϊόντα. Έτσι η αερόβια διεργασία μετατροπής της αλκοόλης σε οξικό οξύ από το βακτήριο *Acetobacter aceti*, πολλές φορές αναφέρεται σαν ζύμωση αντί της οξειδωσης που είναι ο σωστός όρος.

Οι εφαρμογές και τα οφέλη της μικροβιακής ζύμωσης είναι τεράστια για τον σύγχρονο άνθρωπο. Ορισμένες από αυτές αναφέρονται ακολούθως:

- Παραγωγή αλκοολούχων ποτών (κρασί, μπίρα, αποστάγματα).
- Παραγωγή οινόπνευματος για φαρμακευτική χρήση.
- Παραγωγή οξικού οξέος.
- Καλύτερη συντήρηση των τροφίμων που παράγονται ή μετατρέπονται με αλκοολική ζύμωση. Η αλκοόλη και το οξικό οξύ είναι αναστολείς της ανάπτυξης παθογόνων και τεχνολογικά ανεπιθύμητων μικροοργανισμών.
- Μεγαλύτερη θρεπτική αξία των τροφίμων που παράγονται ή μετατρέπονται με αλκοολική ζύμωση, με την αποικοδόμηση πολύπλοκων ενώσεων σε άλλες περισσότερο αξιοποιήσιμες, αλλά και λόγω σύνθεσης βιταμινών και άλλων ουσιών από τους μικροοργανισμούς (CAPLICE και FITZGERALD, 1999).

- Παραγωγή προϊόντων γαλακτικής ζύμωσης (γαλακτοκομικά προϊόντα, αλλαντικά, ελιές, τουρσί κ.ά.) τα οποία χαρακτηρίζονται από υψηλή θρεπτική αξία και καλύτερη ικανότητα συντήρησης.

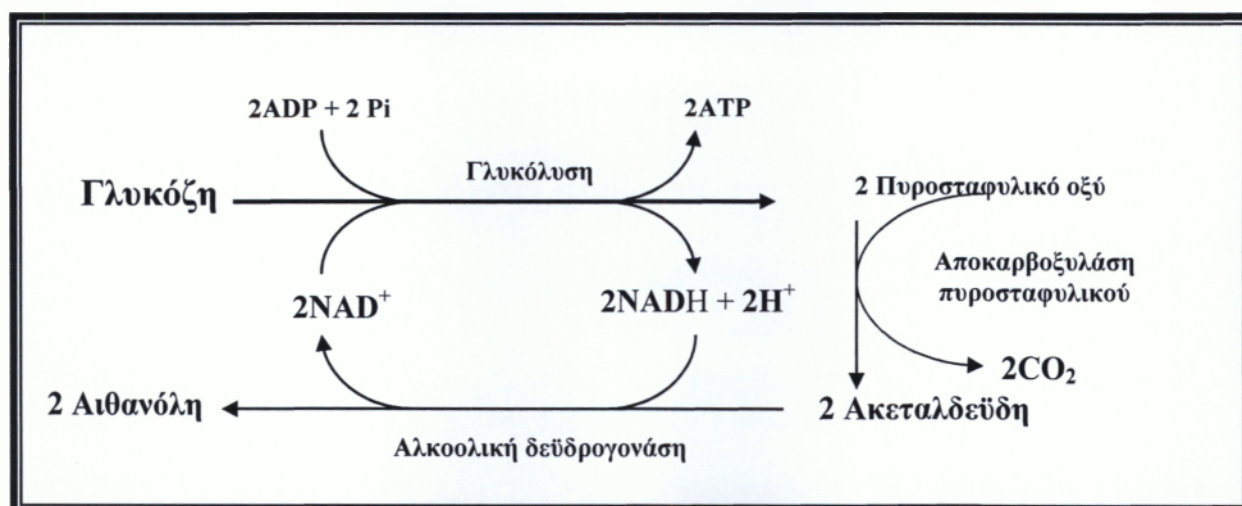
### 3.2. Μηχανισμός

Η αλκοολική ζύμωση έπεται της γλυκόλυσεως, του μεταβολισμού δηλαδή της γλυκόζης -που είναι ο κύριος υδατάνθρακας που χρησιμοποιούν οι ζωντανοί οργανισμοί σαν πηγή ενέργειας- σε πυροσταφυλικό οξύ. Οι υπόλοιποι ζυμώσιμοι υδατάνθρακες των τροφίμων, όπως η σουκρόζη και το άμυλο, υφίστανται πρώτα ενζυμική υδρόλυση προς μόρια μονοσακχαριτών γλυκόζης ή φρουκτόζης, που είναι επίσης απευθείας αφομοιώσιμο σάκχαρο. Η συνηθισμένη πορεία μεταβολισμού της γλυκόζης για τους περισσότερους οργανισμούς, είναι η μετατροπή της σε πυροσταφυλικό οξύ και στη συνέχεια σε  $\text{CO}_2$  και  $\text{H}_2\text{O}$  μέσω του κύκλου του Krebs.

Η αλκοολική ζύμωση επιτελείται από ζύμες και άλλους μικροοργανισμούς και είναι αναερόβια διεργασία κατά την οποία το πυροσταφυλικό οξύ που παράγεται από τη γλυκόλυση, μετατρέπεται σε αιθανόλη και  $\text{CO}_2$  (TADEGE , 1999).

Θεωρητικά, 1 g σακχάρου πρέπει να δώσει 0,51 g αιθανόλης και 0,49 g  $\text{CO}_2$ . Η πρακτική απόδοση όμως της αλκοολικής ζύμωσης είναι 0,46 g αιθανόλης και 0,44 g  $\text{CO}_2$  από 1 g σακχάρου (STEWART και RUSSEL, 1986).

Το μονοπάτι της γλυκόλυσης (που συχνά αναφέρεται ως το μονοπάτι των Embden-Meyerhof) καθώς και η αλκοολική ζύμωση περιγράφονται συνοπτικά στο παρακάτω διάγραμμα (ΓΕΩΡΓΑΤΣΟΣ, 1989, STRYER, 1995).



Σχήμα 5. Σύνοψη γλυκόλυσης και αλκοολικής ζύμωσης

### 3.3. Παραπροϊόντα αλκοολικής ζύμωσης

Η παραγωγή παραπροϊόντων με μεγάλη σημασία για το άρωμα των αλκοολούχων ποτών και ειδικότερα της μπύρας εξαρτάται κατά κύριο λόγο από το είδος της ζύμης που πραγματοποιεί την αλκοολική ζύμωση. Συγκεκριμένα στην μπύρα πάνω από 600 πτητικά συστατικά παράγονται από το μεταβολισμό της ζύμης κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης (RUSSEL και STEWART, 1992). Επίδραση ασκεί φυσικά και η χρησιμοποιούμενη πρώτη ύλη, η θερμοκρασία, και το pH.

Τα κύρια παραπροϊόντα της αλκοολικής ζύμωσης είναι η μεθανόλη, οι εστέρες, οι αλδεΐδες, οι ανώτερες αλκοόλες, τα οξέα, οι δικετόνες, οι θειούχες ενώσεις και η γλυκερόλη. Η επίδρασή τους στο άρωμα του προϊόντος εξαρτάται από τις τελικές τους συγκεντρώσεις και τις μεταξύ τους αναλογίες. Σημαντική συνεισφορά στο άρωμα έχει και η παραγόμενη αιθανόλη και το διοξείδιο του άνθρακα (RUSSEL και STEWART, 1992).

Για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των πτητικών παραπροϊόντων στην μπύρα και γενικότερα στα αλκοολούχα ποτά και τρόφιμα έχουν αναπτυχθεί αναλυτικές τεχνικές με κυριότερη τη φασματοσκοπία μάζας. Η μέθοδος αυτή είναι η πλέον αποτελεσματική και εύχρηστη μέθοδος, ενώ μπορεί να συνδυαστεί με τεχνικές αέριας (GC) και υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC). Μια συνήθης μέθοδος για τον προσδιορισμό των πτητικών παραπροϊόντων σε αλκοολούχα ποτά (κρασί, μπύρα και αποστάγματα) είναι η αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας FID (BARDI et al., 1996b, BARDI et al., 1997b).

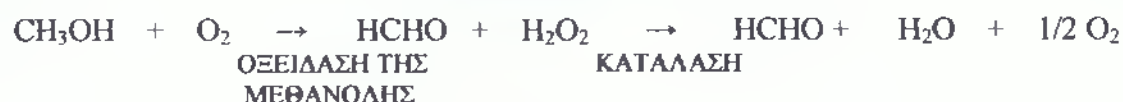
#### 3.3.1. Μεθανόλη

Η μεθανόλη παράγεται από την υδρόλυση πηκτινικών υλών, δηλαδή μεθυλεστέρων του πολυγαλακτουρονικού οξέως, με τη δράση του ενζύμου πηκτινομεθυλεστεράσης (PME) (BELITZ και GROSH, 1987).

Είναι ουσία τοξική που προκαλεί τύφλωση. Ωστόσο μεθανόλη στην μπύρα υπάρχει σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις (<50 mg/L) με κατώφλι τα 500 mg/L (ETIEVANT, 1991).

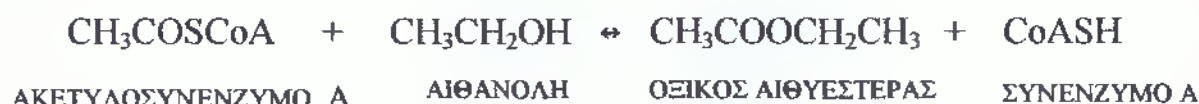
Η μελέτη της παραγωγής και μείωσης της μεθανόλης στο κρασί, σε σχέση με τον τρόπο οινοποίησης και την πρώτη ύλη, απασχολεί πολλούς ερευνητές από το 1940 και μετά. Ο προσδιορισμός της γίνεται με αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας FID (LEE et al., 1975a).

Η τοξική δράση της μεθανόλης οφείλεται στη μετατροπή της σε φορμαλδεΐδη με την αντίδραση:



### 3.3.2. Οξικός αιθυλεστέρας

Οι εστέρες στην μπύρα παράγονται είτε στη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης ως προϊόντα του μεταβολισμού των λιπιδίων της ζύμης ή από την αργή αντίδραση ισορροπίας μεταξύ αλκοολών και οξέων, που συνυπάρχουν στο προϊόν, κατά την παραμονή του (ωρίμανση). Η πρώτη περίπτωση είναι η πιο πιθανή και πραγματοποιείται σύμφωνα με την αντίδραση:



Γενικά:



Η ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* παράγει συνήθως μεγάλες ποσότητες εστέρων, η συγκέντρωση των οποίων εξαρτάται από το στέλεχος, τη θερμοκρασία και το pH και γενικά αυξάνεται στις ζυμώσεις με μεγάλη αρχική ποσότητα σακχάρου ή χαμηλή θερμοκρασία και μικρή συγκέντρωση οξυγόνου (KILLIAN και OUGH 1979).

Οι εστέρες συνεισφέρουν έντονα στον οργανοληπτικό χαρακτήρα του προϊόντος καθώς του προσδίδουν χαρακτηριστικό "φρουτώδες" άρωμα ή άρωμα "ανθέων".

Ο οξικός αιθυλεστέρας ( $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ ) είναι ο σημαντικότερος εστέρας που απαντάται στα αλκοολούχα ποτά όπως το κρασί και η μπύρα και συνεισφέρει θετικά στο άρωμα του προϊόντος όταν η συγκέντρωσή του δεν υπερβαίνει τα 200 mg/L. Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (που συνοδεύονται συνήθως και από αυξημένες συγκεντρώσεις οξικού οξέος) το προϊόν δίδει την εντύπωση ξινισμένου προϊόντος.

Η συγκέντρωσή του οξικού αιθυλεστέρα στην μπύρα κυμαίνεται στην περιοχή 8-69 mg/L, ενώ η παρουσία του γίνεται οργανοληπτικά αντιληπτή σε συγκέντρωση μεγαλύτερη από 30 mg/L.

Άλλοι σημαντικοί εστέρες που υπάρχουν στην μπύρα είναι ο οξικός ισοαμυλεστέρας (έντονο άρωμα μπανάνας), ο εξανοϊκός, οκτανοϊκός και δεκανοϊκός αιθυλεστέρας (άρωμα μήλου), ο καπροϊκός αιθυλεστέρας (άρωμα μήλου η γλυκάνισου) κ.α. (SMOGROVICOVA και DOMENY, 1998).

### 3.3.3. Ακεταλδεΐδη

Η ακεταλδεΐδη είναι η συνηθέστερη καρβονυλική ένωση της μπύρας και έχει ιδιαίτερη σημασία για το άρωμά της. Παράγεται κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης στα πλαίσια του γλυκολυτικού κύκλου, ως πρόδρομη ένωση της αιθανόλης, με αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού οξέος από το ένζυμο αποκαρβοξυλάση του πυροσταφυλικού. Με τη δράση της αλκοολικής αφυδρογονάσης η ακεταλδεΐδη μετατρέπεται σε αιθανόλη.

Η ακεταλδεΐδη στην μπύρα (0-38 mg/L) έχει τη μέγιστη τιμή αμέσως μετά την αλκοολική ζύμωση ενώ κατά την ωρίμανση μειώνεται σταδιακά. Με οξείδωση ή με τη δράση οξικών βακτηρίων μετατρέπεται σε οξικό οξύ (HOUGH et al., 1982, STEWART και RUSSEL, 1986). Σε συγκεντρώσεις μικρότερες των 20 mg/L δίνει ευχάριστο άρωμα "πράσινου μήλου" ενώ σε μεγαλύτερες η μπύρα αποκτά ανεπιθύμητη γεύση και οσμή "λαχανικών" (κατώφλι 25 mg/L) (SMOGROVICOVA και DOMENY, 1998).

Άλλες αλδεΐδες που επηρεάζουν έντονα το άρωμα της μπύρας σε χαμηλές συγκεντρώσεις είναι η 3-μεθυλοβουτανάλη, 2-μεθυλοβουτανάλη και η 3-μεθυλ-θειο-προπιοναλδεΐδη και μειώνονται από τη δράση ζωντανών κυττάρων ζύμης με την πάροδο του χρόνου (HOUGH et al., 1982).

### 3.3.4. Ανώτερες αλκοόλες

Οι ανώτερες αλκοόλες αποτελούν μια απ' τις κυριότερες ομάδες πτητικών παραπροϊόντων της αλκοολικής ζύμωσης, που χαρακτηρίζονται από τοξικότητα και

δυσάρεστη οσμή όταν βρίσκονται σε συγκεντρώσεις πάνω από 400 mg/L, ενώ σε συγκεντρώσεις μέχρι 300 mg/L συνεισφέρουν στον οργανοληπτικό χαρακτήρα.

Παράγονται από την ζύμη κατά την πρωτεϊνική σύνθεση από τα β-οξέα, που παράγονται με τρανσαμίνωση ή απαμίνωση των αμινοξέων του γλεύκους. Ανώτερες αλκοόλες μπορούν επίσης να σχηματιστούν από τους υδατάνθρακες του γλεύκους (STEWART και RUSSEL, 1986).

Η παραγωγή τους εξαρτάται από το στέλεχος της ζύμης και από τη θερμοκρασία. Αύξηση της θερμοκρασίας της ζύμωσης έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση των συγκεντρώσεων των ανώτερων αλκοολών.

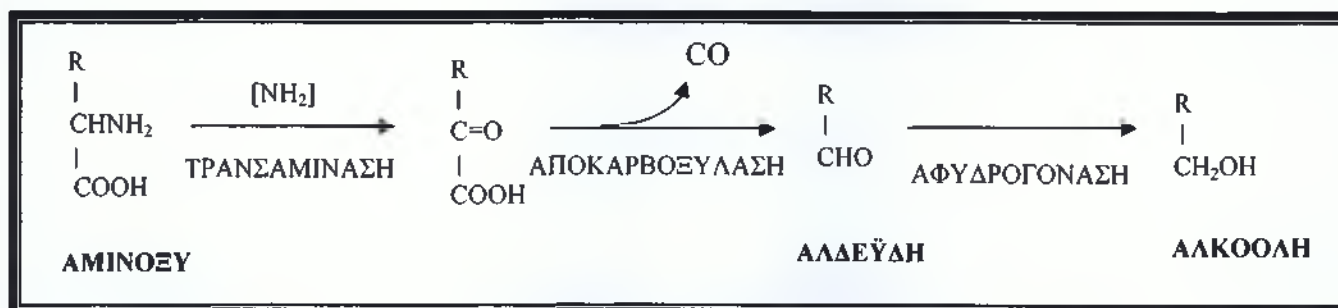
Οι ανώτερες αλκοόλες που υπάρχουν στην μπύρα είναι οι:

- Προπανόλη-1
- Ισοβουτυλική αλκοόλη
- Αμυλικές αλκοόλες (2-μεθυλο-βουτανόλη-1 και 3-μεθυλο-βουτανόλη-1)

Η **προπανόλη-1** και η **ισοβουτυλική αλκοόλη** προσδίδουν τραχιά γεύση και υφή στην μπύρα και γίνονται αντιληπτές σε συγκεντρώσεις πάνω από 500 mg/L και 200 mg/L αντίστοιχα (ETIEVANT, 1991).

Οι **αμυλικές αλκοόλες** προσδίδουν "φρουτώδες" άρωμα (μπανάνα) σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (50 mg/L και 1 mg/L αντίστοιχα) τις οποίες όμως πάντα υπερβαίνουν στις μπύρες. Μεγαλύτερες συγκεντρώσεις είναι ανεπιθύμητες και προσδίδουν δυσάρεστη οσμή φάρμακου και γεύση πικάντικη και καυστική (SMOGROVICOVA και DOMENY, 1998).

Ο σχηματισμός των αμυλικών αλκοολών (3-μεθυλο-βουτανόλη-1 και 2-μεθυλο-βουτανόλη-1) μπορεί να περιγραφεί με το παρακάτω γενικό σχήμα (LEWIS και YOUNG, 1995):



### 3.3.5. Άλλα παραπροϊόντα

Άλλα παραπροϊόντα της αλκοολικής ζύμωσης είναι τα **οργανικά οξέα**, με σημαντικότερα το οξικό (κατώφλι 175 mg/L), προπανικό (κατώφλι 150 mg/L), βουτανοϊκό (κατώφλι 2,2 mg/L), ισοβουτυρικό (κατώφλι 1,5 mg/L), ισοβαλερικό, εξανοϊκό (κατώφλι 8 mg/L), οκτανοϊκό (κατώφλι 13 mg/L), δεκανοϊκό και δωδεκανοϊκό. Τα **λιπαρά οξέα** (γεύση σαπουνιού), ελεύθερα ή εστεροποιημένα σε αιθυλεστέρες, επηρεάζουν το άρωμα και τον αφρισμό του προϊόντος (ETIEVANT, 1991).

Για τον προσδιορισμό των οξέων χρησιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι ενόργανης ανάλυσης όπως η αέρια χρωματογραφία, η φασματογραφία μάζας και η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης, των προϊόντων εστεροποίησης ή μετεστεροποίησης με μεθανόλη (RUSSEL και STEWART, 1992). Για την απομόνωσή τους εφαρμόζονται μέθοδοι όπως η εκχύλιση, η απομόνωση των ατμών (headspace) κ.α.

Ιδιαίτερη σημασία έχει η οξειδωση των λιπαρών οξέων, προς 2-trans-νονενάλη, που είναι ανεπιθύμητο συστατικό του αρώματος της μπύρας (HOUGH et al., 1982).

Ενώσεις που έχουν γλυκό αποτέλεσμα στον οργανοληπτικό χαρακτήρα της μπύρας (sweet flavor compounds) είναι η 4-υδροξυ-2,5-διμεθυλ-3(2H)-φουρανόνη, η 4-υδροξυ-2(ή5)-αιθυλ-5-μέθυλ-3(2H)-φουρανόνη, η μαλτόλη (γεύση καραμέλας) και η γ-νοναλακτόνη (γεύση καρύδας), που παράγονται από αντιδράσεις Maillard κατά τη φρύξη της βύνης, αλλά και κατά την αλκοολική ζύμωση από ορισμένα στελέχη ζύμης (SAKUMA et al., 1996).

Οι κυριότερες θειούχες ενώσεις που παράγονται κατά την αλκοολική ζύμωση και είναι παρούσες στο τελικό προϊόν είναι το διοξειδίο του θείου, τα σουλφίδια (R-S-R), τα δισουλφίδια (R-SS-R) και οι θειόλες (R-SH). Όλες προσδίδουν δυσάρεστο άρωμα και γεύση στο προϊόν. Το διμέθυλο-σουλφίδιο προσδίδει οσμή βρασμένου καλαμποκιού. Το υδρόθειο (οσμή χαλασμένου αυγού), παράγεται σε μικρές ποσότητες, αλλά απομακρύνεται κατά τις διεργασίες ωρίμανσης της μπύρας. Το διοξειδίο του θείου (οσμή καμένου σπύριου) είναι επιθυμητό σε μικρές συγκεντρώσεις λόγω των αντιοξειδωτικών και αντιμικροβιακών ιδιοτήτων του.

Οι σημαντικότερες δικετόνες που παράγονται κατά την αλκοολική ζύμωση είναι το διακετύλιο (2,3-βουτανοδιόνη) και η 2,3-πεντανοδιόνη.

Η γλυκερόλη είναι ουσία που προσδίδει σώμα και γλυκύτητα στο προϊόν.

Το διοξειδίο του άνθρακα εκτός από τη χαρακτηριστική αίσθηση στο στόμα, επηρεάζει το οργανοληπτικό αποτέλεσμα των άλλων πτητικών ουσιών του προϊόντος (RUSSEL και STEWART, 1992).



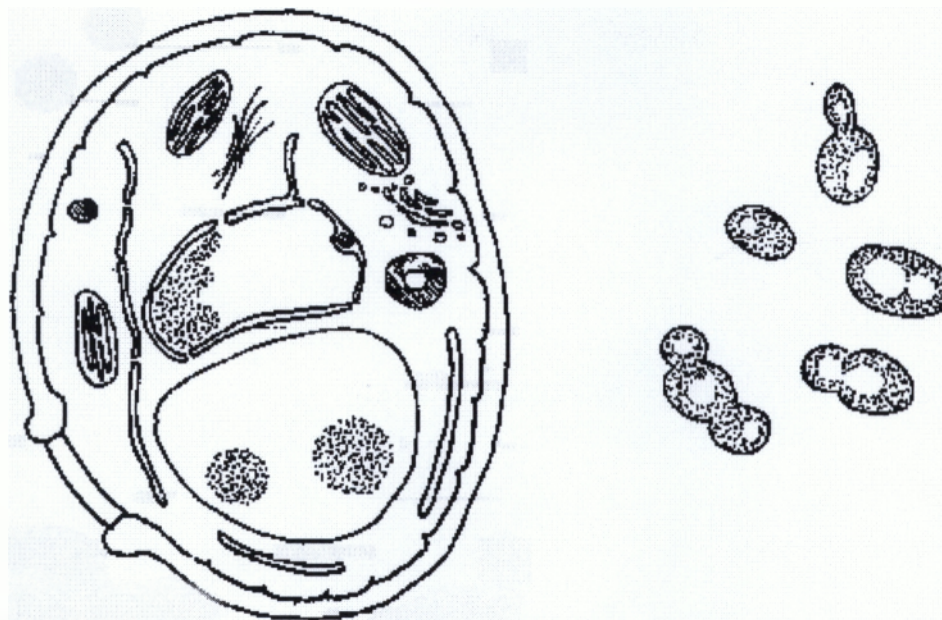
### 3.4. Οι σακχαρομύκητες

Η πολύπλοκη για τον άνθρωπο χημική αντίδραση της αλκοολικής ζύμωσης, γίνεται απλούστατη με τη δράση του ενζυμικού συστήματος των σακχαρομυκήτων

Οι σακχαρομύκητες ανήκουν στις ζύμες, έχουν διακριτό κυτταρικό τοίχωμα, με ένα πυρήνα ανά κύτταρο και πολλαπλασιάζονται με εκβλάστηση . Πιο ειδικά το γένος *Saccharomyces* ανήκει στην υποκατηγορία των ασκομυκήτων. Οι σακχαρομύκητες διακρίνονται από τις άλλες ζύμες γιατί καταναλώνουν διάφορους υδατάνθρακες στα πλαίσια των μεταβολικών τους οδών μετατρέποντας τους σε αλκοόλη ενώ δεν μπορούν να χρησιμοποιήσουν τα νιτρικά ως πηγή αζώτου (HOUGH, 1985).

Οι σακχαρομύκητες είναι ο πιο διαδεδομένος μικροοργανισμός στην παραγωγή αλκοολούχων ποτών γιατί είναι ιδιαίτερα ανθεκτικός στην αλκοόλη και το SO<sub>2</sub>, καταναλώνει πλήρως τα σάκχαρα του γλεύκους, τα οποία μετατρέπει σε αναερόβιες συνθήκες κυρίως σε αλκοόλη και αρωματικά συστατικά κι όχι σε βιομάζα, αναπτύσσεται και ζυμώνει ταχύτατα σε μικρές τιμές pH ή και σε χαμηλές θερμοκρασίες και μεγάλες πιέσεις , παράγει λίγο SO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S, οξικό οξύ και ουρία, είναι ανθεκτικό απέναντι σε ανταγωνιστές μικροοργανισμούς, και καταβυθίζεται σχεδόν πλήρως μετά το πέρας της ζύμωσης. Ειδικά στελέχη διαφέρουν ως προς την παραγωγή αρωματικών συστατικών και παραπροϊόντων και μπορούν να επιλεγούν ανάλογα με την περίπτωση (JACKSON, 1994). Η ιδιότητα αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την απομόνωση και ταυτοποίηση διαφορετικών στελεχών. Οι αυθόρμητες ζυμώσεις όπως η φυσική ζύμωση του κρασιού πραγματοποιούνται από διάφορα είδη σακχαρομυκήτων καθένα από τα οποία επικρατεί σε διάφορα στάδια της ζύμωσης (POLSINELLI et al., 1996).

Η ανάπτυξη και ζυμωτική ικανότητα των σακχαρομυκήτων εξαρτάται από τη θερμοκρασία, το pH, την οσμωτική πίεση, την περίσσεια άνθρακα, αζώτου, θείου και φωσφόρου, και την παρουσία οξυγόνου (TORTORA et al., 1995). Αύξηση της θερμοκρασίας και μείωση του pH έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση της ανθεκτικότητας της ζύμης στην παραγόμενη αιθανόλη. Με τη χρήση ψυχρόφιλων και αλκοολοανθεκτικών στελεχών των σακχαρομυκήτων επιτυγχάνεται παραγωγή προϊόντος βελτιωμένης ποιότητας διατηρώντας την παραγωγικότητα σε επιθυμητά από οικονομικής πλευράς επίπεδα (ARGIRIOU et al., 1996a).



Σχήμα 6. : Κύτταρα *Saccharomyces cerevisiae*

Τα βασικά θρεπτικά συστατικά που απαιτούνται για την ανάπτυξη των ζυμών είναι το νερό, πηγές αζώτου και άνθρακα, οξυγόνο, φώσφορος, μαγνήσιο, ιχνοστοιχεία και βιταμίνες. Το νερό, δεσμευμένο και ελεύθερο, αποτελεί το 85% της μάζας των κυττάρων.

### 3.4.1. Χρήσεις των σακχαρομυκήτων

Οι σακχαρομύκητες αποτελούν το πιο διαδεδομένο είδος ζύμης με πολλές εφαρμογές, και από πρακτικής πλευράς διακρίνονται σε ζύμες οινοποίησης, ζυθοποίησης, αρτοποιίας και αποσταγματοποίησης.

Μερικές βιομηχανικές χρήσεις των σακχαρομυκήτων είναι (ΚΟΥΤΙΝΑΣ και ΠΕΦΑΝΗΣ, 1996):

- Ζύμωση της βύνης - παραγωγή μπύρας.
- Ζύμωση σταφυλιών - παραγωγή κρασιού και λικέρ.
- Παραγωγή κρασιού- απόσταξη- παραγωγή κονιάκ, μπράντυ.
- Ζύμωση βύνης-απόσταξη – παραγωγή ούισκι.
- Ζύμωση μελάσας – παραγωγή ρούμι.
- Ζύμωση ρυζιού - παραγωγή σακέ, σοντί.
- Ζύμωση ζυμαριού – παραγωγή ψωμιού, αρτοποιημάτων.

- Ζύμωση σακχαρούχων υλών – παραγωγή οινόπνεύματος.
- Παραγωγή οξικού οξέος.

#### 3.4.1.1. Οι ζύμες στην παραγωγή μπύρας

Τα στελέχη ζυμών (κυρίως των *Saccharomyces cerevisiae* και *Saccharomyces carlsbergensis*) που χρησιμοποιούνται στη ζυθοποιία εμφανίζουν αρκετές φυσιολογικές και λειτουργικές διαφορές με ιδιαίτερη σημασία για την τεχνολογική πρακτική. Η σημαντικότερη διάκριση μεταξύ των ζυμών είναι η δυνατότητα **επίπλευσης ή καταβύθισης** των κυττάρων (*flocculation*) μετά το πέρας της ζύμωσης, η οποία οφείλεται στη διαφορετική σύσταση του κυτταρικού τους τοιχώματος (HOUGH *et al.*, 1982; HOUGH *et al.*, 1985).

Για την εξήγηση του φαινομένου υπάρχουν δύο θεωρίες. Η μια αφορά τις αλληλεπιδράσεις των φορτισμένων σωματιδίων του υγρού ζύμωσης με την επιφάνεια του κυτταρικού τοιχώματος της ζύμης και η δεύτερη συνδέει την καταβύθιση με την ικανότητα δημιουργίας συσσωματωμάτων ανάμεσα στα κύτταρα της ζύμης. Σε κάθε περίπτωση η καταβύθιση των κυττάρων επηρεάζεται από πολλούς εξωτερικούς παράγοντες όπως η παρουσία ανόργανων ιόντων, η αιθανόλη, το pH, η θερμοκρασία, το διαλυτό οξυγόνο, η σύνθεση και μετουσίωση ορισμένων πρωτεϊνών και η δράση πρωτεολυτικών ενζύμων, τα σάκχαρα του γλεύκους και η ηλικία των κυττάρων. Με βάση την ιδιότητα αυτή οι ζύμες διαχωρίζονται σε **αφροζύμες** και **βυθοζύμες**.

Επίσης μεγάλη σημασία στη ζυθοποιία έχει η ζύμωση των δεξτρινών γιατί οι οργανοληπτικές ιδιότητες της μπύρας εξαρτώνται από το είδος των δεξτρινών. Οι ανώτερες δεξτρίνες (πάνω από την εξόζη) δεν μεταβολίζονται. Αντίθετα η ζύμη αρτοποιίας μπορεί να μεταβολίσει και ανώτερες δεξτρίνες. Η ικανότητα μεταβολισμού των δεξτρινών από τις ζύμες ζυθοποιίας και αρτοποιίας τοποθετεί τα είδη αυτά στην κορυφή της εξελικτικής βαθμίδας του γένους *Saccharomyces* (KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, 1990).

Η σύσταση των ζυμών ζυθοποιίας είναι (KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, 1990):

- Ανθρακας: 44-50 %
- Υδρογόνο: 6-8
- Αζωτο: 8-12 %
- Οξυγόνο: 30-36 %

### **3.4.2. Εξωτερικοί παράγοντες που επηρεάζουν την αλκοολική ζύμωση και την ανάπτυξη των σακχαρομυκήτων**

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την αλκοολική ζύμωση ή την ανάπτυξη των σακχαρομυκήτων και η ρύθμισή τους για την παραγωγή προϊόντος με βελτιωμένο οργανοληπτικό χαρακτήρα έχουν μελετηθεί από πολλούς ερευνητές και έχουν παράλληλα αναπτυχθεί πολλά θεωρητικά μοντέλα για την εξήγηση και περιγραφή της αλκοολικής ζύμωσης. Οι παράγοντες αυτοί είναι:

#### **3.4.2.1. Πηγές άνθρακα**

Οι ουσίες που χρησιμοποιούν οι σακχαρομύκητες ως πηγές ενέργειας είναι τα σάκχαρα (γλυκόζη, φρουκτόζη, σακχαρόζη) και λιγότερο, ορισμένα αμινοξέα και η γλυκερόλη. Συγκεντρώσεις σακχάρων γύρω στο 25% επιβραδύνουν την αλκοολική ζύμωση και πάνω από 25-30% τη σταματούν λόγω οσμωτικών φαινομένων. Η συγκέντρωση των σακχάρων επηρεάζει το σχηματισμό των αρωματικών συστατικών. Σε υψηλές συγκεντρώσεις αυξάνεται η παραγωγή αιθανόλης, οξικού οξέος και εστέρων του (JACKSON, 1994).

Η πιο αξιοποιήσιμη πηγή άνθρακα είναι τα σάκχαρα, που μεταβολίζονται με οξειδωτικό και μη οξειδωτικό τρόπο και συγκεκριμένα οι εξόζες όπως η D-γλυκόζη, D-φρουκτόζη και D-μαννόζη, και ο διασακχαρίτης σουκρόζη αφού υδρολυθεί πρώτα σε γλυκόζη και φρουκτόζη από το ένζυμο ιμβερτάση.

#### **3.4.2.2. Θερμοκρασία**

Η θερμοκρασία είναι από τους σημαντικότερους εξωτερικούς παράγοντες που επηρεάζουν την ταχύτητα της αλκοολικής ζύμωσης. Ακραίες τιμές θερμοκρασίας προκαλούν θάνατο των κυττάρων και αναστολή της ζύμωσης. Σε χαμηλές θερμοκρασίες τα κύτταρα είναι πιο ανθεκτικά στην αλκοόλη λόγω της μεγαλύτερης αναλογίας ακόρεστων λιπαρών οξέων στις μεμβράνες (JACKSON, 1994).

Μεταβολή της θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια της ζύμωσης (ανισόθερμη ζύμωση) έχει παρατηρηθεί ότι επηρεάζει την κινητική, αλλά και την ποιότητα του προϊόντος (WALSH και MARTIN, 1977).

Για την ανάπτυξη των ζυμών η βέλτιστη θερμοκρασία είναι 25 °C, υπάρχουν όμως και είδη που αναπτύσσονται στους 37 °C ή στους 20 °C. Οι ζύμες μπορούν να αναπτυχθούν ακόμα και στους 4-5 °C. Η ζύμη ζυθοποιίας μπορεί να ζυμώσει και

στους 0 °C αλλά δεν αναπτύσσεται σε αυτή τη θερμοκρασία (KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, 1990).

#### 3.4.2.3. pH

Το pH επηρεάζει σημαντικά τον ρυθμό της ζύμωσης, η οποία σταματά σε τιμές μικρότερες του 3. Στην τιμή αυτή ο ρυθμός ανάπτυξης της ζύμης είναι ο μισός απ' ότι σε pH 4.

Έμμεσες δράσεις του pH σε χαμηλές τιμές είναι η ενίσχυση της αντιμικροβιακής δράσης του SO<sub>2</sub>, η αναστολή της ανάπτυξης ανεπιθύμητων μικροοργανισμών, η υδρόλυση των εστέρων, κ.α. (JACKSON, 1994).

#### 3.4.2.4. Οξυγόνο

Το οξυγόνο έχει διαλυτότητα 8 mg/L στους 30 °C και αποτελεί πολύ σημαντικό παράγοντα για την ανάπτυξη των κυττάρων. Αξιοποιείται όμως μόνο το διαλυτό O<sub>2</sub> (KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, 1990). Σε αερόβιες συνθήκες και χαμηλές συγκεντρώσεις σακχάρου ευνοείται ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων αντί της ζύμωσης. Αυτό συμβαίνει γιατί παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων οξυγόνου μεταβάλλεται ο μεταβολισμός του πυροσταφυλικού οξέος. Η μέγιστη παραγωγή βιομάζας φαίνεται πως ευνοείται σε συγκέντρωση διαλυτού οξυγόνου ~10% ενώ για μεγαλύτερες συγκεντρώσεις είναι λιγότερο εμφανής η επίδρασή του.

Οι ζύμες κάτω από αναερόβιες συνθήκες, όπως στην αλκοολική ζύμωση για την παραγωγή μπύρας, απαιτούν ένα ποσό οξυγόνου (0,3-1,0 mg/L) προκειμένου να πραγματοποιηθεί ο σχηματισμός στερολών και ακόρεστων λιπαρών που είναι βασικά συστατικά της κυτταρικής μεμβράνης. Οι ζύμες συνθέτουν τα δικά τους λιπίδια, αλλά δεν μπορούν να συνθέσουν μεγάλες αλυσίδες ακόρεστων λιπαρών οξέων και στερολών απουσία οξυγόνου και γι' αυτό η ανάπτυξή τους είναι μικρή σε αναερόβιες συνθήκες. Γι' αυτό πολλές φορές στη βιομηχανική πρακτική συνηθίζεται η διαβίβαση οξυγόνου για την αύξηση της βιομάζας και κατά συνέπεια της ταχύτητας ιδιαίτερα στην αρχή της ζύμωσης (JACKSON, 1994). Υπάρχουν όμως είδη ζυμών (*Kluyveromyces*) που μπορούν να παράγουν μεγάλη πυκνότητα βιομάζας υπό αναερόβιες συνθήκες αξιοποιώντας δισακχαρίτες (CASTRILLO *et al.*, 1996).

Ο προσδιορισμός του διαλυτού οξυγόνου κατά την πορεία της ζύμωσης γίνεται σήμερα απλά με ευαίσθητους ηλεκτρονικούς ανιχνευτές.

#### 3.4.2.5. Αλκοόλη

Οι αλκοόλες είναι τοξικές πάνω από μια ορισμένη συγκέντρωση. Η τοξική τους δράση εντοπίζεται στην καταστροφή της ημίρρευστης μορφής της κυτταρικής μεμβράνης. Η αντοχή στην αιθανόλη εξαρτάται από το στέλεχος αλλά και τη θερμοκρασία και το pH (JACKSON, 1994).

Η περιεκτικότητα σε αιθανόλη έχει μεγάλη σημασία στην ποιότητα του προϊόντος αφού διευκολύνει τη συντήρηση, είναι διαλύτης των φαινολικών συστατικών συνεισφέροντας στο σχηματισμό του χρώματος και αποτελεί η ίδια συστατικό του αρώματος του προϊόντος (JACKSON, 1994).

Οργανοληπτικά έχει θερμαντικό-ζεστό αποτέλεσμα στο στόμα, εντύπωση γλυκύτητας και απαλότητας και σώμα.

#### 3.4.2.6. Αζωτούχα συστατικά

Το άζωτο απαιτείται για τη σύνθεση των πρωτεϊνών και των νουκλεϊνικών οξέων. Η απαίτηση της ζύμης σε αζωτούχα συστατικά είναι η μέγιστη κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης. Οι πηγές που αξιοποιούνται ευκολότερα είναι η αμμωνία, ορισμένα αμινοξέα (αλανίνη, λευκίνη, ισολευκίνη, βαλίνη, γλουταμίνη, γλουταμινικό οξύ, κ.α.) και η ουρία. Επίσης ορισμένες αμίνες και πεπτίδια, ενώ οι πρωτεΐνες δεν μπορούν να αξιοποιηθούν ως πηγές αζώτου. Η κυστεΐνη δεν αξιοποιείται εύκολα. Παράλληλα, το άζωτο επηρεάζει τη σύνθεση αρωματικών συστατικών. (JACKSON, 1994).

Για την παραγωγή βιομάζας χρησιμοποιούνται φυσικά προϊόντα όπως πεπτόνες, εκχύλισμα ζύμης, κ.α. επίσης αμμωνιακά άλατα θειικά, φωσφορικά και νιτρικά. Τα άλατα αυτά όμως μπορεί να δώσουν ισχυρά οξέα αλλάζοντας το pH. Εξαιρεση αποτελεί το φωσφορικό αμμώνιο, αφού το φωσφορικό οξύ αποτελεί καλό ρυθμιστικό μέσο και ο φωσφόρος βασικό συστατικό της ζύμης (KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, 1990).

#### 3.4.2.7. Φαινόλες

Επηρεάζουν την πορεία της ζύμωσης με ενίσχυση ή αναστολή της, αλλά η δράση αυτή διαφέρει ανάλογα με τη φαινολική ουσία (JACKSON, 1994).

#### 3.4.2.8. SO<sub>2</sub>

Δεν επιτρέπει την ανάπτυξη ανεπιθύμητων μικροοργανισμών, ενώ οι σακχαρομύκητες μπορούν και αναπτύσσονται σε συγκεντρώσεις μικρότερες από 50

mg/L. Επηρεάζει επίσης το μεταβολισμό της ζύμης δεσμεύοντας τις καρβονυλικές ενώσεις όπως η ακεταλδεΐδη, το πυροσταφυλικό και το α-κετογλουταρικό οξύ, οδηγώντας σε αύξηση της παραγωγή τους από τη ζύμη για την πραγματοποίηση των διάφορων μεταβολικών της οδών. Επίσης προκαλεί αύξηση της γλυκερόλης, και μείωση του οξικού οξέος. Αξιοποιείται από τη ζύμη για τη σύνθεση θειούχων ενώσεων. Η αναγωγή του σε υδρόθειο έχει σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση δυσάρεστης οσμής (JACKSON, 1994).

#### 3.4.2.9. CO<sub>2</sub>

Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης παράγονται 260 mg CO<sub>2</sub>/g γλυκόζης. Αυτό με την απομάκρυνσή του οδηγεί σε απώλεια αλκοόλης κατά 1,5%, ανώτερων αλκοολών και μονοτερπενίων κατά 1%, ενώ μεγάλη είναι και η απώλεια οξικών- και αιθυλ- εστέρων μειώνοντας το φρουτώδες αποτέλεσμά τους στο άρωμα. Οι απώλειες αυτές των αρωματικών συστατικών εξαρτώνται από το μέγεθος και την έκταση της επιφάνειας του δοχείου ζύμωσης.

Παράλληλα, το CO<sub>2</sub> αυξάνει την πίεση στο ζυμούμενο υγρό επηρεάζοντας τη ζυμωτική δράση της ζύμης. Η ευαισθησία της ζύμης στην πίεση είναι μεγαλύτερη όσο μεγαλύτερος είναι ο αλκοολικός βαθμός και χαμηλότερο το pH (JACKSON, 1994).

#### 3.4.2.10. Βιταμίνες

Σημαντικός είναι ο ρόλος των βιταμινών-συνενζύμων, ιδίως του συμπλέγματος Β, στη ρύθμιση του μεταβολισμού της ζύμης. Οι βιταμίνες δεν αξιοποιούνται από την ζύμη σαν πηγές ενέργειας, αλλά σε πολλές περιπτώσεις μειώνονται σημαντικά κατά τη ζύμωση (ΚΟΚΚΟΒΑ-ΚΡΑΤΟΧΒΙΛΟΒΑ, 1990).

**Πίνακας 3..** Περιεκτικότητα της ζύμης σε διάφορες βιταμίνες (ΚΟΚΚΟΒΑ-ΚΡΑΤΟΧΒΙΛΟΒΑ, 1990).

Βιταμίνη	Συγκέντρωση (μg/g)
m-Ινοσιτόλη	3000-5000
Παντοθενικό οξύ	80-150
Βιοτίνη	2-2,5
Πυριδοξίνη (B <sub>6</sub> )	20-40
Θειαμίνη (B <sub>1</sub> )	100-150
Νιασίνη	400-600

#### 3.4.2.11. Ανόργανα συστατικά

Αποτελούν σημαντικά συστατικά των ενεργών κέντρων των ενζύμων, συντελούν στη ρύθμιση του μεταβολισμού της ζύμης και τη διατήρηση της ιονικής ισορροπίας (JACKSON, 1994).

Ο φωσφόρος στην τέφρα ζύμης ζυθοποιίας αποτελεί το 48,3%. Αξιοποιείται στη σύνθεση των φωσφοροπρωτεϊνών, φωσφολιπιδίων, νουκλεοπρωτεϊνών, νουκλεϊνικών οξέων, κ.α. Προστίθεται στο μέσο ανάπτυξης ως άλας καλίου, αμμωνίου ή νατρίου. Το  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  προτιμάται γιατί έχει ρυθμιστικές ιδιότητες. Η μελάσα και άλλα θρεπτικά μέσα περιέχουν λίγο αξιοποιήσιμο άζωτο και συνήθως εμπλουτίζονται με  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, 1990).

Το μαγνήσιο αποτελεί το 6% της τέφρας. Είναι ενεργοποιητής πολλών ενζύμων κυρίως των φωσφατασών. Προστίθεται ως θειικό άλας σε όλα τα συνθετικά μέσα ανάπτυξης (KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, 1990).



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### Η σύσταση της μπίρας

Η μπίρα αποτελείται από 400 περίπου διαφορετικές ενώσεις που προέρχονται από την πρώτη ύλη ή έχουν σχηματιστεί ως προϊόντα του μεταβολισμού της ζύμης ή βιοχημικών μετατροπών κατά τη βυνοποίηση, τη ζύμωση και την ωρίμανση (HOUGH., 1985). Οι κυριότερες κατηγορίες συστατικών της μπίρας είναι:

#### 4.1. Αιθανόλη

Ο αλκοολικός βαθμός είναι το % κατ' όγκον ποσοστό της αιθανόλης που περιέχεται στην μπίρα στους 20 °C. Ο προσδιορισμός του μπορεί να γίνει με διαχωρισμό της αιθανόλης με απόσταξη και μέτρηση της πυκνότητας του αποστάγματος.

Γενικά όμως στη ζυθοποιία ο προσδιορισμός της αιθανόλης γίνεται με τη βοήθεια ειδικών πινάκων (νομογράμματα) και των παρακάτω παραμέτρων (HOUGH *et al.*):

- **Original gravity** ή ειδικό βάρος του ζυθογλεύκους (% κ.β. ή °Plato). Η τιμή της για τις συνήθεις εμπορικές μπίρες κυμαίνεται μεταξύ 10 και 13 °Plato.
- **Apparent extract** ή φαινομενικό εκχύλισμα, που είναι η πυκνότητα (% κ.β. ή °Plato), της ζυμωμένης μπίρας.
- **Real extract** ή πραγματικό εκχύλισμα, που είναι η πυκνότητα (% κ.β. ή °Plato) του αποστάγματος 100 g μπίρας αραιωμένου στα 100 g.

Η τιμή του αλκοολικού βαθμού για τις περισσότερες εμπορικές μπίρες κυμαίνεται μεταξύ 2,5 και 5% v/v, ενώ ειδικές δυνατές μπίρες μπορεί να έχουν μέχρι και 10% v/v.

Για τον προσδιορισμό της αιθανόλης χρησιμοποιούνται σήμερα σύγχρονες μέθοδοι ενόργανης ανάλυσης όπως η αέρια χρωματογραφία και η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC) (TARNOWSKI και KORZENIEWSKI, 1996).

#### 4.2. Αζύμωτο σάκχαρο

Η μπίρα περιέχει αζύμωτο σάκχαρο που αποτελείται κυρίως από δεξτρίνες με περισσότερα από τέσσερα μόρια γλυκόζης. Η γλυκόζη, φρουκτόζη, μαλτόζη και

μαλτοτριόζη υπό φυσιολογικές συνθήκες ζυμώνονται πλήρως. Η συγκέντρωση του αζύμωτου σακχάρου στις τυπικές μπύρες του εμπορίου, εκφρασμένη ως γλυκόζη, κυμαίνεται μεταξύ 0,89-5,98% w/v (HOUGH et al., 1982).

Μεγάλα ποσοστά αζύμωτου σακχάρου οφείλονται στη σκόπιμη παύση της ζύμωσης ή σε ατελή ζύμωση λόγω κακής κατάστασης της ζύμης.

Ο προσδιορισμός του αζύμωτου σακχάρου μπορεί να γίνει με μεγάλη ακρίβεια και ευκολία με ενόργανες μεθόδους ανάλυσης όπως η HPLC, αντί των παραδοσιακών χημικών μεθόδων (Lane-Eynon, μέθοδος ανθρόνης-θειικού οξέος) που είναι χρονοβόρες και δαπανηρές.

### 4.3. Πικραντικές ύλες λυκίσκου

Η πικρή γεύση της μπύρας αποδίδεται σε ισο-α-οξέα ή ισο-ουμουλόνες (cis- και trans-), που προκύπτουν από ισομερισμό των α-οξέων του λυκίσκου κατά τον βρασμό και είναι πιο πικρά και πιο διαλυτά συστατικά. Τα πικρά αυτά συστατικά μειώνονται κατά την ωρίμανση και αποθήκευση αυξάνοντας περισσότερο το γλυκό χαρακτήρα του προϊόντος. Οι ισοουμουλόνες υφίστανται οξειδωση κατά την ωρίμανση με την επίδραση του οξυγόνου, του φωτός καθώς και πολλών ιόντων όπως ο σίδηρος, που οδηγούν στο σχηματισμό ελεύθερων ριζών και επιταχύνουν την οξειδωση (KING και DUINEVELD, 1999).

Έχουν προσδιοριστεί πάνω από 150 πτητικά συστατικά από διάφορες ποικιλίες λυκίσκου με μεθόδους GC και GC-MS, καθώς και η επίδραση της αποθήκευσης στη συγκέντρωσή τους.

Τα πικρά συστατικά της μπύρας προσδιορίζονται στο σύνολό τους σε μονάδες BU (Bitterness Units), με βάση την τιμή της απορρόφησης στο υπεριώδες (275 nm) του εκχυλίσματός τους με ισοοκτάνιο. Η περιεκτικότητά τους στις περισσότερες εμπορικές μπύρες κυμαίνεται από 10 έως 62 BU (HOUGH et al., 1982).

Ο SAKUMA και οι συνεργάτες του έχουν πετύχει την αυτοματοποίηση της επίσημης μεθόδου ανάλυσης (οξίνιση-εκχύλιση με ισοοκτάνιο και απορρόφηση στα 275 nm), ώστε να γίνεται με απευθείας μέτρηση σε 5 min (SAKUMA et al., 1994).

### 4.4. Πολυφαινόλες

Στην μπύρα υπάρχει ένα πολυσύνθετο μίγμα φαινολικών συστατικών σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται περίπου μεταξύ 150-350 mg/L. Περίπου τα 2/3 προέρχονται από τη βύνη και το 1/3 από το λυκίσκο. Οι φαινόλες αυτές μπορεί να

είναι πτητικά μονομερή όπως φαινολικά οξέα, αλκοόλες και αμίνες, μονομερείς φαινόλες όπως τα φλαβονοειδή, κατεχίνες, φλαβανόλες και ανθοκυάνες, και μη πτητικά διμερή και πολυμερή των παραπάνω.

Οι πτητικές φαινόλες αποτελούν μέρος του αρώματος και προέρχονται από τη πρώτη ύλη ή το μεταβολισμό της ζύμης. Ανεπιθύμητες για το άρωμα φαινόλες μπορούν να παραχθούν από τη δράση άγριων ζυμών ή βακτηρίων. Επίσης μεγάλο πρόβλημα δημιουργεί η οξείδωση των πολυφαινολών και ο συμπολυμερισμός τους με πρωτεΐνες δημιουργώντας θολώματα. Οι πρωτεΐνες που μπορούν να συνδεθούν με πολυφαινόλες είναι εκείνες που έχουν μεγάλη περιεκτικότητα σε προλίνη.

Παρόμοια φαινόμενα ανάπτυξης κολλοειδών θολωμάτων και off-flavours παρατηρούνται μετά από μακροχρόνια αποθήκευση της μπύρας. Υπεύθυνη για αυτά τα προβλήματα είναι η οξείδωση των λιπιδίων και κυρίως του λινολεϊκού οξέος προς υπεροξειδία, τα οποία με τη δράση ενζύμων μετατρέπονται σε καρβονυλικές ενώσεις. Κυριότερη είναι η trans-2-νονενάλη που δίνει στην μπύρα γεύση χαρτιού. Η παρουσία πολυφαινολών (κυρίως των 3-φλαβανολών) έχει μεγάλη σημασία στην αποφυγή τέτοιων φαινομένων αφού αποτελούν φυσικά αντιοξειδωτικά συστατικά του κριθαριού και της βύνης.

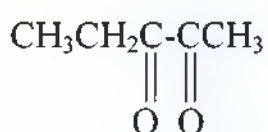
Ο προσδιορισμός των ολικών πολυφαινολών στην μπύρα γίνεται με μέτρηση του χρώματος που σχηματίζεται με αντίδραση με αμμωνιούχο κιτρικό σίδηρο στα 600 nm (HOUGH et al., 1982).

#### 4.5. Δικετόνες: διακετύλιο (2,3 βουτανοδιόνη) και 2,3-πεντανοδιόνη

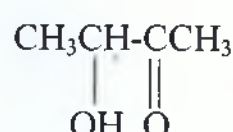
Οι δικετόνες είναι παραπροϊόντα της ζύμωσης που ενισχύουν την απαλότητα της γεύσης της μπύρας και έχουν άρωμα παρόμοιο με του βουτύρου, του μελιού και της βανίλιας, έντονο ακόμα και σε συγκέντρωση 1 mg/L. Μεγαλύτερες συγκεντρώσεις δεν είναι επιθυμητές. Τα ένζυμα της ζύμης ανάγουν το διακετύλιο και την 2,3-πεντανοδιόνη σε άοσμες και άγευστες ουσίες (διόλες).



ΔΙΑΚΕΤΥΛΙΟ



2,3-ΠΕΝΤΑΝΟΔΙΟΝΗ



ΑΚΕΤΟΪΝΗ

Σχήμα 7. : Καρβονυλικές ενώσεις-παραπροϊόντα της μπύρας

Άλλη ουσία που παράγεται από το μεταβολισμό της ζύμης είναι η ακετοΐνη, που ανάγεται επίσης σε διόλη. Το ενζυμικό σύστημα δεϋδρογονάσης της ακετοΐνης/ρεδουκτάσης του διακετυλίου στις ale-ζύμες διαφέρει σε δραστικότητα και θερμική σταθερότητα από τις lager-ζύμες (MURPHY et al., 1996).

Η περιεκτικότητα του διακετυλίου στις περισσότερες εμπορικές μπίρες έχει συγκέντρωση 0,02-0,58 mg/L (πάνω από 0,5 mg/L θεωρείται off-flavour), της 2,3-πεντανοδιόνης 0,01-0,26 mg/L και της ακετοΐνης 0,4-26 mg/L.

Ο προσδιορισμός του διακετυλίου γίνεται με απόσταξη και μέτρηση του χρώματος που σχηματίζεται με αντίδραση με ο-φαιτυλενοδιαμίνη στα 335 nm (HOUGH et al., 1982).

#### 4.6. Άλλα συστατικά της μπίρας

Η μπίρα περιέχει μια πληθώρα **πηητικών συστατικών** που συντελούν στο άρωμά της. Τα πηητικά συστατικά προέρχονται είτε από τις πρώτες ύλες ή είναι παραπροϊόντα της αλκοολικής ζύμωσης και περιλαμβάνουν αλκοόλες, αλδεΐδες, οξέα, εστέρες, λακτόνες, κετόνες και υδρογονάνθρακες (HOUGH et al., 1982).

Οι **αζωτούχες ενώσεις** της μπίρας περιλαμβάνουν πρωτεΐνες, πεπτιδία, αμινοξέα, νουκλεϊνικά οξέα, αμίνες και αμίδια. Το ολικό άζωτο στις περισσότερες εμπορικές μπίρες έχει τιμή 300-1000 mg/L, και εκφρασμένο ως πρωτεΐνη 0,19-0,63% (HOUGH et al., 1982).

Τα κυριότερα **μεταλλικά στοιχεία** της μπίρας είναι το κάλιο (220-1100 mg/L), το νάτριο (9-200 mg/L), το μαγνήσιο (34-250 mg/L), το ασβέστιο (3-140 mg/L), ο σίδηρος (0,02-0,84 mg/L), ο χαλκός (0,01-0,8 mg/L), ο ψευδάργυρος (0,01-0,51 mg/L), κ.α. Επίσης η μπίρα μπορεί να περιέχει σε μικρές ποσότητες βαρέα μέταλλα όπως ο μόλυβδος (0,06 mg/L). Επίσης το αργίλιο, μέταλλο με μεγάλη διασπορά στη φύση, βρίσκεται συχνά στο κρασί και την μπίρα, προκαλώντας προβλήματα λόγω δημιουργίας θολώματος και δυσάρεστης γεύσης (HOUGH et al., 1982).

Η μπίρα είναι πλούσια σε **βιταμίνες** του συμπλέγματος Β. Έτσι, περιέχει σε σημαντικές ποσότητες βιοτίνη (7-18 ppb), θειαμίνη (15-181 ppb), νικοτινικό οξύ (4494-8607 ppb), πυριδοξίνη (329-709 ppb), παντοθενικό οξύ (1093-1808 ppb), ριβοφλαβίνη (219-575 ppb). Περιέχει επίσης ινοσιτόλη, φυλλικό οξύ και βιταμίνη Β<sub>12</sub> (HOUGH et al., 1982).

**Πίνακας 4.:** Ανάλυση μιας τυπικής μπύρας του εμπορίου (POTTER και HOTCHKISS, 1995)

<b>Συστατικό</b>	<b>Συγκέντρωση</b>
<i>Αλκοόλη, %v/v</i>	4,600
<i>Ανάγοντα σάκχαρα, %w/v</i>	1,160
<i>Δεξτρίνες, %w/v</i>	0,175
<i>Πρωτεΐνες, %w/v</i>	0,299
<i>Διακετύλιο, mg/L</i>	0,210
<i>Ταννίνες, mg/L</i>	1,057
<i>CO<sub>2</sub>, w/w</i>	0,460
<i>Τέφρα, %w/v</i>	0,148

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

### Νέες τάσεις στην παραγωγή μπύρας

Αν και η παραγωγή μπύρας αποτέλεσε μια από τις πρώτες εφαρμογές της βιοτεχνολογίας, η επιστήμη αυτή αναζητά ακόμα και σήμερα τρόπους για τη βελτίωσή της. Μερικοί από αυτούς είναι η γενετική τροποποίηση των ζυμών ζυθοποιίας (YAMANO et al., 1995), η βελτίωση του κριθαριού, η χρήση επιλεγμένων καλλιεργειών (DEMUYAKOR και YOSHIYUKI, 1993), οι συνεχείς διεργασίες, η ζύμωση υψηλής πυκνότητας, η τροποποίηση των συνθηκών της ζύμωσης (KANEDA et al., 1992), η ωρίμανση με τη βοήθεια ακινητοποιημένων κυττάρων (LINKO et al., 1998).

Οι κατευθυνόμενες ζυμώσεις πλεονεκτούν γιατί η ζύμωση γίνεται ελεγχόμενα και το προϊόν έχει επιθυμητό και σταθερό οργανοληπτικό χαρακτήρα, σημαντική προϋπόθεση για τη βιομηχανοποίηση ενός προϊόντος (COLAGRANDE et al., 1994).

Παλιότερα στην παραγωγή μπύρας συνηθιζόταν η χρησιμοποίηση ακινητοποιημένων κυττάρων με την προσθήκη πριονιδιού κατά την αλκοολική ζύμωση, που συγκρατούσε τα κύτταρα της ζύμης σε όλο τον όγκο του ζυμούμενου υγρού (KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, 1990).

Η έρευνα για τη χρήση της τεχνολογίας των ακινητοποιημένων κυττάρων άρχισε στα μέσα της δεκαετίας του '70 σε εργαστηριακή και pilot-plant κλίμακα, με πρώτη βιομηχανική εφαρμογή στην Κίνα στα μέσα του '80. Επίσης έχει αναφερθεί η χρήση της τεχνολογίας αυτής στην ωρίμανση της μπύρας, στην παραγωγή μπύρας χωρίς αλκοόλη, και σε μεμονωμένα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης, αλλά όχι σε ολόκληρη τη βιομηχανική διεργασία (NORTON και D' AMORE, 1994).

Η τεχνολογία των ακινητοποιημένων κυττάρων εφαρμόζεται σήμερα κυρίως στην πραγματοποίηση δευτερογενών ζυμώσεων (ωρίμανση του προϊόντος, παραγωγή αφρώδους οίνου κ.λ.π.) (COLAGRANDE et al., 1994).

Σε εργαστηριακή κλίμακα η παραγωγή μπύρας με ακινητοποιημένα κύτταρα έδωσε προϊόν με βελτιωμένο οργανοληπτικό χαρακτήρα. Παραγωγή μπύρας σε χαμηλές θερμοκρασίες με κύτταρα *S. cerevisiae* ακινητοποιημένα σε απολιγνινοποιημένα κυτταρινούχα υλικά (BARDI et al., 1996a,b) και γλουτένη (BARDI et al., 1997a) με συνεχείς και ασυνεχείς διεργασίες, έδειξε σημαντική λειτουργική σταθερότητα, αυξημένες ταχύτητες ζύμωσης, μεγάλες παραγωγικότητες, μικρότερες

συγκεντρώσεις διακετυλίου, πολυφαινολών, και πικραντικών υλών, καλή διαύγεια και βελτιωμένο οργανοληπτικό χαρακτήρα.

### 5.1. Κατευθυνόμενη ζύμωση

Η επιλογή ή δημιουργία καθαρών στελεχών για την πραγματοποίηση κατευθυνόμενων ζυμώσεων (*induced fermentations*) γίνεται με κριτήριο την αντοχή του μικροοργανισμού στην καταπόνηση (συνθήκες ψύξης, θέρμανσης, οσμωτικής πίεσης, ξήρανσης, λυοφιλίωσης, παρουσία τοξικών ουσιών).

Η κατευθυνόμενη ζύμωση μπορεί να γίνει με:

#### α) Αλκοολοανθεκτικές ζύμες

Οι ζύμες ζυθοποίησης είναι οι λιγότερο ανθεκτικές στην αιθανόλη σε σχέση με τις ζύμες οινοποίησης και αποσταγματοποιίας. Συγκεκριμένα η επίδραση της αιθανόλης στον *Saccharomyces cerevisiae* έχει σαν αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της πρόσληψης γλυκόζης, μαλτόζης, αμμωνίου, και αμινοξέων, και άρα παύση της αλκοολικής ζύμωσης. Επίσης μειώνει το ενδοκυτταρικό pH, αλλάζει την σύσταση των στερολών και λιπαρών οξέων, αναταράσσει την ισορροπία των ηλεκτρολυτών, αναστέλλει τη δράση της ATPάσης των κυτοπλασματικών μεμβρανών, κτλ.

Η ανάγκη πλήρους και γρήγορης ζύμωσης γλευκών με υψηλή πυκνότητα, οδήγησε πολλούς ερευνητές στην προσπάθεια απομόνωσης στελεχών ανθεκτικών σε υψηλούς αλκοολικούς βαθμούς. Από την ελληνική μικροχλωρίδα απομονώθηκαν τα αλκοολανθεκτικά στελέχη AXAZ-1, AXAZ-2 (περιοχή Άνω Ζήρειας Αχαΐας) και Visanto-1 (Σαντορίνη). Ο AXAZ-1 μπόρεσε να ζυμώσει μέχρι τελικής συγκέντρωσης αλκοόλης 17,6% v/v και ο AXAZ-2 μέχρι 16,5% v/v. Είναι κατάλληλα στελέχη ακόμη και για ζύμωση μελάσας, δίνοντας μεγάλη παραγωγικότητα αιθανόλης και απόδοση (ARGIRIOU *et al.*, 1996a, 1996b).

#### β) Κρυοανθεκτικές ζύμες

Η παραγωγή κρασιού και μπίρας σε χαμηλές θερμοκρασίες δίνει προϊόν με βελτιωμένο οργανοληπτικό χαρακτήρα. Η πραγματοποίηση όμως ζυμώσεων σε χαμηλές θερμοκρασίες (<5 °C) απαιτεί στελέχη ανθεκτικά σ' αυτές τις συνθήκες.

Κρυοανθεκτικά και αλκοολανθεκτικά στελέχη *Saccharomyces cerevisiae* ικανά να αναπτύσσονται στους 6-7 °C έδωσαν κρασί καλής διαύγειας, σταθερού χρώματος και καλύτερης ποιότητας με την παραγωγή περισσότερης γλυκερόλης, και ηλεκτρικού

οξέος και λιγότερου οξικού οξέος (CASTELLARI *et al.*, 1994, CASTELLARI *et al.*, 1995).

Καλύτερης ποιότητας κρασί και μπίρα παράχθηκε σε χαμηλές θερμοκρασίες με τα στελέχη AXAZ-1, AXAZ-2, Visanto-1, που εκτός από αλκοολανθεκτικά είναι και κρυσανθεκτικά. Στους  $-2^{\circ}\text{C}$  ο AXAZ-1 έδωσε κρασιά με βαθμό 10% v/v σε χρόνο 155 μέρες (ARGIRIOU *et al.*, 1992, ARGIRIOU *et al.*, 1996a, 1996b).

Απομόνωση κρυσανθεκτικών στελεχών *Saccharomyces cerevisiae* έχει γίνει με ακτινοβολία ζυμών οينوποίησης με UV ακτινοβολία και με σύζευξη διαφορετικών στελεχών ζυμών αρτοποιίας (NAKAGAWA και OUCHI, 1994).

Η αντοχή των μικροοργανισμών σε χαμηλές θερμοκρασίες έχει αποδοθεί σε υψηλότερη αναλογία των ακόρεστων ή/και μικρής ανθρακικής αλυσίδας λιπιδίων που δίνουν ελαστικότητα στις κυτταρικές μεμβράνες .

#### γ) Θερμοανθεκτικές ζύμες

Η πραγματοποίηση αλκοολικής ζύμωσης με θερμοανθεκτικές ζύμες έχει μεγάλη σημασία για τις θερμές χώρες που παράγουν μεγάλες ποσότητες ζυμώσιμων πρώτων υλών, αλλά οι υψηλές θερμοκρασίες δεν επιτρέπουν την εφαρμογή της μεθόδου με οικονομικό τρόπο.

Απομόνωση ζυμών και βακτηρίων, ανθεκτικών και ικανών να ζυμώνουν ακόμη και στους  $40^{\circ}\text{C}$ , έχει αναφερθεί από πολλούς ερευνητές π.χ *Kluyveromyces marxianus* (BANAT και MARCHANT, 1995).

#### 5.1.1. Επιλογή του κατάλληλου μικροοργανισμού για την πραγματοποίηση κατευθυνόμενων ζυμώσεων.

Καθαρές καλλιέργειες ζυμών παρασκευάζονται από φυσικά στελέχη που λαμβάνονται από αυθόρμητες ζυμώσεις, απομονώνονται και ανακαλλιεργούνται. Η πρώτη καθαρή καλλιέργεια για οينوποίηση παρασκευάστηκε από τους *Hermann Müller-Thurgau* και *Julius Wortmann* το 1890, ενώ η πρώτη βιομηχανική παρασκευή πιεστής ζύμης για την αρτοποιία έγινε την δεκαετία του 1960 στις ΗΠΑ και η παραγωγή ξηρής ζύμης άρχισε το 1964 (JACKSON, 1994).

Οι προϋποθέσεις που πρέπει να πληρεί μια καθαρή καλλιέργεια είναι η αντοχή στην αλκοόλη, στην οσμωτική πίεση (μεγάλη περιεκτικότητα σακχάρου), στις χαμηλές και υψηλές θερμοκρασίες, η παραγωγή μικρών ποσοτήτων οξικού οξέος,



ακεταλδεϋδης,  $H_2S$ , διακετυλίου και ανώτερων αλκοολών, η παραγωγή επιθυμητού αρώματος, η παραγωγή γλυκερόλης, εστέρων και ουσιών που αναστέλουν την ανάπτυξη ανεπιθύμητων μικροοργανισμών. Επίσης, πρέπει να προκαλεί μικρό αφρισμό, να καταβυθίζεται εύκολα, να είναι κατάλληλη για ξήρανση. Οι διαθέσιμες στο εμπόριο καλλιέργειες αποτελούνται από ένα *Saccharomyces cerevisiae* ( JACKSON, 1994).

Για την απομόνωση ζυμών η διαδικασία περιλαμβάνει ανάπτυξη σε στερεή καλλιέργεια ειδικής σύνθεσης π.χ. υψηλής περιεκτικότητας σακχάρου όταν απαιτείται η απομόνωση ανθεκτικής στην οσμωτική πίεση ζύμης και χαμηλού pH με προσθήκη οξέων (γαλακτικού, κιτρικού, φωσφορικού, υδροχλωρικού) για τον αποκλεισμό βακτηρίων (ATLAS και BARTHA, 1993).

Για την ταυτοποίηση, χαρακτηρισμό και ταξινόμηση των ζυμών εξετάζεται η μορφολογία των κυττάρων. Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά που ενδιαφέρουν είναι το μέγεθος, το σχήμα, η αναπαραγωγή με εκβλάστηση και ο τύπος των σπορίων (JACKSON, 1994).

Επίσης, η απαίτηση σε άζωτο κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης είναι διαφορετική για κάθε στέλεχος. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την επιλογή ενός στελέχους για οινολογικούς σκοπούς αφού κατά τη ζύμωση επικρατούν συνθήκες έλλειψης αζώτου (JACKSON, 1994).

## 5.2. Γενετικά τροποποιημένες ζύμες

Η γενετική τροποποίηση ζυμών ώστε να είναι αλκοολανθεκτικές ή ικανές να ζυμώνουν σε χαμηλές θερμοκρασίες, είναι δυνατή, αλλά η εφαρμογή της δεν έχει ακόμη πραγματοποιηθεί γιατί η αλλαγή ενός μεταβολικού μονοπατιού μπορεί να σημαίνει ανεπιθύμητη ή ανεξέλεγκτη μετατροπή και σε άλλα.

Τεχνικές γενετικής τροποποίησης είναι η σύζευξη, η μετάλλαξη, η γενετική μηχανική κ.α. Μετάλλαξη είναι η τροποποίηση ενός γονιδίου που διατηρείται μετά το διπλασιασμό του γενετικού υλικού ακόμα και όταν ο παράγοντας που την προκαλεί (μεταλλαξιγόνο) πάψει να ενεργεί (KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, 1990). Οι τροποποιήσεις αυτές περιλαμβάνουν απενεργοποίηση, ενεργοποίηση η και μετάλλαξη γονιδίων με σκοπό τη μείωση της συγκέντρωσης ορισμένων ανεπιθύμητων μεταβολιτών ή την αύξηση ουσιών που βελτιώνουν την ποιότητα του προϊόντος (JACKSON, 1994).

Η γενετική βελτίωση ζυμών ζυθοποιίας, αρτοποιίας και αποσταγματοποιίας, έχει μελετηθεί γιατί οι μικροοργανισμοί αυτοί πρέπει να έχουν αντοχή και παραγωγή μεγάλου βαθμού αιθανόλης, καλή μετατροπή των σακχάρων, μεγάλη ταχύτητα ζύμωσης, παραγωγή καλού αρώματος και γεύσης, καλή καταβύθιση, αξιοποίηση τρισακχαριτών, δεξτρινών και αμύλου, μη αφρίζουσα ζύμωση, ικανότητα ζύμωσης σε χαμηλές θερμοκρασίες (JACKSON, 1994). Έτσι, έχουν τροποποιηθεί στελέχη σακχαρομυκήτων που παράγουν λιγότερο διακετύλιο, που είναι ανεπιθύμητο συστατικό του αρώματος της μπίρας και η απομάκρυνσή του απαιτεί ωρίμανση του προϊόντος για ένα ορισμένο χρονικό διάστημα. Άλλα στελέχη οδηγούν σε αύξηση της συγκέντρωσης του θειώδους που προσδίδει στην μπίρα χαρακτηριστικό άρωμα σταθεροποιώντας παράλληλα τη γεύση της (JACKSON, 1994).

Επίσης, έχουν παρασκευαστεί μεταλλαγμένα στελέχη με αντοχή στην αφυδάτωση, την ψύξη, την αλκοόλη, την οσμωτική πίεση και με ικανότητα ζύμωσης διάφορων υποστρωμάτων (KLIONSKY *et al.*, 1997).

Γενικά η γενετική μηχανική αποτελεί ένα πολύτιμο μέσο για τη βελτίωση της ποιότητας της μπίρας, αρκεί να μην προϋποθέτει εισαγωγή ξένων γονιδίων στο γενετικό υλικό της ζύμης και πλασμιδίων που περιέχουν περιττούς παράγοντες επιλογής π.χ. γονίδια ανθεκτικά στα αντιβιοτικά.

Τα τελευταία χρόνια η ανάπτυξη τεχνικών ανασυνδυασμένου DNA οδήγησε στη δημιουργία νέων εξειδικευμένων στελεχών στη ζυθοποιία με βελτιωμένα χαρακτηριστικά (KLIONSKY *et al.*, 1997).

### 5.3. Ακίνητοποίηση κυττάρων

Εκτός από τους γενετικούς χειρισμούς, η βιοτεχνολογία χρησιμοποιεί και άλλες μεθόδους για τη βελτίωση της μπίρας, όπως η ζύμωση με ακίνητοποιημένα κύτταρα σε διάφορα υλικά-φορείς και οι συνεχείς διεργασίες.

Η ακίνητοποίηση κυττάρων είναι παλιά μέθοδος. Στην παραγωγή μπίρας συνηθιζόταν η προσθήκη πριονιδιού κατά την αλκοολική ζύμωση που συγκρατούσε τα κύτταρα της ζύμης σε όλο τον όγκο του ζυμούμενου υγρού (KOČKOVA-KRATOCHVÍLOVÁ, 1990).

Υπάρχει ένας τεράστιος όγκος αναφορών στη βιβλιογραφία σχετικά με την ανάπτυξη και τις προοπτικές της τεχνολογίας των ακίνητοποιημένων κυττάρων, ειδικά στην τεχνολογία των ζυμώσεων, στην επίδραση της ακίνητοποίησης στις ιδιότητες και τη συμπεριφορά των κυττάρων *S. cerevisiae* και την ποιότητα του προϊόντος.

Ως υποστρώματα ακινητοποίησης κυττάρων για αλκοολική ζύμωση έχουν χρησιμοποιηθεί **πηκτές αλγινικών** ( ONAKA et al., 1985, ROTMANN και REHM, 1990), **πολυακρυλαμίδιο** (DIVIES et al., 1979), **κομμάτια ξύλου** (πριονίδι) (GUENETTE και DUVNJAK, 1996), **φυσικό καουτσούκ** (HARRIS και GHANDIMATHI, 1998), **silica gel** και **πολυμερή πολυουρεθάνης** (BRANYIK et al., 1998), **πολυολεφίνη** και **φυτικά πολυμερή** (ίνες καλαμποκιού, άμυλο, κυτταρίνη) (POMETTO et al., 1997), **πελλέτες χιτοζάνης** (SHINONAGA et al., 1992), **πορώδες γυαλί** (WILLAERT και BARON, 1995), **πελλέτες κυτταρίνης** (SZAJANI et al., 1996), **ζελατίνη** (DORAN και BAILEY, 1986), **πηκτική PVA** (SHINDO και KAMIMURA, 1990), **πελλέτες γ-αλουμίνας** (KANA et al., 1989b), **απολιγνινοποιημένα κυτταρινούχα υλικά** (ICONOMOU et al., 1995; ICONOMOU et al., 1996), **γλουτένη** (BARDI et al., 1996c; BARDI et al., 1997a), σε **ορυκτό κίσηρη** (KOUTINAS et al., 1993), **κεραμικά υλικά** (NAKANISHI et al., 1989).

Με βάση την τεχνολογία των ακινητοποιημένων κυττάρων έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι συνεχούς παραγωγής αιθανόλης σε εργαστηριακή και βιομηχανική κλίμακα (KOUTINAS και KANELLAKI, 1990).

Για τη βιομηχανοποίηση της ακινητοποίησης των κυττάρων έχουν σχεδιαστεί σε επίπεδο pilot-plant ειδικά τροποποιημένοι βιοαντιδραστήρες (BAKOYIANIS και KOUTINAS, 1996).

Χρήση των ακινητοποιημένων κυττάρων έχει αναφερθεί στη γαλακτοβιομηχανία, και τη βιομηχανία του κρέατος (CHAMPAGNE et al., 1994). Κύτταρα *S. cerevisiae* ακινητοποιημένα σε απολιγνινοποιημένα κυτταρινούχα υλικά, ορυκτό κίσηρη και γλουτένη για παραγωγή κρασιού σε χαμηλή θερμοκρασία έδειξαν αύξηση της ταχύτητας ζύμωσης κατά 3 φορές σε σχέση με τα ελεύθερα κύτταρα και ικανοποιητικές παραγωγικότητες αιθανόλης ακόμη και στους 0-5 °C (BAKOYIANIS et al., 1992, BARDI et al., 1996c).

### 5.3.1 Μέθοδοι ακινητοποίησης κυττάρων

Υπάρχουν τρεις βασικές μέθοδοι ακινητοποίησης: α) η ακινητοποίηση των κυττάρων απουσία στερεών μη υδατοδιαλυτών φορέων, β) ο φυσικός εγκλωβισμός σε διάφορα πολυμερή και γ) η ακινητοποίηση των κυττάρων σε αδιάλυτους φορείς (ΚΥΡΙΑΚΙΔΗΣ, 1994).

α) Η **ακίνητοποίηση των κυττάρων** απουσία στερεών μη υδατοδιαλυτών φορέων μπορεί να γίνει με:

- **συσσωμάτωση** (aggregation ή flocculation) των κυττάρων. Η ιδιότητα αυτή που είναι γνωστή στη ζυθοποιία, εξαρτάται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες της επιφάνειας των κυττάρων, το pH του μέσου αιώρησης και την παρουσία ουσιών που υποβοηθούν τη δημιουργία συσσωματωμάτων (granules).
- **σχηματισμό χημικών δεσμών** (cross-linking) με τη βοήθεια διλειειτουργικών αντιδραστηρίων όπως η γλουταραλδεΐδη ( $\text{CHOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHO}$ ). Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται κυρίως στην ακίνητοποίηση ενζύμων.

β) Ο **φυσικός εγκλωβισμός σε διάφορα πολυμερή** γίνεται με διάφορες μεθόδους ανάλογα με το υλικό που χρησιμοποιείται. Γενικά, η ακίνητοποίηση των κυττάρων γίνεται κατά τη στερεοποίηση του πολυμερούς με τη βοήθεια κατιόντων. Αιώρημα των κυττάρων αναμιγνύεται με το πολυμερές δημιουργώντας:

- **πηκτές** που περιέχουν εγκλωβισμένα κύτταρα.
- **σφαιρίδια** με περιορισμό των κυττάρων σε μεμβράνες του πολυμερούς (microencapsulation) .

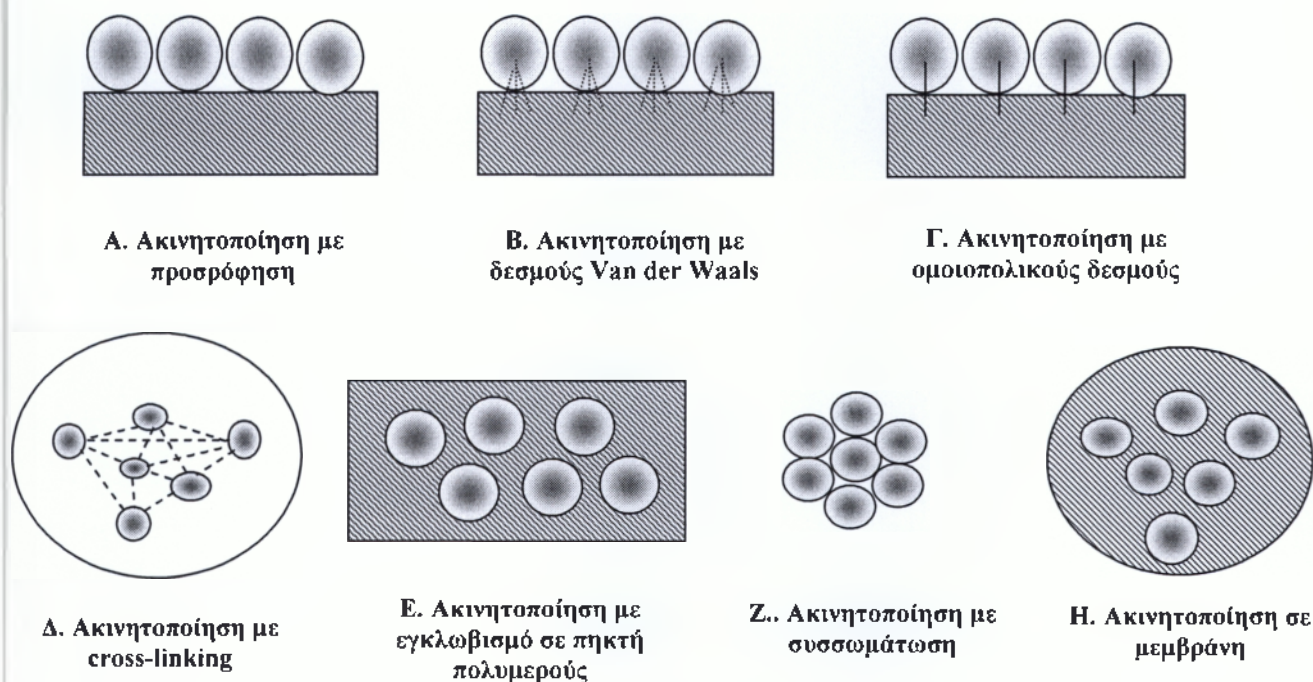
Τα συνηθισμένα μέσα ακίνητοποίησης είναι πολυσακχαρίτες, ζελατίνη, άγαρ, πολυακρυλικό, κολλαγόνο, silica gel, αλγινικό ασβέστιο, κ-καραγενάνη κ.α.

Μειονεκτήματα της μεθόδου είναι η δυσκολία διάχυσης των μεταβολιτών μέσα στην πηκτή, η πιθανότητα αυτόλυσης των εγκλωβισμένων κυττάρων, η ανάπτυξη των κυττάρων που καταστρέφει το βιοκαταλύτη κα.

γ) Η **ακίνητοποίηση των κυττάρων σε αδιάλυτους φορείς** γίνεται με προσρόφηση στην επιφάνεια των φορέων, που μπορεί να είναι φυσικά ή συνθετικά υλικά, με τρεις τρόπους:

- **Φυσική προσρόφηση-συγκράτηση** στους πόρους του φορέα.
- Συγκράτηση με **ηλεκτροστατικής φύσεως δυνάμεις** (ιονικοί δεσμοί που αναπτύσσονται μεταξύ της επιφάνειας του κυττάρου και του φορέα).
- Συγκράτηση με **ομοιοπολικούς δεσμούς** που αναπτύσσονται μεταξύ της επιφάνειας του κυττάρου και του φορέα.
- Συγκράτηση με **δυνάμεις διασποράς** τύπου Van der Waals που αναπτύσσονται μεταξύ της επιφάνειας του κυττάρου και του φορέα.

Οι φορείς ακινητοποίησης πρέπει να έχουν μεγάλη επιφάνεια, να περιέχουν λειτουργικές ομάδες για τη σύνδεση των κυττάρων, να είναι αδιάλυτοι, να έχουν χημική, μηχανική και θερμική σταθερότητα, να είναι αναγεννήσιμοι, να μην αλλοιώνονται από μικροοργανισμούς και κυρίως να είναι υλικά υψηλής καθαρότητας (food grade) (MARTIN, 1991).



**Σχήμα 8.** : Τρόποι ακινητοποίησης κυττάρων (MARTIN, 1991)

### 5.3.2. Πλεονεκτήματα της χρήσης ακινητοποιημένων κυττάρων στην παραγωγή αλκοολούχων ποτών

Τα ακινητοποιημένα κύτταρα εμφανίζουν διαφορετική μορφολογία και μεταβολισμό (ταχύτητες ανάπτυξης και ζύμωσης, αποδόσεις παραγωγής) συγκρινόμενα με τα ελεύθερα κύτταρα. Υπεύθυνο γι' αυτή τις αλλαγές είναι το νέο περιβάλλον που δημιουργείται με την ακινητοποίηση και συγκεκριμένα οι αλληλεπιδράσεις των κυττάρων με τον φορέα, οι περιορισμοί διάχυσης, η οσμωτική πίεση κ.λ.π. (ROTMANN και REHM, 1990 ).

Οι ερευνητές που μελέτησαν την αλκοολική ζύμωση συνθετικών μέσων ή και την παραγωγή κρασιού και μπύρας με ακινητοποιημένα κύτταρα έχουν επισημάνει τη μεγαλύτερη ταχύτητα πρόσληψης (uptake) της γλυκόζης και τη μεγαλύτερη

παραγωγικότητα αλκοόλης. Η ζύμωση είναι πλήρης και ταχύτερη λόγω της υψηλής συγκέντρωσης ενεργών κυττάρων στους βιοαντιδραστήρες. Επίσης, ο απαιτούμενος όγκος εγκαταστάσεων είναι μικρότερος, και άρα μικρότερο είναι και το κόστος της όλης διεργασίας.

Η ακινητοποίηση είναι ιδανική μέθοδος για την παραγωγή αφρώδους οίνου τύπου σαμπάνιας (DIVIES et al., 1994).

Οι **εφαρμογές** των ακινητοποιημένων κυττάρων στη βιομηχανία είναι περιορισμένες. Αυτό οφείλεται στις δυσκολίες αλλαγής της υπάρχουσας τεχνολογίας, στην έλλειψη τεχνογνωσίας, τη δυσκολία στην εξασφάλιση πελατείας και γενικότερα στο σκεπτικισμό που επικρατεί σχετικά με την ασφάλεια των νέων προϊόντων που προορίζονται για βρώση (novel foods), και τη δύσκολη αποδοχή τους από το κοινό.

Οι πιο διαδεδομένες εφαρμογές ακινητοποιημένων κυττάρων είναι η παραγωγή ξυδιού, οργανικών οξέων και η επεξεργασία υδατικών αποβλήτων (NORTON και D' AMORE, 1994).

### **5.3.3. Υποσχόμενα υποστρώματα για μελλοντική βιομηχανική εφαρμογή**

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως υπάρχει μια πλειάδα υποστρωμάτων που έχουν χρησιμοποιηθεί σε εργαστηριακή κλίμακα για παραγωγή μπίρας. Ωστόσο κανένα δεν έχει βρει εφαρμογή στη βιομηχανία. Ο κύριος λόγος για τα περισσότερα από αυτά είναι ότι δεν είναι αποδεκτά από το κοινό, το οποίο ανησυχεί για την ασφάλεια του προϊόντος και αντιδρά στη χρησιμοποίηση κυρίως των ανόργανων (πχ γ-αλουμίνα, πορώδες γυαλί κ.α) υποστρωμάτων. Επίσης για τον ίδιο λόγο, συν το αυξημένο κόστος είναι δύσκολο να βρουν εφαρμογή και τα περισσότερα εκ των οργανικών υποστρωμάτων. Η λύση σε αυτά τα προβλήματα μπορεί να βρεθεί με τη χρησιμοποίηση ως υποστρωμάτων, διαφόρων φυσικών προϊόντων τα οποία να είναι και φθηνά και παράλληλα αποδεκτά από το καταναλωτικό κοινό. Παρακάτω αναφέρονται τα περισσότερα υποσχόμενα εξ' αυτών.

#### **5.3.3.1 Γλουτένη**

Είναι η ελαστική μάζα που αποτελείται από μίγμα των πρωτεϊνών του σιταριού, δηλαδή τις γλοιαδίνες (αδιάλυτες στο νερό, διαλυτές σε πυκνό διάλυμα αλκοόλης), και τις γλουτενίνες (αδιάλυτες στο νερό, διαλυτές σε αραιά οξέα και αλκάλια). Η γλουτένη είναι υπεύθυνη για την αρτοποιητική ικανότητα του σιταριού και κυρίως το κλάσμα των μεγαλομοριακών γλουτενινών (ΜΑΣΟΥΡΑΣ, 2000).

Η σύσταση της γλουτένης μετά το διαχωρισμό της από το άλευρο σίτου είναι διαφορετική από το αρχικό προϊόν. Συγκεκριμένα, η περιεκτικότητα της γλουτένης σε ψευδάργυρο (48,5 mg/L), μαγνήσιο (18,0 mg/L) και χαλκό (9,6 mg/L) είναι μεγαλύτερη απ' ότι στο σιτάρι (31,5 mg/L, 1,5 mg/L και 4,1 mg/L αντίστοιχα), ενώ σε βιταμίνες είναι μικρότερη.

Η γλουτένη έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία ως φορέας ακινητοποίησης κυττάρων ζύμης για την παραγωγή κρασιού και μπύρας σε εργαστηριακή προς το παρόν κλίμακα. Η ακινητοποίηση των κυττάρων στη γλουτένη οφείλεται σε δυνάμεις Van der Waals ή/και σε ηλεκτροστατικές έλξεις μεταξύ της επιφάνειας των κυττάρων και του φορέα (BARDI et al., 1996c).

Η χρήση της γλουτένης ως υπόστρωμα ακινητοποίησης οδήγησε στην αύξηση της ταχύτητας ζύμωσης έως και 3 φορές σε σχέση με τη ζύμωση με ελεύθερα κύτταρα και προσέδωσε βελτιωμένο οργανοληπτικό χαρακτήρα στο προϊόν έναντι του εμπορικού αντίστοιχου προϊόντος (BARDI et al., 1996c).

### **5.3.3.2 Απολιγνινοποιημένα κυτταρινούχα υλικά**

Τα περισσότερα αγροτικά και δασικά κυτταρινούχα απορρίμματα περιέχουν 20-80% κυτταρίνη, 50-80% ημικυτταρίνη και λιγνίνη. Συγκεκριμένα το ξύλο περιέχει 70% πολυσακχαρίτες (κυτταρίνη και ημικυτταρίνη), 25% λιγνίνη και 3-10% λοιπά εκχυλίσιμα οργανικά και ανόργανα συστατικά.

Τα απολιγνινοποιημένα κυτταρινούχα υλικά, που προκύπτουν μετά από κατεργασία πριονιδιού με διάλυμα NaOH 1% έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία ως φορείς ακινητοποίησης για την παραγωγή κρασιού και μπύρας σε εργαστηριακή κλίμακα. Η ακινητοποίηση των κυττάρων στα απολιγνινοποιημένα κυτταρινούχα υλικά οφείλεται σε φυσική προσρόφηση των κυττάρων στους πόρους του υλικού και πιθανότατα σε συγκράτησή τους με δυνάμεις Van der Waals.

Η ακινητοποίηση των κυττάρων της ζύμης στα απολιγνινοποιημένα κυτταρινούχα υλικά όπως και στη γλουτένη έχει επιβεβαιωθεί και με παρατήρηση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Η χρήση τους στην παραγωγή κρασιού και μπύρας ελάττωσε εντυπωσιακά τον χρόνο ζύμωσης και βελτίωσε την ποιότητα του προϊόντος αυξάνοντας την ένταση του αρώματος και της γεύσης σε σχέση με τον αντίστοιχο εμπορικό τύπο (BARDI et al., 1996c, BARDI et al., 1997a,b).

### 5.3.3.3. Ξερά σύκα

Τα σύκα (*Ficus carica* της οικογένειας *Moraceae*) αποτελούν τροφή για τον άνθρωπο από την αρχή της ιστορίας. Ευδοκιμούν στις ηλιόλουστες περιοχές τις Μεσογείου, και άλλων ζεστών περιοχών του κόσμου όπως η Καλιφόρνια. Είναι τα πρώτα φρούτα που ξεράθηκαν και αποθηκεύτηκαν απ' τον άνθρωπο.

Έχουν χρησιμοποιηθεί ως υποκατάστατα του καφέ και του τσιγάρου λόγω της μεγάλης αλκαλικότητάς τους, βοηθούν την πέψη και χρησιμοποιούνται για φαρμακευτικούς σκοπούς. Περιέχουν το μεγαλύτερο ποσοστό φυτικών ινών από κάθε άλλο φρούτο ή λαχανικό. Μικρή ποσότητα σύκων αρκεί για να καλύψει το μεγαλύτερο μέρος της ημερήσιας απαίτησης σε ίνες, σίδηρο, ασβέστιο, κάλιο, και αντιοξειδωτικές πολυφαινόλες. Δεν περιέχουν λιπαρά και νάτριο.

Τα ξερά σύκα περιέχουν περίπου ανά 100 gr: 66 gr ολικούς υδατάνθρακες, 49 gr σάκχαρα, 3 gr πρωτεΐνης, 12 gr ίνες (9 gr αδιάλυτες).

Τα ξερά σύκα περιέχουν 40-45% ιμβερτοσάκχαρο και χρησιμοποιούνται ως πρώτη ύλη αλκοολικών ζυμώσεων για την παραγωγή πόσιμης και ενεργειακής αιθανόλης (ΚΟΥΤΙΝΑΣ και ΠΕΦΑΝΗΣ, 1996).

Οι μπίρες που παρήχθησαν εργαστηριακά με ακινητοποιημένα κύτταρα σε αποξηραμένα σύκα χαρακτηρίστηκαν ως ιδιαίτερα γλυκές, απαλές, με φρουτώδες άρωμα και γεύση (σύκου), με σώμα, επίγευση και σαφώς ξεχωριστές από τα εμπορικά προϊόντα. Ο φρουτώδης χαρακτήρας ήταν πολύ έντονος και καθαρός. Το άρωμα και η γεύση ήταν εντονότερα και χαρακτηρίστηκαν καλύτερα στις μπίρες που ζυμώθηκαν σε χαμηλές θερμοκρασίες (BEKATOROU et al., 2002)

Η μεγάλη περιεκτικότητα των σύκων σε φυτικές ίνες, το πλούσιο άρωμα, το γεγονός ότι είναι άφθονα στην περιοχή της Μεσογείου και φυσικά το ό,τι αποτελούν είδος τροφής, άρα καθαρό και ασφαλές προϊόν, κάνει ενδιαφέρουσα την προοπτική της χρήσης τους ως φορέα ακινητοποίησης σακχαρομυκήτων για την παραγωγή αλκοολούχων ποτών. Παράλληλα, τα αποξηραμένα σύκα είναι φθηνά, άφθονα και κατάλληλα για βρώση, και σε συνδυασμό με το βελτιωμένο οργανοληπτικό χαρακτήρα του προϊόντος πληρούν τις βασικές προϋποθέσεις για μελλοντική εμπορευματοποίησή τους στην παραγωγή μπίρας.

### 5.3.3.4. Βυνοϋπολείμματα

Τέλος ένα πολλά υποσχόμενο υπόστρωμα ακινητοποίησης μπορεί να θεωρηθεί το υπόλειμμα του κριθαριού από τη ζυθοποίηση (βυνοϋπολείμματα).



Αυτά αποτελούνται από 31% πρωτεΐνη , 19% πεντοζάνες, 16% λιγνίνη, 12% άμυλο, 9% κυτταρίνη, 9% λιπίδια και 4% τέφρα και είναι διαθέσιμα σε πάρα πολύ χαμηλή τιμή ακόμα και από μικρές, τοπικές ζυθοποιίες (PRENTICE and REFSGUARD, 1978).

Μέχρι πριν από μερικά χρόνια τα βυνούπολείμματα τα χρησιμοποιούσαν μόνο ως ζωοτροφή ή τα πετάγαν. Όμως τελευταία αρκετές ερευνητικές ομάδες έχουν προσπαθήσει και έχουν πετύχει να ακινητοποιήσουν ζύμες πάνω σε αυτό το υπόστρωμα και το έχουν χρησιμοποιήσει τόσο για παραγωγή πόσιμου οινοπνεύματος όσο και για παραγωγή μπύρας. Μάλιστα το τελικό προϊόν είχε πολύ καλά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Αυτό σε συνδυασμό με το ότι ετοιμάζεται πολύ εύκολα μιας και δεν χρειάζεται κάποια επεξεργασία, είναι αβλαβές και δε χρειάζεται σχεδόν καμία επένδυση από τις ζυθοποιίες, μιας και είναι παραπροϊόν τους, το καθιστά ίσως το πιο ελκυστικό υπόστρωμα ακινητοποίησης για βιομηχανική παραγωγή μπύρας (BRANYIK et al., 2001).

## Συμπεράσματα

Η πτυχιακή εργασία με τίτλο "Αλκοολική ζύμωση στη παραγωγή της μπύρας-Νέες τάσεις" ασχολείται με το κυριότερο στάδιο παρασκευής αλκοολούχων ποτών, την αλκοολική ζύμωση. Εστιάζεται στην μπύρα, που είναι ένα από τα δημοφιλέστερα προϊόντα, τόσο στη χώρα μας όσο και παγκοσμίως.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στη πτυχιακή, η ιστορία της ξεκίνησε αρκετούς αιώνες π.Χ. και αφού εξελίχθηκε στο πέρασμα των χρόνων έφτασε στη σημερινή της μορφή, παίζοντας καθ' όλη τη πορεία της σημαντικό πολιτιστικό και κοινωνικοοικονομικό ρόλο.

Στη χώρα μας, αν και υπάρχουν άφθονες πρώτες ύλες για την παραγωγή της και ενώ η κατανάλωση είναι πράγματι μεγάλη, ιδιαίτερα το καλοκαίρι, δεν υπάρχουν σοβαρές προσπάθειες ανάπτυξης τοπικών ζυθοποιιών όπως γίνεται με το κρασί, με αποτέλεσμα μεγάλες ξένες πολυεθνικές να έχουν μονοπωλήσει την παραγωγή της.

Στις μέρες μας υπάρχει μια συνεχώς αυξανόμενη τάση του καταναλωτή προς ασφαλή προϊόντα ποιότητας με υψηλή διατροφική αξία. Όσον αφορά τη μπύρα οι εργαστηριακές έρευνες που περιγράφονται στην εργασία, δείχνουν να πληρούν τα κριτήρια αυτά των καταναλωτών.

Κυρίως η χρησιμοποίηση φυσικών προϊόντων ως υποστρώματα ζυμών για αλκοολική ζύμωση της μπύρας έχει μεγάλες προοπτικές ανάπτυξης, διότι προσφέρει και πιο ποιοτικό προϊόν στον καταναλωτή και κέρδος στη βιομηχανία.

Είναι λοιπόν ευκαιρία η χώρα μας να πρωτοπορήσει, εισάγοντας τις νέες αυτές τεχνικές στην παραγωγή μπύρας, που θα δώσουν πνοή τόσο στον πρωτογενή (καλλιέργεια κριθαριού) όσο και στο τριτογενή τομέα (ζυθοποιίες).

## Βιβλιογραφία

- AGU, R. C.; PALMER, G. H.: A Reassessment of Sorghum for Lager-Beer Brewing. *Biosource Technology*, 1998. 66(3), 253-261.
- ANON: Use of Crossflow Membranes to Clarify and Stabilize Beer. *Filtration and Separation*, 1998. 35(9), 860-861.
- ARGIROU, T.; KALIAFAS, A.; PSARIANOS, K.; KANA, K.; KANELLAKI, M.; KOUTINAS, A. A.: New Alcohol Resistant Strains of *Saccharomyces cerevisiae* Species for Potable Alcohol Production Using Molasse. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1992. 36, 153-161.
- ARGIROU, T.; KALIAFAS, A.; PSARIANOS, K.; KANELLAKI, M.; VOLIOTIS, S.; KOUTINAS, A. A.: Psychrotolerant *Saccharomyces cerevisiae* Strains After an Adaptation Treatment for Low Temperature Wine Making. *Process Biochemistry*, 1996a. 31 (7), 639-643.
- ARGIROU, T.; KANELLAKI, M.; VOLIOTIS, S.; KOUTINAS, A. A.: Kissiris-Supported Yeast Cells: High Biocatalytic Stability and Productivity Improvement by Successive Preservations at 0 °C. *J. Agric. Food Chem.*, 1996b. 44(12), 4028-4031.
- ATLAS, R. M.; BARTHA, R.: Microbial Ecology-Fundamentals and Applications. Third edition. *The Benjamin/Cummings Publishing company, Inc.*, 1993.
- BAKOYIANIS, V.; KOUTINAS, A. A.: A Multistage Fixed-Bed Tower Bioreactor in an Industrial-Scale Pilot Plant for Alcohol Production. *Biotechnology and Bioengineering*, 1996. 49, 197-203.
- BANAT, I. M.; MARCHANT, R.: Characterization and Potential Industrial Applications of Five Novel, Thermotolerant Yeast Strains. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1995. 11, 304-306.
- BARDI, E.; KOUTINAS, A. A.; SOUPIONI, M.; KANELLAKI, M.: Immobilization of Yeast on Delignified Cellulosic Material for Low Temperature Brewing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1996a. 44 (2), 463-467.
- BARDI, E.; SOUPIONI, M.; KOUTINAS, A. A.; KANELLAKI, M.: Effect of Temperature on the Formation of Volatile By-products in Brewing by Immobilized Cells. *Food Biotechnology*, 1996b. 10 (3), 203-217.
- BARDI, E.; KOUTINAS, A. A.; KANELLAKI, M.: Room and Low Temperature Brewing with Yeast Immobilized on Gluten Pellets. *Process Biochemistry*, 1997a. 32 (8), 691-699.

- BARDI, E.; KOUTINAS, A. A.; PSARIANOS, K.; KANELLAKI, M.: Volatile By-products Formed in Low-temperature Wine-making Using Immobilized Yeast Cells. *Process Biochemistry*, 1997b. 32(7), 579-584.
- BARDI, E.; BAKOYIANIS, V.; KOUTINAS, A. A.; KANELLAKI, M.: Room Temperature and Low Temperature Wine Making Using Yeast Immobilized on Gluten Pellets. *Process Biochemistry*, 1996c. 31(5), 425-430.
- BECATOROU, A.; SARELLAS, A.; TERNAT, N.G.; MALLOUCHOS, A.; KOMAITIS, M.; KOYTINAS, A.A.; KANELLAKI, M.: Low temperature brewing using yeast immobilized on dried frigs. *J. Agric. Food Chem.*, 2002b. 50,p.p, 7249-7257.
- BELITZ, H-D.; GROSCH, W.: Food Chemistry. *Springer Verlag Berlin*, Heidelberg, 1987. σελ. 120-140.
- BRANYIK, T.; KUNCOVA, G.; PACA, J.; DEMNEROVA, K.: Encapsulation of Microbial Cells into Silica gel. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 1998. 13(1-3), 283-287.
- BRANYIK, T.; VICENTE, A.A.; MACHADO CRUZ, J.; MAND TEIXEIRA, J.A.: Spent grains a new support for brewing yeast immobilization, *Biotechnology Letters*, 2001. 23p.p 1073-1078.
- BRIGGS, D. E.; HOUGH, J. S.; STEVENS, R.; YOUNG, T. W.: Malting and Brewing Science. Vol. 1. Malt and Sweet Wort. *Chapman and Hall*, New York, 1981. σελ. 6-8, 15, 190-209.
- BROWN, C. M.; CAMPBELL, I.; PRIEST, F. G.: Introduction to Biotechnology. Blackwell Scientific Publications, 1987.
- CAPLICE, E.; FITZGERALD, G. F.: Food Fermentations: Role of Microorganisms in Food Production and Preservation. *Inter. J. of Food Microbiology*, 1999. 50, 131-149.
- CASTELLARI, L.; PACCHIOLI, G.; ZAMBONELLI, C.; TINI, V.; GRAZIA, L.: Isolation and Initial Characterization of Cryotolerant Saccharomyces Strains. *Ital. J. Food Sci.*, 1992. 4(3), 179-186.
- CASTELLARI, L.; FERRUZZI, M.; MAGRINI, A.; GIUDICI, P.; PASSARELLI, P.; ZAMBONELLI, C.: Unbalanced Wine Fermentation by Cryotolerant vs. non-Cryotolerant Saccharomyces Strains. 1994. 33, 49-52.
- CASTELLARI, L.; MAGRINI, A.; PASSARELLI, P.; ZAMBONELLI, C.: Effect of Must Fermentation Temperature on Minor Products Formed by Cryotolerant and Non-cryotolerant *Saccharomyces cerevisiae* Strains. *Ital. J. Food Sci.*, 1995. 7(2), 125-132.

- CASTRILLO, J.I.; KALITERNA, J.; WEUSTHUIS, R.A.; VAN DIJKEN, J.P.; PRONK, J. T.: High-Cell-Density Cultivation of Yeasts on Disaccharides in Oxygen-Limited Batch Cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 1996. 49(6), 621-628.
- ΓΕΩΡΓΑΤΣΟΥ, Ι. Γ.: Εισαγωγή στη Βιοχημεία, 2<sup>η</sup> Έκδοση. Εκδόσεις Γιαχούδη-Γιαπούλη Ο.Ε., Θεσσαλονίκη, 1989. σελ. 110-138.
- CHAMPAGNE, C. P.; MONDOU, F.; RAYMOND, Y.; ROY, D.: Effect of Polymers and storage Temperature on the Stability of Freeze-dried Lactic Acid Bacteria. *Food Research International*, 1996. 29(5-6), 555-562.
- COLAGRANDE, O.; SILVA, A.; FUMI, M. D.: Recent Applications of Biotechnology in Wine Production. (Review) *Biotechnol. Progr.* 1994 10(1).
- DORAN, P.; BAILEY, J. E.: Effects of Immobilization on Growth, Fermentation Properties and macromolecular Composition of *Saccharomyces cerevisiae* Attached to Gelatin. *Biotechnology and Bioengineering*, 1986. 28, 73-87.
- EAMES, ALAN, D.: Secret Life of Beer. Legends, Lore & Little-known Facts. Storey Books, Ponwal, Vermont, 1995.
- GUENETTE, M.; DUVNJAK, Z.: Wood Blocks as a Carrier for *Saccharomyces cerevisiae* Used in the Production of Ethanol and Fructose. *Chemical Engineering Journal and Biochemical Engineering Journal*, 1996. 61(3), 233-240.
- HARRIS, E. M.; GHANDIMATHI, H.: New Biotechnological Use of Natural Rubber Immobilization of yeast Cells for Alcohol Production. *KGK - Kautschuk and Gummi Kunststoffe*, 1998. 51(11), 804-807.
- HOUGH, J. S.; BRIGGS, D. E.; STEVENS, R.; YOUNG, T. W.: Malting and Brewing Science; Vol. 2. Hopped Wort and Beer. Second edition. *Chapman and Hall*, New York, 1982. σελ. 420-692, 704-832.
- HOUGH, J. S.: The Biotechnology of Malting and Brewing. *Cambridge University Press*, Cambridge, 1985. σελ. 21-151.
- ICONOMOU, L.; PSARIANOS, K.; KOUTINAS, A. A.: Ethanol Fermentation Promoted by Delignified Cellulosic Material. *J. Ferment. Bioeng.*, 1995. 79(3), 294-296.
- ICONOMOU, L.; KANELLAKI, M.; VOLIOTIS, S.; AGELOPOULOS, K.; KOUTINAS, A. A.: Continuous Wine-making by Delignified Cellulosic Material Supported Biocatalyst: An Attractive Process for Industrial Applications. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1996. 60, 303-313.
- JACKSON, R. S.: Wine Science. Principles and Applications. *Academic Press INC*, San Diego, 1994. σελ. 206-257.

- KANA, K.; KANELLAKI, M; KOUINIS, J.; KOUTINAS, A. A. (1988): Alcohol Production from Raisin Extracts: Volatile By-products. *Journal of Food Science*. 1988. 53(6), 1723-1749.
- KANA, K.; KANELLAKI, M; PSARIANOS, K.; KOUTINAS, A. A.: Ethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae* Immobilized on Mineral Kissiris. *J. Ferment. Bioeng.* 1989a. 68 (2), 144-147.
- KANA, K.; KANELLAKI, M; PAPADIMITRIOU, A.; PSARIANOS, K.; KOUTINAS, A. A.: Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* on  $\gamma$ -Alumina Pellets and its Ethanol Production in Glucose and Raisin Extract Fermentation. *J. Ferment. Bioeng.*, 1989b. 68(3), 213-215.
- KLIONSKY, D.; HOLZER, H.; DESTRUELLE, M.: Stress Tolerant Yeast Mutants. *Biotechnology Advances*, 1997. 15(3-4), 704-705.
- KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A.: Yeast and Yeast Like Organisms. *Weinheim: VCH*, 1990.
- KOUTINAS, A. A.; KANELLAKI, M.: Continuous Alcohol Production by Immobilized *Zymomonas mobilis* on  $\gamma$ -Alumina Pellets. *J. Food Sci.*, 1990. 55(2), 525-27 and 531.
- KOUTINAS, A. A.; GOURDOUPIS, C.; PSARIANOS, K.; KALIAFAS, A.; KANELLAKI, M.: Continuous Potable Alcohol Production by Immobilised *Saccharomyces cerevisiae* on Mineral Kissiris. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1991. 30, 203-216.
- ΚΟΥΤΙΝΑΣ, Α. Α.; ΠΕΦΑΝΗΣ, Σ.: Τεχνολογία Τροφίμων και Ποτών. Πανεπιστήμιο Πατρών, Εκτυπωτικό Κέντρο, Πάτρα, 1996. σελ. 59-120.
- LEE, C. Y.; ROBINSON, W. B.; VAN BUREN, J. P.; ACREE, T. E.; STOEWSAND, G. S.: Methanol in Wines in Relation to Processing and Variety. *Am. J. Enol. Viticult.*, 1975a. 26(4).
- MARTIN, A. M.: Bioconversion of Waste Materials to Industrial Products. *Elsevier Applied Science*, London & N. York 1991.
- MARTINI, A.: Origin and Domestication of the Wine Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Wine Research*, 1993. 4(3), 165-176.
- ΜΑΣΟΥΡΑΣ, Θ.: Σημειώσεις Τεχνολογίας Βυνοποίησης-Ζυθοποίησης, ΤΕΙ Αθήνας, 2000. σελ. 11-15.
- ΜΑΣΟΥΡΑΣ, Θ.: Σημειώσεις Τεχνολογίας προϊόντων αλεύρου, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2000. σελ 3-40.
- McELROY, D.; JACOBSEN, J.: What's Brewing in Barley Biotechnology? *Bio/Technology*, 1995. 13(3), 245-249.

- ΜΠΑΡΔΗ, Ε.: Παραγωγή Κρασιού και Μπύρας με Ακίνητοποιημένα Κύτταρα σε Απολιγνινοποιημένα Κυτταρινούχα Υλικά και Γλουτένη. *Διδακτορική Διατριβή*. Πάτρα, 1997.
- MURPHY, C. A.; LARGE, P. J.; WADFORTH, C.; DACK, S. J.; BOULTON, C. A.: Strain-Depended Variation in the NADH-Depended Diacetyl Reductase Activities of Lager- and Ale-Brewing yeasts. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 1996. 23(1), 19-22.
- NAKANISHI, K.; MURAYAMA, H.; SATO, H.; NAGARA, A.; YASHUI, T.; MITSUI, S.: Continuous Beer Brewing with Yeast Immobilized on Granular Ceramic. *Hakko Kogaku Kaishi*, 1989. 67(6), 509-514.
- NORTON, S.; D'AMORE: Physiological Effects of Yeast Immobilization: Applications for Brewing. *Enzyme Micob. Technol.*, 1994. 16, 365-375.
- ONAKA, T.; NAKANISHI, K.; INOUE, T.; KUBO, S.: Beer Brewing with Immobilized Yeast. *Bio/Technology*, 1985. 3, 467-470.
- POMETTO, III; ANTHONY, L.; DEMIRCI, A.; JOHNSON, K.: Immobilization of Microorganisms on a Support Made of Synthetic Polymer and Plant Material 1997. United States Patent. 435/136; C12P007/40.
- POTTER, N. N.; HOTCHKISS, J. H.: Food Science. *Chapman and Hall*, New York, 1995. σελ. 442-446.
- PRENTICE, N.; REFSGUARD. J.M.: Enzymatic hydrolysis of brewers spent grain. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 1978. 36,p.p 196-200.
- ROTMANN, H. B.; REHM, H. J.: Comparison of Fermentation Properties and Specific Enzyme Activities of Free and Calcium-Alginate-Entrapped *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1990. 54-58.
- RUSSEL, I.; STEWART, G. G.: Contribution of Yeast and Immobilization Technology to Flavor Development in Fermented Beverages. *Food Technology*. Edited by Neil H. Mermelstein, 1992.
- SAKUMA, S.; KUROISHI, T.; MAEKOYA, C.: Automated Characterization of the Bitterness Unit of Wort and Beer Using a Flow Injection Analysis system. *Hitachi Review*, 1994. 43(4), 177-182.
- SHINDO, S.; KAMIMURA, M.: Immobilization of Yeast with Hollow PVA Gel Beads. *J. Ferment. Bioeng.*, 1990. 70(4), 332-334.
- SHINONAGA, M.A.; KAWAMURA, Y.; YAMANE, T.: Immobilization of Yeast Cells with Cross-linked Chitosan Beads. *Journal of Fermentation and Biotengineering*, 1992. 74(2), 90-94.

- SMOGROVICOVA, D.; DOMENY, Z.: Beer Volatile By-product Formation at Different Fermentation Temperature Using Immobilized Yeasts. *Process Biochemistry*, 1999. 34, 785-794.
- STEWART, G. G.; RUSSEL, I.: One Hundred Years of Yeast Research and Development in the Brewing Industry. *Journal of the Institute of Brewing*, 1986. 92, 537-558.
- STRYER, L.: Βιοχημεία. Ελληνική Έκδοση. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 1995. σελ 28.
- SZAJANI, B.; DALLMANN, K.; GIMESI, I.; KRISCH, J.; TOTH, M.: Continuous Production of Ethanol Using Yeast Cells Immobilized in Preformed Cellulose Beads. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1996. 46(2), 122-125.
- TADEGE, M.; DUPUIS, I.; KUHLEMEIER, C.: Ethanol Fermentation: New Functions for an Old Pathway. *Trends in Plant Science, Reviews. Elsevier Science*, 1999. 4(8), 320-325.
- TARNOWSKI, D. J.; KORZENIEWSKI, C.: Amperometric Detection with Membrane-based Sampling for Percent-level Determinations of Ethanol. *Analytica Chimica Acta*, 1996. 332(2-3), 111-121.
- TAYSEN, S.; LENZING, T.; GONZALEZ-CALERO, G.; KORN, A.; SINGER, M. V.: Alcoholic Beverages Produced by Alcoholic Fermentation but not by Distillation are Powerful Stimulants of Gastric and Secretion in Humans. *Gut*, 1997. 40(1), 49-56.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L.: Microbiology-An Introduction. Fifth Edition. *The Benjamin/Cummings Publishing company, Inc*, 1995.
- WALSH, R.; MARTIN, P. A.: Growth of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces uvarum* in a Temperature Gradient Incubator. *J. Inst. Brew.*, 1977. 83, 169-172.
- WILLAERT, R. G.; BARON, G. V.: The Dynamic Behaviour of Yeast Cells Immobilised in Porous Glass Studied by Membrane Mass Spectrometry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1995. 42(5), 664-670.
- YAMANO, S.; TOMIZUKA, K.; SONE, H.; IMURA, M.; TAKEUCHI, T.; TANAKA, J.; INOUE, T.: Brewing Performance of a Brewer's Yeast Having Alpha-acetolactate Decarboxylase from *Acetobacter acetii* subsp. *xylum*. *Journal of Biotechnology*, 1995. 39(1), 21-26.