



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων

**ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΑΠΟ
ΤΟ ΦΥΤΟ *Stevia rebaudiana* ΓΙΑ
ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΣΕ ΠΟΤΑ ΩΣ
ΓΛΥΚΑΝΤΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΣΟ ΟΞΙΝΙΣΗΣ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΖΟΛΩΤΑ ΝΙΚΗ

ΕΠΙΒΛ. ΚΑΘΗΓΗΤΕΣ : ΔΡ Π. ΤΑΟΥΚΗΣ (ΕΜΠ)
DR.-ING. F.-J. METHNER (TUB)

ΑΘΗΝΑ 2013

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Πανεπιστήμιο TU-Berlin, στο τμήμα «Brauwesen» του Ινστιτούτου Βιοτεχνολογίας, σε συνεργασία με το εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων της σχολής Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ.Π., στα πλαίσια του προγράμματος ERASMUS.

Καταρχήν, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Π. Ταούκη, που δέχθηκε να αναλάβει την επίβλεψη της διπλωματικής μου εργασίας από κοινού με τον Dr.-Pr. Methner, και με βοήθησε σε όλη την προσπάθειά μου. Θερμά ευχαριστώ και το διδάκτορα Γ. Κατσαρό για τις πολύτιμες συμβουλές του κατά τη συγγραφή της εργασίας μου.

Επίσης ευχαριστώ τον καθηγητή Dr.-Pr. Methner, τον επιστημονικό υπεύθυνο Dipl.-Ing. Kunz και το διδάκτορα Ph. Wietstock για την ευκαιρία που μου έδωσαν να εκπονήσω τη διπλωματική μου στο TU Berlin. Θερμά ευχαριστώ τον επιβλέποντα T. Seewald για την καθημερινή στήριξη και καθοδήγησή του κατά την εκπόνηση των πειραμάτων μου, καθώς και όλους τους εργαζόμενους και διδακτορικούς στο εργαστήριο “Brauwesen” για τη βοήθειά τους.

Τέλος, ευχαριστώ ειλικρινά τους φίλους και κοντινούς μου ανθρώπους, για την παρουσία και την αγάπη τους όλα αυτά τα χρόνια, τη Δέσποινα, για την παρότρυνσή της να συμμετάσχω στο πρόγραμμα Erasmus και φυσικά τη Βίκυ για την αδελφική στήριξη της καθ’ όλη την παραμονή μου στο Βερολίνο.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αντικατάσταση της ζάχαρης με άλλες γλυκαντικές ουσίες σε τρόφιμα και ποτά είναι ένας βασικός στόχος στη βιομηχανία τροφίμων για την παραγωγή προϊόντων που περιέχουν λιγότερες θερμίδες και είναι κατάλληλα για διαβητικούς. Τα τελευταία χρόνια, το ενδιαφέρον έχει προσελκύσει ένα φυσικό γλυκαντικό χωρίς θερμίδες, το οποίο επί αιώνες χρησιμοποιείται στην περιοχή της Παραγουάης. Πρόκειται για τους **γλυκοζίτες στεβιόλης**, που εξάγονται από τα φύλλα του φυτού *Stevia rebaudiana Bertoni* και έχουν 300 φορές τη γλυκύτητα της ζάχαρης και σχεδόν αμελητέα επίδραση στα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα. Η χρήση των γλυκοζιτών στεβιόλης ως γλυκαντική ουσία σε τρόφιμα έχει εγκριθεί από την EFSA (European Food Safety Authority) και στο πρόσθετο τροφίμων έχει αποδοθεί ο αριθμός «**E 960**». Το μεγάλο μειονέκτημα όμως των γλυκοζιτών στεβιόλης είναι η χαρακτηριστική πικρή τους γεύση η οποία επηρεάζει τη γλυκύτητά τους. Αυτό εμποδίζει τη χρήση τους κατά την ολική αντικατάσταση της ζάχαρης σε τρόφιμα και ποτά. Για το λόγο αυτό, τα περισσότερα προϊόντα με γλυκοζίτες στεβιόλης που ήδη κυκλοφορούν στην αγορά περιέχουν και ζάχαρη ή άλλες γλυκαντικές ουσίες, ώστε η γεύση τους να είναι αποδεκτή από τους καταναλωτές.

Στη συγκεκριμένη μελέτη στόχος ήταν να βρεθεί ένα σύνολο διεργασιών για την παραγωγή εκχυλίσματος από το φυτό *Stevia rebaudiana* απαλλαγμένο από την χαρακτηριστική πικρή γεύση και με χαμηλή τιμή pH, το οποίο να μπορεί να προστεθεί ως γλυκαντικό και μέσο οξίνισης σε ποτά. Οι διεργασίες που μελετήθηκαν ήταν η εκχύλιση, η ζύμωση του εκχυλίσματος και στη συνέχεια η συμπύκνωση και ο αποχρωματισμός του. Η μελέτη περιλάμβανε ένα αρχικό πείραμα για την επιλογή των βέλτιστων συνθηκών εκχύλισης και ζύμωσης, το κυρίως πείραμα για την παρακολούθηση της ζύμωσης και την εύρεση βέλτιστων συνθηκών συμπύκνωσης και αποχρωματισμού και τέλος ένα επαναληπτικό πείραμα, βασισμένο στα συμπεράσματα του κυρίως πειράματος. Έτσι, ως καλύτερη μέθοδος εκχύλισης επιλέχθηκε η **κρύα εκχύλιση** φύλλων στέβιας ακολουθούμενη από διήθηση, γιατί το παραγόμενο εκχύλισμα είχε την καλύτερη γεύση, η οποία μάλιστα παρέμενε σταθερή με την αύξηση του χρόνου βρασμού. Η ζύμωση, που πραγματοποιήθηκε τόσο με στελέχη της ζύμης *S.cerevisiae* όσο και με στελέχη του λακτοβάκιλλου *L. plantarum*, οδήγησε στην εξάλειψη της πικρής γεύσης του εκχυλίσματος αλλά και στη μείωση της τιμής του pH. Η συμπύκνωση οδήγησε στην απομάκρυνση της αιθανόλης που είχε παραχθεί από την αλκοολική ζύμωση αλλά και μερικής ποσότητας νερού. Για

τον αποχρωματισμό του εκχυλίσματος χρησιμοποιήθηκε ενεργός άνθρακας και βρέθηκε ότι η προσθήκη ενεργού άνθρακα σε συγκέντρωση **3000 g/hL** είναι η βέλτιστη για τον αποχρωματισμό του εκχυλίσματος.

Μετά το τέλος του επαναληπτικού πειράματος πραγματοποιήθηκε επιπλέον οργανοληπτικός έλεγχος με προσθήκη των παραγόμενων εκχυλισμάτων σε μύρα τύπου *Pilsner* σε συγκεντρώσεις **0.5** και **1.0 mL εκχ./10 mL μύρα**. Τα δείγματα μύρας αξιολογήθηκαν από τους δοκιμαστές κυρίως ως προς τη γλυκύτητα, την πικρή γεύση και την πληρότητα στόματος. Το αποχρωματισμένο εκχύλισμα στέβιας που είχε ζυμωθεί με το στέλεχος *B1* του *L.plantarum* ήταν το δείγμα που άρεσε περισσότερο στους δοκιμαστές, γιατί αύξησε περισσότερο τη γλυκύτητα και την πληρότητα στόματος στη μύρα, ενώ δεν αναγνώρισαν την χαρακτηριστική πικρή γεύση των γλυκοζιτών στεβιόλης. Το συγκεκριμένο εκχύλισμα μετά τη ζύμωση είχε τη μικρότερη τιμή pH (**pH=3.2**) και μετά τη διήθηση με ενεργό άνθρακα έφτασε στο μεγαλύτερο ποσοστό αποχρωματισμού (σχεδόν **80%**).

Συμπερασματικά, το σύνολο των διεργασιών που μελετήθηκαν στο συγκεκριμένο πείραμα οδήγησαν στην παραγωγή ενός εκχυλίσματος από το φυτό *Stevia rebaudiana*, απαλλαγμένο από την πικρή γεύση των γλυκοζιτών στεβιόλης, με χαμηλή τιμή pH και ελαφρώς υποκίτρινο χρώμα, κατάλληλο για προσθήκη σε ποτά ως γλυκαντικό και μέσο οξίνισης.

ABSTRACT

Replacing sugar with other sweeteners in foods and beverages is a key objective in the food industry, for products that contain fewer calories and are suitable for diabetics. In recent years, a non-caloric natural sweetener, which is used for centuries in Paraguay has attracted much interest. The steviol glycosides, extracted from the leaves of the plant *Stevia rebaudiana Bertoni* have 300 times the sweetness of sugar and almost negligible effect on blood glucose levels. The use of steviol glycosides as a sweetener in foods is approved by the EFSA (European Food Safety Authority) and the food additive is assigned the number «E 960». However, the main drawback of this sweetener is its characteristic bitter taste. This prevents the use of steviol glycosides for total replacement of sugar in foods and beverages. For this reason, most products with steviol glycosides that are already on the market, contain also sugar or other sweeteners.

In this study the objective was to find a set of processes, in order to produce an extract of the plant *Stevia rebaudiana*, free of the characteristic bitter taste and with low pH-value, which can be added as sweetener and acidifier in beverages. The processes that were studied were extraction, fermentation of the extract and then its concentration and discoloration. The study included a pre-trial to select the best extraction and fermentation conditions, the main trial for studying the fermentation and finding optimal conditions for concentration and discoloration and finally a repetition, based on the conclusions of the main trial. The cold extraction of *stevia* leaves followed by filtration was selected as the best extraction method, because the extract had the best taste, which remained stable, even with the increase of the boiling time. The extract was fermented with some strains of yeast *S. cerevisiae* and with some strains of lactobacillus *L. plantarum*. Through fermentation the bitter taste of the extract was eliminated and its pH-value was also reduced. The concentration by the rotary evaporator led to removal of ethanol, that was produced by alcoholic fermentation, and partial removal of water. Finally, it was found that the optimal concentration of activated carbon for the discoloration of the extract was 3000 g/hL.

After repetition of the main trial, the several extracts, that were produced, were mixed with beer *Pilsner* (0.5 and 1.0 mL extr./10 mL beer) in order to carry out a sensory analysis. The beer samples were evaluated by testers mainly on the sweetness, the bitterness and palate fullness. The discolored stevia extract which was fermented with strain *B1* of *L.plantarum* was liked the most by testers, because it

increased the sweetness and palate fullness of beer, but not its bitterness. This extract after fermentation had the lowest pH-value (pH=3.2) and after filtration with activated carbon reached the highest percentage of discoloration (almost 80%).

In conclusion, all processes studied in this experiment resulted in the production of an extract from the plant *Stevia rebaudiana*, free of the bitterness of steviol glycosides, with low pH-value and a slightly yellowish color, suitable for addition to beverages as a sweetener and acidifier.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	
ABSTRACT	
ΠΙΝΑΚΕΣ	IV
ΓΡΑΦΗΜΑΤΑ	VII
ΕΙΚΟΝΕΣ	XI
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
2 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ.....	3
2.1 ΓΛΥΚΑΝΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ	3
2.1.1 Ορισμός γλυκύτητας	3
2.1.2 Γλυκαντικές ύλες	4
2.1.3 Τύποι γλυκαντικών	5
2.1.4 Χρήση γλυκαντικών υλών	6
2.2 ΓΛΥΚΑΝΤΙΚΟ ΑΠΟ ΤΟ ΦΥΤΟ ΣΤΕΒΙΑ.....	9
2.2.1 Προέλευση- Ιστορία της στέβιας.....	9
2.2.2 Βοτανική περιγραφή του φυτού <i>Stevia rebaudiana</i>	10
2.2.3 Καλλιέργεια της στέβιας	11
2.2.4 Βιοχημική Σύσταση – Ιδιότητες των φύλλων στέβιας	15
2.2.5 Φυτοχημικά συστατικά της στέβιας- Διτερπενικοί γλυκοζίτες	21
2.2.6 Εκχύλιση γλυκοζιτών από φύλλα <i>S. rebaudiana</i>	24
2.2.7 Χρήση των γλυκοζιτών στεβιόλης ως γλυκαντικό	25
2.2.8 Επίδραση των γλυκοζιτών στεβιόλης στην υγεία	27

2.2.9	Πλαίσιο της ΕΕ για τα γλυκαντικά. Έγκριση γλυκοζιτών στεβιόλης.	30
3	ΣΚΟΠΟΣ	37
4	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	39
4.1	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ	39
4.2	ΣΥΣΚΕΥΕΣ	40
4.3	ΜΕΘΟΔΟΙ	41
4.3.1	Εκχύλιση	41
4.3.2	Εκχύλιση Soxhlet	41
4.3.3	Μέτρηση κυττάρων με τη συσκευή Cellometer Vision.....	42
4.3.4	Ζύμωση.....	44
4.3.5	Συμπύκνωση σε περιστροφικό εξατμιστήρα κενού	49
4.3.6	Διήθηση	50
4.3.7	Οργανοληπτικός Έλεγχος.....	52
4.3.8	Αναλύσεις με το μετρητή πυκνότητας	55
4.3.9	Φωτομέτρηση- Υπολογισμός χρώματος	57
4.4	ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ.....	59
4.5	ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	59
4.6	ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ.....	60
5	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	61
5.1	ΑΡΧΙΚΟ ΠΕΙΡΑΜΑ	61
5.1.1	Εκχύλιση γλυκοζιτών στεβιόλης και βρασμός του εκχυλίσματος.....	61
5.1.2	Εκχύλιση φύλλων στέβιας με νερό και αιθανόλη σε συσκευή Soxhlet	62
5.1.3	Ζύμωση εκχυλισμάτων στέβιας με γλυκόζη/ζυθογλεύκος	63
5.1.4	Νέα ζύμωση με γλυκόζη και διάφορους ζυμομύκητες	64

5.2	ΚΥΡΙΩΣ ΠΕΙΡΑΜΑ	65
5.2.1	Κρύα Εκχύλιση.....	65
5.2.2	Ζύμωση.....	66
5.2.3	Συμπύκνωση.....	68
5.2.4	Αποχρωματισμός	70
5.3	ΕΠΑΝΑΛΗΠΤΙΚΟ ΠΕΙΡΑΜΑ	72
5.4	ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ	75
6	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	79
6.1	ΑΡΧΙΚΟ ΠΕΙΡΑΜΑ	79
6.2	ΚΥΡΙΩΣ ΠΕΙΡΑΜΑ	85
6.2.1	Εκχύλιση-Ζύμωση-Συμπύκνωση	85
6.2.2	Αποχρωματισμός	89
6.3	ΕΠΑΝΑΛΗΠΤΙΚΟ ΠΕΙΡΑΜΑ	95
6.4	ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ	101
7	ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	117
	ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	127
	ΟΝΟΜΑΤΟΛΟΓΙΑ.....	128
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	131
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ I: Επιτρεπτά όρια χρήσης των γλυκοζιτών στεβιόλης	i
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II: Πειραματικές Μετρήσεις.....	vi
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ III: Report of the study.....	xiii

ΠΙΝΑΚΕΣ

Πίνακας 1: Παραδείγματα ολιγοθερμιδικών γλυκαντικών υλών (www.eufic.org)	7
Πίνακας 2: Αναλύσεις φύλλων στέβιας (g/100g επί ξηρού) (Lemus-Mondaca R. et al., 2012)	17
Πίνακας 3: Αμινοξέα της <i>S.rebaudiana</i> και απαραίτητα αμινοξέα για τον ανθρώπινο οργανισμό. (Lemus-Mondaca R. et al., 2012)	18
Πίνακας 4: Μεταλλικά στοιχεία της <i>S. rebaudiana</i> (mg/100g ξηρού βάρους). (Lemus-Mondaca R. et al., 2012)	19
Πίνακας 5: Λιπαρά οξέα σε έλαια φύλλων στέβιας (Tadhani & Subhash, 2006a)	20
Πίνακας 6: Υδατοδιαλυτές βιταμίνες εκχυλίσματος των φυτών <i>S.rebaudiana</i> και callus (mg/100g εκχυλίσματος, επί ξηρού) (Kim et al., 2011)	20
Πίνακας 7: Ποσότητες γλυκοζιτών στα φύλλα στέβιας. (Lemus-Mondaca R. et al., 2012)	21
Πίνακας 8: Κυτταρομέτρηση όλων των μικροοργανισμών του κυρίως πειράματος για τον υπολογισμό του όγκου εμβολιασμού.	67
Πίνακας 9: Μάζα γλυκόζης DE 40 για συγκεντρώσεις 2, 4, 8% σε 1 L <i>stevia</i> ...	67
Πίνακας 10: Κυτταρομέτρηση όλων των μικροοργανισμών του επαναληπτικού πειράματος για τον υπολογισμό του όγκου εμβολιασμού.	72
Πίνακας 11: Αξιολόγηση της γλυκύτητας της μπύρας μετά από προσθήκη του δείγματος εκχυλίσματος στέβιας <i>L48_{b, disc}</i> σε διάφορες συγκεντρώσεις.	75
Πίνακας 12: Κωδικοποίηση δειγμάτων μπύρας για τον οργανοληπτικό έλεγχο (αριστερά: μη αποχρωματισμένα, δεξιά: αποχρωματισμένα).	76

Πίνακας 13: Οργανοληπτική αξιολόγηση της γλυκιάς και της πικρής γεύσης διαφόρων δειγμάτων με γλυκοζίτες στεβιόλης μετά από βρασμό σε διάφορους χρόνους.....	79
Πίνακας 14: Οργανοληπτική αξιολόγηση της γλυκιάς και της πικρής γεύσης του μη αραιωμένου υγρού και του κρύου εκχυλίσματος μετά από βρασμό σε διάφορους χρόνους.....	80
Πίνακας 15: Αποτελέσματα της ανάλυσης στο μετρητή πυκνότητας μετά τη ζύμωση του υγρού(extr.) και του κρύου εκχυλίσματος(cold extr.) διαφόρων χρόνων βρασμού (0,30,60 min) με γλυκόζη(glu) και ζυθογλεύκος(wort)....	83
Πίνακας 16: Αξιολόγηση των ζυμωμένων δειγμάτων για περαιτέρω χρήση.	84
Πίνακας 17: Περιγραφή κλίμακας αξιολόγησης του οργανοληπτικού ελέγχου.	110
Πίνακας 18: Κωδικοποίηση των δειγμάτων <i>RH</i> του οργανοληπτικού ελέγχου	111
Πίνακας 19: Κωδικοποίηση των δειγμάτων <i>L48</i> του οργανοληπτικού ελέγχου	113
Πίνακας 20: Κωδικοποίηση των δειγμάτων <i>B1</i> του οργανοληπτικού ελέγχου	115

ΠΙΝΑΚΕΣ ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΟΣ

Πίνακας Π 1: Επιτρεπτά όρια χρήσης των γλυκοζιτών στεβιόλης ως πρόσθετη γλυκαντική ουσία σε διάφορες κατηγορίες τροφίμων.	i
Πίνακας Π 2: Κυρίως πείραμα - Αρχή ζύμωσης (αμέσως μετά τον εμβολιασμό) νι	
Πίνακας Π 3: Κυρίως πείραμα – 6η ημέρα ζύμωσης	vi
Πίνακας Π 4: Κυρίως πείραμα – 15η ημέρα ζύμωσης	vii
Πίνακας Π 5: Κυρίως πείραμα – Μετά τη συμπύκνωση.....	vii
Πίνακας Π 6: Επαναληπτικό πείραμα - Αρχή ζύμωσης (αμέσως μετά τον εμβολιασμό).....	viii
Πίνακας Π 7: Επαναληπτικό πείραμα - 3η ημέρα ζύμωσης.....	ix
Πίνακας Π 8: Επαναληπτικό πείραμα - 4η ημέρα ζύμωσης.....	ix
Πίνακας Π 9: Επαναληπτικό πείραμα - 7η ημέρα ζύμωσης.....	ix
Πίνακας Π 10: Επαναληπτικό πείραμα – Μετά τη συμπύκνωση και τον αποχρωματισμό	x
Πίνακας Π 11: Οργανοληπτικός Έλεγχος- Μπύρα με μη αποχρωματισμένο εκχύλισμα γλυκοζιτών στεβιόλης	x
Πίνακας Π 12: Οργανοληπτικός Έλεγχος- Μπύρα με αποχρωματισμένο εκχύλισμα γλυκοζιτών στεβιόλης	xi
Πίνακας Π 13: Έντυπο οργανοληπτικού ελέγχου	xii

ΓΡΑΦΗΜΑΤΑ

Γράφημα 1: Συμπύκνωση πρότυπου διαλύματος.....	68
Γράφημα 2: Τιμές pH όλων των δειγμάτων σε όλα τα στάδια του κυρίως πειράματος.....	85
Γράφημα 3: Συγκέντρωση αλκοόλης όλων των δειγμάτων σε όλα τα στάδια του κυρίως πειράματος.	87
Γράφημα 4: Φαινόμενο εκχύλισμα όλων των δειγμάτων σε όλα τα στάδια του κυρίως πειράματος.	88
Γράφημα 5: Αποχρωματισμός των δειγμάτων με ζύμες και 4% w/v γλυκόζη με διάφορες συγκεντρώσεις ενεργού άνθρακα.	90
Γράφημα 6: Αποχρωματισμός των δειγμάτων με ζύμες και 8% w/v γλυκόζη με διάφορες συγκεντρώσεις ενεργού άνθρακα.	91
Γράφημα 7: Αποχρωματισμός των δειγμάτων με λακτοβάκιλλους χωρίς γλυκόζη (0%) με διάφορες συγκεντρώσεις ενεργού άνθρακα.	92
Γράφημα 8: Αποχρωματισμός των δειγμάτων με λακτοβάκιλλους και 2% w/v γλυκόζη με διάφορες συγκεντρώσεις ενεργού άνθρακα.....	93
Γράφημα 9: Τιμές pH όλων των δειγμάτων σε όλα τα στάδια του επαναληπτικού πειράματος.....	96
Γράφημα 10: Συγκέντρωση αλκοόλης όλων των δειγμάτων σε όλα τα στάδια του επαναληπτικού πειράματος.	97
Γράφημα 11: Φαινόμενο εκχύλισμα όλων των δειγμάτων σε όλα τα στάδια του επαναληπτικού πειράματος.	98
Γράφημα 12: Χρώμα των δειγμάτων σε όλα τα στάδια του επαναληπτικού πειράματος.....	99

Γράφημα 13: Ποσοστό αποχρωματισμού όλων των δειγμάτων με ενεργό άνθρακα 3000 g/hL.....	100
Γράφημα 14: Χρώμα (EBC) των δειγμάτων του οργανοληπτικού με 0.5 mL εκχ. γλυκοζιτών στεβιόλης/10 mL μπύρα.....	102
Γράφημα 15: Χρώμα (EBC) των δειγμάτων του οργανοληπτικού με 1.0 mL εκχ. γλυκοζιτών στεβιόλης/10 mL μπύρα.....	103
Γράφημα 16: Τιμή pH των δειγμάτων του οργανοληπτικού με 0.5 mL εκχύλισμα γλυκοζιτών στεβιόλης/10 mL μπύρα.....	104
Γράφημα 17: Τιμή pH των δειγμάτων του οργανοληπτικού με 1.0 mL εκχ. γλυκοζιτών στεβιόλης/10 mL μπύρα.....	105
Γράφημα 18: Συγκέντρωση αλκοόλης των δειγμάτων του οργανοληπτικού με 0.5 mL εκχύλισμα γλυκοζιτών στεβιόλης/10 mL μπύρα.....	106
Γράφημα 19: Συγκέντρωση αλκοόλης των δειγμάτων του οργανοληπτικού με 1.0 mL εκχ. γλυκοζιτών στεβιόλης/10 mL μπύρα.....	107
Γράφημα 20: Φαινόμενο εκχύλισμα των δειγμάτων του οργανοληπτικού με 0.5 mL εκχύλισμα γλυκοζιτών στεβιόλης/10 mL μπύρα.....	107
Γράφημα 21: Φαινόμενο εκχύλισμα των δειγμάτων του οργανοληπτικού με 1.0 mL εκχ. γλυκοζιτών στεβιόλης/10 mL μπύρα.....	108
Γράφημα 22: Θερμίδες των δειγμάτων του οργανοληπτικού με 0.5 mL εκχύλισμα γλυκοζιτών στεβιόλης/10 mL μπύρα.....	109
Γράφημα 23: Θερμίδες των δειγμάτων του οργανοληπτικού με 1.0 mL εκχ. γλυκοζιτών στεβιόλης/10 mL μπύρα.....	109
Γράφημα 24: Αξιολόγηση των δειγμάτων μπύρας με προσθήκη εκχυλίσματος γλυκοζιτών στεβιόλης ζυμωμένο με τη ζύμη <i>RH</i>	111

Γράφημα 25: Αξιολόγηση των δειγμάτων μπύρας με προσθήκη εκχυλίσματος γλυκοζιτών στεβιόλης ζυμωμένο με τη ζύμη L48.	113
Γράφημα 26: Αξιολόγηση των δειγμάτων μπύρας με προσθήκη εκχυλίσματος γλυκοζιτών στεβιόλης ζυμωμένο με το λακτοβάκιλλο <i>B1</i>	115

EΙΚΟΝΕΣ

Εικόνα 1: Αριστ.: Φύλλα στέβιας (Πηγή:Lemus-Mondaka R. et al., 2012), δεξιά: Άνθη στέβιας.....	10
Εικόνα 2: Δομή των βασικών γλυκοζιτών της στέβιας. (Geuns, 2003)	22
Εικόνα 3: Χημική δομή της στεβιοσίδης και των συναφών συστατικών. (Chatsudthipon & Muangprasat, 2009)	23
Εικόνα 4: Διάταξη εκχυλιστήρα Soxhlet.....	41
Εικόνα 5: Συσκευή Cellometer Vision.....	42
Εικόνα 6: Περιστροφικός εξατμιστήρας	50
Εικόνα 7: Συσκευές διήθησης υπό κενό	50
Εικόνα 8: Ενεργός Άνθρακας	51
Εικόνα 9: Μετρητής πυκνότητας που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα	56
Εικόνα 10: Φωτόμετρα που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα.....	57
Εικ. 11: Κλίμακα χρώματος μπύρας σε μονάδες EBC και SRM.	58
Εικόνα 13: Εκχυλίσματα Soxhlet με νερό και EtOH (αριστ.), EtOH μετά από προσθήκη 200 mL νερού (δεξιά).....	62
Εικόνα 12: Φύλλα στέβιας στον εκχυλιστήρα Soxhlet	62
Εικόνα 14: Φύλλα στέβιας (αριστερά), κρύα εκχύλιση–μαγνητική ανάδευση (μέση), διήθηση με πτυχωτά φίλτρα (δεξιά)	65
Εικόνα 15: Περιστροφικός εξατμιστήρας	69
Εικόνα 16: Συσκευές διήθησης υπό κενό που χρησιμοποιήθηκαν για τον αποχρωματισμό του εκχυλίσματος με ενεργό άνθρακα.	70

Εικόνα 17: Μεμβράνη κυτταρίνης μετά τη διήθηση χωρίς ενεργό άνθρακα (αριστερά) και με ενεργό άνθρακα (δεξιά).....	71
Εικόνα 18: Χώρος οργανοληπτικού ελέγχου - Προετοιμασία δειγμάτων μπίρας με μη αποχρωματισμένο εκχύλισμα στέβιας.	77
Εικόνα 19: Χρώμα εκχυλισμάτων. Αριστερά: Υγρό εκχύλισμα (Extr.). Δεξιά: κρύο εκχύλισμα (kA) μετά από διαφορετικούς χρόνους βρασμού(0, 30 και 60 min).....	81
Εικόνα 20: Χρώμα των ζυμωμένων δειγμάτων. Αριστερά: υγρό εκχύλισμα, δείγματα κατά σειρά: 0 min+ζυθογλεύκος, 0 min+γλυκόζη, 30 min+ζυθογλεύκος, 30 min+γλυκόζη, 60 min+ζυθογλεύκος. Δεξιά: κρύο εκχύλισμα, δείγματα κατά σειρά: 0 min+ζυθογλεύκος, 0 min+γλυκόζη, 30 min+ζυθογλεύκος, 30 min+γλυκόζη, 60 min+ζυθογλεύκος	82
Εικόνα 21: Αποχρωματισμένα δείγματα RH 4% (αριστ.) και L48 4% (δεξιά)....	90
Εικόνα 22: Αποχρωματισμένα δείγματα RH 8%.....	91
Εικόνα 23: Αποχρωματισμένα δείγματα B1 0% (αριστ.) και 210 0% (δεξιά).....	92
Εικόνα 24: Αποχρωματισμένα δείγματα B1 2% (αριστ.) και 210 2% (δεξιά).....	93
Εικόνα 25: Μη αποχρωματισμένα (αριστ.) και αποχρωματισμένα (δεξιά) δείγματα B1 _b , RH _b και L48 _a	100
Εικόνα 26: Δείγματα οργανοληπτικού ελέγχου (αριστ.: 0.5 mL εκχ. L48 _b disc./10 mL μπίρα, μέση: καθαρή μπίρα, δεξιά: μπίρα με 0.5 mL εκχ. L48 _b non-disc./10 mL μπίρα).....	103

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο άνθρωπος προσπάθησε από πολύ νωρίς να βρει τη γλυκιά γεύση και να την προσδώσει στην τροφή του. Στη φύση αναγνώρισε τη γλυκύτητα στο μέλι, στους χυμούς φρούτων και αργότερα στη ζάχαρη, η οποία κυριάρχησε και ταυτίστηκε με την έννοια της γλυκύτητας. Πολύ αργότερα στις βιομηχανοποιημένες χώρες η αύξηση της παχυσαρκίας και του σακχαρώδους διαβήτη, νοσήματα που σχετίζονται άμεσα με την υψηλή κατανάλωση θερμίδων, οδήγησαν στη σύνθεση ολιγοθερμιδικών γλυκαντικών υλών, όπως η σακχαρίνη και η ασπαρτάμη. Ο προβληματισμός όμως τις τελευταίες δεκαετίες γύρω από την ασφάλεια των τεχνητών γλυκαντικών, έστρεψε το ενδιαφέρον της επιστήμης και της οικονομίας προς ένα φυσικό γλυκαντικό χωρίς θερμίδες, το οποίο επί αιώνες χρησιμοποιείται στην περιοχή της Παραγουάης, όπου αυτοφυεί. Πρόκειται για το φυτό *stevia rebaudiana bertonii*, το «γλυκό βότανο» όπως το αποκαλούν οι αυτόχθονες, το οποίο ταξινομήθηκε βοτανικά το 1899 από τον Moisis Santiago Bertoni. Η στέβια, που είναι 300 φορές πιο γλυκιά από τη ζάχαρη, οφείλει τη γλυκιά της γεύση στους διτερπενικούς γλυκοζίτες που περιέχει, με κυρίαρχους τη στεβιοσίδη και τη ρεμπαουδιοσίδη Α. Σε αντίθεση με τη ζάχαρη η στέβια έχει αμελητέα επίδραση στα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα κι έτσι θεωρείται ιδανικό υποκατάστατο ζάχαρης για την αντιμετώπιση της παχυσαρκίας, της υπέρτασης και του διαβήτη. Τοξικολογικές μελέτες απόδειξαν την ασφάλεια των γλυκοζιτών στεβιόλης. Έτσι, τον Απρίλιο του 2010 η επιτροπή EFSA (European Food Safety Authority) της Ε.Ε. ενέκρινε τη χρήση των γλυκοζιτών στεβιόλης (E960) και καθόρισε ως ΑΗΠ (Αποδεκτή Ημερήσια Πρόσληψη) τα 4 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα. Οι γλυκοζίτες στεβιόλης, είτε ως επιτραπέζιο, είτε ως πρόσθετο γλυκαντικό σε διαιτητικά προϊόντα έχουν ήδη κυκλοφορήσει στην αγορά, αλλά το βασικό μειονέκτημά τους είναι η χαρακτηριστική πικρή τους γεύση, η οποία εμποδίζει τις προσπάθειες για πλήρη αντικατάσταση της ζάχαρης από το φυσικό γλυκαντικό. Η παρούσα μελέτη είχε σκοπό την ανάπτυξη ενός εκχυλίσματος από το φυτό *Stevia rebaudiana*, απαλλαγμένο από την χαρακτηριστική πικρή γεύση και με χαμηλή τιμή pH, το οποίο να μπορεί να προστεθεί ως γλυκαντικό και μέσο οξίνισης σε ποτά.

2 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

2.1 ΓΛΥΚΑΝΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ

2.1.1 Ορισμός γλυκύτητας

Η γλυκιά γεύση είναι μια εγγενής ανθρώπινη αδυναμία. Σε κάθε νεογέννητο αρέσει η γλυκιά γεύση, ανεξάρτητα από τη διαίτα που ακολουθεί η μητέρα του κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Οι διατροφικές προτιμήσεις για τα γλυκαντικά στα παιδιά και τους ενήλικες δημιουργούνται μέσα από τις προσωπικές τους γευστικές εμπειρίες, και συνακόλουθα μπορεί να διαφέρουν σημαντικά από το ένα άτομο στο άλλο. (www.eufic.org). Η αίσθηση της γλυκύτητας πιστεύεται ότι οφείλεται στην αλληλεπίδραση μεταξύ μορίων του γλυκαντικού παράγοντα και «των θέσεων υποδοχής» της γλώσσας. Η πορεία είναι γρήγορη και αντιστρεπτή και δεν παρέχεται καμία απόδειξη ότι γίνεται χημική αντίδραση. Πιστεύεται ότι η γλυκύτητα των συνηθισμένων σακχάρων οφείλεται σε μία ειδική διεύθετηση στο χώρο μεταξύ ενός πρωτονίου οξέος (υδροξυ-υδρογόνο) και μίας βάσης κατά Lewis (άτομο οξυγόνου). (Πολυσίου, 2001) Η γλυκιά γεύση είναι δυνατόν να προέρχεται από ενώσεις με πολύ διαφορετικές χημικές δομές. Έχει αποδειχθεί με πολυάριθμες ενώσεις, ότι όσο αυξάνεται η υδροφοβικότητα αλλά και η ικανότητα των υδροφοβικών ομάδων να πληρώνουν τους κενούς χώρους, τόσο αυξάνεται και η ένταση της γλυκύτητας, φτάνοντας σε ένα μέγιστο, ενώ πέρα από ένα σημείο η γλυκιά γεύση καταστέλλεται ή μετατρέπεται σε πικρή.

Η ένταση της γλυκύτητας μιας ένωσης μπορεί να μετρηθεί αριθμητικά και εκφράζεται ως:

- όριο ανίχνευσης, c_{tsv} (threshold detection level), το οποίο είναι η χαμηλότερη συγκέντρωση ενός υδατικού διαλύματος στην οποία αυτό το διάλυμα μπορεί να γίνει αντιληπτό ως γλυκό.
- σχετική ένταση γλυκύτητας (relative sweetening strength) μιας ένωσης X, η οποία συγκρίνεται με μία πρότυπη ένωση S. Η σχετική ένταση γλυκύτητας είναι

το πηλίκο των συγκεντρώσεων c (% w/w ή mol/l) ισόγλυκων διαλυμάτων των S και X:

$$f(c_s) = c_s/c_x, \text{ για } \rightarrow c_s \text{ ισόγλυκο με } c_x$$

Η σακχαρόζη σε 2,5 ή αλλιώς σε διάλυμα 10% συνήθως χρησιμεύει ως πρότυπη ένωση ($f_{\text{sac.g}}$). Επειδή η ένταση της γλυκύτητας εξαρτάται από τη συγκέντρωση, η συγκέντρωση του διαλύματος αναφοράς πρέπει πάντα να δίνεται ως ($f(c_s)$). Όταν η ένταση γλυκύτητας εκφράζεται ως $f_{\text{sac.g}}(10)=100$, σημαίνει ότι η ένωση είναι 100 φορές πιο γλυκιά από ένα διάλυμα σακχαρόζης 10%. Σε μίγματα γλυκών ενώσεων παρατηρείται συνεργιστική αύξηση της έντασης. Αυτό σημαίνει ότι η ένταση της γλυκύτητας είναι υψηλότερη από την υπολογισμένη τιμή.

2.1.2 Γλυκαντικές ύλες

Για αιώνες, η μόνη γλυκιά γεύση που ήταν διαθέσιμη στους προγόνους μας, ήταν τα γλυκά φρούτα και το μέλι. Στη συνέχεια ήρθε η ζάχαρη από ζαχαρότευτλα και ζαχαροκάλαμο και πολύ αργότερα οι συνθετικές γλυκαντικές ουσίες. Η ιστορία των γλυκαντικών υλών ξεκινά από τα προϊστορικά χρόνια κατά τα οποία οι άνθρωποι χρησιμοποιούσαν γλυκαντικές ύλες, όπως σιρόπι σφενδάμου, αγριόμελο, σπόρους και χυμούς φρούτων. Κατά την Νεολιθική εποχή εμφανιστήκαν τα πρώτα γλυκά προϊόντα τύπου μπισκότου από μίγμα σπόρων και ψημένα σε πέτρες ζεσταμένες στον ήλιο. Οι αρχαίοι Αιγύπτιοι, οι Έλληνες, οι Ρωμαίοι και αργότερα οι Γαλάτες παρασκεύασαν γλυκά τα οποία σήμερα δεν θα μπορούσαμε να ανεχθούμε γευστικά με κανένα τρόπο. Πρώτοι οι Ινδοί και οι Πέρσες άρχισαν να προμηθεύουν με ζάχαρη τις όχθες της Μεσογείου, ενώ ο Νέαρχος, ναύαρχος του μεγάλου Αλεξάνδρου ξεκίνησε να εξερευνήσει τις θάλασσες των Ινδιών, όπου για παράδειγμα, όπως περιγράφει στις ταξιδιωτικές του αφηγήσεις, «υπάρχει ένα καλάμι που δίνει μέλι χωρίς την βοήθεια των μελισσών», το ζαχαροκάλαμο.

Η πρώτη Ελληνική ζάχαρη εμφανίστηκε το 1984 στην Λαζαρίνα της Θεσσαλίας. Η προσπάθεια αυτή όμως απέτυχε λόγω των τότε κλιματολογικών συνθηκών. Αργότερα, το 1960 με την Ελληνική Βιομηχανία Ζάχαρης, που ίδρυσε αρχικά τρία εργοστάσια, οι προσπάθειες ευδοκίμησαν και απέδωσαν αποτελέσματα μέχρι και σήμερα. (Λαμπρόπουλος Α., 2008)

Η αύξηση της παχυσαρκίας στις βιομηχανοποιημένες χώρες καθιέρωσε καινούρια τάση για διατροφή με μειωμένες θερμίδες και αύξησε το ενδιαφέρον για νέες γλυκαντικές ύλες. Στις μέρες μας είναι διαθέσιμη στην αγορά μια μεγάλη ποικιλία γλυκαντικών, υποκατάστατων της ζάχαρης. Τα υποκατάστατα ζάχαρης είναι εκείνα τα συστατικά που χρησιμοποιούνται ως σάκχαρα (σακχαρόζη, γλυκόζη) για γλύκανση, αλλά μεταβολίζονται χωρίς την παρέμβαση της ινσουλίνης. Σε αυτήν τη μεγάλη ομάδα συστατικών περιλαμβάνονται «έντονα» γλυκαντικά, όπως η ασπαρτάμη, η ακεσουλφάμη K, η ζαχαρίνη, η σουκραλόζη και οι γλυκοζίτες στεβιόλης, τα οποία είναι κατά εκατοντάδες φορές πιο γλυκά από τη ζάχαρη. Καθώς απαιτούνται πολύ μικρές ποσότητες, ώστε να επιτευχθεί η γλυκιά γεύση, η ενεργειακή συνεισφορά των παραπάνω συστατικών είναι αμελητέα σε σύγκριση με τη ζάχαρη. Τελευταία, γλυκαντικά που κυριαρχούσαν στην αγορά για μεγάλο χρονικό διάστημα, όπως η ζαχαρίνη και η ασπαρτάμη, προβληματίζουν ως προς την ασφάλειά τους (Belitz H.D. et al.). Οι γλυκοζίτες στεβιόλης είναι ένα γλυκαντικό χωρίς θερμίδες που αποκτά όλο και μεγαλύτερο ενδιαφέρον, καθώς σε αντίθεση με άλλα έντονα γλυκαντικά προσφέρει επιπλέον το πλεονέκτημα ότι είναι αποκλειστικά φυτικής προέλευσης, όπως ακριβώς και η ζάχαρη (www.eufic.org).

2.1.3 Τύποι γλυκαντικών

Οι γλυκαντικές ύλες είναι φυσικές ή συνθετικές ενώσεις, οι οποίες δίνουν την αίσθηση της γλυκύτητας και δεν περιέχουν ή περιέχουν ελάχιστες θερμίδες («μη διατροφικές γλυκαντικές ύλες») σε σχέση με την ένταση της γλυκύτητας (Belitz H.D. et al.).

Οι φυσικές γλυκαντικές ύλες διακρίνονται σε α) σακχαρούχες και β) μη σακχαρούχες. Στην κατηγορία των σακχαρούχων ανήκουν οι κάτωθι γλυκαντικές: (i) οι μονοσακχαρίτες, (ii) οι ολιγοσακχαρίτες και (iii) οι πολυσακχαρίτες. Παραδείγματα αυτών είναι: η σακχαρόζη, η ιμπερτόζη, η φρουκτόζη, η μαλτόζη, η λακτόζη, η ραφινόζη κ.ά. Η σακχαρόζη είναι ένας δισακχαρίτης που αποτελείται από D- γλυκόζη και D-φρουκτόζη. Ο τρισακχαρίτης ραφινόζη είναι ευρέως διαδεδομένος στη φύση και βρίσκεται στο σιρόπι ζάχαρης (μελάσα) κατά τη διάρκεια της κρυστάλλωσης της σακχαρόζης. Στην κατηγορία των μη σακχαρούχων είναι οι γλυκαντικές ουσίες που δεν ανήκουν στην τάξη των

υδατανθράκων αλλά περιέχουν γλυκιά γεύση. Οι περισσότερες από αυτές ανήκουν στην ομάδα των πολυαλκολών. Παραδείγματα αυτών είναι: η σορβιτόλη, η μαννιτόλη, η ξυλιτόλη, η λακτιτόλη, η ισομαλιτιτόλη.

Οι συνθετικές γλυκαντικές ουσίες προσφέρουν γλυκιά γεύση αλλά δεν προσφέρουν θερμίδες ή προσφέρουν ελάχιστες. Τέτοιες γλυκαντικές είναι οι κάτωθι: η ακεσουλφάμη, η ασπαρτάμη, το κυκλαμικό οξύ και άλατα του με νάτριο και ασβέστιο, η δουλκίνη, η γλυκίνη, η σακχαρίνη και τα άλατα της με νάτριο και κάλιο κ.ά. (Λαμπρόπουλος, 2008, Πολυσίου, 2001)

Άλλη κατηγοριοποίηση των γλυκαντικών είναι η εξής: Ένα είδος αποτελούν τα γλυκαντικά έντονης γλυκύτητας, όπως η ακεσουλφάμη K (E 950), η ασπαρτάμη (E 951), το άλας ασπαρτάμης-ακετοσουλφάμης (E 962), η σακχαρίνη (E 954), τα κυκλαμικά (E 952), η θαυματίνη (E 957), η νεοεσπεριδίνη DC (E 959) και η σουκραλόζη (E 955). Το άλλο είδος είναι τα γλυκαντικά όγκου ή πολυόλες (bulk sweeteners όπως η σορβιτόλη (E 420), μαννιτόλη (E 421), ισομαλιτιτόλης (E 953), μαλιτιτόλη (E 965), λακτιτόλης (E 966) και ξυλιτόλη (E 967). Οι έντονες γλυκαντικές ουσίες χρησιμοποιούνται ως επιτραπέζια γλυκαντικά, καθώς και σε αφεψήματα και έχουν τόσο έντονη γλυκιά γεύση που απαιτείται μόνο μία μικρή ποσότητα. Οι πολυόλες παρέχουν λιγότερες θερμίδες κατά βάρος σε σύγκριση με τη ζάχαρη, αλλά έχουν το ίδιο όγκο (bulk), γι' αυτό είναι χρήσιμα στην παρασκευή αρτοσκευασμάτων χαμηλών θερμίδων.

2.1.4 Χρήση γλυκαντικών υλών

Η ύπαρξη των ολιγοθερμιδικών γλυκαντικών υλών χρονολογείται εδώ και πάνω από έναν αιώνα. Η σακχαρίνη ανακαλύφθηκε το 1879 από τον χημικό Constantin Fahlberg ο οποίος εργαζόταν στο πανεπιστήμιο Johns Hopkins στις Ηνωμένες Πολιτείες, και χρησιμοποιήθηκε ευρέως σε περιόδους έλλειψης ζάχαρης, όπως για παράδειγμα κατά τον Πρώτο Παγκόσμιο Πόλεμο. Αν και σε ορισμένες χώρες μετά το 1945 χρησιμοποιήθηκε ο συνδυασμός ζάχαρης και σακχαρίνης ως γλυκαντικών υλών σε αναψυκτικά, τα light/diet ροφήματα έγιναν δημοφιλή μόλις στις αρχές της δεκαετίας του 1980 με την έλευση της ασπαρτάμης. Τις τρεις τελευταίες δεκαετίες, οι πωλήσεις αναψυκτικών με μειωμένες θερμίδες στην Ευρώπη αυξήθηκαν τουλάχιστον κατά 15

φορές. Στον Πίνακα 1 παρουσιάζεται η σχετική γλυκύτητα μερικών γλυκαντικών υλών, καθώς και το έτος ανακάλυψης και χρήσης τους στην Ε.Ε.

Πίνακας 1: Παραδείγματα ολιγοθερμιδικών γλυκαντικών υλών (www.eufic.org)

Όνομασία	Γλυκαντική ικανότητα σε σύγκριση με τη ζάχαρη	Έτος ανακάλυψης	Χρησιμοποιούνται στην ΕΕ από το:
Ακεσουλφάμη-Κ (E950)	150-200 φορές μεγαλύτερη γλυκαντική ικανότητα	1966	1983
Ασπαρτάμη (E951)	150-200 φορές '-''	1965	1983
Κυκλαμικό οξύ (E952)	30-50 φορές '-''	1937	1954
Νεοτάμη (E961)	7.000-13.000 φορές '-''	1990	2010
Σακχαρίνη (E954)	300-400 φορές '-''	1879	1887
Στέβια (E960)	200-300 φορές '-''	1901*	2011
Σουκραλόζη (E955)	400-600 φορές '-''	1976	2000

**Η πρώτη περιγραφή της στέβιας έγινε το 1901 ημερομηνία κατά την οποία της αποδόθηκε και η συγκεκριμένη ονομασία.*

Η γλυκαντική τους ισχύς εξαρτάται από την εγγενή γλυκαντική τους ικανότητα και από την ποσότητα στην οποία χρησιμοποιούνται. Η περιεκτικότητά τους σε θερμίδες κυμαίνεται από μηδέν έως 4 θερμίδες (kcal) ανά γραμμάριο, στην πραγματικότητα όμως όλες αυτές οι γλυκαντικές ύλες προσδίδουν πρακτικά πολύ λίγες θερμίδες διότι προστίθενται στα προϊόντα σε ελάχιστες ποσότητες. Οι ολιγοθερμιδικές γλυκαντικές ύλες χρησιμοποιούνται σε μια μεγάλη ποικιλία τροφίμων και ροφημάτων για διάφορους λόγους, συμπεριλαμβανομένων του ενδιαφέροντος των καταναλωτών για έλεγχο του σωματικού τους βάρους και των προσπαθειών της βιομηχανίας να προσφέρει στους καταναλωτές δυνατότητα επιλογής μεταξύ προϊόντων με διαφορετικό θερμιδικό περιεχόμενο. Η βελτιωμένη γεύση των ολιγοθερμιδικών γλυκαντικών υλών είναι ακόμα ένας λόγος. Ενώ με τις πρώτες γλυκαντικές ύλες υπήρχαν ορισμένα θέματα

όσον αφορά στη γεύση, κυρίως όταν χρησιμοποιούνταν ως μοναδική γλυκαντική ύλη σε κάποιο προϊόν, με την εισαγωγή νεότερων γλυκαντικών υλών, το γευστικό προφίλ τους βελτιώθηκε. Επίσης, χρησιμοποιούνται μίγματα γλυκαντικών υλών, καθώς έτσι συχνά επιτυγχάνεται υψηλότερος βαθμός γλυκύτητας σε σύγκριση με αυτόν που θα αναμενόταν από κάθε γλυκαντική ύλη ξεχωριστά: το συνολικό αποτέλεσμα είναι καλύτερο από το απλό άθροισμα των επιμέρους συστατικών.

Εκτός από τις ολιγοθερμιδικές γλυκαντικές ύλες, στη ζαχαροπλαστική καθώς και στην παρασκευή τσιγλών και επιδορπίων χρησιμοποιούνται οι πολυόλες. Οι πολυόλες όπως η μαλτιτόλη, η ισομαλτόζη, η σορβιτόλη, η μαννιτόλη και η ξυλιτόλη αποδίδουν περίπου 2,4 θερμίδες (kcal) ανά γραμμάριο (8,4 kcal/γραμμάριο), έναντι 4 θερμίδων ανά γραμμάριο (16,8 kcal/γραμμάριο) που αποδίδουν τα σάκχαρα και οι υδατάνθρακες. Εξαιρέση αποτελεί η ερυθριτόλη, μια γλυκαντική ύλη όγκου μηδενικών θερμίδων που εγκρίθηκε στην Ευρώπη το 2006. Οι πολυόλες δεν υποκαθιστούν μόνο τη γλυκιά γεύση αλλά και πολλές λειτουργικές ιδιότητες των σακχάρων όπως την υφή, το χρώμα, τη δομή καθώς και τις ιδιότητες κατακράτησης υγρασίας. (www.eufic.org)

Η δυνητική χρήση μιας ουσίας ως γλυκαντική ύλη εξαρτάται από τις φυσικές και οργανοληπτικές της ιδιότητες αλλά και από τη δυνατότητα επεξεργασίας της. Σημαντικές φυσικές ιδιότητες είναι η διαλυτότητα, το ιξώδες των διαλυμάτων και η υγροσκοπικότητα. Για να χρησιμοποιηθεί ένα συστατικό επιτυχώς ως γλυκαντικό, πρέπει να ελεγχθεί η ασφάλειά του για την ανθρώπινη υγεία καθώς και οι οικονομικές επιπτώσεις. (Belitz H.D. et al.)

Η στέβια, η κοινή ονομασία για τη στεβιοσίδη από τα φύλλα της *S. rebaudiana Bertoni*, είναι μια νέα πολλά υποσχόμενη ανανεώσιμη ακατέργαστη ουσία τροφίμων στην παγκόσμια αγορά και είναι ένα φυσικό, γλυκαντικό χωρίς θερμίδες που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υποκατάστατο της ζάχαρης ή ως εναλλακτική λύση σε τεχνητές γλυκαντικές ουσίες (Anton et al., 2010.).

2.2 ΓΛΥΚΑΝΤΙΚΟ ΑΠΟ ΤΟ ΦΥΤΟ ΣΤΕΒΙΑ

2.2.1 Προέλευση- Ιστορία της στέβιας

Το φυτό στέβια προέρχεται από την Παραγουάη. Συγκεκριμένα, είναι ενδημικό των υψιπέδων *Amambay* στα βορειοανατολικά της Παραγουάης και της περιοχής όπου πηγάζει ο ποταμός *Monday* ανάμεσα στη Βραζιλία και την Παραγουάη, ενώ απαντάται επίσης και στις γειτονικές περιοχές της Βραζιλίας και της Αργεντινής (Soejarto, 2002). Σήμερα η καλλιέργεια της στέβιας έχει εξαπλωθεί και σε άλλες περιοχές του κόσμου, όπως ο Καναδάς και ορισμένες περιοχές της Ασίας και της Ευρώπης (Amzad-Hossain et al., 2010). Η Ιαπωνία ήταν η πρώτη χώρα στην Ασία που προώθησε τη στεβιοσίδη ως γλυκαντικό στη βιομηχανία τροφίμων και φαρμάκων. Από τότε η καλλιέργεια του φυτού εξαπλώθηκε και σε άλλες χώρες στην Ασία, όπως στην ηπειρωτική Κίνα, τη Μαλαισία, τη Νότιο Κορέα, την Ταϊβάν και την Ταϋλάνδη. (Chatsudthipong & Muanprasat, 2009). Εκτός από τις προαναφερθείσες χώρες, καλλιέργειες στέβιας υπάρχουν επίσης στο Ισραήλ, την Ουκρανία, το Ηνωμένο Βασίλειο, τις Φιλιππίνες, τη Χαβάη, την Καλιφόρνια και παντού στη Νότια Αμερική (Sivaram & Mukundam, 2003).

Για αιώνες οι φυλές *Guarani* χρησιμοποιούσαν τα διάφορα είδη της στέβιας, και κυρίως τη *S. rebaudiana*, η οποία ονομαζόταν «*ka'a he'k*» (“γλυκό βότανο), ως γλυκαντικό και σε θεραπευτικά τσάγια για καούρες και άλλα νοσήματα. (Brandle & Telmer, 2007). Η πρώτη γραπτή μαρτυρία για τις "θαυματουργές" χρήσεις της στέβιας είναι το 1576 από τον Ισπανό γιατρό Francisco Hernandez στο βιβλίο του "Φυσική ιστορία φυτών της Νέας Ισπανίας". Η βοτανική ταξινόμηση του φυτού *Stevia rebaudiana Bertoni* έγινε το 1899 από τον Moisis Santiago Bertoni, ο οποίος το περιέγραψε με περισσότερες λεπτομέρειες. Αρχικά ονομάστηκε *Eupatorium rebaudianum* και το όνομά του άλλαξε σε *S. rebaudiana (Bertoni)* το 1905. Οι μελέτες για να ανακαλυφθούν οι χημικές δομές των γλυκαντικών της *S. rebaudiana* ξεκίνησαν στις αρχές του 20ου αιώνα, αλλά προχώρησαν αργά. Η γλυκιά ουσία απομονώθηκε πρώτα το 1909 και το 1931 το εκχύλισμα καθαρίστηκε για να παράγει στεβιοσίδη, η χημική δομή της οποίας καθορίστηκε το 1952. Κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1970 κι άλλα γλυκά συστατικά, συμπεριλαμβανομένων των ρεμπαουδιοσίδων A-E,

απομονώθηκαν από τα φύλλα της *S. rebaudiana* και χαρακτηρίστηκαν από τον Osamu Tanka και τους συναδέλφους του στο Πανεπιστήμιο της Χιροσίμα στην Ιαπωνία (Kinghorn & Soejarto, 1985).

2.2.2 Βοτανική περιγραφή του φυτού *Stevia rebaudiana*

Το φυτό στέβια με επιστημονική ονομασία «*Stevia rebaudiana Bertoni*» είναι ένα πολυετές θαμνώδες φυτό της οικογένειας *Asteraceae*, στην οποία ανήκουν κοινά φυτά όπως η μαργαρίτα, το ραδίκι, ο ηλίανθος και το χρυσάνθεμο. Το φυτό έχει εκτεταμένο ριζικό σύστημα και εύθραυστους μίσχους που παράγουν μικρά, ελλειπτικά φύλλα (Shock, 1982). Τα φύλλα είναι άμισχα, μήκους 3-4 cm, επιμήκη με λογχοειδές ή σπαθοειδές σχήμα, με αμβλύ έλασμα και οδοντωτές άκρες. Η άνω επιφάνεια του φύλλου είναι ελαφρώς κοκκώδης. Ο μίσχος είναι ξυλώδης και «εφηβικά-αδύνατος» στο κάτω μέρος. Το ρίζωμα έχει ελαφρώς διακλαδισμένες ρίζες. Τα λουλούδια είναι πενταμερή, μικρά και λευκά με έναν απαλό μωβ λαιμό και περιβάλλονται από έναν επικάλυκα. Τα μικροσκοπικά λευκά άνθη γεννιούνται σε μικρούς κορύμβους, 2-6 άνθη, σε χαλαρές φούντες. Ο καρπός έχει πέντε ραβδώσεις ατρακτοειδούς σχήματος (Blumenthal, 1996, Katayama et al. 1976). Το φυτό φτάνει το ύψος του 1 μ. περίπου (Mishra et al., 2010). Τα φύλλα και τα άνθη της στέβιας απεικονίζονται στην Εικ. 1.



Εικόνα 1: Αριστ.: Φύλλα στέβιας (Πηγή: Lemus-Mondaka R. et al., 2012), δεξιά: Άνθη στέβιας

2.2.3 Καλλιέργεια της στέβιας

Η *Stevia* μπορεί να καλλιεργηθεί σε ένα ευρύ φάσμα εδαφών με επαρκή υγρασία και κατάλληλο σύστημα αποστράγγισης: Καλύτερα αναπτύσσεται σε πηλώδη ή αμμοπηλώδη εδάφη. Η *Stevia* πρέπει να καλλιεργείται ως ετήσιο φυτό, σε περιοχές μεσαίου-υψηλού γεωγραφικού πλάτους, όπου η μεγάλη διάρκεια της ημέρας ευνοεί την παραγωγή φύλλων και την περιεκτικότητα σε στεβιοσίδη.

Στην Ιαπωνία η έρευνα στη στέβια και η καλλιέργεια σε θερμοκήπια άρχισε το 1954. Τη στέβια ως καλλιέργεια οι Ευρωπαίοι την "άκουσαν" το 1941, κατά το Δεύτερο Παγκόσμιο Πόλεμο, όταν δοκιμάστηκε να καλλιεργηθεί στην Αγγλία λόγω έλλειψης ζάχαρης εξαιτίας του αποκλεισμού από τους Γερμανούς. Σήμερα η καλλιέργεια της στέβιας στην Ε.Ε. καλύπτει περίπου τα 1.500 στρ., τα οποία υπάρχουν στη Ρωσία, Ισπανία, Γαλλία, Πορτογαλία, Ιταλία και Ελλάδα. Εμπορική καλλιέργεια λέγεται ότι έχει αρχίσει και σε Βουλγαρία και Τουρκία. Η μεγαλύτερη χώρα παραγωγός στέβιας παγκοσμίως είναι η Κίνα, με περισσότερα από 135.000 στρέμματα καλλιέργειας. Με τις μεγάλες ανάγκες των πολυεθνικών Cargil, Coca-Cola, Pepsi-Cola κ.ά., η παγκόσμια έκταση με στέβια εκτιμάται ότι θα φτάσει τα 8.000.000 στρ. και θα αυξάνεται κάθε χρόνο. (Λόλας, 2008)

Οι μεσογειακές χώρες θεωρούνται ως ιδιαίτερα κατάλληλες για την καλλιέργεια στέβιας. Στην Ελλάδα ακόμα δεν υπάρχει εμπορική καλλιέργεια αλλά για τα πειράματα του Παν/μίου Θεσσαλίας, το οποία συνολικά κάλυψαν έκταση περίπου 40 στρέμματα το 2008. Από την έρευνα του Π.Θ φαίνεται ότι στην Ελλάδα σε ορισμένες περιοχές η στέβια θα είναι πολυετής καλλιέργεια με παραγωγική ζωή 3-5 χρόνια. Επιπλέον, η καλλιέργεια στέβιας θεωρείται ότι μπορεί να αντικαταστήσει την καπνοκαλλιέργεια, η οποία δεν ευνοείται πλέον από την αγροτική πολιτική της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Η Ελλάδα έχει αναπτύξει ήδη ενδιαφέρον για την καλλιέργεια στέβιας, ενώ προβλέπεται οι καλλιέργειες στέβιας να αντικαταστήσουν τις φυτείες καπνού σε περιοχές όπως η Καρδίτσα, η Φθιώτιδα και η Αιτωλοακαρνανία. Μάλιστα έχει ήδη δημιουργηθεί ο Αγροτικός Συνεταιρισμός Στέβιας για την οργάνωση και τη βοήθεια των νέων καλλιεργητών. (www.paseges.gr)

2.2.3.1 Πολλαπλασιασμός φυτών

Ο Oddone (1997) θεωρεί ότι το φυτό *Stevia* είναι αυτο-ασύμβατο και γονιμοποιείται από έντομα. Επιπλέον, ο ίδιος θεωρεί ότι οι καθαροί σπόροι είναι άγονοι. Οι σπόροι περιέχονται σε λεπτά αχάινια, μήκους 3 mm περίπου. Κάθε αχάινιο έχει περίπου 20 ανθεκτικά χνουδωτές τρίχες. Η κακή βλάστηση των σπόρων είναι ένας από τους παράγοντες που περιορίζουν την καλλιέργεια σε μεγάλη κλίμακα. Κατά συνέπεια, η διάδοση του φυτού είναι μια ιδιαίτερη ανησυχία για τους καλλιεργητές στις βόρειες περιοχές του πλανήτη, οι οποίοι πρέπει να παράγουν *Stevia* ως ετήσια καλλιέργεια. Ο πολλαπλασιασμός με σπόρους δεν επιτρέπει την παραγωγή ομοιογενών πληθυσμών, γιατί έχει ως αποτέλεσμα τη μεγάλη μεταβλητότητα σε σημαντικά χαρακτηριστικά, όπως τα επίπεδα γλυκύτητας και η σύσταση (Nakamura et al., 1985). Η *Stevia* επομένως συνήθως πολλαπλασιάζεται με μοσχεύματα βλαστού που ριζώνουν εύκολα, αλλά απαιτούν μεγάλο εργατικό δυναμικό. Ο φυτικός πολλαπλασιασμός περιορίζεται ακόμα περισσότερο λόγω του μικρού αριθμού των ξεχωριστών ατόμων που μπορούν να παρατηρηθούν ταυτόχρονα σε ένα φυτό. Λόγω των παραπάνω δυσκολιών, η ιστοκαλλιέργεια είναι η καλύτερη εναλλακτική λύση για τον ταχύ μαζικό πολλαπλασιασμό φυτών στέβιας. (Sivaram & Mukundam, 2003).

2.2.3.2 Συνθήκες καλλιέργειας

Η στέβια δεν είναι ανθεκτική στο κρύο και συνήθως δεν αντέχει θερμοκρασίες μικρότερες των 9°C. Παρ' όλα αυτά περιστασιακά μπορεί να αντέξει θερμοκρασίες κοντά στο 0. Για ταχεία ανάπτυξη όμως χρειάζεται 20-24°C. (Singh & Rao, 2005). Από την άλλη μεριά η στέβια έχει ανάγκη από υγρασία. Τα φύλλα και οι μίσχοι μαραίνονται γρήγορα αλλά ανακάμπτουν, εάν η περίοδος των κακών συνθηκών τους δεν είναι παρατεταμένη. Μεγαλώνει γρήγορα και μπορεί να καλλιεργηθεί ως ετήσιο βότανο κατά τα τέλη της άνοιξης και του καλοκαιριού. Ως εκ τούτου, η στέβια θα μπορούσε να γίνει μια ενδιαφέρουσα και αποδοτική νέα καλλιέργεια για τις τροπικές περιοχές (ως πολυετές φυτό), για τις θερμές περιοχές, συμπεριλαμβανομένων και των εύκρατων με ζεστό και βροχερό καλοκαίρι (ως ετήσια καλοκαιρινή καλλιέργεια) και για τις μεγάλες περιοχές της Μεσογείου, ως ετήσια καλλιέργεια την άνοιξη και το φθινόπωρο ή ως πολυετής καλλιέργεια σε αρδευόμενες περιοχές. Η στέβια είναι «φωτοπεριοδικό» φυτό

μικρής μέρας. Δηλαδή, για να συμβεί η άνθιση πρέπει το μήκος της ημέρας να είναι κάτω από το κρίσιμο όριο των 13 ωρών. Αυτή η ιδιότητα έχει πολύ μεγάλη πρακτική σημασία, γιατί η έρευνα έδειξε ότι η συγκέντρωση της στεβιοσίδης στα φύλλα της στέβιας αυξάνεται όταν τα φυτά μεγαλώνουν κάτω από συνθήκες μεγάλης μέρας (Metivier and Viana, 1979).

Η στέβια μπορεί να καλλιεργηθεί σε σχετικά φτωχά εδάφη. Τα φυτά μπορούν να χρησιμοποιούνται για εμπορική παραγωγή για 8 χρόνια στη διάρκεια των οποίων η συγκομιδή πραγματοποιείται έξι φορές το χρόνο. Οι ρίζες παραμένουν στη θέση τους και το φυτό αναγεννιέται με ταχείς ρυθμούς. Η ποσότητα των ξηρών φύλλων που μπορεί να συγκομισθεί κυμαίνεται από 15 έως 35 g ανά φυτό (Mishra et al., 2010). Σύμφωνα με τον Sergio (2010), ένα εκτάριο φυτείας μπορεί να παράγει μεταξύ 1000 και 1200 kg αποξηραμένα φύλλα που περιέχουν 60-70 kg στεβιοσίδα, η οποία είναι μια χαμηλή απόδοση σε σύγκριση με τη ζάχαρη από ζαχαροκάλαμο ή από ζαχαρότευτλα. Ωστόσο, 70 kg στεβιοσίδα, που είναι 300 φορές γλυκύτερη από την σακχαρόζη, είναι ισοδύναμη με μία απόδοση 21.000 kg ζάχαρη ανά εκτάριο. Υπάρχουν περίπου 90 ποικιλίες της *S. rebaudiana* που έχουν αναπτυχθεί σε όλο τον κόσμο, ανάλογα με τις διάφορες κλιματικές συνθήκες. (Ibrahim et al., 2008, Singh & Rao, 2005). Τα καλλιεργήσιμα εδάφη έχουν οργωθεί και/ή καλλιεργηθεί δύο φορές για να προετοιμαστεί μια αρκετά αποδοτική επιφάνεια φύτευσης. Η φύτευση μοσχευμάτων είναι καλύτερη μέθοδος αναπαραγωγής από τους σπόρους που τοποθετούνται σε δίσκους στο θερμοκήπιο για μια περίοδο 7-8 εβδομάδων, μια μάλλον δαπανηρή διαδικασία. Τα φυτά στη συνέχεια φυτεύονται στο χωράφι καλλιέργειας σε απόσταση 53 ή 61 cm μεταξύ των σειρών με συνολική πυκνότητα των φυτών της τάξης των 100.000 φυτών ανά εκτάριο. Ωστόσο, διαφορετικές κλιματικές συνθήκες θα επηρεάσουν την καλλιέργεια της *Stevia*, γι 'αυτό είναι σκόπιμο να διενεργηθούν δοκιμές σε κάθε ζώνη φύτευσης για να καθοριστεί η επαρκής πυκνότητα πληθυσμού στέβιας για τη συγκεκριμένη περιοχή. (Rahmesh et al., 2006). Τα φυτά *Stevia* φαίνεται να έχουν χαμηλές θρεπτικές απαιτήσεις, αλλά γενικά απαιτούν συχνή και ρηχή άρδευση. Κανονικά, η άρδευση πραγματοποιείται τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα, εάν οι άκρες των βλαστών είναι πεσμένες. (Kaushik, et al., 2010).

2.2.3.3 Συγκομιδή

Η συγκομιδή των χλωρών φύλλων του φυτού *Stevia rebaudiana* μπορεί να επιτευχθεί είτε χειρωνακτικά μέσω της αποφύλλωσης του φυτού (διαδικασία γνωστή και ως άρμεγμα), είτε μέσω μηχανικής κοπής των φύλλων. Βασικό μειονέκτημα της αποφύλλωσης είναι ο σημαντικός αριθμός εργατικών χεριών που απαιτούνται για τη συλλογή των φύλλων, με αποτέλεσμα να είναι δύσκολος ο ανταγωνισμός χωρών όπου το εργατικό κόστος είναι χαμηλό. Ωστόσο, αξίζει να αναφερθεί ότι μέσω αυτής της μεθόδου είναι δυνατόν να επιτευχθεί μεγαλύτερη καθαρότητα και ποιότητα φύλλων. Μειονεκτήματα της μηχανικής συγκομιδής φύλλων είναι η ανάγκη προσθήκης ενός επιπλέον σταδίου για το διαχωρισμό των φύλλων από τα στελέχη του φυτού καθώς και το γεγονός ότι απαιτούνται κτιριακές και μηχανολογικές εγκαταστάσεις μεγάλου όγκου προκειμένου η μεγάλη ποσότητα χλωρών φύλλων που συλλέγεται να απορροφηθεί πλήρως από τη μονάδα ξήρανσης και να υποστεί άμεση επεξεργασία, για να αποφευχθεί η μείωση του περιεχομένου των φύλλων σε γλυκοζίτες και η υποβάθμιση της ποιότητας του προϊόντος. Η συγκομιδή είναι καλύτερο να λαμβάνει χώρα νωρίς το πρωί, αφενός γιατί στην περίπτωση συγκομιδής με άρμεγμα τα φύλλα απομακρύνονται ευκολότερα από το στέλεχος του φυτού και αφετέρου γιατί η αύξηση της θερμοκρασίας το μεσημέρι, προκαλεί ελάττωση της περιεκτικότητας σε γλυκοζίτες.

Η ξήρανση πρέπει να γίνεται εντός δώρου για την αποφυγή της οξειδωσης των γλυκοζιτών ενώ αξίζει να σημειωθεί ότι καθυστέρηση 3 ημερών προκαλεί απώλεια του 30% της περιεκτικότητας των φύλλων σε γλυκοζίτες. Το έντονο πράσινο χρώμα στα ξηρά φύλλα είναι ενδεικτικό της καθαρότητας και της υψηλής ποιότητάς τους ενώ μετά την ξήρανση τα φύλλα μπορούν να αποθηκευτούν για μεγάλο χρονικό διάστημα πριν την τελική επεξεργασία τους στο στάδιο της εκχύλισης. (Oddone, 1997)

2.2.4 Βιοχημική Σύσταση – Ιδιότητες των φύλλων στέβιας

Η στέβια έγινε γνωστή για την υψηλή περιεκτικότητά της σε γλυκά διτερπένια (περίπου 4–20%) στα ξηρά φύλλα. (Ghanta et al., 2007). Οι ent-kaurene διτερπενοειδείς γλυκοζίτες είναι τα συστατικά που είναι υπεύθυνα για τη γλυκιά γεύση της στέβιας (Prakash et al., 2008). Από τα 230 είδη που υπάρχουν στο γένος της στέβιας, μόνο τα είδη *rebaudiana* και *phlebophylla* παράγουν γλυκοζίτες στεβιόλης. (Brandle & Telmer, 2007). Η στεβιοσίδη περιγράφεται ως ένας γλυκοζίτης απαρτισμένος από τρία μόρια γλυκόζης συνδεδεμένα με ένα άγλυκον, τη μονάδα της στεβιόλης. Η στεβιοσίδη, ένας από τους γλυκοζίτες της στέβιας, είναι 300 περίπου φορές πιο γλυκός από τη σακχαρόζη και μπορεί να είναι ιδιαίτερα ωφέλιμη για όσους πάσχουν από παχυσαρκία, σακχαρώδη διαβήτη, καρδιαγγειακά νοσήματα και τερηδόνα. (Ghanta et al., 2007)

Οι Savita et al. (2004) ανέλυσαν φύλλα στέβιας επί ξηρού βάρους και υπολόγισαν το ενεργειακό τους περιεχόμενο σε 2,7 kcal/g. Αυτό σημαίνει ότι το εκχύλισμα στέβιας μπορεί να χαρακτηριστεί ως ένα γλυκαντικό με χαμηλές θερμίδες, καθώς η γλυκύτητά της είναι έντονη και συγκρίσιμη με εκείνη των άλλων εμπορικών γλυκαντικών, όπως η ακεσουλφάμη K (χωρίς θερμίδες), ασπαρτάμη (4 kcal/g), σακχαρίνη (χωρίς θερμίδες) και σουκραλόζη (χωρίς θερμίδες). Η ευρέως χρησιμοποιούμενη σακχαρόζη έχει πολύ υψηλή συνεισφορά θερμίδων στη διατροφή, δεδομένου ότι μεταβολίζεται πλήρως από τον οργανισμό και μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση του βάρους. Σε αυτό το πλαίσιο, η χρήση της Stevia ως γλυκαντική ουσία χαμηλών θερμίδων θα μπορούσε να προσφέρει τεράστια βοήθεια για τον περιορισμό ή τον έλεγχο της ημερήσιας πρόσληψης θερμίδων στη διατροφή.

2.2.4.1 Λειτουργικές ιδιότητες της σκόνης από φύλλα *Stevia*

Σύμφωνα με τον Mishra et al. (2010) τα φύλλα της στέβιας παρουσιάζουν τιμές φαινόμενης πυκνότητας 0,443 g/ml, ικανότητα συγκράτησης νερού 4,7 ml/g, ικανότητα απορρόφησης λίπους 4,5 ml/g, η αξία γαλακτωματοποίησης 5,0 ml/g, δείκτη διόγκωσης 5,01 g/g, διαλυτότητα 0.365 g/g και pH 5,95. Η φαινόμενη πυκνότητα της σκόνης από φύλλα στέβιας φαίνεται να είναι χαμηλή. Υψηλότερες πυκνότητες είναι συνήθως επιθυμητές για τη μείωση του πάχους της αλοιφής, ένας σημαντικός παράγοντας στη διατροφή των παιδιών, όπου ο όγκος του τροφίμου πρέπει να λαμβάνεται υπόψη. Από την άλλη μεριά, η ίδια μελέτη έδειξε μια αυξημένη ικανότητα συγκράτησης νερού, η οποία φαίνεται να αποτελεί πλεονέκτημα και μπορεί να οφείλεται στην υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες αυξάνουν την ικανότητα συγκράτησης νερού, ενισχύοντας έτσι την ικανότητα διόγκωσης, μια σημαντική λειτουργία στην παρασκευή παχύρευστων τροφών όπως σούπες, σάλτσες, ζύμες και ψημένα προϊόντα. Η ικανότητα της πρωτεΐνης να βοηθάει στο σχηματισμό και τη σταθεροποίηση του γαλακτώματος είναι επίσης κρίσιμη σε πολλές εφαρμογές σε τρόφιμα, όπως σε κέικ, σε χυλούς, κρέμες γάλακτος για καφέ, γάλατα, παγωμένα επιδόρπια και άλλα. Η ιδιότητα αυτή εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη σύσταση και τις συνθήκες επεξεργασίας του προϊόντος (Savita et al., 2004). Η ικανότητα απορρόφησης του λίπους έχει αποδοθεί στην φυσική παγίδευση του ελαίου. Η σκόνη των φύλλων στέβιας φαίνεται να έχει επαρκή ικανότητα απορρόφησης λίπους, επιτρέποντας αυτό να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην επεξεργασία τροφίμων, δεδομένου ότι το λίπος επιδρά στη γεύση και αυξάνει την αίσθηση των τροφίμων στο στόμα.

Οι Crammer και Ikan (1986) επιβεβαίωσαν ότι εφόσον η στεβιοσίδη είναι σταθερή στους 95°C, είναι ένα κατάλληλο γλυκό πρόσθετο για μαγειρεμένα ή ψημένα τρόφιμα. Τα φύλλα στέβιας, όπως και τα καθαρά εκχυλίσματα στεβιοσίδης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη φυσική τους κατάσταση ή μαγειρεμένα, και είναι θερμικά σταθερά σε θερμοκρασίες έως και 200°C (Serio, 2010). Θέρμανση του στερεού γλυκαντικού στεβιοσίδης σε υψηλές θερμοκρασίες επί 1 ώρα έδειξε καλή σταθερότητα έως τους 120°C, ενώ σε θερμοκρασίες άνω των 140°C παρατηρήθηκε αναγκαστική διάσπαση, η οποία οδήγησε σε ολική αποσύνθεση στους 200°C. (Abou- Arab et al., 2010). Εκτός αυτού, αναφέρθηκε επίσης ότι η στεβιοσίδη και η ρεμπαουδιοσίδη A είναι ευλόγως σταθερές θερμικά υπό υψηλές θερμοκρασίες, κατά τη χρησιμοποίησή τους σε

διεργασίες τροφίμων και δεν συμμετέχουν σε μη ενζυμική κασπάνωση (αντίδραση Maillard), ούτε καραμελώνουν κατά τη θέρμανση. (Abou-Arab et al., 2010). Μελέτες αποδεικνύουν επίσης τη μη φωτοαποικοδόμηση όξινων αφεψημάτων που περιέχουν ρεμπαουδιοσίδη Α ή στεβιοσίδη όταν εκτίθενται στο φως. (Prakash et al., 2009)

Τα οφέλη που συσχετίζονται με τα φύλλα στέβιας οφείλονται κυρίως στη θρεπτική σύνθεσή τους (Πίνακας 2). Όπως φαίνεται η στέβια είναι μια καλή πηγή υδατανθράκων, πρωτεϊνών και φυτικών ινών.

Πίνακας 2: Αναλύσεις φύλλων στέβιας (g/100g επί ξηρού) (Lemus-Mondaca R. et al., 2012)

Component	References						
	Mishra et al. (2010)	Goyal et al. (2010)	Serio (2010)	Savita et al. (2004)	Abou-Arab et al. (2010)	Tadhani and Subhash (2006a)	Kaushik et al. (2010)
Moisture	7	4.65	ND	7	5.37	ND	7.7
Protein	10	11.2	11.2	9.8	11.40	20.4	12
Fat	3	1.9	5.6	2.5	3.73	4.34	2.7
Ash	11	6.3	ND	10.5	7.41	13.1	8.4
Carbohydrate	52	ND	53	52	61.9	35.2	ND
Crude fibre	18	15.2	15	18.5	15.5	ND	ND

ND, not determined.

2.2.4.2 Υδατάνθρακες

Στις ρίζες και τα φύλλα της *S. rebaudiana* απομονώθηκαν φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες τύπου ινουλίνης, οι οποίοι είναι φυσικοί πολυσακχαρίτες των φυτών με σημαντικές λειτουργικές ιδιότητες που σχετίζονται με προβιοτικά, φυτικές ίνες, το μεταβολισμό των λιπιδίων και τον έλεγχο του σακχαρώδους διαβήτη. Παρατηρήθηκαν στις ρίζες και τα φύλλα του φυτού ποσοστά καθαρών φρουκτο-ολιγοσακχαριτών 4,6% και 0,46%, αντίστοιχα. Αυτό δείχνει μια πιθανή εφαρμογή των εκχυλισμάτων ως συμπλήρωμα διατροφής (Braz de Oliveira et al., 2011).

2.2.4.3 Πρωτεΐνες

Οι Mohammad et al. (2007) προσδιόρισαν εννέα αμινοξέα σε φύλλα στέβιας: γλουταμικό οξύ, ασπαρτικό οξύ, λυσίνη, σερίνη, ισολευκίνη, αλανίνη, προλίνη, τυροσίνη και μεθειονίνη. Οι Abou-Arab et al. (2010) βρήκαν ακόμα περισσότερα αμινοξέα στα φύλλα στέβιας. Συνολικά δεκαεπτά αμινοξέα προσδιορίστηκαν και ταξινομήθηκαν ως ουσιώδη και μη ουσιώδη αμινοξέα (Πίνακας 3). Σύμφωνα με την έκθεση της Κοινής Διαβούλευσης Εμπειρογνομόνων FAO/WHO/UNU (WHO, 2007), τα απαραίτητα αμινοξέα των φύλλων στέβιας είναι: λευκίνη, ισολευκίνη, βαλίνη, λυσίνη, θρεονίνη, τρυπτοφάνη, μεθειονίνη, φαινυλαλανίνη και ιστιδίνη. Οι καθημερινές απαιτήσεις αυτών των αμινοξέων στην ανθρώπινη διατροφή συνοψίζονται επίσης στον Πίνακα 2. Αυτό δείχνει ότι τα φύλλα στέβιας περιέχουν σχεδόν όλα τα απαραίτητα αμινοξέα, συμπεριλαμβανομένης της τυροσίνης και της κυστεΐνης. Μόνο το αμινοξύ τρυπτοφάνη απουσιάζει. Αυτό σημαίνει ότι μετά την εκχύλιση της στεβιοσίδης από τα φύλλα, το υπόλειμμα θα μπορούσε να είναι μια πολύτιμη πηγή απαραίτητων αμινοξέων για την υγεία. Το περιεχόμενό τους μπορεί να ταιριάζει με τις πρωτεϊνικές απαιτήσεις που συνιστά η Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (WHO, 2007).

Πίνακας 3: Αμινοξέα της *S.rebaudiana* και απαραίτητα αμινοξέα για τον ανθρώπινο οργανισμό. (Lemus-Mondaca R. et al., 2012))

Reported by Abou-Arab et al. (2010)				Report of a Joint WHO/FAO/UNU Expert Consultation (WHO, 2007)		
Essential amino acid g 100 g ⁻¹ d.m.		Non-essential amino acid g 100 g ⁻¹ d.m.		Indispensable amino acid	Report of (2002) mg/kg per day	Report of (1985) mg/kg per day
Arginine ^a	0.45	Aspartate	0.37	Histidine	10	8-12
Lysine	0.70	Serine	0.46	Isoleucine	20	10
Histidine	1.13	Glutamic	0.43	Leucine	39	14
Phenyl alanine	0.77	Proline	0.17	Lysine	30	12
Leucine	0.98	Glycine	0.25	Methionine + cysteine	15	13
Methionine	1.45	Alanine	0.56	Phenylalanine + tyrosine	25	14
Valine	0.64	Cysteine ^b	0.40	Threonine	15	7
Threonine	1.13	Tyrosine ^b	1.08	Tryptophan	4	3.5
Isoleucine	0.42			Valine	26	10
Total	7.67	Total	3.72	Total	184	93.5

^a Not considered as indispensable amino acid in Technical Report FAO/WHO/UNU (WHO, 2007).

^b Considered indispensable under specific situation.

2.2.4.4 Μέταλλα

Κάλιο, ασβέστιο, μαγνήσιο, και νάτριο βρέθηκαν σε εύλογες ποσότητες σε φύλλα στέβιας. Όπως αναφέρθηκε από ορισμένους συγγραφείς, οι μέσες συγκεντρώσεις μακρο-και μικροστοιχείων που έχουν βρεθεί στα αποξηραμένα φύλλα στέβιας φαίνονται στον Πίν. 4. Η υψηλή περιεκτικότητα σε κάλιο που προσδιορίστηκε σε όλες τις μελέτες είναι αξιοσημείωτη, αν και η ποσότητα του καλίου που βρέθηκε από τους Abou- Arab et al. (2010) φαίνεται να είναι πολύ χαμηλή σε σύγκριση με εκείνη των άλλων μελετών, το οποίο όμως μπορεί να εξηγηθεί από διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης (Rahmesh et al. (2006). Στα φύλλα στέβιας παρουσιάζονται επίσης ψευδάργυρος και σίδηρος.

Πίνακας 4: Μεταλλικά στοιχεία της *S. rebaudiana* (mg/100g ξηρού βάρους). (Lemus-Mondaca R. et al., 2012))

Minerals	References					
	Mishra et al. (2010)	Goyal et al. (2010)	Serio (2010)	Tadhani and Subhash (2006a)	Kaushik et al. (2010)	Abou-Arab et al. (2010)
Calcium	464.4	544	600	1550	722	17.7
Phosphorous	11.4	318	318	350	ND	ND
Sodium	190	89.2	ND	160	32.7	14.93
Potassium	1800	1780	1800	2510	839	21.15
Iron	55.3	3.9	3.9	36.3	31.1	5.89
Magnesium	349	349	500	ND	ND	3.26
Zinc	1.5	1.5	ND	6.39	ND	1.26

ND, not determined.

2.2.4.5 Λιπίδια

Στα έλαια των φύλλων στέβιας, οι Tadhani και Subhash (2006a) προσδιόρισαν έξι λιπαρά οξέα (Πίνακας 5) με τη χρήση προτύπων μεθυλεστέρα. Τα οξέα: παλμιτικό, παλμιτελαϊκό, στεατικό, ελαϊκό, λινολεϊκό και λινολενικό ταυτοποιήθηκαν στο έλαιο φύλλων. Μεταξύ αυτών που εντοπίστηκαν, η περιεκτικότητα σε παλμιτικό οξύ βρέθηκε να είναι υψηλότερη, ενώ η περιεκτικότητα σε στεατικό οξύ ήταν η μικρότερη. Τα έλαια φύλλων στέβιας αποδεικνύεται ότι είναι μια πλούσια πηγή λινολενικού οξέος. Αυτή η

υψηλή τιμή του λινολενικού οξέος μπορεί να συνεισφέρει στη διατήρηση μιας ιδανικής αναλογίας λιπαρών οξέων στην ανθρώπινη διατροφή.

Πίνακας 5: Λιπαρά οξέα σε έλαια φύλλων στέβιας (Tadhani & Subhash, 2006a).

Fatty acids	g 100 g ⁻¹
Palmitic acid (C16)	27.51
Palmitoleic acid (C16-1)	1.27
Stearic acid (C18)	1.18
Oleic acid (C18-1)	4.36
Linoleic acid (C18-2)	12.40
Linolenic acid (C18-3)	21.59

2.2.4.6 Βιταμίνες

Οι Kim et al. (2011) μελέτησαν τα ποσά των υδατοδιαλυτών βιταμινών στα φύλλα στέβιας και τα εκχυλίσματα του φυτού *callus* (Πίν. 6), και προσδιορίστηκε, ότι το περιεχόμενο του φολικού οξέος, της βιταμίνης C και της βιταμίνης B2 στα εκχυλίσματα φύλλων ήταν σημαντικά υψηλότερο από εκείνο στα εκχυλίσματα *callus*. Στο εκχύλισμα των φύλλων στέβιας, το φολικό οξύ βρέθηκε να είναι η κύρια ένωση, ακολουθούμενη από τη βιταμίνη C.

Πίνακας 6: Υδατοδιαλυτές βιταμίνες εκχυλίσματος των φυτών *S.rebaudiana* και *callus* (mg/100g εκχυλίσματος, επί ξηρού) (Kim et al., 2011)

Vitamin	Leaf	Callus
Vitamin C	14.98 ± 0.07	1.64 ± 0.02
Vitamin B2	0.43 ± 0.02	0.23 ± 0.02
Vitamin B6	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Folic acid	52.18 ± 0.21	0.09 ± 0.01
Niacin	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Thiamin	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

2.2.5 Φυτοχημικά συστατικά της στέβιας- Διτερπενικοί γλυκοζίτες

Η *S. rebaudiana* είναι ένα φυτό πλούσιο σε τερπένια και φλαβονοειδή. Τα φυτοχημικά συστατικά που υπάρχουν στη *S. rebaudiana* είναι τα: *austroinullin*, β -καροτένιο, *dulcoside*, *nilacin*, ρεμπαουδι-οξείδια, ριβοφλαβίνη, στεβιόλη, στεβιοσίδη και θειαμίνη (Jayaraman et al., 2008)

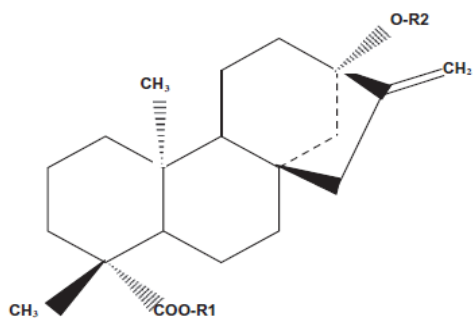
Οι γλυκοζίτες είναι ενώσεις που περιέχουν ένα μόριο υδατάνθρακα (σάκχαρο) συνδεδεμένο με ένα μόριο μη υδατάνθρακα (άγλυκον). Οι ενώσεις αυτές βρίσκονται κυρίως σε φυτά, και μπορούν να μετατραπούν, με υδρολυτική διάσπαση, σε ένα σακχαρούχο και ένα μη σακχαρούχο συστατικό. Ονομάζονται ανάλογα με τον τύπο σακχάρου που περιέχουν, ως γλυκοζίτες (γλυκόζη), πεντοζίτες (πεντόζη), φρουκτοζίτες (φρουκτόζη), κλπ. (Bernal et al., 2011). Οι φυσικές γλυκαντικές ουσίες των φύλλων στέβιας, οι γλυκοζίτες στεβιόλης, είναι διτερπένια, που απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν ως στεβιοσίδη, στεβιολβιοσίδη ρεμπαουδιοσίδη A, B, C, D, E, F και δουλκοσίδη (Geuns, 2003).

Η περιεκτικότητα των γλυκών γλυκοζιτών στα φύλλα *stevia* φαίνεται στον Πίν.7. Η περιεκτικότητα εξαρτάται από τις συνθήκες ανάπτυξης (Pól et al., 2007), καθώς και από την υιοθέτηση σύγχρονων γεωπονικών τεχνικών (GEUNS, 2003).

Πίνακας 7: Ποσότητες γλυκοζιτών στα φύλλα στέβιας. (Lemus-Mondaca R. et al., 2012)

Glycosides	Contents, % of the leaves dry weight		
	Gardana et al. (2010)	Goyal et al. (2010)	Kinghorn and Soejarto (1985)
Stevioside	5.8 ± 1.3	9.1	5–10
Rebaudioside A	1.8 ± 1.2	3.8	2–4
Rebaudioside C	1.3 ± 1.4	0.6	1–2
Dulcoside A	ND	0.3	0.4–0.7

ND, not determined.



Compound	R1	R2
Steviol	H	H
Steviolbioside	H	β -Glc- β -Glc(2 \rightarrow 1)
Stevioside	β -Glc	β -Glc- β -Glc(2 \rightarrow 1)
Rebaudioside A	β -Glc	β -Glc- β -Glc(2 \rightarrow 1) β -Glc(3 \rightarrow 1)
Rebaudioside B	H	β -Glc- β -Glc(2 \rightarrow 1) β -Glc(3 \rightarrow 1)
Rebaudioside C (Dulcoside B)	β -Glc	β -Glc- α -Rha(2 \rightarrow 1) β -Glc(3 \rightarrow 1)
Rebaudioside D	β -Glc- β -Glc(2 \rightarrow 1)	β -Glc- β -Glc(2 \rightarrow 1) β -Glc(3 \rightarrow 1)
Rebaudioside E	β -Glc- β -Glc(2 \rightarrow 1)	β -Glc- β -Glc(2 \rightarrow 1)
Rebaudioside F	β -Glc	β -Glc- β -Xyl(2 \rightarrow 1) β -Glc(3 \rightarrow 1)
Dulcoside A	β -Glc	β -Glc- α -Rha(2 \rightarrow 1)

Εικόνα 2: Δομή των βασικών γλυκοζιτών της στέβιας. (Geuns, 2003)

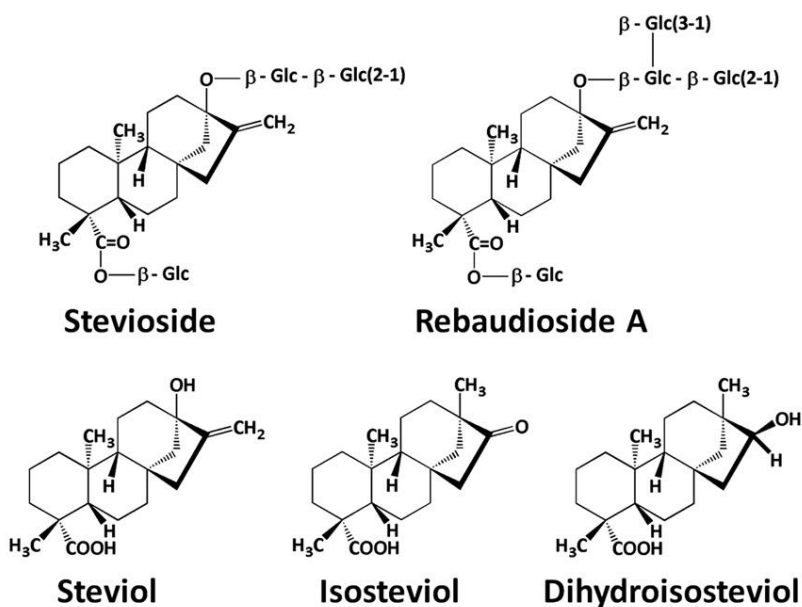
Η στεβιοσίδη είναι ο γλυκοζίτης που βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στα φύλλα της στέβιας (4-13% w/w) και έχει τον χημικό τύπο ενός διτερπενικού γλυκοζίτη ($C_{38}H_{60}O_{18}$). Ακολουθείται από τη ρεμπαουδιοσίδη Α (2-4% w/w), τη ρεμπαουδιοσίδη C (1-2% w/w) και τη δουλκοσίδη Α (0,4-0,7% w/w). Οι γλυκοζίτες στεβιολβιοσίδη, ρεμπαουδιοσίδη Β, D, E και F εντοπίστηκαν επίσης σε εκχυλίσματα των φύλλων, αλλά ως δευτερεύοντα συστατικά (GEUNS, 2003) Εκτός από αυτές τις ενώσεις, στα εκχυλίσματα στέβιας αναφέρθηκαν φλαβονοειδή, sterebins Α-Η, τριτερπένια, συστατικά πτητικού ελαίου, χρωστικές, κόμμεα και ανόργανα συστατικά (GEUNS, 2003). Οι γλυκοζίτες που βρίσκονται κυρίως στα φύλλα του φυτού, αποτελούν το 15% του περιεχομένου

τους, ανάλογα με την ποικιλία (Giraldo et al., 2005). Η περιεκτικότητα σε ρεμπαουδιοσίδη Β είναι αμελητέα σε σύγκριση με εκείνη της στεβιοσίδης. Αντιστρόφως, καθαρά εκχυλίσματα που λαμβάνονται από φύλλα στέβιας και προσφέρονται στην αγορά περιέχουν κυρίως στεβιοσίδη (>80%) ή ρεμπαουδιοσίδη Α (>90%) (Gardana et al., 2010). Μελέτες των Starratt et al. (2002) δείχνουν ότι το πάχος του φύλλου συνδέεται με καλύτερη αναλογία ρεμπαουδιοσίδης προς στεβιοσίδη. Η ρεμπαουδιοσίδη Α έχει γλυκαντική δράση ακόμα μεγαλύτερη από αυτή της στεβιοσίδης (Barriocanal et al., 2008). Υπάρχουν ενδείξεις ότι η ρεμπαουδιοσίδη Β και η στεβιολβιοσίδη δεν είναι φυσικά συστατικά της *S. rebaudiana*, αλλά σχηματίζονται από

μερική υδρόλυση κατά τη διάρκεια της εκχύλισης (Prakash et al., 2008), όντας έτσι προϊόντα της διαδικασίας εκχύλισης (Kennelly, 2002).

Όλοι οι διτερπενικοί γλυκοζίτες στα φύλλα της *S. rebaudiana* έχουν τον ίδιο «κορμό» στεβιόλης (Εικ. 2) και διαφέρουν κυρίως στο περιεχόμενο των υπόλοιπων υδατανθράκων (R1 και R2), μονο-, δι- και τρισακχαρίτες που περιέχουν γλυκόζη και/ή ραμνόζη στις θέσεις C13 και C19. (Kochikyan et al., 2006)

Η γλυκύτητα των ρεμπαουδιοσιδών αυξάνεται με την αύξηση του αριθμού των μονάδων σακχάρων, που είναι συνδεδεμένα με το άγλυκον της στεβιόλης. (Kongyiaeva et al., 2007). Η ρεμπαουδιοσίδη Α, για παράδειγμα, που έχει μια επιπλέον μονάδα γλυκόζης σε σχέση με τη στεβιοσίδη, είναι ανώτερη τόσο σε γλυκύτητα όσο και στην ποιότητα της γεύσης. Η καθαρή στεβιοσίδη συνήθως παράγει μια σημαντική πικρή επίγευση. Η γλυκύτητα οποιασδήποτε από τις ενώσεις της στέβιας είναι μεγαλύτερη από ότι της σακχαρόζης: ρεμπαουδιοσίδη Α (250-450 φορές), ρεμπαουδιοσίδη Β (300-350 φορές), ρεμπαουδιοσίδη C (50-120 φορές), ρεμπαουδιοσίδη D (250-450 φορές), ρεμπαουδιοσίδη E (150-300 φορές), dulcoside A (50-120 φορές) και στεβιολβιοσίδη (100-125 φορές). Κατά μέσο όρο, η γλυκύτητα των γλυκοζιτών στεβιόλης είναι 250-300 φορές μεγαλύτερη από εκείνη της σακχαρόζης (Crammer & Ikan, 1987)



Εικόνα 3: Χημική δομή της στεβιοσίδης και των συναφών συστατικών. (Chatsudthipon & Muanprasat, 2009)

Οι διτερπενικοί γλυκοζίτες είναι μόρια ιδιαίτερα σταθερά σε υδατικά διαλύματα ευρέως φάσματος pH και θερμοκρασίας (Abou-Arab et al., 2010, Virendra & Kalragam, 2008) Κατά τη θερμική επεξεργασία σε ένα εύρος pH 1-10 επί 2 ώρες στους 60°C, δεν παρατηρείται σχεδόν καμία υποβάθμιση της στεβιοσίδης, παρά μόνο ελαφρές απώλειες μέχρι 5% (pH 2 και 10) κατά τη θέρμανση στους 80°C. Υπό ισχυρά όξινες συνθήκες (pH 1,0) παρατηρήθηκε όμως διάσπαση της στεβιοσίδης η οποία είχε ως αποτέλεσμα την ολική αποσύνθεση μετά από επώαση σε θερμοκρασία 80°C για 2 ώρες (Abou-Arab et al., 2010). Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρθηκαν από τους Buckenhuskers και Omran (1997) που έδειξαν, ότι η στεβιοσίδη διαθέτει μια εξαιρετική θερμική σταθερότητα μέχρι τους 100°C για 1 ώρα σε pH 3-9, αλλά υφίσταται ταχεία αποσύνθεση σε pH>9 υπό τις ίδιες συνθήκες θερμοκρασίας.

Τα χαρακτηριστικά αυτά ευνοούν τη χρήση των γλυκοζιτών στεβιόλης ως γλυκαντικό στη βιομηχανία τροφίμων.

2.2.6 Εκχύλιση γλυκοζιτών από φύλλα *S. rebaudiana*

Οι συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης στεβιοσίδης από τα φύλλα *S. rebaudiana* περιλαμβάνουν υδατικά ή αλκοολικά εκχυλίσματα, που ακολουθούνται από καταβύθιση, θρόμβωση και κρυστάλλωση (Puri et al., 2011). Άλλες σύγχρονες τεχνικές εκχύλισης, όπως η υγρή εκχύλιση υπό πίεση, η εκχύλιση ζεστού νερού υπό πίεση (PHWE), η υπερκρίσιμη εκχύλιση και η εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα (MAE), έχουν χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση των βιοενεργών συστατικών από φύλλα στέβιας (Konylyaeva et al., 2007, Pol et al., 2007, Puri et al., 2011). Ο καθαρισμός της στεβιοσίδης μπορεί να γίνει με χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων, η οποία έχει γίνει αποδεκτή ως η καλύτερη τεχνική. Στη συνέχεια, το υδατικό εκχύλισμα διηθείται και επανακαθαρίζεται για να δώσει 90% καθαρή στεβιοσίδη.

Πρόσφατα, έχουν αναφερθεί και ενζυμικές εκχυλίσεις με ένζυμα όπως κυτταρινάσες, πηκτινάσες, ημικυτταρινάσες για την εκχύλιση βιοενεργών συστατικών από φυτά, όπως η βανιλίνη, φαινόλες, έλαια από σπόρους σταφυλιών, και αρωματικές ύλες. Η ενζυμική εκχύλιση προσφέρει μια πιο αποτελεσματική «πράσινη» επιλογή, για να ελαχιστοποιηθεί η χρήση οργανικών διαλυτών (χλωροφόρμιο-μεθάνιο, γλυκερόλη, προπυλενογλυκόλη) για την παραλαβή των γλυκοζιτών στεβιόλης από τα φύλλα *S.rebaudiana*. (Puri et al., 2011)

2.2.7 Χρήση των γλυκοζιτών στεβιόλης ως γλυκαντικό

Η εμπορική σημασία των γλυκαντικών στεβιόλης είχε επισημανθεί ήδη από το 1887, αλλά οικονομικά συμφέροντα έβαζαν πολλά εμπόδια στη χρήση τους και συνακόλουθα στην επέκταση της καλλιέργειας και επεξεργασίας της στέβιας. Οι μεγάλες ανάγκες των ανθρώπων για υγιεινή διατροφή, όμως και οι πιέσεις των οργανωμένων κοινωνιών υπερνίκησαν τα μεγάλα οικονομικά συμφέροντα και ανάγκασαν ακόμη και μεγάλες επιχειρήσεις να χρησιμοποιήσουν τους γλυκοζίτες στεβιόλης για την παραγωγή υγιεινών τροφίμων και ποτών (Λόλας, 2008).

2.2.7.1 Ανάγκη για υποκατάσταση της ζάχαρης

Στις ευρωπαϊκές βιομηχανικές χώρες σήμερα η χρήση ζάχαρης υπολογίζεται σε 130g ανά άτομο ανά ημέρα. Καταναλωτές που επιζητούν να περιορίσουν την πρόσληψη θερμίδων ή πρέπει να αποφεύγουν τη ζάχαρη λόγω σακχαρώδους διαβήτη χρειάζονται εναλλακτικά γλυκαντικά. Παράλληλα υπάρχει μια πολύ αμφιλεγόμενη συζήτηση για τους πιθανούς κινδύνους από συνθετικές γλυκαντικές ουσίες, που χρησιμοποιούνται ως υποκατάστατα ζάχαρης όπως η ασπαρτάμη και το άλας κυκλαμικών.

Ως εκ τούτου, είναι κατανοητό, ότι οι καταναλωτές αναζητούν μια γλυκαντική ουσία με αποδεκτή γεύση χωρίς θερμίδες και χωρίς αρνητικές παρενέργειες για την υγεία τους. Εξού και το όλο και αυξανόμενο ενδιαφέρον για τη *Stevia rebaudiana*, μια εναλλακτική λύση που έχει χρησιμοποιηθεί για εκατοντάδες χρόνια για τη γλύκανση τροφίμων και ποτών στη Νότια Αμερική και για δεκαετίες στην Ασία. (www.eustas.org)

Η *S. rebaudiana Bertonii* έχει προσελκύσει οικονομικό και επιστημονικό ενδιαφέρον λόγω της γλυκύτητας και των υποτιθέμενων θεραπευτικών ιδιοτήτων των φύλλων της. Τα φύλλα της στέβιας έχουν λειτουργικές και γευστικές ιδιότητες, ανώτερες από αυτές άλλων γλυκαντικών υψηλής δραστηριότητας και ήδη αποτελούν μια σημαντική πηγή γλυκαντικών υψηλής δραστηριότητας στην αγορά τροφίμων. (Goyal et al., 2010).

Πολλές διαφορετικές χρήσεις εκχυλισμάτων από φύλλα στέβιας είναι ήδη γνωστές: ως επιτραπέζιο γλυκαντικό, ως πρόσθετο σε αναψυκτικά, γλυκά, τουρσιά, προϊόντα καπνού, γλυκά, μαρμελάδες, γιαούρτι, τσίγλες, γρανίτες κ.α. Η μεγαλύτερη βιομηχανία αναψυκτικών Coca Cola χρησιμοποιεί ήδη γλυκοζίτες στεβιόλης για την παραγωγή Diet Coke στην Ιαπωνία, ενώ και σε πολλές ευρωπαϊκές χώρες, συμπεριλαμβανομένης και της Ελλάδας, μετά την έγκριση των γλυκοζιτών στεβιόλης από την EFSA, πολλές εταιρείες αναψυκτικών αντικατέστησαν τις γλυκαντικές ύλες που χρησιμοποιούσαν με τους γλυκοζίτες στεβιόλης. Στην Ιαπωνία και στην Κορέα το 40-50% της κατανάλωσης γλυκαντικών ουσιών καλύπτεται από εκχυλίσματα στεβιοσίδης.

2.2.7.2 Πλεονεκτήματα της χρήσης γλυκοζιτών στεβιόλης ως γλυκαντικό

Η χρήση της *Stevia rebaudiana* και των γλυκών συστατικών της (γλυκοζίτες στεβιόλης) ως γλυκαντική ουσία είναι απλή και έχει διάφορα πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλους τύπους γλυκαντικών:

- είναι ένα εντελώς φυσικό, μη συνθετικό προϊόν
- οι γλυκοζίτες στεβιόλης δεν περιέχουν θερμίδες
- τα φύλλα μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη φυσική τους κατάσταση
- απαιτούνται μικρές ποσότητες, χάρη στην τεράστια γλυκαντική της δύναμη (τα ξηρά φύλλα 40 φορές και οι γλυκοζίτες στεβιόλης έως 300 φορές μεγαλύτερη γλυκύτητα από τη ζάχαρη)
- το φυτό είναι μη τοξικό
- τα φύλλα, καθώς και ο καθαρός γλυκοζίτης στεβιόλης μπορεί να μαγειρευτεί και να χρησιμοποιηθεί στο ψήσιμο
- το γλυκαντικό διατηρείται σταθερό όταν θερμαίνεται μέχρι και στους 200°C
- κλινικές δοκιμές και συχνή ανθρώπινη χρήση δεν έδειξαν αρνητικά αποτελέσματα
- ιδανική, μη εθιστική γλυκαντική ουσία για τα παιδιά
- πολυετής διάρκεια ζωής στο ράφι
- μπορεί να αναμιχθεί με άλλα γλυκαντικά με αξιοσημείωτα αποτελέσματα ενίσχυσης γεύσης (www.eustas.org)

2.2.7.3 Μειονεκτήματα της χρήσης γλυκοζιτών στεβιόλης ως γλυκαντικό

Το γλυκαντικό από το φυτό στέβια όμως παρουσιάζει και μερικά ελαττώματα, που δυσχεραίνουν τη χρήση του στη βιομηχανία τροφίμων. Κατ' αρχήν η στεβιοσίδη αφήνει μία πικρή επίγευση, που χαρακτηρίζει τη γεύση του εκχυλίσματος στέβιας και δυσαρεστεί τους καταναλωτές. Σε αντίθεση με τη ζάχαρη, οι γλυκοζίτες στεβιόλης, δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συντηρητικό στα τρόφιμα (π.χ. μαρμελάδες). Επίσης δεν συμμετέχουν σε μη ενζυμική καστανώση και δεν καραμελοποιούνται κατά το ψήσιμο, ενώ δεν μπορούν να μεταβολιστούν μέσω μαγιάς. Σημαντικό στην παρασκευή γλυκισμάτων με γλυκαντικό από στέβια είναι επίσης ο μειωμένος όγκος γλυκαντικού που απαιτείται για συγκεκριμένη γλυκύτητα σε σύγκριση με τη ζάχαρη. (www.eustas.org)

2.2.8 Επίδραση των γλυκοζιτών στεβιόλης στην υγεία

Το φυτό στέβια είναι μια καλή πηγή υδατανθράκων, πρωτεϊνών και φυτικών ινών, με αποτέλεσμα να βοηθά στην ευεξία και να μειώνει τον κίνδυνο ορισμένων ασθενειών.

2.2.8.1 Μεταβολισμός των γλυκοζιτών στεβιόλης

Στον ανθρώπινο οργανισμό τα πεπτικά ένζυμα δεν μπορούν να διασπάσουν τους β-γλυκοζιτικούς δεσμούς των γλυκοζιτών στεβιόλης. Η στεβιοσίδη και η ρεμπαουδιοσίδη Α διασπώνται στο στομάχι και στο λεπτό έντερο και στη συνέχεια μεταφέρονται στο παχύ έντερο. Εκεί υδρολύονται μέσω της εντερικής μικροχλωρίδας και προκύπτει στεβιόλη, η οποία κατά το μεγαλύτερο μέρος απορροφάται και μεταφέρεται στο ήπαρ. Εκεί ακολουθεί σύζευξη με γλυκουρονικό οξύ. Το προκύπτον γλυκουρονίδιο αποκρίνεται μέσω των νεφρών (όπως συμβαίνει και με την καφεΐνη στη δεύτερη φάση του μεταβολισμού). Ένα μικρό μέρος του γλυκουρονιδίου στεβιόλης επιστρέφει στο λεπτό έντερο μέσω της χολής, έτσι ώστε δημιουργείται μία εντεροηπατική κυκλοφορία. (Bechthold A., 2010)

2.2.8.2 Διατροφικά οφέλη των γλυκοζιτών στεβιόλης

Οι γλυκοζίτες στεβιόλης χρησιμοποιούνται ήδη ως υποκατάστατα της σακχαρόζης, σε περιπτώσεις σακχαρώδους διαβήτη, παχυσαρκίας, υπέρτασης και για την πρόληψη της τετηδόνιας (Poi et al., 2007). Μία σειρά από άλλες μελέτες πρότειναν, ότι η στεβιοσίδη μαζί με άλλα συναφή συστατικά, τα οποία περιλαμβάνουν τη ρεμπαουδιοσίδη Α, τη στεβιόλη και ισοστεβιόλη, μπορούν να προσφέρουν εκτός από τη γλυκύτητα και άλλα οφέλη, όπως αντι-υπεργλυκαιμική, αντι-υπερτασική, αντιφλεγμονώδη, αντικαρκινική, αντιδιαρροϊκή, αντιδιουρητική και ανοσορυθμιστική επίδραση. (Chatsudthipong et al., 2009).

Επιπλέον, οι γλυκοζίτες στεβιόλης θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν ως γλυκαντική επιλογή ελεύθερη φαινυλαλανίνης για άτομα με φαινυλκετονουρία, μια σπάνια γενετική ασθένεια που απαιτεί τον έλεγχο της προσλαμβανόμενης φαινυλαλανίνης (<http://www.eufic.org>).

Από την άλλη, η μεγάλη ποσότητα του σιδήρου στο εκχύλισμα στέβιας θα μπορούσε να συμβάλλει στη διατήρηση των κανονικών επιπέδων της αιμοσφαιρίνης στον οργανισμό. Έτσι εκχυλίσματα στέβιας θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την παρασκευή διαφόρων γλυκών προϊόντων για την καταπολέμηση της σιδηροπενικής αναιμίας, μια σημαντική διατροφική διαταραχή στις αναπτυσσόμενες χώρες (Abou-Arab et al., 2010).

Στο υδατικό εκχύλισμα των φύλλων της *S. rebaudiana* εντοπίστηκαν υψηλά επίπεδα ολικών φαινολικών ενώσεων, ικανά να αναστέλλουν την αλυσιδωτή δράση των ελεύθερων ριζών και να ενεργούν ως ένας αναγωγικός παράγοντας. Η σημαντική αντιοξειδωτική δράση του υδατικού εκχυλίσματος των φύλλων της *S. rebaudiana* παρέχει μια επιστημονική επικύρωση για την παραδοσιακή χρήση του φυτού αυτού ως μια προσιτή πηγή φυσικών αντιοξειδωτικών με ωφέλιμα αποτελέσματα για την υγεία. (Shukla et al., 2012)

Οι Puri & Sharma (2011) παρατήρησαν αντιβακτηριδιακές ιδιότητες των γλυκοζιτών στεβιόλης. Προτάθηκε να διερευνηθεί η χρήση των γλυκαντικών από στέβια σε διάφορα τρόφιμα, όπως τσάι, είδη αρτοποιίας, τσίχλες, ακόμα και σε οδοντόκρεμες, ώστε να έχουν αντιβακτηριδιακή δράση κατά συνηθισμένων παθογόνων βακτηρίων (*Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*), που είναι η αιτία πολλών τροφιμογενών νόσων όπως ο εντερικός πυρετός, διάρροια, κλπ.

2.2.8.3 Έλεγχος σωματικού βάρους

Για πολλούς ανθρώπους τα γλυκαντικά προσφέρουν έναν τρόπο να απολαμβάνουν τη γλυκιά γεύση και παράλληλα να «εξοικονομούν» θερμίδες. Ακριβώς όπως και τα άλλα έντονα γλυκαντικά, οι γλυκοζίτες στεβιόλης επιτρέπουν στους καταναλωτές να απολαμβάνουν τη γλυκιά γεύση, χωρίς την προσθήκη θερμίδων στην ημερήσια ενεργειακή τους πρόσληψη, καθώς δεν περιέχουν σημαντικές θερμίδες.

Τα έντονα γλυκαντικά μπορεί να έχουν σημαντική συμβολή στη διαχείριση του σωματικού βάρους, όταν χρησιμοποιούνται στη διατροφή ως υποκατάστατα των προστιθέμενων σακχάρων. (Phelan S et al., 2009) Όμως το γεγονός ότι τα γλυκαντικά έχουν σχεδόν μηδενική θερμιδική αξία, δεν σημαίνει ότι η κατανάλωσή τους έχει ως αποτέλεσμα αυτόματα την απώλεια βάρους. Υπάρχουν ενδείξεις, ότι η υποκατάσταση προϊόντων που περιέχουν κανονική ζάχαρη από προϊόντα χωρίς ζάχαρη δε μειώνει σημαντικά τη συνολική ημερήσια πρόσληψη θερμίδων στους υγιείς ενήλικες (Holt SHA et al., 2000). Αυτό δικαιολογείται από το γεγονός ότι η γλυκιά γεύση ενεργοποιεί την όρεξη. Το να συμπεριλάβει κανείς απλώς στη διατροφή του γλυκαντικά δεν θα οδηγήσει απαραίτητα σε απώλεια βάρους. Πρέπει να τονίζεται ότι η απώλεια βάρους δεν θα επιτευχθεί, εάν δε μειωθεί συνολικά η πρόσληψη των θερμίδων. (www.eufic.org)

2.2.8.4 Ασφάλεια των γλυκοζιτών στεβιόλης

Μία από τις πιο προφανείς ενδείξεις για την ασφάλεια των γλυκοζιτών στεβιόλης είναι ότι ποτέ δεν έχουν υπάρξει αναφορές για αρνητικές συνέπειες σε πάνω από 1500 χρόνια συνεχούς χρήσης από τους αυτόχθονες της Παραγουάης (Kroger et al., 2006). Τοξικολογικές μελέτες έδειξαν ότι η στεβιοσίδη δεν έχει μεταλλαξιογόνα, τερατογόνα ή καρκινογόνα αποτελέσματα. Ομοίως δεν παρατηρήθηκαν αλλεργικές αντιδράσεις όταν χρησιμοποιήθηκε ως γλυκαντικό (Pol et al., 2007). Πρόσφατα ολοκληρωμένες μελέτες στη γενική και αναπαραγωγική τοξικότητα της ρεμπαουδιοσίδης Α επιβεβαιώνουν μελέτες που διεξάχθηκαν με γλυκοζίτες στεβιόλης, και έδειξαν την ασφάλειά τους σε υψηλά επίπεδα διατροφικής πρόσληψης. (Carakostas et al., 2008).

2.2.9 Πλαίσιο της ΕΕ για τα γλυκαντικά. Έγκριση γλυκοζιτών στεβιόλης.

2.2.9.1 Γλυκαντικές ουσίες

Όπως όλα τα πρόσθετα τροφίμων, τα γλυκαντικά είναι ουσίες που υπάγονται σε κανονισμούς και υπόκεινται σε αξιολόγηση της ασφάλειάς τους πριν από την έγκριση κυκλοφορίας τους στην αγορά. Στην Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ), η Ευρωπαϊκή Επιτροπή, το Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο και το Συμβούλιο ρυθμίζουν τη χρήση των προσθέτων τροφίμων και ειδικότερα, η Επιτροπή και τα κράτη μέλη αποφασίζουν ποια πρόσθετα μπορούν να χρησιμοποιούνται στα τρόφιμα και σε ποια επίπεδα. Όλα τα πρόσθετα τροφίμων περιλαμβάνονται στη λίστα με τα συστατικά στις ετικέτες των προϊόντων, όπου πρέπει να προσδιορίζεται τόσο η χρήση του προσθέτου τροφίμων στο τελικό προϊόν (π.χ. γλυκαντική ουσία) όσο και η συγκεκριμένη ουσία που χρησιμοποιήθηκε, είτε με αναφορά στον αντίστοιχο αριθμό Ε ή με το όνομά της (π.χ. Ε 954 για 'Σακχαρίνη »).

2.2.9.2 Ο ρόλος της EFSA

Η EFSA (European Food Safety Authority) έχει τρεις κύριες δραστηριότητες σε σχέση με την αξιολόγηση του κινδύνου των γλυκαντικών:

- Αξιολόγηση της ασφάλειας των νέων γλυκαντικών ουσιών πριν να μπορεί να εγκριθεί η χρήση τους στην ΕΕ.
- Επαναξιολόγηση όλων των γλυκαντικών ουσιών που έχουν ήδη εγκριθεί για χρήση στην ΕΕ πριν από 20, Ιανουαρίου του 2009.
- Απάντηση σε ad-hoc αιτήματα από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή να επανεξετάσει ορισμένες γλυκαντικές ουσίες, υπό το πρίσμα των νέων επιστημονικών πληροφοριών και / ή την τροποποίηση όρων χρήσης.

Στο πλαίσιο των αξιολογήσεων ασφάλειας των προσθέτων τροφίμων η EFSA θεσπίζει, όταν είναι εφικτό (δηλαδή όταν επαρκείς πληροφορίες είναι διαθέσιμες), την αποδεκτή ημερήσια πρόσληψη (ΑΗΠ ή ADI) για κάθε πρόσθετο τροφίμων ή ομάδα

των προσθέτων με παρόμοιες ιδιότητες. Η ADI είναι η ποσότητα μιας ουσίας, την οποία οι άνθρωποι μπορούν να καταναλώνουν σε καθημερινή βάση σε όλη τη διάρκεια της ζωής τους, χωρίς αξιολογικό κίνδυνο για την υγεία τους. Η ADI συνήθως εκφράζεται σε χιλιοστόγραμμα ή μικρογραμμάρια ανά κιλό σωματικού βάρους ανά ημέρα (mg/kg ή µg/kg σωματικού βάρους/ημέρα). Κατά την επαναξιολόγηση ενός πρόσθετου που είχε εγκριθεί παλαιότερα, η EFSA μπορεί να επιβεβαιώσει, να τροποποιήσει ή ακόμα και να αποσύρει μια υπάρχουσα ADI μετά από εξέταση όλων των διαθέσιμων επιστημονικών πληροφοριών.

Στον τομέα των “health claims”, η EFSA έχει αξιολογήσει επίσης ορισμένες απόψεις για τις ευεργετικές επιδράσεις των γλυκαντικών ουσιών στην υγεία των καταναλωτών. “Health claims” είναι οποιαδήποτε δήλωση στην ετικέτα, διαφήμιση ή άλλο προϊόν μάρκετινγκ, ότι η κατανάλωση ενός συγκεκριμένου τροφίμου μπορεί να οδηγήσει σε οφέλη για την υγεία, για παράδειγμα, ότι ένα τρόφιμο μπορεί να συμβάλει στην ενίσχυση της φυσικής άμυνας του οργανισμού ή να βελτιώσει την ικανότητα μάθησης. (www.efsa.europa.eu)

2.2.9.3 Το πλαίσιο της ΕΕ

Όλα τα πρόσθετα τροφίμων πρέπει να υποβάλλονται σε αξιολόγηση της ασφάλειας από την EFSA πριν από την έγκριση κυκλοφορίας τους στην αγορά από τους διαχειριστές κινδύνου της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Ευρωπαϊκή Επιτροπή, τα κράτη μέλη και το Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο). Ο κανονισμός ΕΚ 1331/2008 εισήγαγε μια κοινή διαδικασία έγκρισης για τα πρόσθετα τροφίμων, τα ένζυμα τροφίμων και τα αρωματικά. Ο κανονισμός ΕΚ 1333/2008 για τα πρόσθετα τροφίμων, ο οποίος τέθηκε σε ισχύ τον Ιανουάριο του 2010, καθιέρωσε έναν κοινοτικό κατάλογο εγκεκριμένων προσθέτων τροφίμων. Ο κατάλογος αυτός, συμπεριλαμβανομένου του ονόματος των προσθέτων τροφίμων και τους αριθμούς Ε, τα τρόφιμα στα οποία μπορούν να χρησιμοποιούνται τα πρόσθετα τροφίμων και τους όρους χρήσης τους, δημοσιεύθηκε στον κανονισμό της ΕΕ 1129/2011 και τέθηκε σε ισχύ την 1η Ιουνίου 2013. (www.efsa.europa.eu)

Στο άρθρο 6 του κανονισμού ΕΚ 1333/2008 αναφέρονται οι γενικοί όροι για την καταχώριση και τη χρήση προσθέτων τροφίμων στους κοινοτικούς καταλόγους και στο άρθρο 7 οι ειδικοί όροι για τα γλυκαντικά.

Γενικοί όροι για τα πρόσθετα τροφίμων

1. Ένα πρόσθετο τροφίμων μπορεί να συμπεριληφθεί στον κοινοτικό κατάλογο προσθέτων τροφίμων μόνο εάν πληροί τους ακόλουθους όρους και, ανάλογα με την περίπτωση, άλλες θεμιτές παραμέτρους, συμπεριλαμβανομένων περιβαλλοντικών παραγόντων:

- α)** βάσει των διαθέσιμων επιστημονικών στοιχείων, δεν θέτει θέμα ασφαλείας για την υγεία των καταναλωτών, στο προτεινόμενο επίπεδο χρήσης,
- β)** υφίσταται εύλογη τεχνολογική ανάγκη που δεν μπορεί να επιτευχθεί με άλλο οικονομικά και τεχνολογικά εφικτό μέσο· και
- γ)** η χρήση του δεν παραπλανά τον καταναλωτή.

2. Επίσης το πρόσθετο τροφίμων πρέπει να παρέχει πλεονεκτήματα και οφέλη στον καταναλωτή και, επομένως, να εξυπηρετεί έναν ή περισσότερους από τους ακόλουθους σκοπούς:

- α)** διατήρηση της διατροφικής αξίας του τροφίμου
- β)** παροχή αναγκαίων συστατικών ή στοιχείων για τρόφιμα που παρασκευάζονται για ομάδες καταναλωτών με ειδικές διατροφικές ανάγκες
- γ)** αύξηση της ικανότητας διατήρησης ή της σταθερότητας ενός τροφίμου ή βελτίωση των οργανοληπτικών του ιδιοτήτων, υπό τον όρο ότι η φύση, η σύσταση ή η ουσία του τροφίμου δεν μεταβάλλονται κατά τρόπο που να παραπλανεί τον καταναλωτή
- δ)** συμβολή στην παρασκευή, τη μεταποίηση, την προετοιμασία, την επεξεργασία, τη συσκευασία, τη μεταφορά ή την αποθήκευση τροφίμου, συμπεριλαμβανομένων των προσθέτων τροφίμων, των ενζύμων τροφίμων και των αρωματικών υλών τροφίμων, υπό τον όρο ότι το πρόσθετο τροφίμων δεν χρησιμοποιείται για τη συγκάλυψη των αποτελεσμάτων της χρήσης ελαττωματικών πρώτων υλών ή ανεπιθύμητων πρακτικών ή τεχνικών συμπεριλαμβανομένων των μη υγιεινών πρακτικών ή τεχνικών, κατά τη διάρκεια κάποιας από τις δραστηριότητες αυτές.

3. Κατά παρέκκλιση από §2α, ένα πρόσθετο τροφίμων που μειώνει τη διατροφική αξία ενός τροφίμου μπορεί να συμπεριληφθεί στον κοινοτικό κατάλογο υπό τον όρο ότι:

- α)** το τρόφιμο δεν αποτελεί σημαντικό στοιχείο μιας κανονικής διατροφής ή
- β)** το πρόσθετο τροφίμων είναι αναγκαίο για την παραγωγή τροφίμων για ομάδες καταναλωτών με ειδικές διατροφικές ανάγκες.

Ειδικοί όροι για τα γλυκαντικά

Ένα πρόσθετο τροφίμων μπορεί να συμπεριληφθεί στον κοινοτικό κατάλογο ως γλυκαντικό μόνο εάν, εκτός από το ότι εξυπηρετεί έναν ή περισσότερους από τους σκοπούς του άρθρου 6 παράγραφος 2, εξυπηρετεί επίσης έναν ή περισσότερους από τους ακόλουθους σκοπούς:

- α)** την αντικατάσταση σακχάρων για την παραγωγή τροφίμων με μειωμένη ενεργειακή αξία, τροφίμων που δεν προκαλούν τερηδόνα ή τροφίμων χωρίς προσθήκη σακχάρων· ή
- β)** την αντικατάσταση σακχάρων όταν αυτό επιτρέπει την αύξηση του χρόνου διατήρησης του τροφίμου· ή
- γ)** την παραγωγή τροφίμων που προορίζονται για ειδικές διατροφικές χρήσεις όπως ορίζονται στο άρθρο 1 παράγραφος 2 στοιχείο α) της οδηγίας 89/398/ΕΟΚ. (www.eur-lex.europa.eu)

Ο κανονισμός ΕΚ 1333/2008 ορίζει ότι όλα τα πρόσθετα τροφίμων, των οποίων η χρήση εγκρίθηκε πριν από τις 20 Ιανουαρίου 2009, πρέπει να υποστούν νέα αξιολόγηση κινδύνου από την EFSA. Οι προθεσμίες για τις επαναξιολογήσεις διαφέρουν ανάλογα με την ομάδα. Καθώς οι γλυκαντικές ουσίες αξιολογήθηκαν πιο πρόσφατα, πριν από το 2009, έχουν προγραμματιστεί να είναι η τελευταία ομάδα των προσθέτων τροφίμων που πρέπει να επαναξιολογηθεί το 2020. Το χρονοδιάγραμμα μπορεί να τροποποιηθεί εάν προκύψουν λόγοι ανησυχίας για ένα μεμονωμένο πρόσθετο τροφίμων και / ή εάν προκύψουν νέα επιστημονικά δεδομένα που απαιτούν περαιτέρω διερεύνηση. Όλες οι γλυκαντικές ουσίες που είχαν εγκριθεί σύμφωνα με την προηγούμενη νομοθεσία (οδηγία 94/35/ΕΚ για τα γλυκαντικά) επιτρέπονται μέχρι την πλήρη αναθεώρησή τους.

Η Επιτροπή της EFSA για τα πρόσθετα τροφίμων και τις πηγές θρεπτικών συστατικών που προστίθενται στα τρόφιμα (ANS Panel) πραγματοποιεί αξιολογήσεις κινδύνων και παρέχει επιστημονικές συμβουλές για τα πρόσθετα τροφίμων που χρησιμοποιούνται ως γλυκαντικά. Επιστημονική Ομάδα της EFSA για τα διαιτητικά προϊόντα, τη διατροφή και τις αλλεργίες (NDA Panel) είναι υπεύθυνη για τον έλεγχο της επιστημονικής τεκμηρίωσης των “health claims” που αφορούν τις γλυκαντικές ουσίες και πρότεινε ευεργετικά αποτελέσματα για τους καταναλωτές.

2.2.9.4 Έγκριση των γλυκοζιτών στεβιόλης

Οι γλυκοζίτες στεβιόλης (E960) είναι μίγματα γλυκοζιτών στεβιόλης που χρησιμοποιούνται ως γλυκαντική ουσία και εξάγονται από τα φύλλα του φυτού *Stevia rebaudiana*. Η γλυκαντική αυτή ουσία έχει έως και 300 φορές τη γλυκύτητα της ζάχαρης, αλλά μια σχεδόν αμελητέα επίδραση στα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα: Ως εκ τούτου, θεωρείται από κάποιους ως ένα ελκυστικό υποκατάστατο της ζάχαρης.

Σε μια επιστημονική γνώμη που εξέδωσε τον Απρίλιο του 2010, η ομάδα ANS κατέληξε στο συμπέρασμα ότι οι γλυκοζίτες στεβιόλης δεν είναι γενετοξικοί ή καρκινογόνοι και καθόρισε ως ΑΗΠ τα **4 mg/kg** σωματικού βάρους/ημέρα, σύμφωνα με τη σύσταση της Μικτής FAO/WHO Επιτροπής Εμπειρογνομόνων για τα πρόσθετα τροφίμων (JECFA) το 2008. (PFAN, 2010) Η ΑΗΠ αυτή ισοδυναμεί με καθημερινή δόση έως και 240 mg για μια γυναίκα 60 κιλών ή 280mg για έναν άνδρα 70 κιλών. (www.eufic.org) Η Ομάδα σημείωσε, ωστόσο, ότι η ADI θα μπορούσε να υπερβληθεί τόσο στους ενήλικες όσο και στα παιδιά, εάν αυτή η γλυκαντική ουσία χρησιμοποιείτο στα ανώτατα όρια που προτείνονται από τους αιτούντες.

Μετά από αίτημα της Ευρωπαϊκής Επιτροπής τον Ιανουάριο του 2011, η EFSA αναθεώρησε την προηγούμενη εκτίμηση της έκθεσης των καταναλωτών σε αυτό το γλυκαντικό με βάση αναθεωρημένα επίπεδα χρήσης που προτείνονται από τους αιτούντες. Η Επιτροπή ANS κατέληξε στο συμπέρασμα, ότι αν και οι αναθεωρημένες εκτιμήσεις της έκθεσης ήταν ελαφρώς χαμηλότερες από αυτές τον Απρίλιο του 2010 οι ενήλικες και τα παιδιά που καταναλώνουν μεγάλες ποσότητες τροφίμων που περιέχουν

γλυκοζίτες στεβιόλης, θα μπορούσαν ακόμα υπερβαίνουν την ADI που ορίστηκε από την Επιτροπή, εάν η γλυκαντική ουσία χρησιμοποιείται στα ανώτατα όρια που προτείνονται. Το Νοέμβριο του 2011, η Επιτροπή εξέδωσε τον κανονισμό της ΕΕ 1131/2011 με τον οποίο χορήγησε την άδεια για τη χρήση των γλυκοζιτών στεβιόλης ως γλυκαντική ουσία σε τρόφιμα. (EFSA, 2011). Στο πρόσθετο τροφίμων αποδόθηκε ο αριθμός «E 960» και προστέθηκε στον επίσημο κατάλογο της ΕΕ των εγκεκριμένων προσθέτων τροφίμων. Οι κύριοι «συμμετέχοντες» στη συνολική αναμενόμενη έκθεση σε γλυκοζίτες στεβιόλης είναι μη αλκοολούχα αρωματισμένα ποτά (αναψυκτικά). Τα επιτρεπτά όρια χρήσης των γλυκοζιτών στεβιόλης ως πρόσθετη γλυκαντική ουσία σε διάφορες κατηγορίες τροφίμων παρουσιάζονται στον Πίν. Π1 του Παραρτήματος Ι.

Λαμβάνοντας υπόψη την ανάγκη για νέα προϊόντα με μειωμένη ενεργειακή αξία για να διατεθούν στην αγορά, η χρήση των γλυκοζιτών στεβιόλης ως γλυκαντικό πρέπει να επιτραπεί σε κατάλληλα μέγιστα επίπεδα χρήσης. Λαμβάνοντας υπόψη την πιθανή σημαντική συμβολή των αναψυκτικών στην πρόσληψη γλυκοζιτών στεβιόλης, θα έπρεπε να καθοριστούν μειωμένα επίπεδα χρήσης για τα αρωματισμένα ποτά, σε σύγκριση με τα προηγούμενα προτεινόμενα επίπεδα χρήσης που ορίστηκαν από την EFSA. Η Αρχή εξέφρασε στη γνωμοδότησή της την ADI για γλυκοζίτες στεβιόλης ως ισοδύναμα στεβιόλης. Η διατροφική έκθεση σε γλυκοζίτες στεβιόλης επίσης εκφράστηκε ως ισοδύναμα στεβιόλης. Επομένως, τα ανώτατα επιτρεπόμενα επίπεδα χρήσης θα πρέπει επίσης να εκφράζονται ως ισοδύναμα στεβιόλης. Τα ανώτατα επίπεδα γλυκοζιτών στεβιόλης εκφράζονται ως άθροισμα όλων των γλυκοζιτών στεβιόλης που αναφέρονται ονομαστικά στις προδιαγραφές και μπορούν να μετατραπούν σε ισοδύναμα στεβιόλης χρησιμοποιώντας τους συντελεστές μετατροπής που αναφέρονται στις τεχνικές προδιαγραφές. Τα μέτρα που προβλέπονται στον παρόντα κανονισμό είναι σύμφωνα με τη γνώμη της μόνιμης επιτροπής για την τροφική αλυσίδα και την υγεία των ζώων και ούτε το Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο ούτε το Συμβούλιο αντιτάχθηκαν σε αυτά. (COMMISSION REGULATION (EU) No 1131/2011)

Εκτός από την ΕΕ, στις 20/12/2008 2008 ο οργανισμός FDA (Food and Drug Administration) των ΗΠΑ ενέκρινε τη χρήση του γλυκαντικού από το φυτό στέβια, ενώ και η Αυστραλία και η Νέα Ζηλανδία ενέκριναν πρόσφατα ορισμένα παρασκευάσματα γλυκοζιτών στεβιόλης ως συστατικά σε φαγητά και ροφήματα στις αγορές τους. Στις ΗΠΑ στις 20/12/2008 εγκρίθηκε με καθυστέρηση η χρήση των γλυκοζιτών στεβιόλης ως τρόφιμο και υποκατάστατο της ζάχαρης, ενώ μέχρι τώρα επιτρεπόταν η χρήση τους μόνο ως διαιτητικό συμπλήρωμα διατροφής. Η καθυστέρηση στην έγκριση των γλυκοζιτών στεβιόλης από ΗΠΑ και ΕΕ ως τρόφιμο και ως υποκατάστατο της ζάχαρης δεν οφείλεται σε επιστημονικούς λόγους (δήθεν τοξικότητας της στέβιας), αλλά πρωτίστως σε πολιτικούς λόγους και σε ισχυρές αντιστάσεις και αντιδράσεις οικονομικών συμφερόντων (παραγωγούς ζάχαρης και ασπαρτάμης) στις ΗΠΑ και στην ΕΕ.

3 ΣΚΟΠΟΣ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η ανάπτυξη ενός εκχυλίσματος από φύλλα του φυτού *Stevia rebaudiana bertonii* για προσθήκη σε ποτά ως γλυκαντικό και μέσο οξίνισης. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν η εκχύλιση ξηρών φύλλων στέβιας, η ζύμωση του εκχυλίσματος και στη συνέχεια η συμπύκνωση και ο αποχρωματισμός του. Τέλος, για να πραγματοποιηθεί οργανοληπτικός έλεγχος, το τελικό προϊόν προστέθηκε σε συγκεντρώσεις 0.5 και 1.0 mL εκχ. στέβιας/10 mL σε μύρα τύπου *Pilsner*.

Σκοπός της μελέτης ήταν η παραγωγή ενός εκχυλίσματος γλυκοζιτών στεβιόλης με χαμηλό pH, ελαφρώς υποκίτρινο χρώμα και βελτιωμένη γεύση, δηλαδή χωρίς την χαρακτηριστική πικρή γεύση της στέβιας. Συγκεκριμένα, η ζύμωση είχε στόχο την εξάλειψη της πικρής γεύσης, αλλά και τη μείωση του pH, ώστε το γλυκαντικό να δρα ταυτόχρονα ως μέσο οξίνισης και να αυξάνει τη διάρκεια ζωής του προϊόντος. Η συμπύκνωση στόχευε στην απομάκρυνση όλης της αιθανόλης, η οποία παράγεται από την αλκοολική ζύμωση, ώστε το προϊόν να μπορεί να προστεθεί και σε μη αλκοολούχα ποτά. Τέλος, η μελέτη του αποχρωματισμού έγινε για να βρεθεί η βέλτιστη συγκέντρωση ενεργού άνθρακα, που απαιτείται για την ελάττωση του έντονου καφέ-κίτρινου χρώματος του εκχυλίσματος στέβιας, ώστε αυτό να μπορεί να προστεθεί ακόμα και σε άχρωμα ή ελαφρώς κίτρινα ποτά (μύρα, λεμονάδα κ.ά.). Ο οργανοληπτικός έλεγχος είχε στόχο την αξιολόγηση της γεύσης του εκχυλίσματος, τη σύγκριση των εκχυλισμάτων, που ζυμώθηκαν με διαφορετικούς μικροοργανισμούς, τη σύγκριση μεταξύ αποχρωματισμένων και μη αποχρωματισμένων δειγμάτων, αλλά και τη σύγκριση της καθαρής μύρας με τη μύρα που αναμίχθηκε με 0.5 mL εκχ. στέβιας/10 mL μύρα και με 1 mL εκχ. στέβιας/10 mL μύρα.

4 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

- Γουδί
- Δισκία μέτρησης κυττάρων για το Cellometer Vision (Nexcelom Bioscience)
- Δοκιμαστικοί σωλήνες 1.5 mL, non-sterile-clear, (LLG, Art.No:9.409.024)
- Κυψελίδες Makro PS 1 cm (VWR internat. bvba, B3001 Leuven, Cat No. 634-2500)
- Μαγνήτες
- Μπουκάλια από εργαστηριακό γυαλί 0.1-10 L (SCHOTT)
- Ογκομετρικοί κύλινδροι 0,1-1 L
- Πιπέτες 20 μl, 10-100 μL and 100-1000 μL
- Πιπέτες γυάλινες 10 mL
- Ποτήρια γυάλινα 0.1-1.5 L
- Πτυχωτά φίλτρα, 597 1/2, Diam.320 mm, pore size 4-7 μm (GE Healthcare Life Sciences Whatman™, Cat No. 10311853, Lot No G1447293)
- Πτυχωτά φίλτρα, 597 1/2, Diam.185 mm, pore size 4-7 μm (GE Healthcare Life Sciences Whatman™, Cat No. 10311853, Lot No G1447293)
- Ρίγχι πιπετών 2-200 μL, (original Eppendorf, LOT No. B146364G3702)
- Ρίγχι πιπετών 50-1000 μL (BRANDS GmbH)
- Σύριγγες πλαστικές 5 mL
- Σωλήνες ζύμωσης
- Σωλήνες φυγοκέντρισης 50 mL
- Φίλτρα κυτταρίνης για σύριγγες 25mm, w/0.45 μm, (VWR International)
- Φιάλες γυάλινες 1-2 L
- Φιάλες κωνικές 5 L
- Φιάλες ογκομετρικές 25 mL
- Φίλτρα κυτταρίνης, μέγεθος πόρων:0.45 μm (Sartorius Biolab Products, Lot No: 1211111061102193)
- Χωνιά γυάλινα

4.2 ΣΥΣΚΕΥΕΣ

- Αναλυτικός ζυγός, A200S (Sartorius analytic)
- Αντλία: Diaphragm Vacuum pump, Type MZ 2C, 1,7m³/h (VACUUBRAND GMBH+CO KG)
- Αντλία: Diaphragm Vacuum pump, Type MZ 2C, 1,9m³/h (VACUUBRAND GMBH+CO KG)
- Cellometer Vision Profiler, (Nexcelom Bioscience LLC)
- Ζυγός Mettler PM4000 (Mettler Waagen GmbH)
- Λουτρό υπερήχων: Ultrasonic bath Sonorex digital 10P, frequency 35kHz (Bandelin electronic)
- Μαγνητικός αναδευτήρας (Variomag[®] Telesystem)
- Περιστροφικός Εξαμιστήρας
- pH-meter 766 Calimatic (Knick)
- Precision densimeter DMA 4500M with Alcoholizer Beer ME, color- and pH-module (Anton Paar)
- Συσκευή Φυγοκέντρισης: Centrifuge Avanti[™] J-25, centrifuge cage JLA 16.250 (Beckmann Coulter)
- Swip VKS 75 (Edmund Bühler)
- Υδατόλουτρο με ρυθμιστή θερμοκρασίας
- Φωτόμετρο Lambda 25 UV/Vis system (Perkin Elmer)
- Ψυγεία 0-2°C, θάλαμοι θέρμανσης 28°C

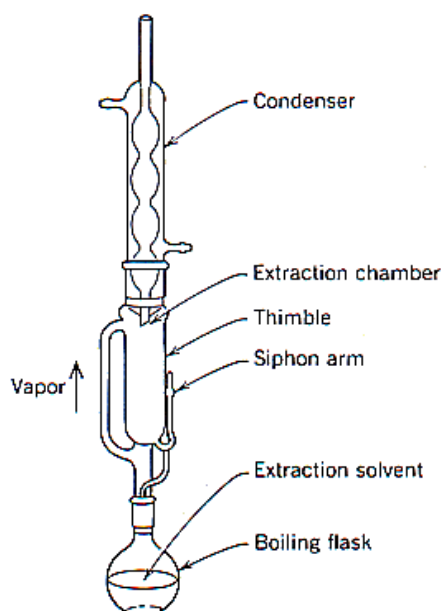
4.3 ΜΕΘΟΔΟΙ

4.3.1 Εκχύλιση

Η εκχύλιση είναι μια από τις παλαιότερες "χημικές" δραστηριότητες του ανθρώπου. Η παρασκευή ενός αφειγήματος (καφέ, τσάι, κλπ), αλλά και άλλες ανάλογες διαδικασίες, όπως η παραλαβή ενός αρώματος, μιας χρωστικής ή μιας δραστικής φαρμακευτικής ουσίας από μια φυτική πρώτη ύλη, είναι κατά βάση αρχέγονες διαδικασίες εκχύλισης, όπου το επιθυμητό συστατικό με τη χρήση συνήθως θερμού νερού μεταφέρεται από την φυτική πρώτη ύλη στην υδατική φάση.

Η εκχύλιση νοείται σαν την διαδικασία όπου μεταφέρεται μια ουσία από μια φάση όπου βρίσκεται είτε υπό μορφή διαλύματος είτε διασποράς σε μια υγρή φάση. Με την τεχνική της εκχύλισης η απομόνωση μιας ουσίας από ένα μίγμα γίνεται με τη στενή επαφή του με ένα διαλυτικό μέσο το οποίο την διαλύει εκλεκτικά. Το αρχικό μίγμα μπορεί να είναι ένα στερεό ή υγρό φυσικό υλικό ή ένα ακατέργαστο μίγμα μιας αντίδρασης. Ανάλογα με την περίπτωση εφαρμόζεται και διαφορετική τεχνική. (www.chem.auth.gr)

4.3.2 Εκχύλιση Soxhlet



Εικόνα 4: Διάταξη εκχυλιστήρα Soxhlet

Η εκχύλιση Soxhlet επινοήθηκε το 1879 από τον Franz von Soxhlet, και η συσκευή φαίνεται στην Εικ. 4. Η διεργασία πραγματοποιείται ως εξής: Το προς εκχύλιση στερεό τοποθετείται σε ειδικό πορώδη χάρτινο υποδοχέα της συσκευής. Οι ατμοί του ζέοντος διαλύτη διέρχονται από τον πλευρικό υάλινο σωλήνα του επιθέματος, συμπυκνώνονται στον ψυκτήρα και επαναρρέουν επί του χάρτινου υποδοχέα του στερεού μίγματος. Όταν ο χώρος του επιθέματος πληρωθεί με διαλύτη μέχρι του ύψους του κεκκαμένου πλευρικού απαγωγού σωλήνα, γίνεται αυτόματος σιφωνισμός και ο διαλύτης (εκχύλισμα) επαναρρέει στη φιάλη και ο

κύκλος επαναλαμβάνεται . Με τον τρόπο αυτό γίνεται εμπλουτισμός του διαλύματος στη φιάλη με τα διαλυτά συστατικά του στερεού μίγματος. Η τεχνική αυτή με παρατεταμένη λειτουργία είναι κατάλληλη για την παραλαβή και ελάχιστα διαλυτών ουσιών. (www.chem.auth.gr)

4.3.3 Μέτρηση κυττάρων με τη συσκευή Cellometer Vision.



Εικόνα 5: Συσκευή Cellometer Vision

Οι αναλώσιμοι θάλαμοι καταμέτρησης κυττάρων περιέχουν ακριβώς 20 μl των δειγμάτων με ένα σταθερό ύψος θαλάμου μικρότερο των 90 μm, το οποίο χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της συγκέντρωσης των δειγμάτων. Τέσσερις ξεχωριστές περιοχές (~1 μl) απεικονίζονται και αναλύονται διαδοχικά από το σύστημα, όπου τα κύτταρα-στόχοι προσδιορίζονται και υπολογίζονται από το λογισμικό. Σε γενικές γραμμές, η απόκτηση της εικόνας και ο χρόνος κυτταρικής καταμέτρησης διαρκεί συνολικά περίπου 30 δευτερόλεπτα, το οποίο εξαρτάται από το χρόνο έκθεσης στο φθορισμό και τη συγκέντρωση των κυττάρων.

Η συσκευή Cellometer Vision (Εικ. 5) χρησιμοποιεί οπτικές ρυθμίσεις εκπομπής και επιφθορισμού για ένα φωτεινό πεδίο και δύο κανάλια φθορισμού για να εκτελέσει κυτταρομετρική ανάλυση με βάση την εικόνα. Η συνολική ανάλυση του Cellometer Vision είναι ένας συνδυασμός της οπτικής μεγέθυνσης και της ανάλυσης της κάμερας, η οποία οδηγεί σε μια ψηφιακή απεικόνιση. Το σύστημα χρησιμοποιεί έναν μηχανισμό για αυτόματη εναλλαγή μεταξύ των δύο καναλιών και τη συνεχή απόκτηση εικόνων φθορισμού σε διαφορετικά μήκη κύματος.

Οι αναλώσιμοι θάλαμοι

Το λογισμικό Cellometer χρησιμοποιεί έναν αλγόριθμο για να αναλύσει τις ληφθείσες εικόνες φωτεινού πεδίου και τις εικόνες φθορισμού. Το λογισμικό σαρώνει κάθε εικόνα και σκιαγραφεί τη σκούρα μεμβράνη των μεμονωμένων κυττάρων εναιωρήματος για την καταμέτρηση. Τα συστήματα Cellometer απαριθμούν κυρίως των εναιωρούμενων κυττάρων (suspension cells) λόγω της υψηλότερης αντίθεσης της μεμβράνης τους σε σύγκριση με τα προσκολλημένα κύτταρα (adherent cells). (Chan et al., 2011) Οι εικόνες εστιάζονται έτσι ώστε το κέντρο του κάθε κυττάρου να φαίνεται φωτεινό, ενώ τα άκρα να είναι σκοτεινά και έντονα στη ζωντανή προβολή της εικόνας. Οι παράμετροι της κυτταρικής καταμέτρησης για το μέγεθος και την ενίσχυση της αντίθεσης βελτιστοποιούνται με εξέταση των εικόνων για να εξασφαλιστεί, ότι υπολογίζονται όλα τα μεμονωμένα κύτταρα, τα συσσωματώματα κυττάρων αποσυμπλέκονται με ακρίβεια, και τα θραύσματα αγνοούνται από το λογισμικό. Η βιωσιμότητα των κυττάρων προσδιορίζεται με χρώση με τη φθορίζουσα χρωστική βιωσιμότητας, το ιωδιούχο προπίδιο (PI). Το PI είναι μία χρωστική σύνδεσης στο DNA που αποκλείεται από τα ζώντα κύτταρα, αλλά εισέρχεται στα νεκρά κύτταρα με υποχωρημένες μεμβράνες. Τα νεκρά κύτταρα μπορούν στη συνέχεια να απεικονιστούν με την προαναφερθείσα μονάδα φθορισμού. Ο συνολικός αριθμός των κυττάρων προσδιορίζεται με καταμέτρηση όλων των κυττάρων στις εικόνες φωτεινού πεδίου και ο αριθμός των νεκρών κυττάρων από την ανάλυση των αντίστοιχων εικόνων φθορισμού. Ο αριθμός των ζώντων κυττάρων υπολογίζεται με απλή αφαίρεση του αριθμού νεκρών κυττάρων από το συνολικό αριθμό κυττάρων, και η βιωσιμότητα υπολογίζεται διαιρώντας τον αριθμό ζώντων κυττάρων προς το συνολικό αριθμό κυττάρων και εκφράζεται ως ποσοστό επί τις εκατό. (www.nexcelom.com)

4.3.4 Ζύμωση

Με τον όρο ζύμωση εννοείται η διαδικασία παραγωγής ενέργειας κατά τη μετατροπή μιας ή περισσότερων οργανικών ενώσεων, όπως είναι οι υδατάνθρακες, σε ένα οξύ ή μια αλκοόλη. Ειδικότερα, ο όρος ζύμωση αναφέρεται στη χρήση μιας ειδικής κατηγορίας μυκήτων (τους "ζυμομύκητες") για τη μετατροπή ενός σακχάρου σε αλκοόλη ή στη χρήση βακτηρίων για την παραγωγή γαλακτικού οξέος σε μερικά τρόφιμα. Κάτω από τις κατάλληλες συνθήκες, η ζύμωση πραγματοποιείται αυθόρμητα σε πολλές τροφές. Πρόκειται για μια διαδικασία που εδώ και χιλιάδες χρόνια οι άνθρωποι εκμεταλλεύτηκαν, ευνοώντας την πραγματοποίησή της. Η παρασκευή, για παράδειγμα, άρτου και αλκοολούχων ποτών, όπως το κρασί και η μύρα, γίνεται με ζύμωση.

4.3.4.1 Ανάπτυξη των μικροοργανισμών

Στις επιθυμητές και ελεγχόμενες από τον άνθρωπο ζυμώσεις επιζητείται ο απρόσκοπτος πολλαπλασιασμός των μικροοργανισμών. Για να είναι εφικτός ο πολλαπλασιασμός των μικροβίων θα πρέπει να συντρέξουν ορισμένες προϋποθέσεις και να εξασφαλισθούν ορισμένες περιβαλλοντικές συνθήκες. Γενικά οι παράγοντες που επηρεάζουν τον μεταβολισμό και άρα τον πολλαπλασιασμό των μικροβίων είναι: τα θρεπτικά συστατικά, το νερό, η θερμοκρασία, το pH, το οξυγόνο, οι παρεμποδιστές, ο χρόνος, ο φωτισμός κ.τ.λ. Ο πολλαπλασιασμός των μικροοργανισμών και υπό τις ιδεωδέστερες συνθήκες ακολουθεί ένα ορισμένο πρότυπο, που περιλαμβάνει 4 φάσεις:

- της καθυστέρησης ή προσαρμογής (lag phase)
- της λογαριθμικής αύξησης (logarithmic growth phase)
- της σταθεροποίησης του πληθυσμού (stationary phase)
- της παρακμής ή θανάτου (decline or death phase)

Συνήθως η φάση παρακμής ή θανάτου έχει την αρχή της στην εξάντληση των θρεπτικών συστατικών του υποστρώματος, στο συνωστισμό, την έκκριση αντιμεταβολιτών κ.τ.λ.

4.3.4.2 Θρεπτικά συστατικά του υποστρώματος

Η σημασία της χημικής σύστασης του υποστρώματος για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των μικροβίων είναι προφανής, εκ του γεγονότος ότι τα μικρόβια που προξενούν ωφέλιμες ζυμώσεις είναι ετερότροφα και έχουν ανάγκη από έτοιμη τροφή. Τα μικρόβια που θα αναπτυχθούν πρέπει να βρουν στο υπόστρωμα όλα τα θρεπτικά συστατικά, τα οποία τους είναι απαραίτητα για την ανάπτυξή τους και δε μπορούν τα ίδια να τα συνθέσουν. οι απαιτήσεις των μικροβίων σε θρεπτικά συστατικά ποικίλλουν από το ένα είδος στο άλλο και καθορίζονται κυρίως από τις μικροβιακές ικανότητες του μικροβιακού κυττάρου. Γενικά τα βακτήρια θετικά κατά Gram, όπως τα γαλακτοβακτήρια, είναι πιο απαιτητικά σε θρεπτικά συστατικά από ότι τα αρνητικά. Ενδιάμεσες απαιτήσεις ως προς τα θρεπτικά συστατικά του υποστρώματος έχουν οι ευγενείς ζύμες, που χρησιμοποιούνται στις διάφορες βιομηχανικές ζυμώσεις.

Τα θρεπτικά συστατικά τα οποία πρέπει να περιέχονται στο υπόστρωμα ανάπτυξης των μικροοργανισμών είναι μία ή περισσότερες πηγές άνθρακα, μία πηγή αζώτου, επιβοηθητικοί τροφικοί παράγοντες της ανάπτυξης και ανόργανα συστατικά. Σχεδόν όλα τα μικρόβια χρησιμοποιούν ως πηγή άνθρακα τους μόνο- και δισακχαρίτες και σπανιότερα ολιγοσακχαρίτες και πολυσακχαρίτες. Σε ορισμένες περιπτώσεις υπάρχουν μικρόβια που χρησιμοποιούν ως πηγή άνθρακα αλκοόλες, αιθέρες, οργανικά οξέα κ.ά. Τα διάφορα είδη μικροβίων είτε αφομοιώνουν, είτε ζυμώνουν τα ζάχαρα κατά περίπτωση και για αυτά ισχύει ότι και για τους άλλους ζωντανούς οργανισμούς- χρησιμοποιούν όλα τη γλυκόζη ως πηγή άνθρακα.

4.3.4.3 Η θερμοκρασία ως παράγοντας ανάπτυξης των μικροβίων

Η θερμοκρασία πιθανώς είναι ο σπουδαιότερος περιβαλλοντικός παράγοντας που επηρεάζει την ανάπτυξη των μικροβίων. Για κάθε είδος μικροοργανισμού υπάρχει ελάχιστη, άριστη και μέγιστη θερμοκρασία ανάπτυξης. Γενικά η μικροβιακή ανάπτυξη μπορεί να γίνει σε όλο το εύρος μεταξύ -8°C και $+90^{\circ}\text{C}$. Οι μικροοργανισμοί διαχωρίζονται σε 4 ομάδες με βάση τη συμπεριφορά τους στη διακύμανση της θερμοκρασίας ανάπτυξής τους:

- ψυχρόφιλοι, με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης 15°C, μέγιστη 20°C και ελάχιστη 0°C.
- ψυχρότροφοι, που μπορούν να αναπτυχθούν γύρω στους 0°C αλλά η άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης κυμαίνεται μεταξύ 20 και 30°C.
- μεσόφιλοι, με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης 25-45°C, μέγιστη 35-47°C και ελάχιστη 5-10°C.
- θερμόφιλοι, με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης 45-65°C, ελάχιστη 35-45°C και μέγιστη 60-90°C.

4.3.4.4 Αλκοολική ζύμωση – Ο ζυμομύκητας *Saccharomyces cerevisiae*

Οι ζύμες είναι μία ομάδα μονοκύτταρων μυκήτων. Πολλαπλασιάζονται ταχύτατα κάτω από αερόβιες συνθήκες, ενώ απουσία O₂ μετατρέπουν τη γλυκόζη σε αιθυλική αλκοόλη. Αποτελούν την πιο σημαντική και ευρύτερα χρησιμοποιούμενη κατηγορία μικροοργανισμών στη βιομηχανία. Καλλιεργούνται με σκοπό την παραγωγή ζύμης αρτοποιίας (μαγιά), τη χρήση τους στις αντιδράσεις αλκοολικής ζύμωσης και την παραγωγή διάφορων προϊόντων όπως οι βιταμίνες C και D. Η αλκοολική ζύμωση είναι η διαδικασία παραγωγής αιθυλικής αλκοόλης και διοξειδίου του άνθρακα από τη διάσπαση σακχάρων, όπως η γλυκόζη, σύμφωνα με την αντίδραση:



Τη σειρά αυτή των βιοχημικών αντιδράσεων την πραγματοποιούν ορισμένα είδη ζυμών όπως ο *Saccharomyces cerevisiae*. Η αλκοολική ζύμωση έχει εφαρμογή τόσο στη βιομηχανική παραγωγή αλκοόλης όσο και στην παραγωγή των αλκοολούχων ποτών.

Τα κύτταρα του ζυμομύκητα *Saccharomyces* είναι σφαιρικά, ωοειδή αλλά και επιμήκη στα πρώτα στάδια της εξελίξεώς τους. Στο γένος *Saccharomyces* τάσσονται 7 είδη, με το είδος *Saccharomyces cerevisiae* να συγκεντρώνει το μεγαλύτερο ενδιαφέρον για τη Βιομηχανία Τροφίμων στη ζύμωση του οινογλεύκου, βυνογλεύκου και της μαλτόζης στο ζυμάρι αρτοποιίας. Χαρακτηρίζεται από έντονο ζυμωτικό σφρίγος, υψηλή αλκοολογένεση και αλκοολοαντοχή, αυξημένη αντοχή στα αντισηπτικά και ευρεία προσαρμογή σε ποικιλία περιβαλλοντικών συνθηκών. Στις ζυμώσεις που διεξάγονται με ζύμες το pH μειώνεται λόγω σχηματισμού CO₂, SO₂, κίτρικού οξέος, κετογλουταρικού

οξέος κ.ά. Η μείωση του pH είναι σημαντική κατά την παραγωγή μύρας. Στα τρόφιμα και ποτά που παράγονται με τη βοήθεια ζυμών επέρχονται πολλές μεταβολές στη θρεπτική αξία της πρώτης ύλης. Η συνολική περιεκτικότητα του τροφίμου σε θερμίδες μειώνεται λόγω της μετατροπής των σακχάρων σε διοξείδιο του άνθρακα και αλκοόλη. Περίπου το 20% των σακχάρων που προέρχονται από σάκχαρα της πρώτης ύλης χάνεται. Οι ζύμες *Saccharomyces* έχουν άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης 20-35°C, ελάχιστη 0-7°C και μέγιστη 30-35°C. Το είδος *Saccharomyces cerevisiae* εμφανίζει το maximum του πολλαπλασιασμού του σε εύρος θερμοκρασιών μεταξύ 25 και 30°C (Μπαλατσούρας, 2006)

4.3.4.5 Ζύμωση με γαλακτικά βακτήρια – Το γένος *Lactobacillus plantarum*

Τα γαλακτικά βακτήρια αποτελούν μια ομάδα από θετικά κατά Gram, μη σποριογόνα, χωρίς αυτόνομη κίνηση, αρνητικά στην καταλάση βακτήρια, τα οποία έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν σάκχαρα (εξόζες και πεντόζες) σε γαλακτικό οξύ και ενέργεια. Η ανάπτυξη των γαλακτοβακτηρίων σε υγρό υπόστρωμα συνεχίζεται μέχρι τιμής pH 3,5-3,8, τουλάχιστον για ορισμένα είδη και στελέχη. (Μπαλατσούρας, 2006)

Το γένος *Lactobacillus* με σχήμα βάκιλλου, έχει το μεγαλύτερο γονιδίωμα μεταξύ όλων των βακτηριδίων γαλακτικού οξέος και η αλληλουχία του έχει καθοριστεί πλήρως. Είναι αποκλειστικά ζυμωτικοί μικροοργανισμοί και έχουν πολύπλοκες τροφικές απαιτήσεις και με τη δράση τους παράγονται πολλά ζυμούμενα προϊόντα.. Οι λακτοβάκιλλοι είναι ανθεκτικοί σε όξινο περιβάλλον και τροποποιούν στην όξινη περιοχή του pH των τροφίμων που περιέχουν ζυμώσιμους υδατάνθρακες, με αποτέλεσμα να μπορούν να εξοντώσουν ή να αναστείλουν άλλα βακτήρια. Έτσι ευνοούν τη συντήρηση και τη μικροβιακή σταθερότητα του τροφίμου, βελτιώνουν τη γεύση και συμβάλλουν στα τελικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τροφίμου (Caplice και Fitzgerald, 1999).

Από πλευράς μεταβολισμού τα γαλακτοβακτήρια διαιρούνται σε 2 ομάδες, τα ομοζυμωτικά, που μετατρέπουν τις εξόζες σχεδόν στοιχειομετρικά (σε ποσοστό μεγαλύτερο του 85%) προς γαλακτικό οξύ και τα ετεροζυμωτικά, που μετατρέπουν τις εξόζες προς ισομοριακές ποσότητες γαλακτικού οξέος, αιθανόλης και CO₂.

Το στέλεχος *L. plantarum* είναι προαιρετικά ετεροζυμωτικός μικροοργανισμός, δηλαδή ζυμώνει τις εξόζες και παράγει γαλακτικό οξύ διαμέσου της γλυκόλυσης, αλλά μπορεί και διαμέσου του κύκλου της φωσφοροπεντόζης να ζυμώσει το γλυκονικό οξύ, παράγοντας CO₂. Ακόμα ζυμώνει τις πεντόζες προς παραγωγή γαλακτικού και οξικού οξέος.

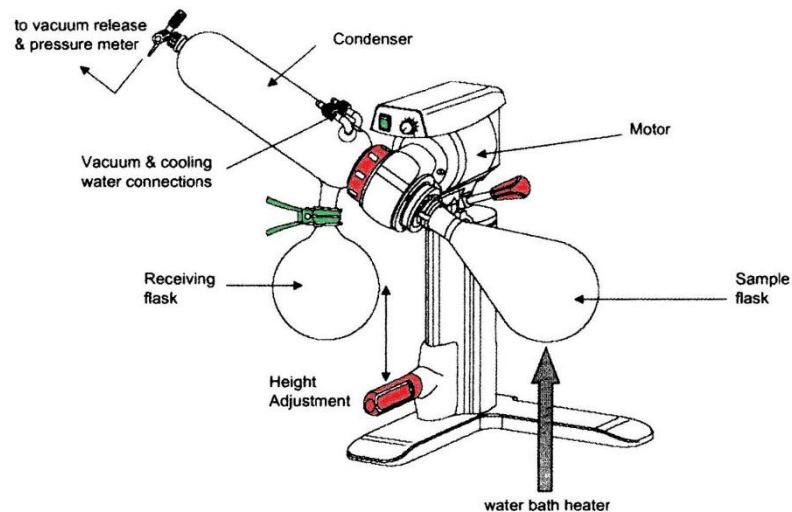
Τα στελέχη *L. plantarum* είναι προαιρετικά αναερόβια με την έννοια ότι μπορεί να αναπαραχθούν τόσο παρουσία όσο και απουσία οξυγόνου. Με την παρουσία του οξυγόνου, μπορούν να μετατρέψουν το οξυγόνο σε υπεροξείδιο του υδρογόνου. Από την άλλη πλευρά, απουσία οξυγόνου, μπορούν να υποστούν ζύμωση και να μετατρέψουν τα σάκχαρα σε γαλακτικό οξύ. Το γαλακτικό οξύ που παράγεται είναι ένας συνδυασμός D-και L-ισομερών. (University of Ottawa IGEM 2009). Εμφανίζει optimum ανάπτυξης στη θερμοκρασία των 30-35°C, ενώ είναι ικανό να αναπτυχθεί στους 15°C αλλά όχι στους 45°C. Είναι είδος με ιδιαίτερη σημασία για τη γαλακτική ζύμωση φυτικών προϊόντων. Ως μεσόφιλο, ανθεκτικό στο αλάτι και σε αυξημένη οξύτητα (άνω του 1%), μετέχει ενεργά σε όλες τις ζυμώσεις και τις εξαντλεί μέχρι εξαντλήσεως των σακχάρων. (Μπαλατσούρας, 2006)

4.3.5 Συμπύκνωση σε περιστροφικό εξατμιστήρα κενού

Ο περιστροφικός εξατμιστήρας είναι μία ειδικά σχεδιασμένη συσκευή για τη συμπύκνωση διαλυμάτων ή την απομάκρυνση πτητικών ουσιών από διαλύματα. Ο εξατμιστήρας αποτελείται από ένα θερμόλουτρο (με νερό) στο οποίο βυθίζεται μία περιστρεφόμενη φιάλη που περιέχει το δείγμα προς εξάτμιση. Το υγρό διανέμεται ως μία λεπτή μεμβράνη στα θερμά τοιχώματα της φιάλης και μπορεί να εξατμίζεται εύκολα. Ο ρυθμός εξάτμισης εξαρτάται από το λουτρό θέρμανσης, τη θερμοκρασία, το μέγεθος της φιάλης, την πίεση της εξάτμισης και την ταχύτητα περιστροφής. Τα μέρη της συσκευής φαίνονται στην Εικ. 6.

Το δείγμα αρχικά θερμαίνεται μέσω του λουτρού θέρμανσης. Μία λεπτή μεμβράνη δημιουργείται στην εσωτερική επιφάνεια της περιστρεφόμενης φιάλης εξάτμισης και όταν η θερμοκρασία φτάσει το σημείο ζέσεως του διαλύτη ή άλλων πτητικών ουσιών ακολουθεί εξάτμιση. Η περιστροφή εξασφαλίζει την ομοιογενή ανάμιξη του δείγματος και αποτρέπει την υπερθέρμανση στο εσωτερικό της φιάλης. Ο μηχανισμός κίνησης παρέχει σταθερή περιστροφή της φιάλης εξάτμισης. Ο ατμός ρέει στη συνέχεια με μεγάλη ταχύτητα μέσα στο τμήμα συμπύκνωσης (συμπυκνωτής) του περιστροφικού εξατμιστήρα. Σε αυτό το σημείο η ενέργεια μεταφέρεται στο ψυκτικό μέσο (συνήθως νερό) που ρέει μέσα στη σπείρα του συμπυκνωτή και ο διαλύτης συμπυκνώνεται. Η θερμοκρασία του ψυκτικού μέσου ρυθμίζεται από τη συσκευή ψύξης. Ο συμπυκνωμένος ατμός ρέει τέλος με τη δύναμη της βαρύτητας στην φιάλη συλλογής του αποστάγματος. Η συσκευή κενού ρυθμίζει τη μείωση της πίεσης στο εσωτερικό του εξατμιστήρα, ώστε να αυξηθεί η αποτελεσματικότητα της διαδικασίας εξάτμισης.

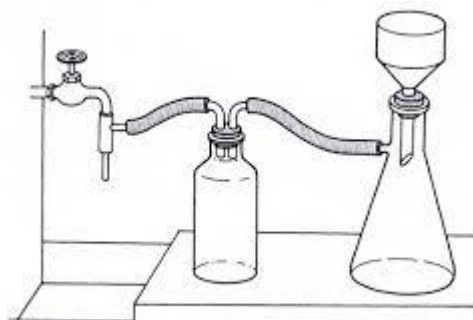
Με περιστροφικό εξατμιστήρα κενού μπορεί να πραγματοποιηθεί ένα στάδιο εξάτμισης γρήγορα και ομαλά. Η ικανότητα εξάτμισης ενός περιστροφικού εξατμιστήρα είναι περίπου 4 φορές μεγαλύτερη από εκείνη μιας συμβατικής, στατικής συσκευής αποστάξεως. Η μετάδοση της θερμότητας στο λουτρό θέρμανσης καθώς και στο εσωτερικό της φιάλης βελτιώνεται σε μεγάλο βαθμό με την περιστροφή, γιατί διευρύνεται σημαντικά η ενεργός επιφάνεια στο εσωτερικό της φιάλης, επιταχύνοντας την εξάτμιση. Το υγρό παραμένει σε οποιοδήποτε σημείο του τοιχώματος φιάλης για ένα σύντομο χρονικό διάστημα και μόνο, υπόκειται σε ελάχιστο στρες κατά τη διάρκεια της εξάτμισης. (www.buchi.com)



Εικόνα 6: Περιστροφικός εξαμιστήρας

4.3.6 Διήθηση

Η διήθηση χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό μιας στερεής από μία υγρή ουσία. Ο ηθμός συγκρατεί το στερεό, ενώ το υγρό διέρχεται λόγω της βαρύτητας. Στη διήθηση με κενό χρησιμοποιείται χωνί Büchner και μία υδραντλία. (Εικ. 7) Καλό είναι μεταξύ της υδραντλίας και του χωνιού να παρεμβάλλεται μία φιάλη ασφαλείας (παγίδα), ώστε να αποφεύγεται αναρρόφηση του νερού. (Κωνσταντίνου, Κουλαδούρος) Στην παρούσα εργασία η διήθηση υπό κενό χρησιμοποιήθηκε για τον αποχρωματισμό του υγρού εκχυλίσματος στέβιας με ενεργό άνθρακα. Ενώ έγινε και προσπάθεια αποχρωματισμού με PVPP.



Εικόνα 7: Συσκευές διήθησης υπό κενό

4.3.6.1 *Ενεργός Άνθρακας*

Ο ενεργός άνθρακας (activated carbon) είναι μία πορώδης μορφή άνθρακα με μεγάλη επιφάνεια ανά μονάδα όγκου. Παρασκευάζεται με απανθράκωση υλικών ζωϊκής ή φυτικής προέλευσης, με κυριότερες σήμερα πρώτες ύλες το λιγνίτη, το ξύλο, τα υπολείμματα της βιομηχανίας χάρτου κλπ. Ένα γραμμάριο ενεργού άνθρακα μπορεί να έχει επιφάνεια άνω



Εικόνα 8: Ενεργός Άνθρακας

των 500 m² μέχρι και 1500m². Αυτή η επιφάνεια προσφέρει ένα τεράστιο δίκτυο από πόρους, όπου πραγματοποιείται η προσρόφηση. Η προσρόφηση είναι η ικανότητα των στερεών να προσελκύνουν στην επιφάνειά τους μόρια από τις ουσίες που έρχονται σε επαφή. Ο ενεργός άνθρακας έχει την ικανότητα να προσροφά στην επιφάνειά του μικρομοριακές οργανικές ουσίες, χρωστικές ουσίες, πάσης φύσεως οσμές, αέρια, χλώριο κ.ά. Έτσι, χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση τοξικών αερίων (φίλτρα αερίων), τον αποχρωματισμό (π.χ. ζάχαρης βρωσίμων ελαίων κλπ.), τα φίλτρα τσιγάρων, τον καθαρισμό νερού κλπ. Η ποσότητα του ενεργού άνθρακα που θα χρησιμοποιηθεί για τον αποχρωματισμό μιας ουσίας θα πρέπει να είναι η ελάχιστη δυνατή ώστε να αποχρωματιστεί, αλλά να μην υπάρξουν σημαντικές απώλειες της ουσίας η οποία εν μέρει επίσης προσροφάται πάνω στην επιφάνεια του άνθρακα. (Λιοδάκης, 2003). Η συνήθης μορφή του ενεργού άνθρακα φαίνεται στην Εικ. 8.

4.3.6.2 *PVPP*

Η πολυβινυλοπυρρολιδόνη είναι ένας πολυσακχαρίτης, αρκετά διαλυτός στο νερό και στους οργανικούς διαλύτες. Η PVPP σχηματίζει αδιάλυτα σύμπλοκα με τις φαινολικές ενώσεις και επομένως βρίσκει εφαρμογή ως μέσο διαύγασης στη βιομηχανία ποτών (μπύρα, κρασί, χυμός φρούτων). (Belitz et al., 2006). Το επιτρεπτό όριο για χρήση της PVPP στη Γερμανία είναι τα 50 g/hL.

4.3.7 Οργανοληπτικός Έλεγχος

4.3.7.1 Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά

Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά αποτελούν ένα βασικό κριτήριο ποιότητας, γιατί καθορίζουν και το βαθμό αρεσκείας και αποδοχής των τροφίμων από τους καταναλωτές. Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά που αξιολογούνται με τις αισθήσεις είναι η εμφάνιση (χρώμα, γεωμετρικά χαρακτηριστικά, μέγεθος, ελαττώματα), η υφή, η γεύση και η οσμή. Το αποτέλεσμα της αίσθησης της γεύσης και της οσμής μαζί ονομάζεται *flavor* και δύσκολα μπορεί να μετρηθεί αντικειμενικά με όργανα, γι αυτό αξιολογείται από ομάδες δοκιμαστών.

Η γεύση χρησιμοποιείται πολύ συχνά στον έλεγχο της ποιότητας των τροφίμων. Οι πληροφορίες που δίνονται με τη γεύση είναι ταχύτατες. Τα αισθητήρια της γεύσης είναι οι γευστικοί κάλυκες που αποτελούνται από 20-30 αισθητικά κύτταρα ο καθένας και τα οποία ανανεώνονται κάθε 5 ημέρες περίπου. Η γεύση είναι τετραδιάστατο αίσθημα που γίνεται αντιληπτό σε 4 αποκλίσεις: γλυκό, ξινό, αλμυρό και πικρό. Για το γλυκό και το πικρό είναι υπεύθυνη η ειδική στερεοδομή των μορίων του σήματος (Stimuli) η οποία βρίσκεται σε αλληλεπίδραση με το συμπληρωματικό σύστημα υποδοχέα. Η γλυκύτητα μπορεί να μετρηθεί με επιτυχία για καθαρά διαλύματα σακχάρων με πυκνόμετρα, διαθλασίμετρα σε °Brix, αλλά με λιγότερη ακρίβεια στα τρόφιμα όπου τα σάκχαρα αποτελούν βάση διαλυτών στερεών. Το πικρό δεν μπορεί να προσδιοριστεί με κάποια γενική μέθοδο, απλά γίνεται σύγκριση του τροφίμου με αραιά διαλύματα ορισμένων πικρών ουσιών.

4.3.7.2 Οργανοληπτική εκτίμηση

Η οργανοληπτική εκτίμηση/ αξιολόγηση των τροφίμων ορίζεται ως «ο επιστημονικός κλάδος που χρησιμοποιείται για να προκαλέσει, να μετρήσει, να αναλύσει και να ερμηνεύσει τις αντιδράσεις στα χαρακτηριστικά εκείνα των τροφίμων και των συστατικών όπως αυτά γίνονται αντιληπτά από τις αισθήσεις της όρασης, όσφρησης, γεύσης, αφής και ακοής». Οι δοκιμές οργανοληπτικής μελέτης διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: αρεσκείας/υποκειμενικές και αναλυτικές/αντικειμενικές. Ο σκοπός

των δοκιμών αρεσκείας είναι να εκτιμήσει την προτίμηση και την αποδοχή των προϊόντων, εκτιμώντας διαφορές/ομοιότητες, ποιότητα και ποσότητα οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των προϊόντων. Στις αναλυτικές δοκιμές ενδιαφέρει κάποια άποψη της οργανοληπτικής ποιότητας του ίδιου του προϊόντος και όχι η προσωπική αντίδραση του δοκιμαστή. Η ομάδα (*panel*) είναι το αναλυτικό εργαλείο. Ο Διεθνής Οργανισμός Τυποποίησης (ISO) ορίζει την αντικειμενική μέθοδο ως «μία μέθοδο στην οποία τα αποτελέσματα των επιδράσεων των ατόμων ελαχιστοποιούνται». Για τις αναλυτικές οργανοληπτικές δοκιμές έχουν αναπτυχθεί διαδικασίες στην προσπάθεια ελέγχου ή ελαχιστοποίησης της επίδρασης που μπορεί να έχουν οι ψυχολογικές και φυσικές συνθήκες στις αντιδράσεις των δοκιμαστών. Εάν ακολουθηθούν αυτές οι διαδικασίες οι αναλυτικές οργανοληπτικές δοκιμές ανταποκρίνονται στις απαιτήσεις των αποκαλούμενων «αντικειμενικών».

4.3.7.3 Οργανοληπτική μελέτη

Για την επιτυχή διεξαγωγή κάθε δοκιμής οργανοληπτικής εκτίμησης παίζουν ρόλο κάποιοι σημαντικοί παράγοντες. Θεμελιώδες θέμα είναι η σαφής κατανόηση και έκθεση του αντικειμένου της μελέτης, που επιτυγχάνεται μέσω της επικοινωνίας του δοκιμαστή και εκείνου που ζητά τη δοκιμή. Ο σχεδιασμός και η ανάλυση των πειραμάτων αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την ακρίβεια της οργανοληπτικής εκτίμησης. Η αμερόληπτη κρίση των δοκιμαστών είναι απαραίτητη αφού οι άνθρωποι χρησιμοποιούνται ως μετρητικά όργανα, όπως και το άριστο περιβάλλον διεξαγωγής των πειραμάτων. Ιδανικά ο χώρος εξέτασης πρέπει να έχει ειδικό εξαερισμό, κλιματισμό και με ελεγχόμενη υγρασία και να είναι ελεύθερος από άλλες οσμές, ομοιόμορφα φωτισμένος και να περιλαμβάνει ατομικούς θαλάμους χωρισμένους από το χώρο παρασκευής των δειγμάτων.

Πολλοί παράγοντες σχετικοί με τα δείγματα, οι οποίοι επηρεάζουν την οργανοληπτική εξέταση, εξαρτώνται από τα εξεταζόμενα δείγματα, όπως:

- Παρασκευή των δειγμάτων: η μέθοδος παρουσίασής τους σχετίζεται με το προϊόν.
- Θερμοκρασία σερβιρίσματος: τα δείγματα σερβιρίζονται στη θερμοκρασία στην οποία καταναλώνονται κανονικά, αλλά για πολλά τρόφιμα συνιστώνται χαμηλότερες ή υψηλότερες θερμοκρασίες.
- Περιέκτες: ο περιέκτης δεν πρέπει να μεταδίδει καμία γεύση ή οσμή στο προϊόν.
- Ποσότητα: η ποσότητα των δειγμάτων πρέπει να είναι σταθερή και αρκετή για γευστική εξέταση και επανεξέταση.
- Κωδικοποίηση και σειρά παρουσίασης: η σειρά παρουσίασης είναι τυχαία και συνιστώνται τυχαίοι αριθμοί για την κωδικοποίηση των δειγμάτων.

Διαφορετικές μέθοδοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αναλυτικές δοκιμές, όπως η τριγωνική δοκιμή, δοκιμή Duo-Trio, δοκιμή σύγκρισης ζεύγους, αναλογική διαβάθμιση, περιγραφική οργανοληπτική ανάλυση και οι μέθοδοι βαθμολόγησης με κλίμακα. Στην τελευταία γίνεται εκτίμηση κωδικοποιημένων δειγμάτων για να προσδιοριστεί η ένταση μερικών ειδικών χαρακτηριστικών που καθένα κατέχει. Ο δοκιμαστής καταγράφει την κρίση του χρησιμοποιώντας την κλίμακα. (Τζια et al., 2009)

4.3.8 Αναλύσεις με το μετρητή πυκνότητας

Η πυκνότητα των ρευστών είναι μία βασική παράμετρος στον έλεγχο των περισσότερων βιομηχανικών διεργασιών, γιατί επιτρέπει όχι μόνο την καλύτερη ρύθμιση της διεργασίας, αλλά και της ποιότητας και ποσότητας του παραγόμενου προϊόντος. Η μέτρηση πυκνότητας χρησιμοποιείται στη βιομηχανία ποτών για τον προσδιορισμό του αλκοόλ σε αλκοολούχα ποτά ή των σακχάρων σε αναψυκτικά και χυμούς φρούτων.

Τελευταία οι μετρητές πυκνότητας τύπου ταλάντωσης U, όπως ο μετρητής πυκνότητας Precision densimeter 4500 DMA (Εικ. 9), χρησιμοποιούνται σε πολλές βιομηχανικές διεργασίες. Η αρχή λειτουργίας αυτών των συσκευών βασίζεται σε μια χαμηλή αρμονική ταλάντωση, στην οποία ένας σωλήνας σχήματος U γεμίζεται με το δείγμα προς ανάλυση και τοποθετείται σε ένα ηλεκτρομαγνητικό πεδίο. Η μέτρηση της συχνότητας και της διάρκειας της δόνησης του γεμισμένου σωλήνα, επιτρέπει τον προσδιορισμό της πυκνότητας του δείγματος. Η μέτρηση βασίζεται στο μοντέλο Μάζας-ελατηρίου. Το κελί της μέτρησης περιέχει έναν ταλαντωτή που αποτελείται από έναν γυάλινο σωλήνα σχήματος U με διπλά τοιχώματα ανάμεσα από τα οποία υπάρχει αέριο με επαρκή θερμική αγωγιμότητα. Η κατεύθυνση της ταλάντωσης είναι κάθετη προς το επίπεδο των δύο κλάδων του σωλήνα. Η συχνότητα του ταλαντωτή επηρεάζεται μόνο από το μέρος του δείγματος που εμπλέκεται πράγματι στην ταλάντωση. Ο όγκος που εμπλέκεται στην ταλάντωση περιορίζεται από τους σταθερούς κόμβους ταλάντωσης στα σημεία τοποθέτησης του ταλαντωτή. Ο σωλήνας ταλαντώνεται με μία βασική συχνότητα, η οποία είναι συνάρτηση της μάζας του συστήματος. Εάν υποθεθεί ότι ο όγκος του κελιού είναι σταθερός, είναι κατανοητό ότι η συχνότητα της ταλάντωσης είναι συνάρτηση της πυκνότητας του δείγματος. Η περίοδος της ταλάντωσης δίνεται από τον τύπο:

$$\tau = 2\pi\sqrt{((\rho\nu + m)/C)}$$

όπου: ρ η πυκνότητα του δείγματος, ν ο όγκος του κελιού, m η μάζα του κελιού και C η σταθερά του ελατηρίου. Τετραγωνίζοντας και αντικαθιστώντας τις σταθερές $G = 4\pi^2\nu/C$ και $H = 4\pi^2m/C$ καταλήγουμε ότι:

$$\rho = (\tau^2 - H)/G$$

(Furtado A. et al.)



Εικόνα 9: Μετρητής πυκνότητας που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα

Η πυκνότητα της μύρας συνήθως μετράται με αραιόμετρα, όμως τα αραιόμετρα είναι καλιμπραρισμένα για να μετράνε τα περιεχόμενα σάκχαρα ενός διαλύματος νερού. Η ζυμωμένη μύρα, ωστόσο, περιέχει και αιθανόλη η οποία έχει μικρότερη πυκνότητα από το νερό και έτσι η τιμή που δείχνει το αραιόμετρο είναι χαμηλότερη από την κανονική. Το φαινόμενο εκχύλισμα (apparent extract) είναι η μέτρηση που λαμβάνεται από το αραιόμετρο και εκφράζεται συνήθως σε βαθμούς Plato και αντιστοιχεί ουσιαστικά στην τελική πυκνότητα της μύρας. (ένας βαθμός Plato είναι περίπου 4 βαθμοί ειδικής πυκνότητας) Το πραγματικό εκχύλισμα που είναι το πραγματικό περιεχόμενο εκχύλισμα της ζυμωμένης μύρας, αντιπροσωπεύοντας την πραγματική περιεχόμενη αλκοόλη. Το πραγματικό εκχύλισμα μπορεί να υπολογιστεί ως εξής (όλες οι μονάδες είναι βαθμοί Plato):

$$\text{Πραγματικό εκχύλισμα} = 0.188 * \text{αρχική πυκνότητα} + 0.8192 * \text{φαιν. εκχύλισμα}$$

4.3.9 Φωτομέτρηση- Υπολογισμός χρώματος














Φωτομετρία ονομάζεται η μέτρηση της έντασης του φωτός Στη UV-VIS φασματομετρία απορροφάται ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία από 190-800 nm από τα μόρια μιας διαλυμένης ουσίας, τα οποία υφίστανται ηλεκτρομαγνητικές μεταπτώσεις. Στην ορατή περιοχή του φάσματος τα φαινόμενα της απορρόφησης και ανάκλασης ή εκπομπής της ακτινοβολίας από διάφορες ενώσεις γίνονται αντιληπτά από το ανθρώπινο μάτι, δηλ. το δείγμα παρουσιάζεται στον παρατηρητή ως έγχρωμο. Συγκεκριμένα ο παρατηρητής βλέπει το συμπληρωματικό χρώμα της ένωσης που απορροφάται, δηλ. το ποσοστό της ακτινοβολίας που ανακλάται και όχι απορροφάται. Στα 430 nm, όπου έγιναν όλες οι φωτομετρήσεις του πειράματος, το φάσμα απορρόφησης είναι το ιώδες, ενώ το συμπληρωματικό χρώμα που γίνεται αντιληπτό από το μάτι είναι το κίτρινο/πράσινο. (Οξενκιουν-Πετροπούλου, 2006)

Το φωτόμετρο που χρησιμοποιήθηκε ήταν διπλής δέσμης, με κάτοπτρα με υμένιο χαλαζία, μονοχρωμάτορα Seya Namioka, πυκνότητα χαραγών 1053χαραγές/mm, λάμπες δευτερίου (για την υπεριώδη περιοχή) και βολφραμίου (για την ορατή περιοχή) και εύρος μέτρησης 190-1100 nm, με ακρίβεια φωτομέτρησης ± 0.001 A. (www.perkinelmer.com) Το φωτόμετρο χρειάζεται απαραίτητα να είναι συνδεδεμένο σε Η/Υ και η απορρόφηση του φωτός που μετριέται σε κάθε δείγμα, καταγράφεται κατευθείαν στο κατάλληλα ρυθμισμένο λογισμικό. Στην Εικ. 10 παρουσιάζονται τα φωτόμετρα που χρησιμοποιήθηκαν στο συγκεκριμένο πείραμα.



Εικόνα 10: Φωτόμετρα που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα

Η μέτρηση χρώματος της μύρας και του ζυθογλεύκου πραγματοποιείται σύμφωνα με δύο κλίμακες: είτε με τη μέθοδο SRM (Standard Reference Method), κυρίως στη Βόρεια Αμερική, ή με τη μέθοδο EBC (European Brewing Convention) στον υπόλοιπο κόσμο. Και οι δύο μέθοδοι βασίζονται στη φασματοφωτομετρία, χρησιμοποιώντας την απορρόφηση (ABS) (σε σχέση με εκείνη ενός τυφλού δείγματος που περιέχει αποσταγμένο νερό) από ένα δείγμα μύρας ή ζυθογλεύκου σε μήκος κύματος 430 nm. Οι δύο κλίμακες διαφέρουν κυρίως στο μήκος της οπτικής διαδρομής: το χρώμα SRM βασίζεται (λαμβάνοντας υπόψη τον πολλαπλασιαστικό παράγοντα) σε οπτική διαδρομή 5 ιντσών, ενώ το χρώμα EBC σε διαδρομή 25 εκατοστών. (White F H., 1995) Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε στο συγκεκριμένο πείραμα ήταν η EBC. Η τιμή απορρόφησης πολλαπλασιαζόταν κάθε φορά επί 25 για να υπολογιστεί το χρώμα EBC του δείγματος. Στην Εικ. 11 παρουσιάζεται μία κλίμακα χρώματος της μύρας σε μονάδες EBC και SRM. Αναγράφονται επίσης μερικές χαρακτηριστικές μύρες δίπλα στο αντίστοιχο χρώμα.

SRM/Lovibond	Example	Beer color	EBC
2	Pale lager		4
3	German Pilsener		6
4	Pilsner Urquell		8
6			12
8	Weissbier		16
10	Bass pale ale		20
13			26
17	Dark lager		33
20			39
24			47
29	Porter		57
35	Stout		69
40			79
70	Imperial stout		138

Εικ. 11: Κλίμακα χρώματος μύρας σε μονάδες EBC και SRM.

4.4 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ

Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στα εργαστήρια του TU Berlin, Lab of Brewing Science και ήταν σύμφωνες με τον κανονισμό της MEBAK (Mittleeuropäische Brautechnische Analysenkommission).

- Precision densimeter : cp. MEBAK 2.9.2.3
- Alcohol : cp. MEBAK 2.9.2.3
- Color : cp. MEBAK 2.12.2
- Apparent extract : cp. MEBAK 2.9.3
- pH-value : cp. MEBAK 2.13

4.5 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- Αιθανόλη, $\geq 99.9\%$, 0.79kg/L (VWR International S.A.S, 201 Rue Carnot-F-94126-Fontenay-sous-Bois France, fr.vwr.com. , CAS No: 64-17-5)
- Απιονισμένο νερό
- Αποσταγμένο νερό
- Γλυκόζη: Glucose syrup DE40, Sugar 83°Bx (Agrana Zucker GmbH, Austria, www.agrana.at)
- Ενεργός άνθρακας, M=12,01 g/mol (VWR, de.vwr.com, CAS: 7440-44-0)
- Ιωδιούχο προπίδιο (PI), $\geq 94,0\%$ M=668.39 g/mol (Sigma Aldrich[®], www.sigmaaldrich.com, CAS No: 25535-16-4)
- Μπύρα: Berliner Kindl Jubiläums Pilsener Premium, Alc. 5.1% vol., (03L02981G and 14L01581I)
- Πολυβινυλοπυρολιδόνη: Divergan F crosslinked Polyvinylpyrrolidone, (PVPP), (BASF SE, 67056 Ludwigshafen Germany, www.basf.com, Art. No: 50545184, Lot. No: 28915724U0)
- Στέβια, αποξηραμένα φύλλα, Stevia-Blätter aus naturgemäßem Anbau, Zutaten: Getrocknete Blätter der *Stevia rebaudiana bertonii* (Blauer Planet GmbH)
- Στέβια, σκόνη ενζυμικά επεξεργασμένη, υγρό εκχύλισμα

- Χλωριούχο νάτριο (NaCl), $\geq 99.5\%$, $M=58.44$ g/mol (Merck kGaA, Darmstadt Germany, www.merck.de, 1.06404.0500)

4.6 ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ

- Ζυμομύκητες: *Saccharomyces cerevisiae*: Hebru, RH, L48, «top-fermenting» 68
- Λακτοβάκιλλοι: *Lactobacillus plantarum*: B1, 210

5 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

5.1 ΑΡΧΙΚΟ ΠΕΙΡΑΜΑ

Αρχικά πραγματοποιήθηκε ένα διερευνητικό πείραμα για την εκχύλιση γλυκοζιτών στεβιόλης, την επίδραση του χρόνου βρασμού στο εκχύλισμα και τη ζύμωση του εκχυλίσματος. Πιο αναλυτικά τα στάδια του αρχικού πειράματος περιγράφονται παρακάτω.

5.1.1 Εκχύλιση γλυκοζιτών στεβιόλης και βρασμός του εκχυλίσματος

Για τη μελέτη της εκχύλισης γλυκοζιτών στεβιόλης παρήχθησαν 4 διαφορετικά εκχυλίσματα:

- Υδατικό διάλυμα σκόνης στέβιας ενζυμικά επεξεργασμένης 1 g/100 mL.
- Υγρό εκχύλισμα στέβιας αραιωμένο με νερό, 10 g/100 mL.
- Θρυμματισμένα φύλλα στέβιας σε νερό, 2 g/100 mL.
- Κρύο εκχύλισμα: 2 g θρυμματισμένα φύλλα στέβιας παρέμειναν σε 100 mL νερό για 10 min και μετά διηθήθηκαν με πτυχωτά φίλτρα.

Η ενζυμικά επεξεργασμένη σκόνη, το υγρό εκχύλισμα και τα φύλλα στέβιας ήταν σκευάσματα του εμπορίου (97% γλυκοζίτες στεβιόλης). Τα διάφορα εκχυλίσματα έβρασαν για 10, 30 και 60 min και στη συνέχεια δοκιμάστηκαν για να αξιολογηθούν ως προς τη γλυκιά και την πικρή γεύση τους. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίν.13 στην Παρ.6.1. Μόνο το υγρό εκχύλισμα και το κρύο εκχύλισμα εξετάστηκαν περαιτέρω. Αυτή τη φορά το υγρό εκχύλισμα δεν αραιώθηκε με νερό και το κρύο εκχύλισμα παράχθηκε από 2 g θρυμματισμένα φύλλα σε 50 mL νερό, στα οποία μετά τη διήθηση προστέθηκαν άλλα 50 mL νερό. Τα δύο εκχυλίσματα έβρασαν για 10, 30 και 60 min και δοκιμάστηκαν, όπως προηγουμένως. Τα αποτελέσματα της αξιολόγησης παρουσιάζονται στον Πίν.14 της Παρ.6.1

5.1.2 Εκχύλιση φύλλων στέβιας με νερό και αιθανόλη σε συσκευή Soxhlet



Εικόνα 12: Φύλλα στέβιας στον εκχυλιστήρα Soxhlet

Εκτός από την απλή εκχύλιση μελετήθηκε και η εκχύλιση των φύλλων στέβιας με νερό και με αιθανόλη σε συσκευή Soxhlet, η οποία φαίνεται στην Εικ. 12. Συγκεκριμένα 4 g φύλλα στέβιας λειοτριβήθηκαν και στη συνέχεια εκχυλίστηκαν στη συσκευή Soxhlet με α) 200 mL αιθανόλης και β) 200 mL νερού. Η διάρκεια της εκχύλισης ήταν 30 min. Το εκχύλισμα αιθανόλης αραιώθηκε σε 200 mL νερό και στη συνέχεια η αιθανόλη απομακρύνθηκε με εξάτμιση. Στην Εικ.13 παρουσιάζονται τα εκχυλίσματα Soxhlet νερού και αιθανόλης.



Εικόνα 13: Εκχυλίσματα Soxhlet με νερό και EtOH (αριστ.), EtOH μετά από προσθήκη 200 mL νερού (δεξιά).

5.1.3 Ζύμωση εκχυλισμάτων στέβιας με γλυκόζη/ζυθογλεύκος

Το κρύο εκχύλισμα (2 g φύλλα/100 mL) και το μη αραιωμένο υγρό εκχύλισμα ζυμώθηκαν με το ζυμομύκητα *RH*, μία φορά με γλυκόζη και μία φορά με ζυθογλεύκος. Η ζύμωση διεξάχθηκε στους 16°C για 7 ημέρες.

Με γλυκόζη ζυμώθηκαν συνολικά 4 δείγματα εκχυλίσματος στέβιας. Κάθε δείγμα περιείχε 200 mL δ/μα γλυκόζης (40 g γλυκόζης), 50 mL ζυμομύκητα *RH* και 250 mL:

- κρύο εκχύλισμα
- κρύο εκχύλισμα, βρασμένο για 30 min
- υγρό εκχύλισμα
- υγρό εκχύλισμα, βρασμένο για 30 min

Ομοίως, 6 δείγματα ζυμώθηκαν με ζυθογλεύκος. Κάθε δείγμα περιείχε 200 mL ζυθογλεύκος, 50 mL ζυμομύκητα *RH* και 250 mL:

- κρύο εκχύλισμα
- κρύο εκχύλισμα, βρασμένο για 30 min
- κρύο εκχύλισμα, βρασμένο για 60 min
- υγρό εκχύλισμα
- υγρό εκχύλισμα, βρασμένο για 30 min
- υγρό εκχύλισμα, βρασμένο για 60 min

Μετά από 7 ημέρες ζύμωσης όλα τα δείγματα αναλύθηκαν στο μετρητή πυκνότητας για να διαπιστωθεί η πορεία της ζύμωσης σε σχέση με την τιμή του pH. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίν.15 της Παρ. 6.1

Μια ποσότητα από τα ζυμωμένα δείγματα οδηγήθηκε στον περιστροφικό εξατμιστήρα, για να μελετηθεί και η συμπύκνωση του εκχυλίσματος. Αρχικά η αιθανόλη και άλλες πτητικές ουσίες εξατμίστηκαν στα 100 mbar και στους 40-45°C. Με μία δεύτερη εξάτμιση απομακρύνθηκε επίσης και νερό και το εκχύλισμα συμπυκνώθηκε.

5.1.4 Νέα ζύμωση με γλυκόζη και διάφορους ζυμομύκητες

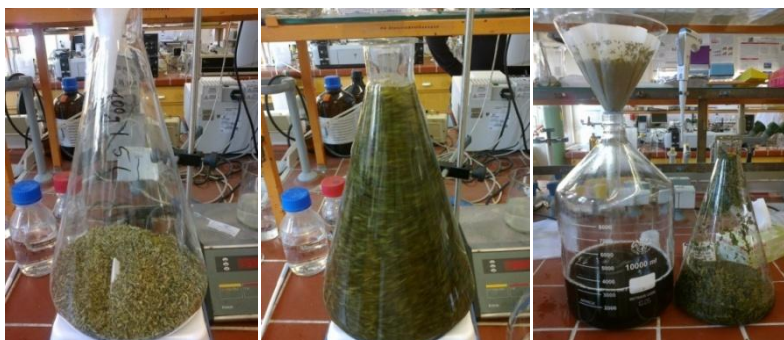
Το εκχύλισμα ζυμώθηκε με 3 διαφορετικούς ζυμομύκητες: *Hebru*, «*top-fermenting*»⁶⁸ και *RH*. Δεκατρία αποστειρωμένα μπουκάλια πληρώθηκαν με το υπόλοιπο από το υγρό εκχύλισμα, το κρύο εκχύλισμα (2 g/100 mL) και συμπτκνωμένο κρύο εκχύλισμα (4 g/100 mL). Για τη ζύμωση προστέθηκε γλυκόζη σε συγκέντρωση 8% και 4% στο συνολικό όγκο του δείγματος. Η σύνθεση κάθε δείγματος ήταν: 50 mL διάλυμα γλυκόζης (20 g γλυκόζης για 4% και 40 g γλυκόζης για 8%), 50 mL ζύμης, 400 mL εκχύλισμα (υγρό/ κρύο/ συμπτκνωμένο κρύο). Ο τελικός όγκος κάθε δείγματος ήταν 500 mL. Τα δείγματα ζυμώθηκαν για 7 ημέρες στους 16°C και στη συνέχεια διηθήθηκαν και δοκιμάστηκαν.

5.2 ΚΥΡΙΩΣ ΠΕΙΡΑΜΑ

Λαμβάνοντας υπόψη τα συμπεράσματα που ελήφθησαν από το αρχικό πείραμα, πραγματοποιήθηκε το κυρίως πείραμα για την παραγωγή εκχυλίσματος στέβιας απαλλαγμένο από τη χαρακτηριστική πικρή γεύση, ελαφρώς όξινο, συμπυκνωμένο και αποχρωματισμένο. Έτσι, μετά την απλή κρύα εκχύλιση των φύλλων στέβιας σε νερό, μελετήθηκε η ζύμωση του εκχυλίσματος με τρεις ζύμες *S. cerevisiae* (*Hebru, RH, L48*) και 2 λακτοβάκιλλους *L. plantarum* (*B1, 210*) και με την προσθήκη γλυκόζης. Ακολούθησε συμπύκνωση σε περιστροφικό εξατμιστήρα για την απομάκρυνση νερού και της παραγόμενης αιθανόλης από την αλκοολική ζύμωση. Τέλος μελετήθηκε ο αποχρωματισμός του εκχυλίσματος με ενεργό άνθρακα σε συγκεντρώσεις 500-5000 g/hL

5.2.1 Κρύα Εκχύλιση

Φύλλα στέβιας (200 g) εκχυλίστηκαν σε 10 L αποσταγμένο νερό. Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε σε δύο κωνικές φιάλες των 5 L, κάθε μία από τις οποίες περιείχε 100 g φύλλα στέβιας και 5 L νερό. Τα φύλλα ζυγίστηκαν κατευθείαν στη φιάλη και στη συνέχεια προστέθηκε το νερό. Η εκχύλιση διήρκεσε 10 min, ενώ το μίγμα αναδευόταν καθ' όλη τη διάρκεια σε μαγνητικό αναδευτήρα. Ακολούθησε διήθηση του εκχυλίσματος και των δύο φιαλών με πτυχωτά φίλτρα και μεταφορά του σε αποστειρωμένο γυάλινο μπουκάλι των 10 L. Η διήθηση κάθε εκχυλίσματος διήρκεσε περίπου 70 min. Στο τέλος προστέθηκαν 900mL αποσταγμένου νερού, ώστε ο τελικός όγκος του εκχυλίσματος να είναι 10 L. Η διαδικασία της κρύας εκχύλισης των φύλλων στέβιας σε νερό φαίνεται στην Εικ. 14.



Εικόνα 14: Φύλλα στέβιας (αριστερά), κρύα εκχύλιση–μαγνητική ανάδευση (μέση), διήθηση με πτυχωτά φίλτρα (δεξιά)

5.2.2 Ζύμωση

Το εκχύλισμα στέβιας ζυμώθηκε με 5 διαφορετικούς μικροοργανισμούς: 3 ζυμομύκητες (*Hebru, RH, L48*) και 2 λακτοβάκιλλους (*B1, 210*). Δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις γλυκόζης χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε είδος ζύμωσης: 4% και 8% στους ζυμομύκητες και 0% και 2% στους λακτοβάκιλλους. Η συγκέντρωση κάθε μικροοργανισμού στο εκχύλισμα ήταν 1×10^6 κύτταρα/mL. Η ζύμωση πραγματοποιήθηκε σε δέκα αποστειρωμένα γυάλινα μπουκάλια των 2 L.

Πριν τον εμβολιασμό του εκχυλίσματος στέβιας με τους μικροοργανισμούς, προηγήθηκε μία μέτρηση των κυττάρων στο διάλυμα κάθε μικροοργανισμού, ώστε να υπολογιστεί ο ακριβής όγκος του διαλύματος του μικροοργανισμού που έπρεπε να προστεθεί στο εκχύλισμα. Δείγμα περίπου 5 mL από κάθε μικροοργανισμό λήφθηκε για τη μέτρηση. Τα διαλύματα των μικροοργανισμών είχαν ψυχθεί για 3 ώρες στους 0°C, για να είναι πιο εύκολος ο διαχωρισμός με απόχυση των κυττάρων (που παρέμειναν στον πάτο του μπουκαλιού) από το θρεπτικό υλικό (wort). Κάθε δείγμα μικροοργανισμού διαλύθηκε σε αναλογία 1:10 με διάλυμα NaCl 0.9% και αυτό στη συνέχεια σε αναλογία 1:2 με διάλυμα PI 1 mg/mL. Η διαδικασία αυτή ήταν απαραίτητη για τη μέτρηση των κυττάρων, όπως υποδεικνύει η αρχή της μεθόδου κυτταρομέτρησης. Πιο συγκεκριμένα, 100 μ L του μικροοργανισμού διαλύθηκαν σε 900 μ L NaCl και στη συνέχεια 20 μ L αυτού του διαλύματος διαλύθηκαν σε 20 μ L PI. Τέλος, 20 μ L από το τελικό διάλυμα απλώθηκαν στο ειδικό δισκίο, το οποίο εισήχθηκε στη συσκευή Cellometer Vision. Η διαδικασία έλαβε χώρα δύο φορές για κάθε μικροοργανισμό για τη λήψη διπλών μετρήσεων (A και B) και υπολογίστηκε ο μέσος όρος τους. Τα αποτελέσματα της μέτρησης των κυττάρων και ο απαιτούμενος όγκος εμβολιασμού εμφανίζονται στον Πίνακα 8. Ο απαιτούμενος όγκος εμβολιασμού ώστε η συγκέντρωση κάθε μικροοργανισμού στο εκχύλισμα στέβιας να είναι 1×10^6 κύτταρα/mL, υπολογίστηκε ως εξής:

$$\text{Ζωντανά κύτταρα/mL} = \text{Κύτταρα/mL} \times \text{Βιωσιμότητα} / 100.$$

$$\text{Όγκος εμβολιασμού [mL]} = 1000 \text{ mL} \times 10^6 \text{ [κύτταρα/mL]} / \text{ζωντανά κύτταρα/mL}.$$

Πίνακας 8: Κυτταρομέτρηση όλων των μικροοργανισμών του κυρίως πειράματος για τον υπολογισμό του όγκου εμβολιασμού.

	A	B	μέσος όρος	A	B	μέσος όρος		
Μικροοργανισμός	Κύτταρα/ mL*10 ⁷	Κύτταρα/ mL*10 ⁷	Κύτταρα/ mL*10 ⁷	Βιωσιμότητα %	Βιωσιμότητα %	Βιωσιμότητα %	Ζωντανά Κýt./mL*10 ⁷	Όγκος εμβολ. [mL]
Hebru	5.35	5.79	5.57	93.40	88.20	90.80	5.06	19.77
RH	7.47	6.14	6.81	96.60	96.80	96.70	6.58	15.20
L48	2.42	2.61	2.52	83.00	78.50	80.75	2.03	49.24
B1	30.20	38.00	34.10	79.50	76.60	78.05	26.62	3.76
210	67.10	68.20	67.65	76.00	76.40	76.20	51.55	1.94

Το σιρόπι γλυκόζης ζυγίστηκε κατευθείαν στα μπουκάλια που θα γινόταν η ζύμωση. Σύμφωνα με τα στοιχεία του κατασκευαστή το σιρόπι γλυκόζης DE 40 περιείχε 82-84°Brix διαλυτές στερεές ουσίες. Για το πείραμα λήφθηκε η μέση τιμή των 83°Brix. Η απαιτούμενη ποσότητα σιροπιού για κάθε συγκέντρωση γλυκόζης (2%, 4% και 8%) φαίνεται στον Πίνακα 9.

Πίνακας 9: Μάζα γλυκόζης DE 40 για συγκεντρώσεις 2, 4, 8% σε 1 L stevia.

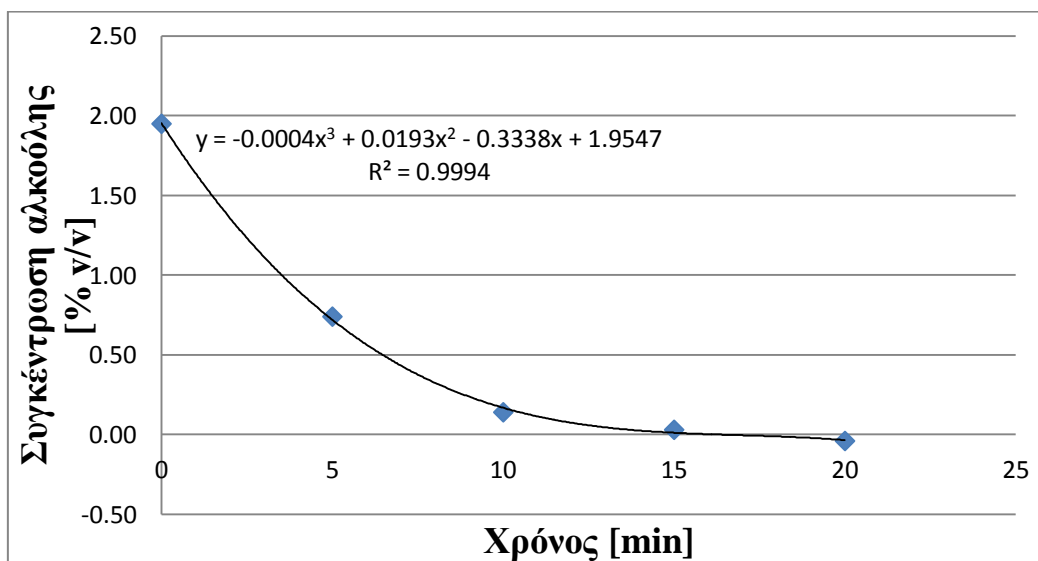
Γλυκόζη [% w/v]	Σιρόπι γλυκόζης [g]
2	23.4
4	46.8
8	93.6

Σε κάθε μπουκάλι πρώτα προστέθηκε η γλυκόζη, μετά ο μικροοργανισμός και στο τέλος το εκχύλισμα στέβιας μέχρι τη χαραγή του 1 L. Τα μπουκάλια με τους λακτοβάκιλλους κλείστηκαν με πλαστικά καπάκια, ενώ στα μπουκάλια με τους ζυμομύκητες τοποθετήθηκαν φελλοί με σωλήνες ζύμωσης, οι οποίοι πληρώθηκαν μέχρι τη μέση με ίση ποσότητα αιθανόλης και νερού. Αμέσως μετά λήφθηκαν 100 mL δείγμα από κάθε μπουκάλι, καθώς και από το καθαρό εκχύλισμα στέβιας. Μετά από διήθηση όλα τα δείγματα οδηγήθηκαν για φωτομέτρηση, μέτρηση του pH και ανάλυση στο μετρητή πυκνότητας. Πριν τη φωτομέτρηση τα δείγματα αραιώθηκαν με νερό σε αναλογία 1:10 (2.5 mL δείγμα σε ογκομετρική των 25 mL). Οι ζυμομύκητες ζυμώθηκαν στους 12°C και οι λακτοβάκιλλοι στους 28°C. Μετά από 6 ημέρες ζύμωσης έγινε ξανά δειγματοληψία και ανάλυση. Η ζύμωση συνεχίστηκε για 9 ημέρες ακόμη, στους 16°C και 28°C για τις ζύμες και τους λακτοβάκιλλους αντίστοιχα. Τη 15^η ημέρα αφού είχε επιτευχθεί η επιθυμητή μείωση του pH, η ζύμωση σταμάτησε και όλα τα μπουκάλια τοποθετήθηκαν στο ψυγείο, στους 2-4°C.

5.2.3 Συμπύκνωση

Στη συνέχεια, όλα τα δείγματα εκχυλίσματος στέβιας, που ζυμώθηκαν με τους διάφορους μικροοργανισμούς συμπυκνώθηκαν σε περιστροφικό εξατμιστήρα (Εικ.15) στους 50°C και υποπίεση 100 mbar. Η θερμοκρασία του ψυχρού ρεύματος ήταν -10°C. Μετά την εξάτμιση ακολούθησε διήθηση με πτυχωτά φίλτρα.

Για να προσδιοριστεί ο επαρκής χρόνος εξάτμισης για την απομάκρυνση όλης της αλκοόλης που είχε παραχθεί από την αλκοολική ζύμωση μελετήθηκε πρώτα η εξάτμιση ενός πρότυπου διαλύματος με 2% EtOH και 4% γλυκόζη στους 50°C, 100 mbar, με πέτρες βρασμού. Το πρότυπο διάλυμα (δείγμα 100 mL κάθε φορά) αποστάχθηκε για 5, 10, 15 και 20 min και στη συνέχεια αναλύθηκε στο μετρητή πυκνότητας. Το αλκοόλ που παρέμεινε στο διάλυμα μετά από κάθε εξάτμιση παρουσιάζεται στο Γράφημα 1.



Γράφημα 1: Συμπύκνωση πρότυπου διαλύματος

Τα δέκα δείγματα με το ζυμωμένο εκχύλισμα στέβιας αποστάχθηκαν πρώτα για 15 min. Η θερμοκρασία του θερμόλουτρου, στο οποίο ήταν βυθισμένη η περιστρεφόμενη φιάλη με το δείγμα προς εξάτμιση, ήταν σταθερή στους 50°C, ενώ το κενό μειώθηκε βαθμιαία από 150 σε 100 mbar. Το απόσταγμα απορρίφθηκε, ενώ το συμπύκνωμα οδηγήθηκε προς ανάλυση, φωτομέτρηση και μέτρηση τιμής pH. Αφού δεν είχε απομακρυνθεί όλο το αλκοόλ η συμπύκνωση επαναλήφθηκε για άλλα 30 min στους 50°C, 100 mbar, με χρήση πετρών βρασμού και αναλύθηκαν ξανά. Μετά τη συμπύκνωση το εκχύλισμα διηθήθηκε με πτυχωτά φίλτρα, ώστε το τελικό εκχύλισμα να είναι καθαρό.



Εικόνα 15: Περιστροφικός εξατμιστήρας

5.2.4 Αποχρωματισμός

Τα συμπυκνωμένα δείγματα διηθήθηκαν με 6 διαφορετικές συγκεντρώσεις ενεργού άνθρακα (500, 1000, 2000, 3000, 4000 and 5000 g/hL) σε συσκευή διήθησης υπό κενό, για να αποχρωματιστούν. Πριν τη διήθηση, η απαιτούμενη ποσότητα ενεργού άνθρακα ζυγίστηκε σε αναλυτικό ζυγό, μετά προστέθηκε 50 mL συμπυκνωμένου εκχυλίσματος στέβιας και το διάλυμα αναδεύτηκε για 10 min σε μαγνητικό αναδευτήρα. Ένα «τυφλό» δείγμα εκχυλίσματος στέβιας χωρίς ενεργό άνθρακα διηθήθηκε επίσης στη συσκευή. Στην Εικ. 16 φαίνονται οι δύο συσκευές διήθησης που χρησιμοποιήθηκαν και στην Εικ. 17 φαίνεται η μεμβράνη κυτταρίνης μετά τη διήθηση ενός τυφλού δείγματος και ενός δείγματος με ενεργό άνθρακα.



Εικόνα 16: Συσκευές διήθησης υπό κενό που χρησιμοποιήθηκαν για τον αποχρωματισμό του εκχυλίσματος με ενεργό άνθρακα.



Εικόνα 17: Μembrάνη κυτταρίνης μετά τη διήθηση χωρίς ενεργό άνθρακα (αριστερά) και με ενεργό άνθρακα (δεξιά).

Τέλος, μετρήθηκε το χρώμα και η τιμή pH όλων των φιλτραρισμένων δειγμάτων και το ποσοστό αποχρωματισμού υπολογίστηκε ως εξής, χρησιμοποιώντας ως αρχική τιμή το χρώμα του δείγματος μετά τη συμπύκνωση:

$$\text{Ποσοστό αποχρωματισμού} = \left[\frac{\text{αρχικό χρώμα} - \text{τελικό χρώμα}}{\text{αρχικό χρώμα}} \right] \times 100$$

Για τη μέτρηση χρώματος στο φωτόμετρο (πριν και μετά τη διήθηση) τα δείγματα δεν αραιώθηκαν με νερό όπως στα προηγούμενα στάδια του πειράματος. Για τη διαύγαση των δειγμάτων όμως χρησιμοποιήθηκαν φίλτρα σύριγγας με μεμβράνη οξικής κυτταρίνης με μέγεθος πόρων 0.45 μm .

5.3 ΕΠΑΝΑΛΗΠΤΙΚΟ ΠΕΙΡΑΜΑ

Λαμβάνοντας υπόψη τα συμπεράσματα που ελήφθησαν από το κυρίως πείραμα, πραγματοποιήθηκε ένα επαναληπτικό πείραμα με τις βέλτιστες συνθήκες και συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων, όπως προέκυψαν από το κυρίως πείραμα. Η πειραματική διαδικασία του επαναληπτικού πειράματος περιγράφεται πιο αναλυτικά παρακάτω.

Η διαδικασία της κρύας εκχύλισης για την παραγωγή 10 L εκχυλίσματος στέβιας ήταν ακριβώς ίδια με το κυρίως πείραμα, όπως περιγράφεται στην Παρ.5.2.1.

Το εκχύλισμα στέβιας ζυμώθηκε μόνο με 3 από τους 5 μικροοργανισμούς που χρησιμοποιήθηκαν στο κυρίως πείραμα: τις ζύμες *RH* και *L48* και το λακτοβάκιλλο *B1*. Η ζύμωση του εκχυλίσματος με κάθε μικροοργανισμό έγινε 2 φορές (συνολικά 6 δείγματα). Ο ολικός όγκος του κάθε δείγματος προς ζύμωση μετά τον εμβολιασμό και την προσθήκη γλυκόζης ήταν 1.5 L. Η συγκέντρωση των μικροοργανισμών *RH* και *B1* στο εκχύλισμα ήταν 2×10^7 κύτταρα/mL, ενώ της ζύμης *L48* ήταν 1×10^7 κύτταρα/mL. Η διαδικασία της μέτρησης των κυττάρων σε κάθε διάλυμα μικροοργανισμού για τον υπολογισμό του απαιτούμενου όγκου εμβολιασμού ήταν ίδια με το κυρίως πείραμα, όπως περιγράφεται στην Παρ.5.2.2. Τα αποτελέσματα της κυτταρικής μέτρησης και οι όγκοι εμβολιασμού εμφανίζονται στον Πίν.10.

Όγκος εμβολιασμού [mL] = $1500 \text{ mL} \times 2 \times 10^7$ [κύτταρα/mL] / ζωντανά κύτταρα/mL.
(για τους μικροοργανισμούς *RH* και *B1*)

Όγκος εμβολιασμού [mL] = $1500 \text{ mL} \times 10^7$ [κύτταρα /mL] / ζωντανά κύτταρα/mL. (για τη ζύμη *L48*)

Πίνακας 10: Κυτταρομέτρηση όλων των μικροοργανισμών του επαναληπτικού πειράματος για τον υπολογισμό του όγκου εμβολιασμού.

	A	B	μέσος όρος	A	B	μέσος όρος		
Μικροοργανισμός	Κύτταρα/ mL* 10^7	Κύτταρα/ mL* 10^7	Κύτταρα/ mL* 10^7	Βιωσιμότητα %	Βιωσιμότητα %	Βιωσιμότητα %	Ζωντανά Κύτ./mL* 10^7	Όγκος εμβολ. [mL]
RH	48.00	40.40	44.20	89.40	90.50	89.95	39.76	75.46
L48	12.20	14.10	13.15	80.30	79.40	79.85	10.50	142.85
B1	481.00	317.00	399.00	88.20	86.30	87.25	348.13	8.62

Η συγκέντρωση της γλυκόζης ήταν 4% για τις ζύμες και 1% για τους λακτοβάκιλλους. Η ποσότητα του σιροπιού γλυκόζης DE 40 για κάθε επιθυμητή συγκέντρωση γλυκόζης υπολογίστηκε 70.2 g για 4% και 17.6 g για 1%. Τα βήματα του υπολογισμού περιγράφονται στην Παρ. 5.2.2. Αυτή τη φορά το σιρόπι γλυκόζης θερμάνθηκε σε θερμόλουτρο στους 60°C, για να γίνει πιο ρευστό και να μπορεί να μεταφερθεί και να ζυγιστεί ευκολότερα. Η διαδικασία προετοιμασίας της ζύμωσης και της δειγματοληψίας ήταν ίδια με το κυρίως πείραμα. Η ζύμωση με τους ζυμομύκητες (*RH* and *L48*) πραγματοποιήθηκε αυτή τη φορά στους 18°C, ενώ η ζύμωση με τους λακτοβάκιλλους (*B1*) στους 28°C, όπως και πριν. Η ζύμωση με τους μικροοργανισμούς *RH* και *B1* διήρκεσε 7 ημέρες, ενώ η ζύμωση με τη ζύμη *L48* μόνο 4 ημέρες. Δείγματα των 60 mL λήφθηκαν για φωτομέτρηση, μέτρηση τιμής pH και ανάλυση στο μετρητή πυκνότητας αμέσως μετά τον εμβολιασμό και την 1^η, 3^η, 4^η και 7^η ημέρα ζύμωσης. Το καθαρό εκχύλισμα στέβιας αναλύθηκε επίσης. Σε αντίθεση με το κυρίως πείραμα τα δείγματα πριν τη φωτομέτρηση δεν αραιώθηκαν με νερό, αλλά διαυγάστηκαν με φίλτρα σύριγγας πόρων 0.45 μm.

Η συμπύκνωση πραγματοποιήθηκε στον περιστρεφόμενο εξάτμιστήρα, σε 50°C και 100 mbar. Κάθε ζυμωμένο δείγμα χωρίστηκε στα δύο, ώστε ο όγκος του δείγματος προς εξάτμιση κάθε φορά να είναι περίπου 600 mL (συνολικά 12 δείγματα). Αυτή τη φορά τα δείγματα διηθήθηκαν με πτυχωτά φίλτρα πριν την εξάτμιση. Η εξάτμιση διήρκεσε 60 min και ακολούθησε φωτομέτρηση, μέτρηση τιμής pH και ανάλυση του κάθε συμπυκνώματος στο μετρητή πυκνότητας. Η θερμοκρασία ήταν σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια ενώ η υποπίεση μειώθηκε βαθμιαία στα 100 mbar.

Για τον αποχρωματισμό χρησιμοποιήθηκε ενεργός άνθρακας σε συγκέντρωση 3000 g/hL, η οποία ήταν η βέλτιστη συγκέντρωση για τα δείγματα με τους μικροοργανισμούς *RH*, *L48*, *B1*, όπως προέκυψε από το κυρίως πείραμα (βλ. Παρ.6.2.2). Αποχρωματίστηκε μόνο η μισή ποσότητα καθενός από τα 12 συμπυκνωμένα δείγματα, ώστε τελικά να υπάρχει ένα αποχρωματισμένο και ένα μη αποχρωματισμένο δείγμα εκχυλίσματος στέβιας όμοιας ζύμωσης. Η διαδικασία του αποχρωματισμού ήταν όμοια με το κυρίως πείραμα, όπως περιγράφεται στην Παρ.5.2.4. Η διήθηση του *B1* διήρκεσε μόνο 5 min, ενώ των *RH* και *L48* πάνω από 60 min. Τέλος, τα όμοια δείγματα, που είχαν χωριστεί πριν τη συμπύκνωση (π.χ. τα *RH_{a1}* και *RH_{a2}*)

αναμίχθηκαν εκ νέου, έτσι ώστε στο τέλος υπήρχαν 6 αποχρωματισμένα και 6 μη αποχρωματισμένα δείγματα εκχυλίσματος στέβιας. Μετά την ανάμιξη τα δείγματα αναλύθηκαν ξανά για να ληφθούν νέες μετρήσεις.

Στα παραγόμενα από αυτό το πείραμα δείγματα πραγματοποιήθηκε επιπλέον και οργανοληπτικός έλεγχος, μετά από προσθήκη του παραγόμενου εκχυλίσματος στέβιας σε μύρα τύπου *Pilsner*.

5.4 ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Τα εκχυλίσματα στέβιας προστέθηκαν σε μύρα ώστε να αξιολογηθούν οργανοληπτικά ως προς την έλλειψη πικρής γεύσης όσο και ως προς την γλυκύτητά τους. Αρχικά επιλέχθηκε ένα τυχαίο δείγμα ($L48_{b,discolorred}$) και δοκιμάστηκε πρώτο για να επιλεγθούν οι δύο κατάλληλες συγκεντρώσεις για τον οργανοληπτικό έλεγχο όλων των δειγμάτων. Έξι διαφορετικές συγκεντρώσεις του δείγματος προστέθηκαν σε μύρα και αξιολογήθηκαν με βάση τη γλυκύτητα σε σύγκριση με την καθαρή μύρα. Οι συγκεντρώσεις και η αξιολόγηση παρουσιάζονται στον Πίνακα 11.

Πίνακας 11: Αξιολόγηση της γλυκύτητας της μύρας μετά από προσθήκη του δείγματος εκχυλίσματος στέβιας $L48_{b,disc}$ σε διάφορες συγκεντρώσεις.

Συγκέντρωση του δείγματος $L48_{b,disc}$. (mL/10 mL μύρα)	Γλυκύτητα
0.25	ανεπαίσθητα γλυκό
0.5	ελαφρώς γλυκό
1.0	γλυκό, ευχάριστο
2.0	πολύ γλυκό
3.0	υπερβολικά γλυκό
4.0	υπερβολικά γλυκό

Οι συγκεντρώσεις 0.5 και 1.0 mL εκχ. στέβιας/10 mL μύρας επιλέχθηκαν για τον οργανοληπτικό έλεγχο όλων των δειγμάτων, γιατί όπως φαίνεται και στον Πίν.11 είχαν την πιο αποδεκτή γλυκιά γεύση. Η μύρα που χρησιμοποιήθηκε για τον οργανοληπτικό έλεγχο ήταν *Pilsner*. Συνολικά, δοκιμάστηκαν 24 διαφορετικά δείγματα μύρας -2 συγκεντρώσεις για κάθε ένα από τα 6 αποχρωματισμένα και τα 6 μη αποχρωματισμένα εκχυλίσματα στέβιας- και αξιολογήθηκαν σε σύγκριση με την καθαρή μύρα *Pilsner*. Ο συνολικός όγκος κάθε δείγματος μύρας μετά την ανάμιξη με εκχύλισμα στέβιας ήταν 1 L για τα μη αποχρωματισμένα δείγματα και 500 mL για τα αποχρωματισμένα. Σε κάθε μπουκάλι πρώτα προστέθηκε το εκχύλισμα στέβιας, της

οποίας ο όγκος είχε μετρηθεί με σιφώνιο, και μετά η μπόρα μέχρι τη χαραγή του 1 L και 500 mL αντίστοιχα. Ο οργανοληπτικός έλεγχος διεξάχθηκε σε 2 ημέρες –μία ημέρα τα μη αποχρωματισμένα και μία τα αποχρωματισμένα δείγματα. Στον έλεγχο συμμετείχαν 9-10 δοκιμαστές, οι οποίοι αξιολόγησαν τα δείγματα ως προς το άρωμα, τη γεύση, την πληρότητα στόματος, τη γλυκύτητα και την πικρή γεύση. Η οργανοληπτική μέθοδος που επιλέχθηκε ήταν η μέθοδος βαθμολόγησης με κλίμακα (1-5). Κάθε δοκιμαστής έλαβε ένα έντυπο αξιολόγησης (βλ. Πίν. Π13 στο Παράρτ. II) και τα δείγματα με τυχαία σειρά σε πλαστικούς περιέκτες, πάνω στους οποίους αναγράφονταν οι κωδικοί των δειγμάτων. Η ποσότητα της μπόρας σε κάθε περιέκτη ήταν επαρκής (περίπου 50 mL), για περισσότερες από μία δοκιμές, ενώ ενδιάμεσα από τις δοκιμές υπήρχε και διαθέσιμο νερό. Η κωδικοποίηση των δειγμάτων, όπως φαίνεται στον Πίν. 12, ήταν τυχαία για να εξασφαλιστεί η αντικειμενικότητα.

Πίνακας 12: Κωδικοποίηση δειγμάτων μπόρας για τον οργανοληπτικό έλεγχο (αριστερά: μη αποχρωματισμένα, δεξιά: αποχρωματισμένα).

Δείγμα (μη αποχρ.)	Κωδικός	Δείγμα (αποχρ.)	Κωδικός
<i>RHa 0.5</i>	357	<i>RHa disc. 0.5</i>	εκτός
<i>RHa 1.0</i>	608	<i>RHa disc. 1.0</i>	εκτός
<i>RHb 0.5</i>	210	<i>RHb disc. 0.5</i>	204
<i>RHb 1.0</i>	853	<i>RHb disc. 1.0</i>	198
<i>B1a 0.5</i>	940	<i>B1a disc. 0.5</i>	502
<i>B1a 1.0</i>	194	<i>B1a disc. 1.0</i>	103
<i>B1b 0.5</i>	291	<i>B1b disc. 0.5</i>	992
<i>B1b 1.0</i>	421	<i>B1b disc. 1.0</i>	877
<i>L48a 0.5</i>	087	<i>L48a disc. 0.5</i>	095
<i>L48a 1.0</i>	972	<i>L48a disc. 1.0</i>	612
<i>L48b 0.5</i>	182	<i>L48b disc. 0.5</i>	705
<i>L48b 1.0</i>	539	<i>L48b disc. 1.0</i>	234

Στην Εικ. 18 φαίνεται ο χώρος του οργανοληπτικού ελέγχου, τα μπουκάλια με τα διάφορα δείγματα μπόρας με μη αποχρωματισμένο εκχύλισμα στέβιας, καθώς και οι πλαστικοί περιέκτες με τα δείγματα που δόθηκαν σε κάθε δοκιμαστή την πρώτη ημέρα του οργανοληπτικού ελέγχου.



Εικόνα 18: Χώρος οργανοληπτικού ελέγχου - Προετοιμασία δειγμάτων μύρας με μη αποχρωματισμένο εκχύλισμα στέβιας.

Μετά τον έλεγχο όλα τα δείγματα, συμπεριλαμβανομένης και της καθαρής μύρας, τοποθετήθηκαν για 5 min στο λουτρό υπερήχων, στη συνέχεια διηθήθηκαν με πτυχωτά φίλτρα και ακολούθησε ανάλυση στο μετρητή πυκνότητας, φωτομέτρηση και μέτρηση τιμής pH.

6 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.1 ΑΡΧΙΚΟ ΠΕΙΡΑΜΑ

Στο αρχικό πείραμα πρώτα μελετήθηκε η εκχύλιση των γλυκοζιτών στεβιόλης με 4 διαφορετικούς τρόπους και η επίδραση του χρόνου βρασμού στα διάφορα εκχυλίσματα. Τα δείγματα δοκιμάστηκαν και αξιολογήθηκαν ως προς τη γλυκιά και την πικρή τους γεύση, όπως παρουσιάζεται στον Πίν. 13.

Πίνακας 13: Οργανοληπτική αξιολόγηση της γλυκιάς και της πικρής γεύσης διαφόρων δειγμάτων με γλυκοζίτες στεβιόλης μετά από βρασμό σε διάφορους χρόνους.

	κρύο	χρόνος βρασμού			
		10 min.	30 min.	60 min.	
υγρό εκχύλισμα	χαμηλή	χαμηλή	χαμηλή	χαμηλή(γίνεται „bready“)	γλυκύτητα
	χαμηλή	χαμηλή	χαμηλή, αυξανόμενη	πιο αυξημένη	πικρή γεύση
	γενικά πιο χαμηλή συμπίκνωση σε σχέση με τα υπόλοιπα				άλλο
ενζυμικά. επεξεργ. σκόνη	πολύ έντονη	ελαττωμένη	πιο ελαττωμένη	χαμηλή	γλυκύτητα
	χαμηλή	αυξανόμενη	έντονη	πολύ έντονη	πικρή γεύση
	ελαφρώς όξινο, χαμηλή ”πληρότητα στόματος				άλλο
θρυμματι- σμένα φύλλα	χαμηλή	αυξανόμενη	πιο αυξημένη	πιο αυξημένη	γλυκύτητα
	ελαφριά	πικρό	αυξανόμενη	έντονη	πικρή γεύση
	η πικρή γεύση αυξήθηκε πολύ, στο τέλος ήταν στυφό				άλλο
κρύο εκχύλισμα	έντονη	έντονη	έντονη	έντονη	γλυκύτητα
	χαμηλή, ευχάριστη	χαμηλή, ευχάριστη	χαμηλή, ευχάριστη	χαμηλή, ευχάριστη	πικρή γεύση
	η πικρή γεύση παραμένει σταθερή				άλλο

Όπως φαίνεται στον Πίν.13 η οργανοληπτική αξιολόγηση έδειξε ότι η αύξηση του χρόνου βρασμού προκαλεί αύξηση της πικρής γεύσης σε όλα τα δείγματα, εκτός από το κρύο εκχύλισμα, το οποίο γενικά φαίνεται να έχει σταθερά έντονη γλυκιά και χαμηλή-ευχάριστη πικρή γεύση. Η ενζυμικά επεξεργασμένη σκόνη δεν έχει καλή πληρότητα στόματος και τα θρυμματισμένα φύλλα με το βρασμό αποκτούν έντονη πικρή έως στυφή γεύση. Η αραιώση του υγρού εκχυλίσματος ήταν πολύ μεγάλη, ενώ παρατηρήθηκε έντονη θολότητα στα δείγματα, τα οποία θα μπορούσαν να διαυγαστούν με καλύτερη διήθηση. Έτσι, αποφασίστηκε η περαιτέρω εξέταση μόνο του **κρύου** και του **υγρού εκχυλίσματος**, το οποίο όμως αυτή τη φορά δεν αραιώθηκε. Η γλυκύτητα των δύο δειγμάτων ήταν αυτή τη φορά συγκρίσιμη, καθώς το υγρό εκχύλισμα δεν είχε αραιωθεί. Τα αποτελέσματα της νέας οργανοληπτικής αξιολόγησης των δύο δειγμάτων παρουσιάζονται στον Πίν. 14.

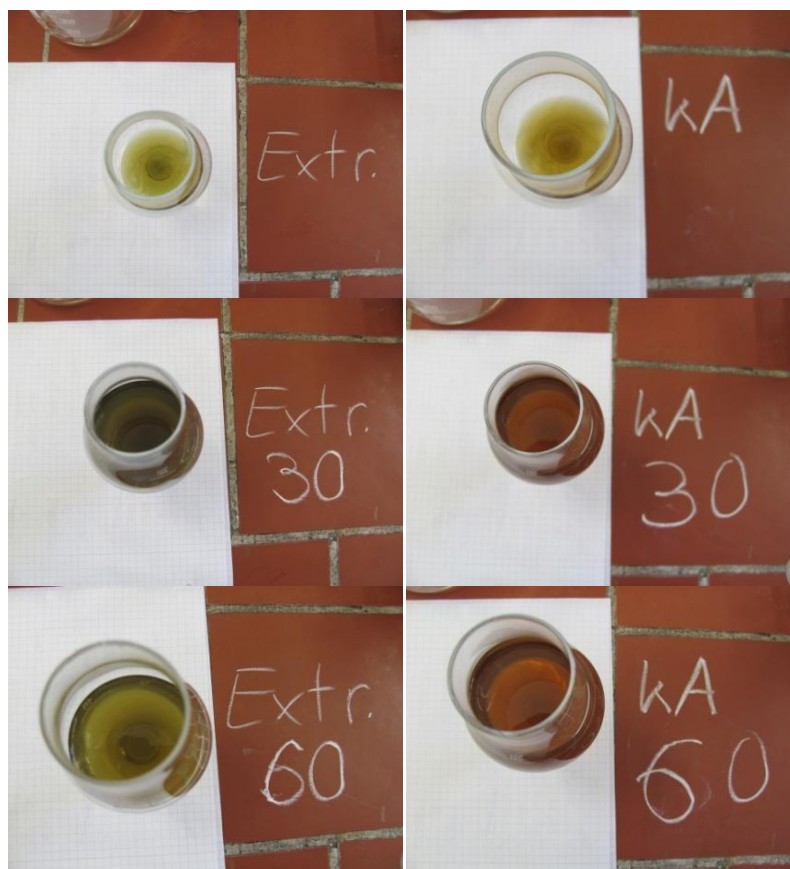
Πίνακας 14: Οργανοληπτική αξιολόγηση της γλυκιάς και της πικρής γεύσης του μη αραιωμένου υγρού και του κρύου εκχυλίσματος μετά από βρασμό σε διάφορους χρόνους.

	κρύο	χρόνος βρασμού			
		10 min.	30 min.	60 min.	
μη αραιωμένο υγρό εκχύλισμα	έντονη	έντονη	ελαφρώς ελαττωμένη	πολύ ελαττωμένη	γλυκύτητα
	χαμηλή	αυξημένη	πιο αυξημένη	έντονη, όχι ευχάριστη	πικρή γεύση
	πολύ θολό				άλλο
κρύο εκχύλισμα	έντονη	έντονη	έντονη	έντονη	γλυκύτητα
	χαμηλή, ευχάριστη	χαμηλή, ευχάριστη	χαμηλή, ευχάριστη	χαμηλή, ευχάριστη	πικρή γεύση
	η πικρή και γλυκιά γεύση παρέμειναν σταθερές				άλλο

Όπως φαίνεται στον Πίν. 14 το κρύο εκχύλισμα υπερτερεί του υγρού εκχυλίσματος. Συγκεκριμένα, η γλυκιά γεύση του κρύου εκχυλίσματος παραμένει σταθερά έντονη και η πικρή γεύση παραμένει χαμηλή και ευχάριστη κατά το βρασμό. Αντίθετα, το υγρό εκχύλισμα χάνει σταδιακά τη γλυκιά του γεύση όταν αυξάνεται ο χρόνος βρασμού περισσότερο από 10 min, ενώ η πικρή του γεύση αυξάνεται κατά το

βρασμό και στο τέλος δεν είναι ευχάριστη. Επιπλέον στο υγρό εκχύλισμα παρατηρήθηκε αυξημένη θολότητα. όπως φαίνεται και στην Εικ.19, όπου παρουσιάζονται το υγρό (αριστερά) και το κρύο εκχύλισμα (δεξιά) πριν το βρασμό και μετά από βρασμό 30 και 60 min.

Όπως παρατηρείται στην Εικ.19, το χρώμα και των δύο εκχυλισμάτων γίνεται πιο σκούρο κατά το βρασμό, με το υγρό εκχύλισμα να είναι πράσινο-κίτρινο και το κρύο εκχύλισμα καφέ-κίτρινο. Το κρύο εκχύλισμα όμως γενικά είναι πιο διαυγές από το υγρό εκχύλισμα.



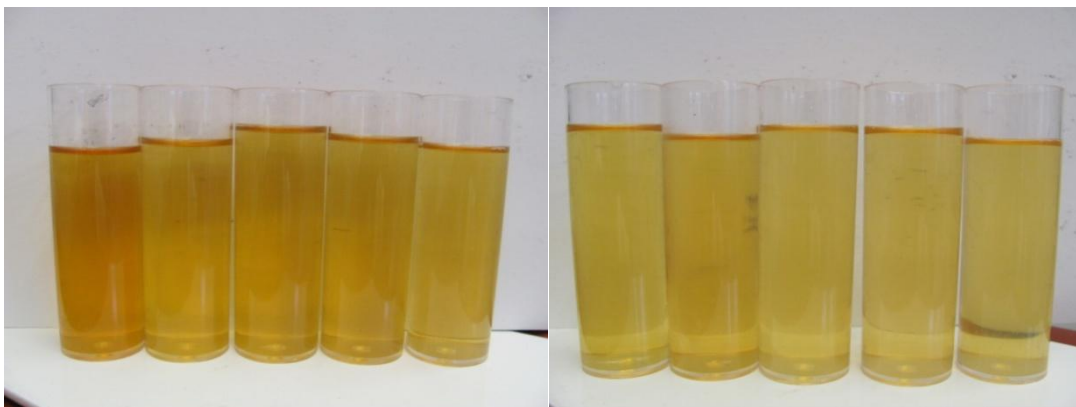
Εικόνα 19: Χρώμα εκχυλισμάτων. Αριστερά: Υγρό εκχύλισμα (Extr.). Δεξιά: κρύο εκχύλισμα (kA) μετά από διαφορετικούς χρόνους βρασμού(0, 30 και 60 min).

Εκτός από την απλή εκχύλιση μελετήθηκε και η εκχύλιση των φύλλων στέβιας με νερό και αιθανόλη σε συσκευή Soxhlet. Η οργανοληπτική δοκιμή έδειξε ότι το εκχύλισμα με νερό ήταν καθαρό και πολύ γλυκό, αλλά επίσης και πικρό. Το εκχύλισμα με αιθανόλη είχε έντονη "grassy" οσμή, ήταν αρκετά θολό και πικρό. Γενικά, διαπιστώθηκε ότι η εκχύλιση Soxhlet δεν αποτελεί καλή επιλογή εκχύλισης των

φύλλων στέβιας, διότι οδηγεί στη δημιουργία πάρα πολλών ανεπιθύμητων αρωμάτων και πικρών ουσιών.

Έτσι, η απλή **κρύα εκχύλιση** (2 g φύλλα/100 mL νερό και διήθηση) επιλέχθηκε ως η καλύτερη διαδικασία εκχύλισης για επόμενα πειράματα. (βλ. Παρ. 5.2.1)

Στη συνέχεια μελετήθηκε η ζύμωση του εκχυλίσματος στέβιας με σκοπό τη μείωση της τιμής του pH και τη βελτίωση της γεύσης του εκχυλίσματος. Αρχικά πραγματοποιήθηκε ζύμωση δειγμάτων του κρύου και υγρού εκχυλίσματος που είχαν υποστεί βρασμό για 0, 30 και 60 min με το ζυμομύκητα *RH* και προσθήκη γλυκόζης ή ζυθογλεύκος (αναμεμιγμένο με γλυκόζη). Στην Εικ. 20 φαίνεται το χρώμα όλων των δειγμάτων ζύμωσης. Δεν παρατηρούνται αξιοσημείωτες διαφορές στο χρώμα, αν και γενικά το κρύο εκχύλισμα είναι ελαφρώς πιο ανοιχτόχρωμο σε σχέση με το υγρό εκχύλισμα.



Εικόνα 20: Χρώμα των ζυμομένων δειγμάτων. Αριστερά: υγρό εκχύλισμα, δείγματα κατά σειρά: 0 min+ζυθογλεύκος, 0 min+γλυκόζη, 30 min+ζυθογλεύκος, 30 min+γλυκόζη, 60 min+ζυθογλεύκος. Δεξιά: κρύο εκχύλισμα, δείγματα κατά σειρά: 0 min+ζυθογλεύκος, 0 min+γλυκόζη, 30 min+ζυθογλεύκος, 30 min+γλυκόζη, 60 min+ζυθογλεύκος

Όλα τα δείγματα ζύμωσης αναλύθηκαν στο μετρητή πυκνότητας και οι τιμές από τις μετρήσεις παρουσιάζονται στον Πίν.15. Σύμφωνα με τον Πίνακα 15 η ζύμωση όλων των δειγμάτων ολοκληρώθηκε (βαθμός ζύμωσης >85%). Αξιοσημείωτες είναι οι πιο χαμηλές τιμές pH (περίπου 3.5) των δειγμάτων με καθαρή γλυκόζη, σε αντίθεση με τα δείγματα με ανάμικτη γλυκόζη και ζυθογλεύκος, που είχαν τιμές pH>4.

Πίνακας 15: Αποτελέσματα της ανάλυσης στο μετρητή πυκνότητας μετά τη ζύμωση του υγρού(extr.) και του κρύου εκχυλίσματος(cold extr.) διαφόρων χρόνων βρασμού (0,30,60 min) με γλυκόζη(glu) και ζυθογλεύκος(wort).

	Πυκνότητα [g/cm ³]	Συγκέντρωση αλκοόλης (%v/v)	Συγκέντρωση αλκοόλης (%w/w)	Πραγμ. εκχύλισμα [%w/w]	Βαθμός ζύμωσης [% w/w]	Χρώμα [EBC]	Τιμή pH
extr.0+ glu	0.99770	4.82	3.81	1.65	101.47	12.22	3.57
extr.30 +glu	0.99872	4.66	3.69	1.86	98.57	14.57	3.50
cold extr.0+ glu	1.00256	4.06	3.20	2.63	87.44	14.38	3.58
cold extr.30 +glu	1.00200	4.09	3.22	2.50	88.93	13.05	3.55
extr.0+ wort	1.00340	4.31	3.39	2.91	86.18	17.04	4.39
extr.30 +wort	1.00259	4.50	3.54	2.79	88.37	14.59	4.16
extr.60 +wort	1.00314	4.31	3.39	2.86	86.63	15.14	4.20
cold extr.0+ wort	1.00200	4.35	3.43	2.59	89.51	13.03	4.19
cold extr.30 +wort	1.00259	4.28	3.37	2.71	87.86	13.36	4.14
cold extr.60 +wort	1.00278	4.49	3.53	2.83	87.91	13.56	4.15

Η οργανοληπτική δοκιμή έδειξε ότι τα δείγματα που ζυμώθηκαν με ζυθογλεύκος, είχαν μια πολύ δυσάρεστη πικρή-ξινή γεύση. Τα δείγματα με γλυκόζη αντίθετα είχαν καλύτερη γεύση. Οι μετρήσεις του Πίν.15 έδειξαν επίσης ότι οι ζύμες παίρνουν αρκετά θρεπτικά συστατικά για τη ζύμωση της γλυκόζης, ακόμη και χωρίς ζυθογλεύκος.

Συνεπώς για το κυρίως πείραμα προτείνεται η χρήση χαμηλών θερμοκρασιών και η προσθήκη μόνο γλυκόζης στη ζύμωση.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε **νέα ζύμωση** δειγμάτων κρύου εκχυλίσματος (2 g φύλλα/100mL νερού), συμπυκνωμένου κρύου εκχυλίσματος(4 g φύλλα/100mL νερού) και ενός δείγματος υγρού εκχυλίσματος. Χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις γλυκόζης (4% και 8%) και οι ζύμες: *RH*, *Hebru* και “*top-fermenting*” 68. Τα δείγματα δοκιμάστηκαν και αξιολογήθηκε η γεύση τους. Όπως φαίνεται στον Πίν.16 ως καλύτερα γευστικά και κατάλληλα για περαιτέρω εξέταση επιλέχθηκαν τα δείγματα κρύου εκχυλίσματος(2 g φύλλα/100mLνερού), που ζυμώθηκαν με τις ζύμες *Hebru* και *RH* και περιείχαν 4% ή 8% γλυκόζη.

Πίνακας 16: Αξιολόγηση των ζυμομένων δειγμάτων για περαιτέρω χρήση.

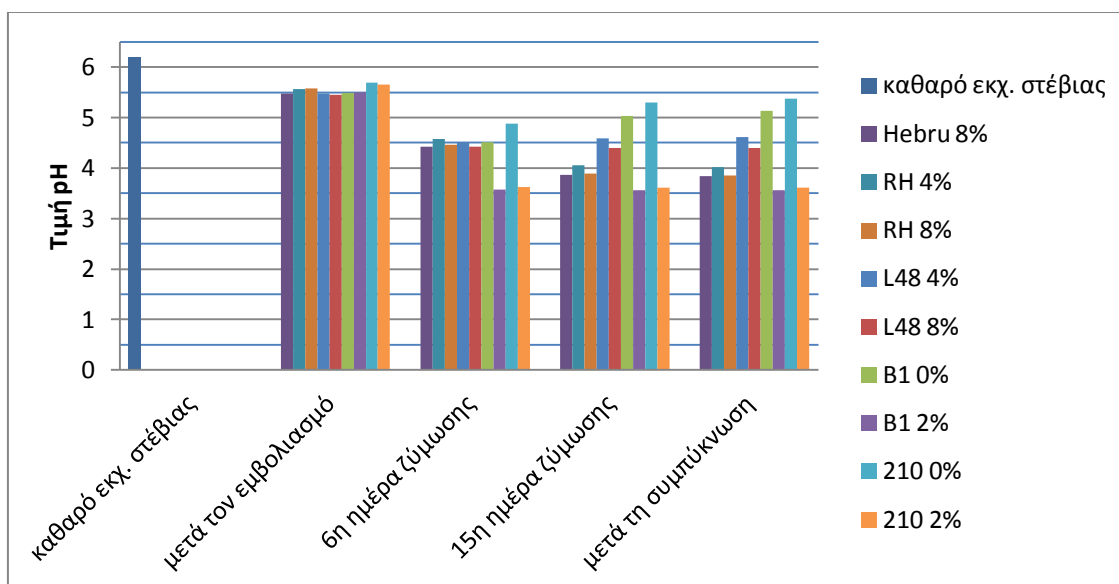
δείγμα	g φύλλα/100 mL	ζύμη	συγκέντρωση γλυκόζης (%)	Καλή γεύση, κατάλληλο για επόμενο πείραμα
1a	2	Hebru	4	X
2a	2	Hebru	8	X
3a	2	RH	4	X
4a	2	RH	8	X
5a	2	68	4	
6a	2	68	8	
7a	4	Hebru	4	
8a	4	Hebru	8	
9a	4	RH	4	
10a	4	RH	8	
11a	4	68	4	
12a	4	68	8	
13a	υγρό εκχύλισμα.	Hebru	8	

Τέλος πραγματοποιήθηκαν προκαταρκτικά πειράματα διήθησης με ενεργό άνθρακα και με *PVPP*, τα οποία οδήγησαν σε ελαφρύ αποχρωματισμό των δειγμάτων, αλλά προκάλεσαν και μια επιμέρους απώλεια της γλυκιάς γεύσης.

6.2 ΚΥΡΙΩΣ ΠΕΙΡΑΜΑ

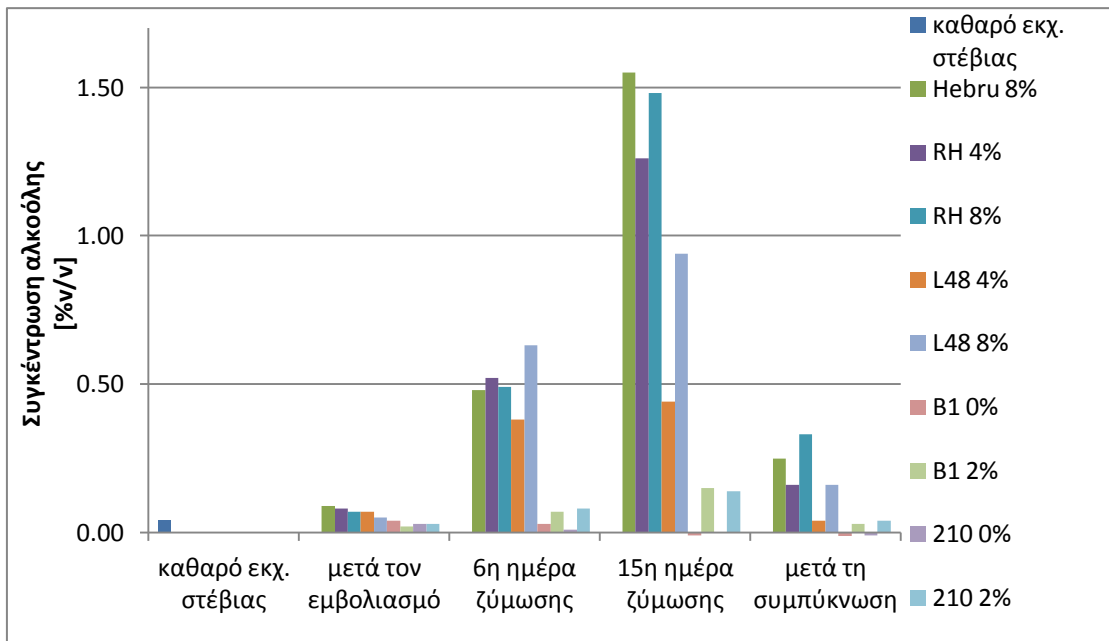
6.2.1 Εκχύλιση-Ζύμωση-Συμπύκνωση

Με βάση τα αποτελέσματα του αρχικού πειράματος αποφασίστηκε στο κυρίως πείραμα να παραχθεί **κρύο εκχύλισμα** γλυκοζιτών στεβιόλης (2 g φύλλα/100mL νερού). Στη συνέχεια μελετήθηκε η **ζύμωση** του εκχυλίσματος με τις ζύμες *Hebru* και *RH* και προσθήκη γλυκόζης σε συγκεντρώσεις 4% και 8% (όπως προέκυψε από το αρχικό πείραμα), αλλά και με ένα τρίτο στέλεχος της ζύμης *S.cerevisiae*, το *L48*, με ίδιες συγκεντρώσεις γλυκόζης. Επιπλέον μελετήθηκε και ένα άλλο είδος ζύμωσης, με 2 λακτοβάκιλλους *L.plantarum*, τα στελέχη *B1* και *210* με 0% και 2% γλυκόζη. Ακολούθησε **συμπύκνωση** του εκχυλίσματος για την απομάκρυνση νερού και αιθανόλης. Οι μετρήσεις της τιμής του pH, της συγκέντρωσης αλκοόλης και του φαινομένου εκχυλίσματος για όλα τα δείγματα σε όλα τα στάδια του πειράματος παρουσιάζονται στα Γραφήματα 2,3,4. Ως πρώτο στάδιο σε κάθε Γράφημα παρουσιάζεται το καθαρό εκχύλισμα φύλλων στέβιας.



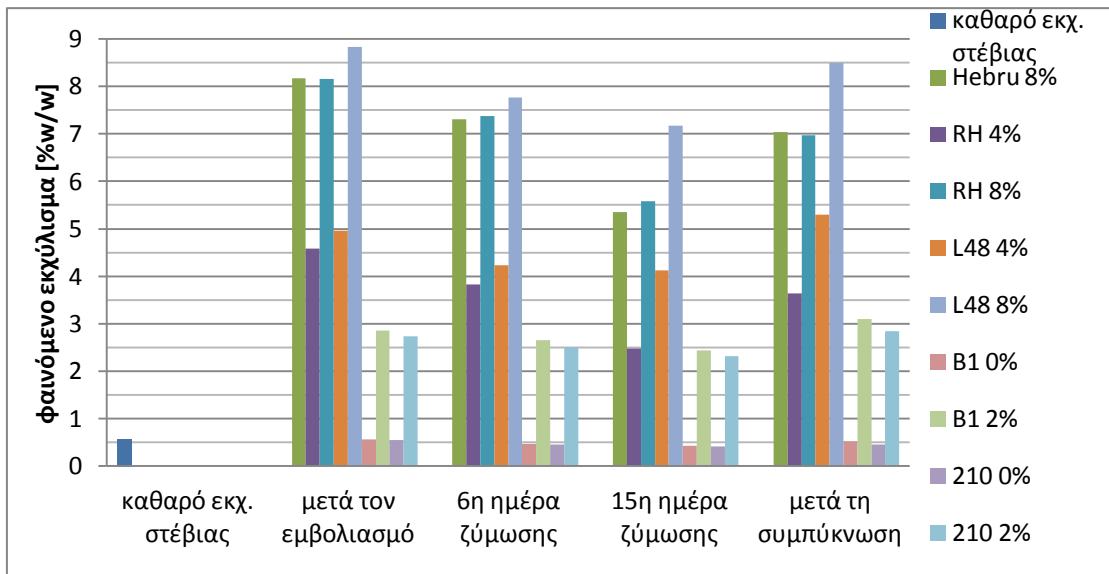
Γράφημα 2: Τιμές pH όλων των δειγμάτων σε όλα τα στάδια του κυρίως πειράματος.

Σύμφωνα με το Γράφημα 2 η ζύμωση του εκχυλίσματος στέβιας (pH 6.19) με όλα τα είδη μικροοργανισμών προκάλεσε μείωση της τιμής του pH. Μία μείωση 0.65 μονάδων μπορεί να παρατηρηθεί σε όλα τα δείγματα αμέσως μετά τον εμβολιασμό. Μετά από 6 ημέρες ζύμωσης η τιμή του pH των δειγμάτων που ζυμώθηκαν με ζυμομύκητες (*RH*, *Hebru*, *L48*) είναι περίπου 4.50. Το δείγμα 210 0% παρουσιάζει τη μεγαλύτερη τιμή pH=4.88. Η μεγαλύτερη μείωση του pH παρατηρείται στη ζύμωση με λακτοβάκιλλους (*B1*, *210*) με 2% γλυκόζη. Και τα δύο δείγματα *B1* 2% και *210* 2% έφτασαν κοντά στην τιμή pH=3,5. Μετά από 15 ημέρες ζύμωσης οι τιμές pH των δειγμάτων με τις ζύμες *Hebru* και *RH* μειώθηκε κατά περίπου 0.5 μονάδες. Το pH των δειγμάτων *L48* 4%, *L48* 8% και των *B1* 2% και *210* 2% παρέμεινε σχεδόν ίδια. Επίσης, μία αύξηση περίπου 0.5 μονάδες μπορεί να παρατηρηθεί στην τιμή του pH των δειγμάτων ζύμωσης με λακτοβάκιλλους και 0% γλυκόζη. Τέλος, η διεργασία της συμπύκνωσης δεν επηρέασε σημαντικά το pH του εκχυλίσματος σε κανένα είδος ζύμωσης. Κάτι που αξίζει επίσης να αναφερθεί είναι, ότι τα δείγματα που περιείχαν χαμηλότερες συγκεντρώσεις γλυκόζης (4% για τα *RH*, *L48* και 0% για τα *B1*, *210*) έχουν ελαφρώς υψηλότερο pH σε όλα τα στάδια του κυρίως πειράματος, σε σχέση με τα αντίστοιχα δείγματα όμοιας ζύμωσης που περιείχαν υψηλότερες συγκεντρώσεις γλυκόζης. (8% για τις ζύμες και 2% για τους λακτοβάκιλλους, αντίστοιχα).



Γράφημα 3: Συγκέντρωση αλκοόλης όλων των δειγμάτων σε όλα τα στάδια του κυρίως πειράματος.

Όπως παρουσιάζεται στο Γράφημα 3 -και όπως αναμενόταν- μόνο οι ζυμομύκητες (*Hebru*, *RH*, *L48*), σε αντίθεση με τους λακτοβάκιλλους (*B1*, *210*), παράγουν αλκοόλ κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του εκχυλίσματος στέβιας (αρχική περιεκτικότητα σε αλκοόλ: 0.04% v/v). Στην αρχή της ζύμωσης, η συγκέντρωση της αλκοόλης είναι σχεδόν μηδενική σε όλα τα δείγματα. Μετά από 6 ημέρες ζύμωσης τα δείγματα με τους ζυμομύκητες εμφανίζουν μία αύξηση της συγκέντρωσης αλκοόλης περίπου 0.5%. Μετά από 15 ημέρες ζύμωσης μπορεί να παρατηρηθεί μία περαιτέρω αύξηση σε όλα τα δείγματα με τους ζυμομύκητες εκτός από το δείγμα *L48 4%*. Στο σημείο αυτό του πειράματος τα δείγματα *Hebru 8%* και *RH 8%* εμφανίζουν τα υψηλότερα ποσοστά αλκοόλ, περίπου 1.5% v/v. Τα δείγματα με τους λακτοβάκιλλους δεν περιέχουν περισσότερο από 0.2% v/v αλκοόλη. Μετά τη συμπύκνωση, το αλκοόλ όλων των δειγμάτων μειώθηκε κάτω από 0.3% v/v. Γενικά τα δείγματα με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις γλυκόζης (8% για τα *RH*, *L48* και 2% για τα *B1*, *210*) περιέχουν περισσότερο αλκοόλ σε όλα τα βήματα του κυρίως πειράματος, σε σχέση με τα δείγματα με τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις γλυκόζης (4% και 0% αντίστοιχα).



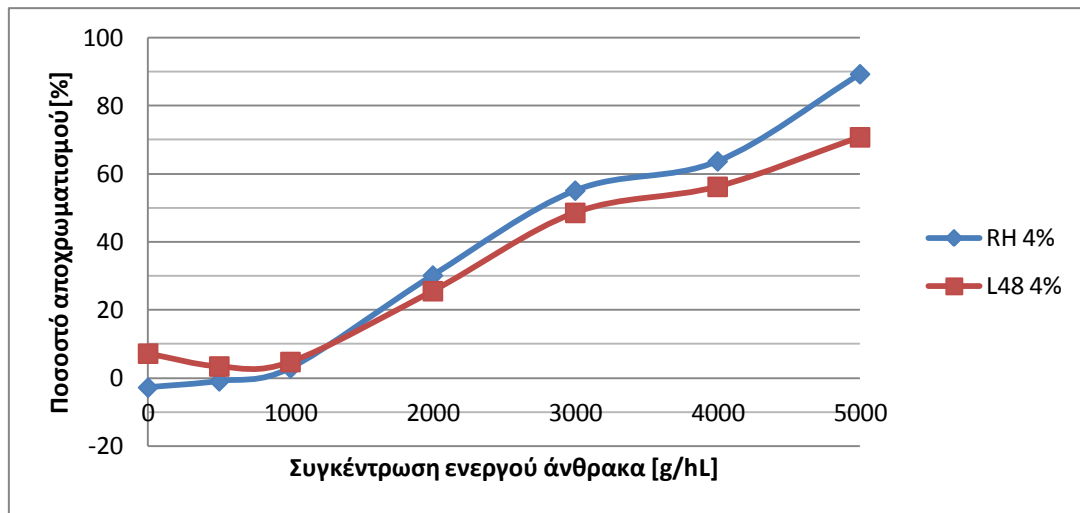
Γράφημα 4: Φαινόμενο εκχύλισμα όλων των δειγμάτων σε όλα τα στάδια του κυρίως πειράματος.

Όσον αφορά το φαινόμενο εκχύλισμα, σύμφωνα με το Γράφημα 4, σε όλα τα δείγματα που περιέχουν γλυκόζη, μειώνεται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και αυξάνεται ξανά μετά τη συμπύκνωση. Μετά τον εμβολιασμό τα δείγματα με τους ζυμομύκητες (*Hebru*, *RH* και *L48*) με 8% γλυκόζη εμφανίζουν το μεγαλύτερο φαινόμενο εκχύλισμα, περίπου 8.5% w/w. Τα αντίστοιχα δείγματα με 4% γλυκόζη έχουν φαινόμενο εκχύλισμα 5% w/w και τα δείγματα με λακτοβάκιλλους (*B1*, *210*) και 2% γλυκόζη περίπου 3.0% w/w. Μετά από 6 ημέρες ζύμωσης μπορεί να παρατηρηθεί μία μείωση του φαινομένου εκχυλίσματος περίπου 1% στα δείγματα με τους ζυμομύκητες, ενώ τα δείγματα με τους λακτοβάκιλλους δεν παρουσιάζουν μεταβολή. Μετά από 15 ημέρες ζύμωσης τα δείγματα *Hebru 8%*, *RH 4%* και *RH 8%* εμφανίζουν τη μεγαλύτερη μείωση του φαινομένου εκχυλίσματος, περίπου 2%. Μετά από τη συμπύκνωση παρατηρείται μία αύξηση περίπου 1.5% και 0.5% αντίστοιχα στους ζυμομύκητες και τους λακτοβάκιλλους. Μοναδική εξαίρεση αποτελούν τα δείγματα *B1 0%* και *210 0%*, τα οποία δεν περιέχουν καθόλου γλυκόζη. Το φαινόμενο εκχύλισμά τους παραμένει σχεδόν σταθερό καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος και παραπλήσια με το φαινόμενο εκχύλισμα του καθαρού εκχυλίσματος στέβιας (0.5% w/w).

6.2.2 Αποχρωματισμός

Με βάση τα επιτυχή αποτελέσματα του δοκιμαστικού αποχρωματισμού στο αρχικό πείραμα αποφασίστηκε η μελέτη του αποχρωματισμού με διάφορες συγκεντρώσεις ενεργού άνθρακα στο κυρίως πείραμα. Στα Γραφήματα 5-8 παρουσιάζεται το ποσοστό αποχρωματισμού συναρτήσει της συγκέντρωσης του ενεργού άνθρακα, ενώ στις Εικ. 21-24 φαίνεται το χρώμα των αντίστοιχων δειγμάτων μετά τον αποχρωματισμό τους με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις ενεργού άνθρακα. Κάθε Γράφημα αφορά δείγματα εκχυλίσματος στέβιας που ζυμώθηκαν με ίδιο είδος μικροοργανισμού (ζύμες/λακτοβάκιλλους) και περιείχαν την ίδια συγκέντρωση γλυκόζης.

Από τα Γραφήματα βρέθηκε η εκάστοτε **βέλτιστη συγκέντρωση ενεργού άνθρακα**, η οποία αντιστοιχεί στο σημείο καμψής στις καμπύλες αποχρωματισμού. Παρατηρήθηκε ότι μεγαλύτερη συγκέντρωση από τη βέλτιστη οδηγεί μεν σε μεγαλύτερο αποχρωματισμό, αλλά η κλίση της καμπύλης, δηλαδή ο «ρυθμός» αποχρωματισμού μειώνεται. Έτσι, συμπεραίνεται ότι δεν αξίζει να χρησιμοποιηθεί μεγαλύτερη ποσότητα ενεργού άνθρακα από αυτή και γι' αυτό ονομάζεται βέλτιστη. Επίσης, και στις Εικ. 21-24, όπου αυξάνεται από αριστερά προς τα δεξιά η συγκέντρωση ενεργού άνθρακα που χρησιμοποιήθηκε στα δείγματα, είναι εμφανής η μείωση του χρώματος στο δείγμα που περιέχει τη βέλτιστη συγκέντρωση (όπως αυτή προκύπτει από την καμπύλη). Έτσι, το χρώμα μετά τη διήθηση με την εκάστοτε βέλτιστη συγκέντρωση, είναι αποδεκτό για την προσθήκη του γλυκαντικού σε ανοιχτόχρωμα/υποκίτρινα αναψυκτικά.

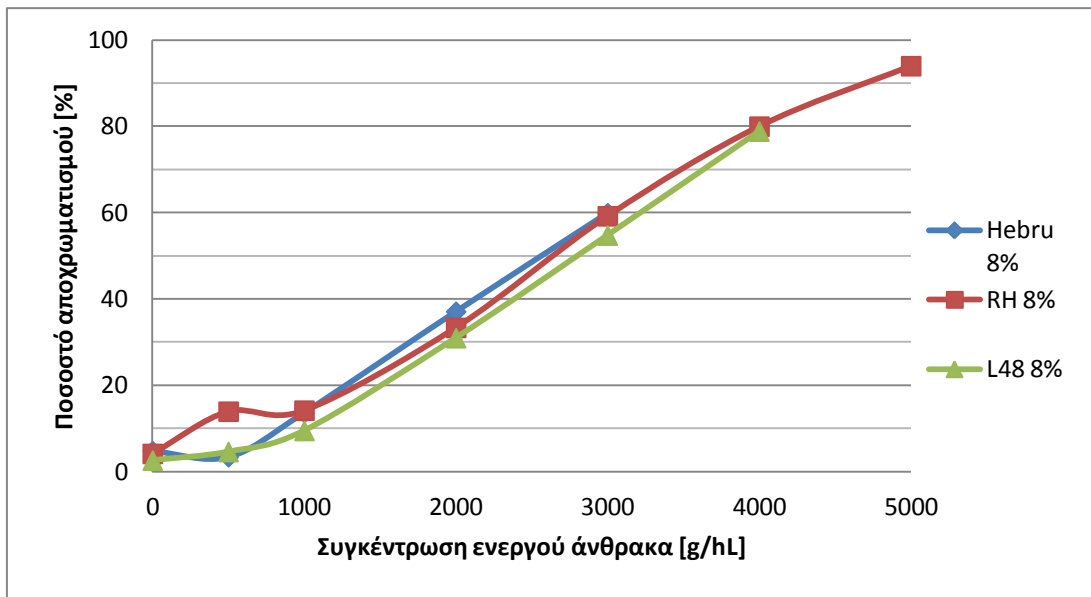


Γράφημα 5: Αποχρωματισμός των δειγμάτων με ζύμες και 4% w/v γλυκόζη με διάφορες συγκεντρώσεις ενεργού άνθρακα.

Το Γράφημα 5 παρουσιάζει τις καμπύλες αποχρωματισμού των δύο δειγμάτων με ζυμομύκητες και 4% γλυκόζη. Όπως φαίνεται από την κλίση των καμπυλών, η **βέλτιστη συγκέντρωση** του ενεργού άνθρακα για τον αποχρωματισμό και των δύο δειγμάτων είναι 3000 g/hL. Ο αποχρωματισμός και των δύο δειγμάτων τότε είναι κοντά στο 50%. Συγκεντρώσεις ενεργού άνθρακα χαμηλότερες από 1000 g/hL δεν προκαλούν σημαντικό ποσοστό αποχρωματισμού. Η διήθηση με μεγαλύτερη συγκέντρωση ενεργού άνθρακα (5000 g/hL), οδήγησε σε αποχρωματισμό του δείγματος *RH 4%* κατά 90%, και του *L48 4%* κατά 70%. Τα δείγματα *RH 4%* (αριστ.) και *L48 4%* (δεξιά) μετά τον αποχρωματισμό τους με τις διάφορες συγκεντρώσεις ενεργού άνθρακα παρουσιάζονται στην Εικ.20. Όπως φαίνεται στην Εικ.21 αλλά όπως προκύπτει και από το Γράφημα 5, το δείγμα *RH4%* αποχρωματίστηκε περισσότερο από το δείγμα *L48 4%*.



Εικόνα 21: Αποχρωματισμένα δείγματα *RH 4%* (αριστ.) και *L48 4%* (δεξιά).



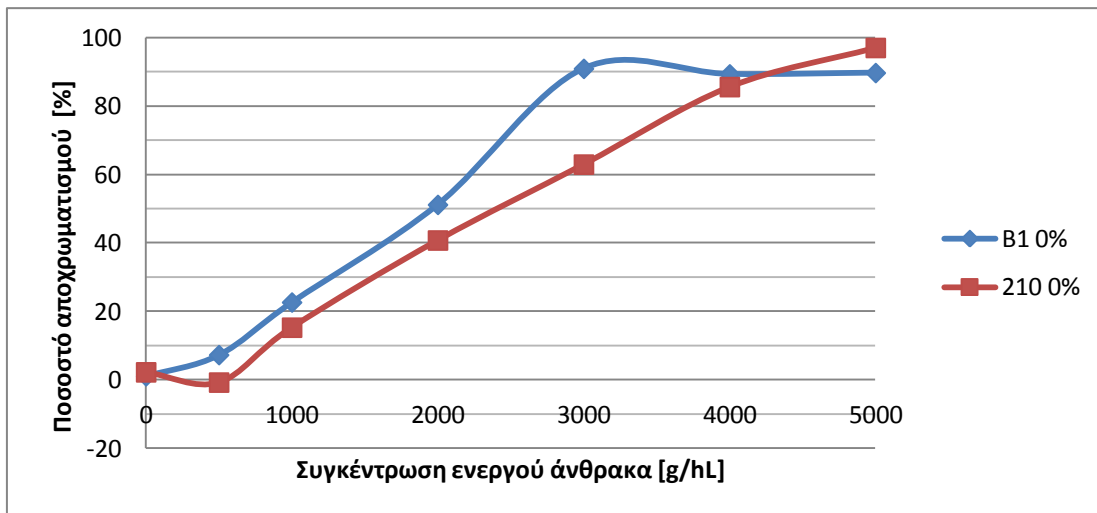
Γράφημα 6: Αποχρωματισμός των δειγμάτων με ζύμες και 8% w/v γλυκόζη με διάφορες συγκεντρώσεις ενεργού άνθρακα.

Σύμφωνα με το Γράφημα 6 η βέλτιστη συγκέντρωση του ενεργού άνθρακα για τον αποχρωματισμό του δείγματος *RH 8%* είναι 3000 g/hL. Ο αποχρωματισμός του δείγματος τότε είναι 60%, ενώ με ενεργό άνθρακα 5000 g/hL φτάνει το 90%. Για τα δείγματα *Hebru 8%* και *L48 8%* δεν υπάρχουν αρκετά σημεία στην καμπύλη για να προσδιοριστεί η βέλτιστη συγκέντρωση ενεργού άνθρακα, αλλά οι καμπύλες τους φαίνεται να ακολουθούν την καμπύλη του δείγματος *RH*. Το δείγμα *Hebru 8%* αποχρωματίστηκε κατά 60% και το *L48 8%* κατά 80% μετά από διήθηση με 3000 g/hL και 4000 g/hL ενεργό άνθρακα αντίστοιχα.



Όπως φαίνεται και στις Εικ. 21-24 το εκχύλισμα μετά τη διήθηση με την εκάστοτε βέλτιστη συγκέντρωση είναι εμφανώς αποχρωματισμένο, σε σχέση με το τυφλό δείγμα, που είναι πάντα πρώτο από αριστερά, ενώ το τελευταίο δείγμα με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση εν. άνθρακα είναι σχεδόν άχρωμο.

Εικόνα 22: Αποχρωματισμένα δείγματα *RH 8%*

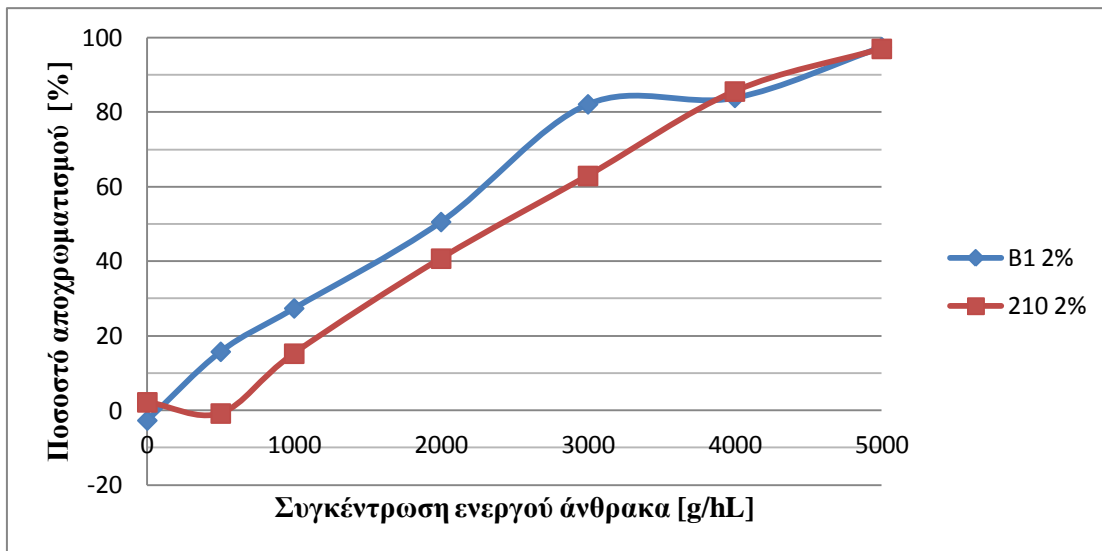


Γράφημα 7: Αποχρωματισμός των δειγμάτων με λακτοβάκιλλους χωρίς γλυκόζη (0%) με διάφορες συγκεντρώσεις ενεργού άνθρακα.

Στο Γράφημα 7 παρουσιάζεται η καμπύλη αποχρωματισμού των δειγμάτων που είχαν ζυμωθεί με λακτοβάκιλλους, χωρίς προσθήκη γλυκόζης. Η βέλτιστη συγκέντρωση ενεργού άνθρακα για τον αποχρωματισμό του δείγματος *B1 0%* είναι 3000 g/hL, όπως φαίνεται πολύ έντονα από την μπλε καμπύλη, όπου έχει επιτευχθεί 90% αποχρωματισμός. Υψηλότερες συγκεντρώσεις ενεργού άνθρακα δεν οδηγούν σε περαιτέρω αποχρωματισμό. Το δείγμα *210 0%* έφτασε σε ποσοστό αποχρωματισμού 85% όταν διηθήθηκε με ενεργό άνθρακα 4000 g/hL, η οποία φαίνεται να είναι και η βέλτιστη συγκέντρωση. Γενικά, το δείγμα *B1 0%* αποχρωματίστηκε περισσότερο από το δείγμα *210 0%* για τις ίδιες συγκεντρώσεις ενεργού άνθρακα, γεγονός που φαίνεται και στην Εικ. 23. Μόνο η διήθηση με τη μέγιστη συγκέντρωση ενεργού άνθρακα (5000 g/hL) αποχρωμάτισε το *210 0%* περισσότερο (97%) από το *B1 0%* (90%).



Εικόνα 23: Αποχρωματισμένα δείγματα *B1 0%* (αριστ.) και *210 0%* (δεξιά).



Γράφημα 8: Αποχρωματισμός των δειγμάτων με λακτοβάκιλλους και 2% w/v γλυκόζη με διάφορες συγκεντρώσεις ενεργού άνθρακα.

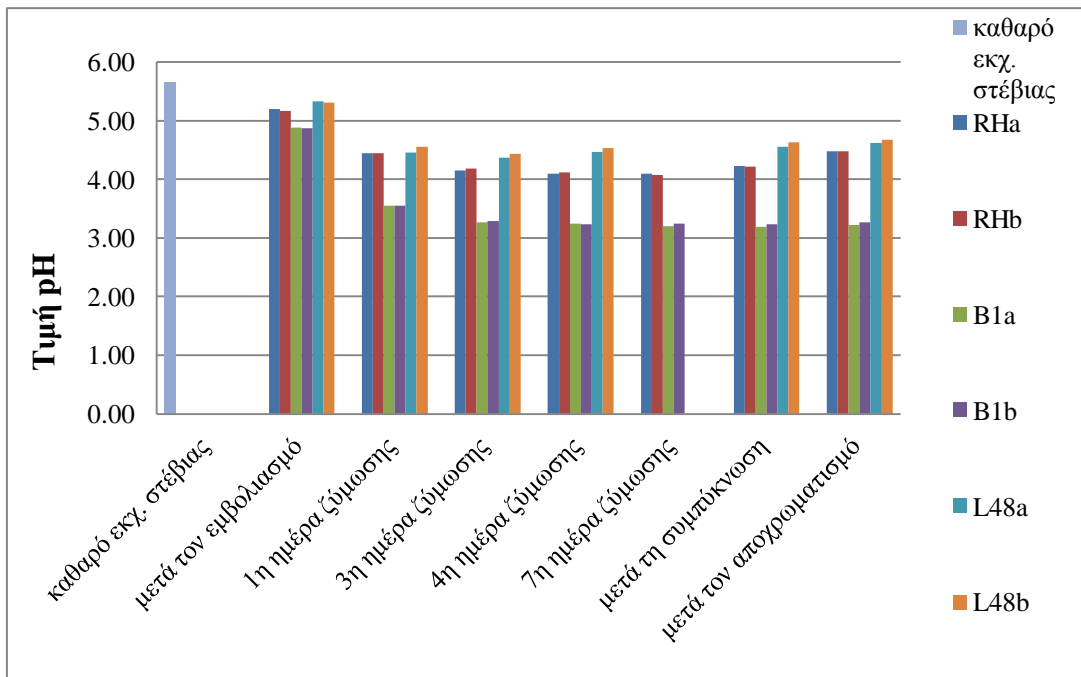
Όπως φαίνεται στο Γράφημα 8 η βέλτιστη συγκέντρωση ενεργού άνθρακα για τον αποχρωματισμό του δείγματος *B1 2%* είναι 3000 g/hL, όπου το δείγμα αποχρωματίστηκε κατά 82%. Χρησιμοποιώντας την ίδια συγκέντρωση στο δείγμα *210 2%* ο αποχρωματισμός που επιτεύχθηκε ήταν 62%. Η βέλτιστη συγκέντρωση για αυτό το δείγμα είναι 4000 g/hL. Και τα δύο δείγματα έφτασαν ποσοστό αποχρωματισμού σχεδόν 100% όταν διηθήθηκαν με ενεργό άνθρακα 5000 g/hL, όπως φαίνεται και στην Εικ. 24 όπου το τελευταίο δείγμα από τα *B1 2%* είναι σχεδόν άχρωμο.



Εικόνα 24: Αποχρωματισμένα δείγματα *B1 2%* (αριστ.) και *210 2%* (δεξιά).

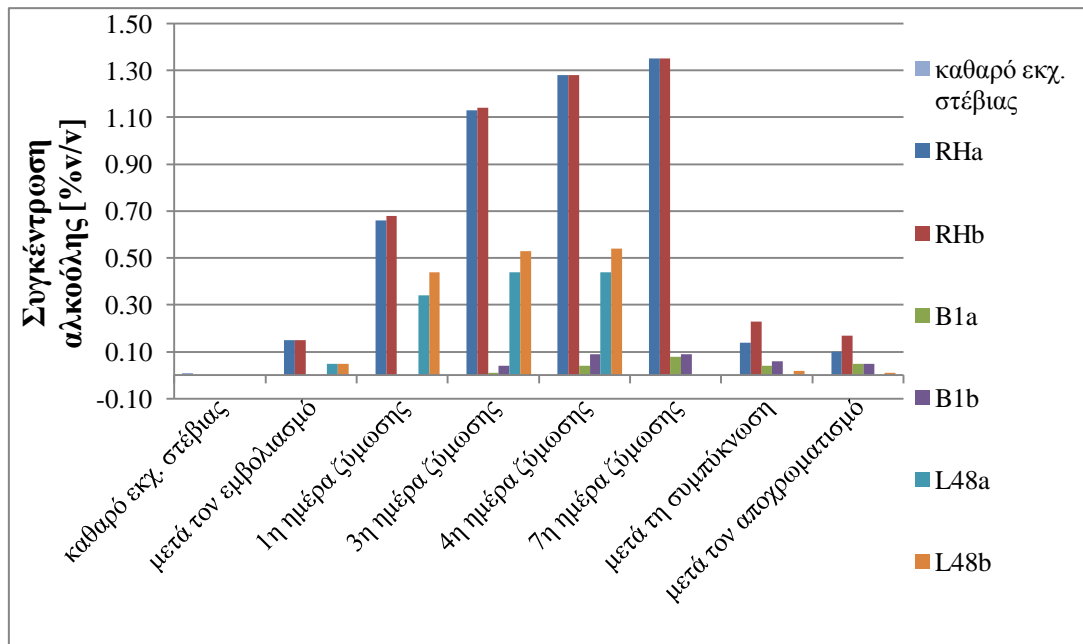
6.3 ΕΠΑΝΑΛΗΠΤΙΚΟ ΠΕΙΡΑΜΑ

Λαμβάνοντας υπόψη τα συμπεράσματα που ελήφθησαν από το κυρίως πείραμα, πραγματοποιήθηκε ένα επαναληπτικό πείραμα με τις βέλτιστες συνθήκες και συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων, όπως προέκυψαν από το κυρίως πείραμα. Πιο συγκεκριμένα, το κρύο εκχύλισμα γλυκοζιτών στεβιόλης ζυμώθηκε με δύο ζύμες (***RH*** και ***L48***) και με ένα λακτοβάκιλλο (***BI***). Η συγκέντρωση της γλυκόζης ήταν **4%** για τις ζύμες και **1%** για τους λακτοβάκιλλους, ενώ η ζύμωση έγινε εις διπλούν για κάθε μικροοργανισμό (δείγματα *RH_a*, *RH_b*, *BI_a*, *BI_b*, *L48_a*, *L48_b*). Η συμπύκνωση διήρκεσε 60 min και για τον αποχρωματισμό χρησιμοποιήθηκε ενεργός άνθρακας σε συγκέντρωση **3000 g/hL**, η οποία είχε προκύψει ως βέλτιστη για τα εκχυλίσματα που ζυμώθηκαν με αυτούς τους τρεις μικροοργανισμούς (*RH*, *L48*, *BI*) στο κυρίως πείραμα. Αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν μετά τον εμβολιασμό, την 1^η, 3^η, 4^η και 7^η ημέρα ζύμωσης, καθώς και μετά τη συμπύκνωση και τον αποχρωματισμό. Οι μετρήσεις της τιμής του pH, της συγκέντρωσης αλκοόλης, του φαινόμενου εκχυλίσματος και του χρώματος σε όλα τα στάδια του επαναληπτικού πειράματος παρουσιάζονται στα Γραφήματα 9-12. Ως πρώτο στάδιο σε κάθε Γράφημα παρουσιάζεται το καθαρό εκχύλισμα φύλλων στέβιας.



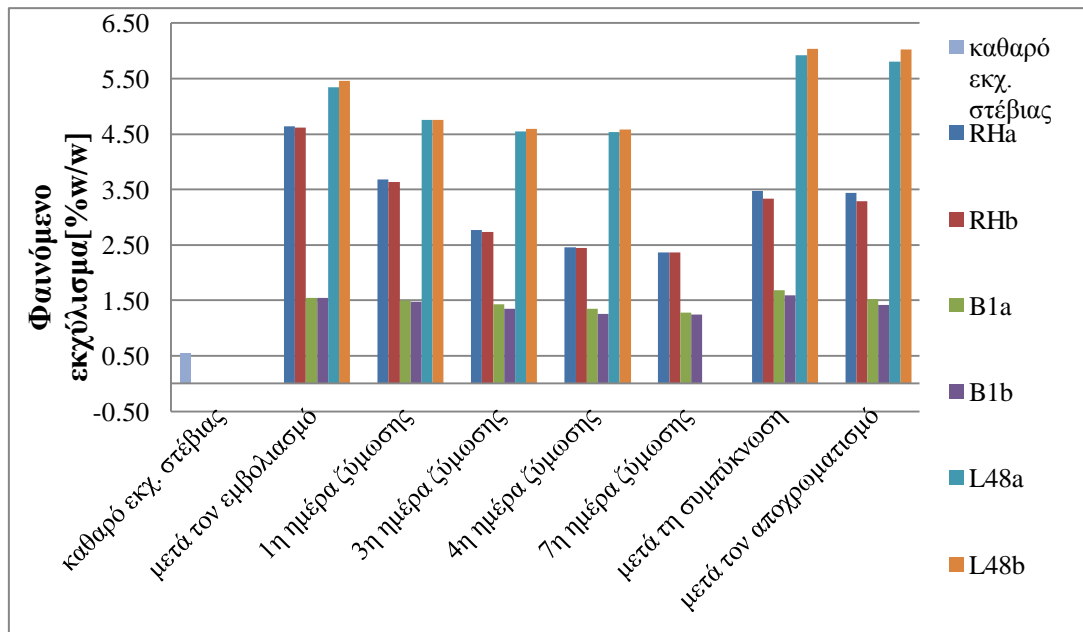
Γράφημα 9: Τιμές pH όλων των δειγμάτων σε όλα τα στάδια του επαναληπτικού πειράματος.

Όπως φαίνεται στο Γράφημα 9 η τιμή pH του εκχυλίσματος στέβιας (pH 5.66) μειώθηκε κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Αμέσως μετά τον εμβολιασμό των μικροοργανισμών τα δείγματα *B1* εμφανίζουν τις μικρότερες τιμές pH (4,9). Την 1^η ημέρα της ζύμωσης οι τιμές του pH των δειγμάτων με τους ζυμομύκητες *RH* και *L48* είναι κοντά στο 4.5, ενώ οι τιμές pH των δειγμάτων με λακτοβάκιλλο *B1* είναι κοντά στο 3.5. Η τιμή pH των δειγμάτων *L48* παραμένει σχεδόν σταθερή μέχρι το τέλος της ζύμωσης. Οι μικροοργανισμοί *RH* και *B1* προκάλεσαν περαιτέρω μείωση του pH και μετά από 7 ημέρες ζύμωσης οι τιμές του pH ατόν των δειγμάτων είναι περίπου 4.0 και 3.0 αντίστοιχα. Οι διεργασίες της συμπύκνωσης και του αποχρωματισμού δεν επηρέασαν την τιμή του pH των δειγμάτων *B1* και *L48*, αλλά ο αποχρωματισμός των δειγμάτων *RH* επέφερε αύξηση του pH ξανά κοντά στο 4.5.



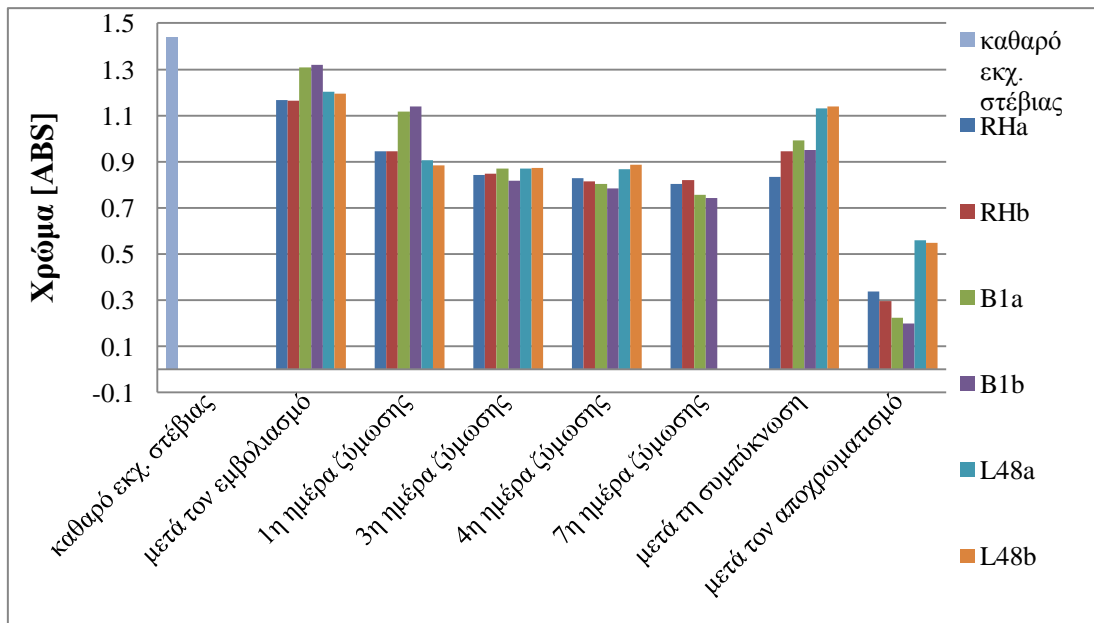
Γράφημα 10: Συγκέντρωση αλκοόλης όλων των δειγμάτων σε όλα τα στάδια του επαναληπτικού πειράματος.

Όπως παρουσιάζεται στο Γράφημα 10 -και όπως αναμενόταν- μόνο οι ζυμομύκητες (*RH* και *L48*) παράγουν αλκοόλη κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του εκχυλίσματος στέβιας, το οποίο δεν περιείχε καθόλου αλκοόλη αρχικά (0.01% v/v). Αμέσως μετά τον εμβολιασμό του εκχυλίσματος με τους διάφορους μικροοργανισμούς κανένα δείγμα δεν περιέχει περισσότερο από 0.15% αλκοόλη. Την 1^η ημέρα της ζύμωσης τα δείγματα *RH* περιέχουν περίπου 0.65% v/v και τα δείγματα *L48* 0.4% v/v αλκοόλης. Την 3^η ημέρα ζύμωσης η ζύμη *RH* προκάλεσε αύξηση της συγκέντρωσης αλκοόλης κατά 0.5%, ενώ η ζύμη *L48* κατά 0.1%. Την 4^η ημέρα τα δείγματα *RH* εμφανίζουν μικρή αύξηση 0.1%, ενώ η αλκοόλη των δειγμάτων *L48* παραμένει κοντά στο 0.5% v/v. Μετά από 7 ημέρες ζύμωσης τα δείγματα *RH* περιέχουν το περισσότερο αλκοόλ 1.35%, ενώ το εκχύλισμα στέβιας που ζυμώθηκε με τον λακτοβάκιλλο *B1* έφτασε σε συγκέντρωση αλκοόλης μόνο 0.1% v/v. Μετά τη συμπύκνωση στα δείγματα *RH* η συγκέντρωση αλκοόλης μειώθηκε πάνω από 1% και στα δείγματα *L48* κατά 0.5%. Όλα τα δείγματα περιέχουν λιγότερο από 0.3% v/v αλκοόλη, με το δείγμα *RHb* να εμφανίζει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση (0.23% v/v). Τέλος η διαδικασία του αποχρωματισμού δε μετέβαλε σημαντικά τη συγκέντρωση αλκοόλης κανενός δείγματος.



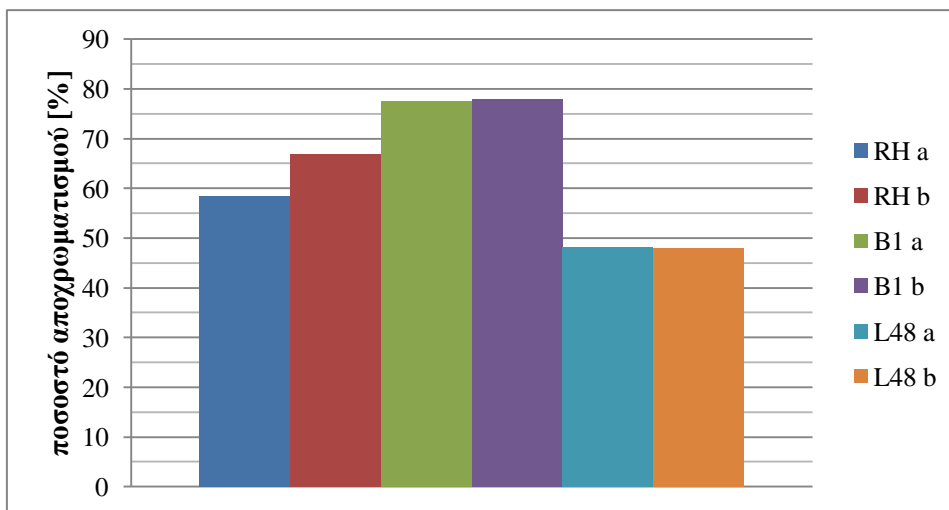
Γράφημα 11: Φαινόμενο εκχύλιση όλων των δειγμάτων σε όλα τα στάδια του επαναληπτικού πειράματος.

Όσον αφορά το φαινόμενο εκχύλιση, σύμφωνα με το Γράφημα 11, σε όλα τα δείγματα μειώνεται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και αυξάνεται πάλι μετά τη συμπύκνωση. Το φαινόμενο εκχύλιση του καθαρού εκχυλίσματος στέβιας είναι 0.5% w/w. Μετά τον εμβολιασμό τα δείγματα *RH* και *L48* με 4% γλυκόζη, έχουν το υψηλότερο φαινόμενο εκχύλιση, 4.5% w/w και 5.5% w/w αντίστοιχα. Την ίδια στιγμή τα δείγματα *BI* με 1% γλυκόζη, έχουν 1.5% w/w φαινόμενο εκχύλιση. Και οι 2 ζυμομύκητες (*RH* και *L48*) προκαλούν μείωση περίπου 1% στο φαινόμενο εκχύλιση την 1^η ημέρα της ζύμωσης. Τα δείγματα *RH* παρουσιάζουν περαιτέρω μείωση 1% την 3^η ημέρα ζύμωσης, και μία μικρότερη μείωση περίπου 0.5% μέχρι την 7^η ημέρα ζύμωσης (τελικό φαινόμενο εκχύλιση 2.4% w/w). Τα δείγματα *L48* έχουν περίπου σταθερό φαινόμενο εκχύλιση (4.5% w/w) μέχρι την 4^η ημέρα ζύμωσης. Τα δείγματα *BI* εμφανίζουν συνολική μείωση περίπου 0.25% μετά από 7 ημέρες ζύμωσης. Μετά τη συμπύκνωση μία αύξηση του φαινόμενου εκχυλίσματος, περίπου 1%, 1.5% και 0.4%, μπορεί να παρατηρηθεί στα *RH*, *L48* και *BI* αντίστοιχα. Η διαδικασία του αποχρωματισμού δεν επηρεάζει το φαινόμενο εκχύλιση των δειγμάτων.



Γράφημα 12: Χρώμα των δειγμάτων σε όλα τα στάδια του επαναληπτικού πειράματος.

Σύμφωνα με το Γράφημα 12 η ζύμωση με όλους τους μικροοργανισμούς προκάλεσε μία μείωση στο χρώμα του εκχυλίσματος στέβιας (1.44 ABS). Αμέσως μετά τον εμβολιασμό το χρώμα των δειγμάτων με ζύμες (*RH* και *L48*) είναι περίπου 1.2 ABS και το χρώμα των δειγμάτων με λακτοβάκιλλο *B1* είναι περίπου 1.3 ABS. Την 1^η ημέρα της ζύμωσης το χρώμα των ζυμομυκήτων μειώθηκε στα 0.9 ABS και το χρώμα των λακτοβάκιλλων στα 1.1 ABS. Την 3^η ημέρα ζύμωσης τα δείγματα *B1* παρουσιάζουν περαιτέρω απώλεια χρώματος και πλησιάζουν το χρώμα των ζυμομυκήτων ανάμεσα σε 0.8 και 0.9 ABS. Μέχρι το τέλος της ζύμωσης δεν παρατηρείται σημαντική μεταβολή του χρώματος σε κανένα από τα δείγματα. Η διαδικασία της συμπύκνωσης προκάλεσε αύξηση του χρώματος όλων των δειγμάτων, αλλά την εντονότερη αύξηση, 0.28 ABS, παρουσιάζουν τα δείγματα *L48*. Μετά τον αποχρωματισμό τα δύο αυτά δείγματα έχουν ακόμα τη μεγαλύτερη τιμή χρώματος από όλα (0.56 ABS), ενώ ακολουθούν τα δείγματα *RH* με χρώμα 0.32 ABS και τέλος οι λακτοβάκιλλοι που αποχρωματίστηκαν μέχρι τα 0.2 ABS.



Γράφημα 13: Ποσοστό αποχρωματισμού όλων των δειγμάτων με ενεργό άνθρακα 3000 g/hL.

Σύμφωνα με το Γράφημα 13 τα δείγματα *B1* παρουσιάζουν το μεγαλύτερο ποσοστό αποχρωματισμού, περίπου 78%, ενώ τα δείγματα *L48* αποχρωματίστηκαν λιγότερο από όλα, μόνο 48%. Αυτή η διαφορά στο τελικό χρώμα είναι εμφανής και στην Εικ. 25, όπου παρουσιάζονται όλα τα δείγματα πριν και μετά τον αποχρωματισμό. Συγκεκριμένα στην Εικ.24 βρίσκεται το κάθε αποχρωματισμένο δείγμα στα δεξιά του μη αποχρωματισμένου όμοιου δείγματος. Όπως φαίνεται στην εικόνα, όπου από αριστερά προς τα δεξιά είναι τα ζεύγη δειγμάτων *B1*, *RH*, *L48*, το αποχρωματισμένο δείγμα *B1* είναι πολύ πιο ανοιχτόχρωμο από το αποχρωματισμένο δείγμα *L48*. Αξιοσημείωτο είναι ότι, όπως φαίνεται στο Γρ.13., τα δείγματα *RH_a* και *RH_b* έφτασαν σε διαφορετικό ποσοστό αποχρωματισμού, 58% και 67% αντίστοιχα, ενώ τα υπόλοιπα όμοια δείγματα *a* και *b* δεν εμφανίζουν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους.

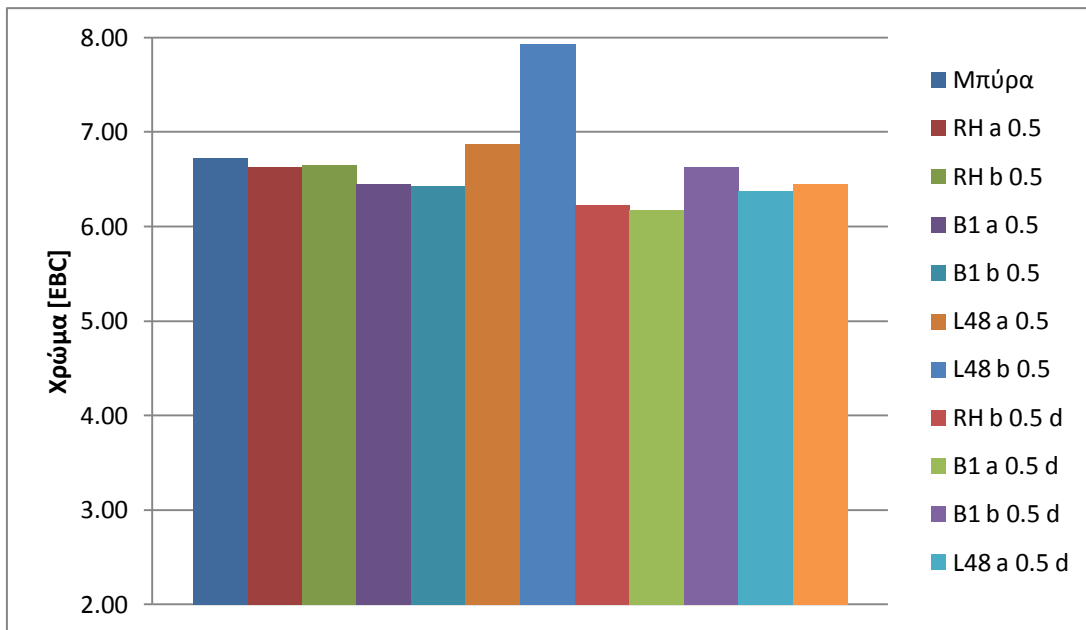


Εικόνα 25: Μη αποχρωματισμένα (αριστ.) και αποχρωματισμένα (δεξιά) δείγματα *B1_b*, *RH_b* και *L48_a*.

6.4 ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

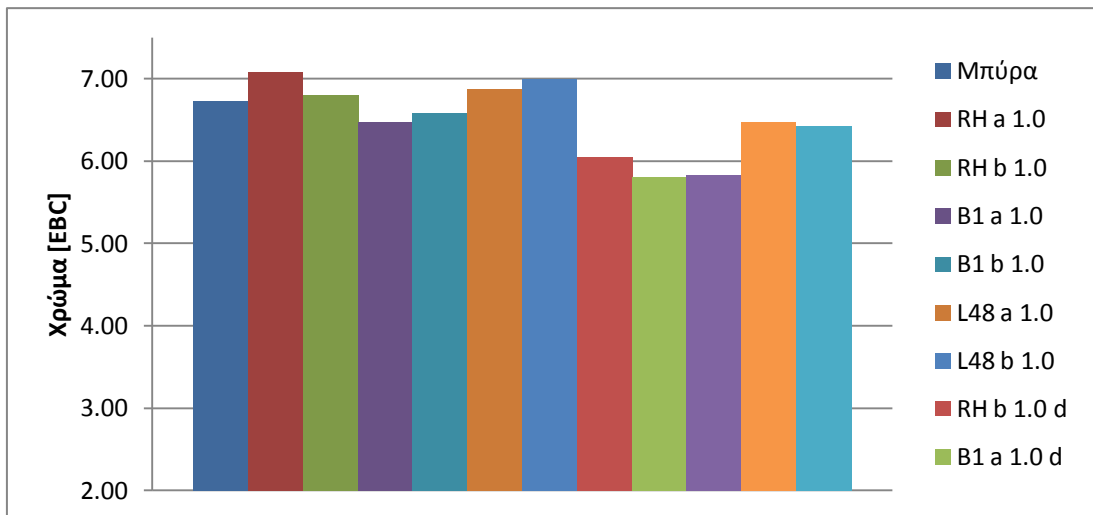
Τα δείγματα εκχυλίσματος στέβιας που παρήχθησαν στο κυρίως πείραμα προστέθηκαν σε μύρα ώστε να πραγματοποιηθεί οργανοληπτικός έλεγχος. Το εκχύλισμα προστέθηκε σε συγκεντρώσεις 0.5 και 1.0 mL εκχ. στέβιας/10 mL μύρας, γιατί αυτές οι δύο συγκεντρώσεις μετά από την πρώτη δοκιμή που έγινε στο δείγμα L48disc. (βλ. Παρ.5.4 και Πίν. 11) είχαν την πιο αποδεκτή γλυκιά γεύση.

Η μύρα που χρησιμοποιήθηκε για τον οργανοληπτικό έλεγχο ήταν *Pilsner*. Συνολικά, δοκιμάστηκαν 24 διαφορετικά δείγματα μύρας -2 συγκεντρώσεις για κάθε ένα από τα 6 αποχρωματισμένα και τα 6 μη αποχρωματισμένα εκχυλίσματα στέβιας- και αξιολογήθηκαν σε σύγκριση με την καθαρή μύρα *Pilsner*. Πρώτα, στα Γρ.14-23 παρουσιάζονται οι μετρήσεις που ελήφθησαν από τις ενόργανες μετρήσεις του χρώματος, της τιμής του pH, της συγκέντρωσης αλκοόλης, του φαινομένου εκχυλίσματος, και των θερμίδων των δειγμάτων μύρας που δοκιμάστηκαν στον οργανοληπτικό έλεγχο. Τα δείγματα μύρας που περιέχουν 0.5 mL εκχ./10 mL μύρας και τα δείγματα μύρας που περιέχουν 1.0 mL εκχ./10 mL μύρας παρουσιάζονται σε ξεχωριστά Γραφήματα. Πρώτο δείγμα, ως «τυφλό», σε κάθε Γράφημα είναι η καθαρή μύρα *Pilsner*.



Γράφημα 14: Χρώμα (EBC) των δειγμάτων του οργανοληπτικού με 0.5 mL εκχ. γλυκοζιτών στεβιόλης/10 mL μύρα..

Όπως φαίνεται στο Γράφημα 14, το χρώμα της καθαρής μύρας είναι 6.75 EBC. Η ανάμιξη με μη αποχρωματισμένο εκχύλισμα στέβιας που ζυμώθηκε με τους μικροοργανισμούς *RH* και *B1* ουσιαστικά δεν προκάλεσε μεταβολή του χρώματος της μύρας. Μόνο η μύρα με μη αποχρωματισμένο εκχύλισμα στέβιας *L48b* έχει μεγαλύτερη τιμή χρώματος (7.5 EBC). Όπως φαίνεται και στην Εικ. 26 το συγκεκριμένο δείγμα έχει εμφανώς πιο σκούρο χρώμα από τη μύρα. Όλα τα δείγματα με αποχρωματισμένο εκχύλισμα στέβιας είχαν ελαφρώς χαμηλότερη τιμή χρώματος από την καθαρή μύρα, αλλά η διαφορά δεν ξεπέρασε τις 5 EBC.

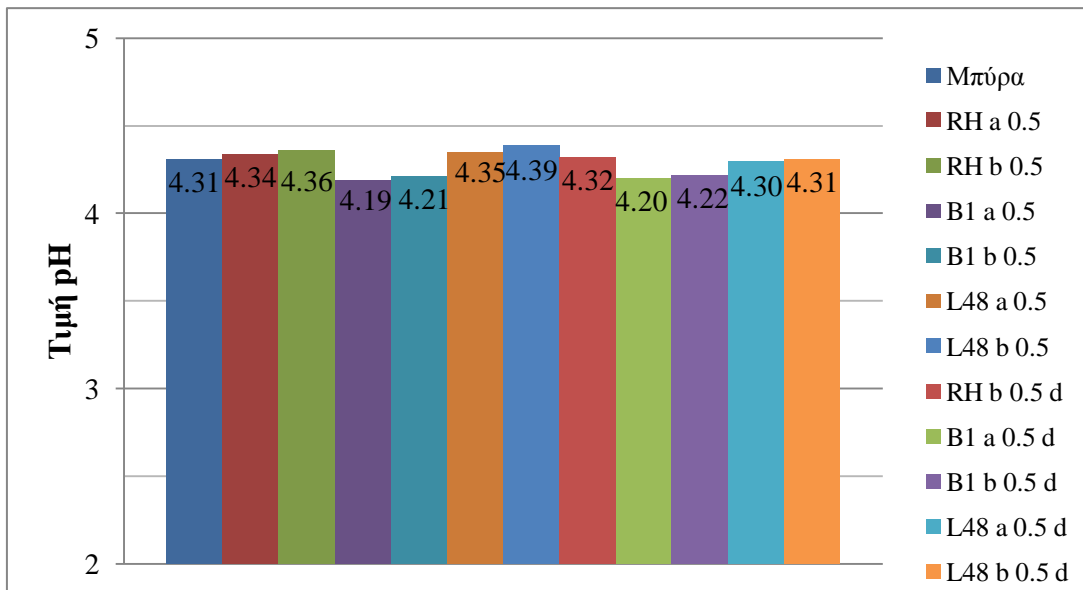


Γράφημα 15: Χρώμα (EBC) των δειγμάτων του οργανοληπτικού με 1.0 mL εκχ. γλυκοζιτών στεβιόλης/10 mL μύρα.

Σύμφωνα με το Γράφημα 15 όλες οι μύρες που αναμιχθηκαν με μη αποχρωματισμένο εκχύλισμα στέβιας έχουν παραπλήσιο χρώμα (χρώμα:6.75 EBC), γεγονός που φαίνεται και στην Εικ.26. Όλα τα δείγματα μύρας με αποχρωματισμένο εκχύλισμα στέβιας έχουν μικρότερη τιμή χρώματος από την καθαρή μύρα, με τα δείγματα *B1* να εμφανίζουν το μικρότερο χρώμα (5.75 EBC).

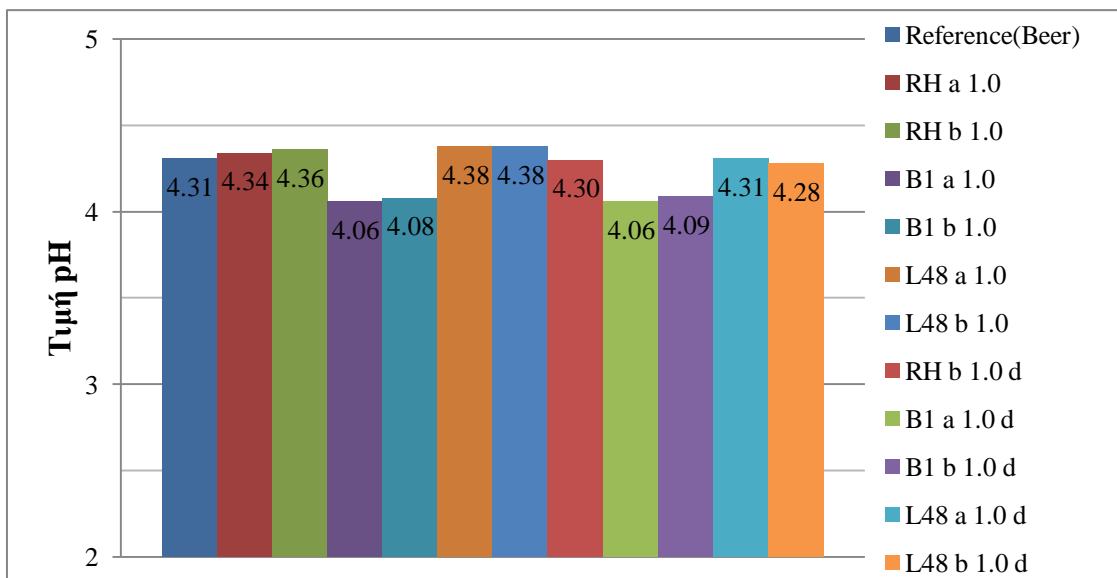


Εικόνα 26: Δείγματα οργανοληπτικού ελέγχου (αριστ.: 0.5 mL εκχ. *L48_b disc*./10 mL μύρα, μέση: καθαρή μύρα, δεξιά: μύρα με 0.5 mL εκχ. *L48_{b non-disc}*./10 mL μύρα)



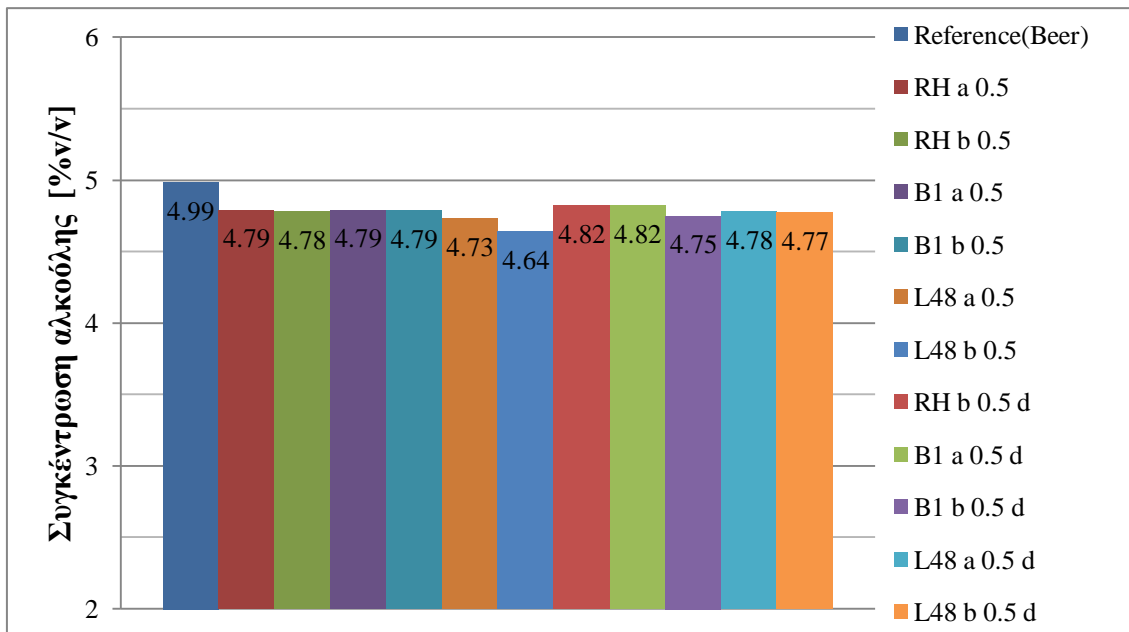
Γράφημα 16: Τιμή pH των δειγμάτων του οργανοληπτικού με 0.5 mL εκχύλισμα γλυκοζιτών στεβιόλης/10 mL μπύρα.

Στα δείγματα μετρήθηκε και η τιμή του pH. Σύμφωνα με το Γράφημα 16 η τιμή του pH όλων των δειγμάτων μπύρας με 0.5 mL εκχύλισμα γλυκοζιτών στεβιόλης/10 mL μπύρα είναι παραπλήσια της τιμής pH του δείγματος καθαρής μπύρας (pH=4.31). Το εκχύλισμα στέβιας που είχε ζυμωθεί με λακτοβάκιλλο *B1* προκαλεί μείωση του pH της μπύρας κατά 0.1, ενώ το εκχύλισμα που είχε ζυμωθεί με ζύμες διατηρεί το ίδιο pH ή το αυξάνει ελάχιστα, χωρίς όμως να ξεπερνάει ποτέ την τιμή pH=4.39 (δείγμα *L48_b*). Δεν υπάρχει αξιοσημείωτη διαφορά στην τιμή του pH μεταξύ των αποχρωματισμένων και των μη αποχρωματισμένων εκχυλισμάτων στέβιας που προστέθηκαν στη μπύρα.



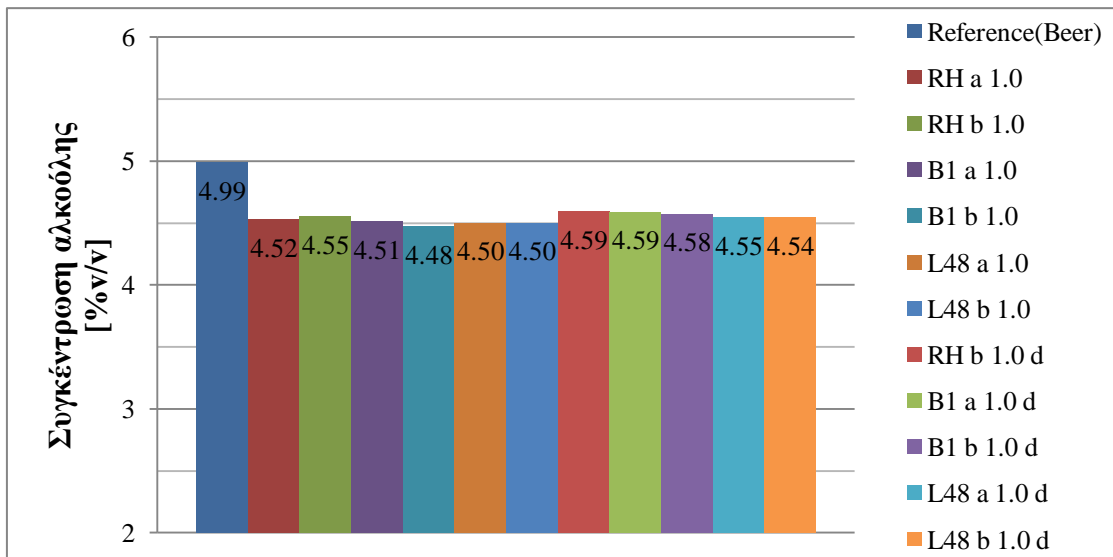
Γράφημα 17: Τιμή pH των δειγμάτων του οργανοληπτικού με 1.0 mL εκχ. γλυκοζιτών στεβιόλης/10 mL μύρα.

Στο Γράφημα 17 φαίνεται ότι η μύρα που αναμίχθηκε με εκχύλισμα στέβιας ζυμωμένο με το λακτοβάκιλλο *B1*, έχει χαμηλότερη τιμή pH από τη μύρα που αναμίχθηκε με εκχύλισμα ζυμωμένο με ζύμες. Τα δείγματα μύρας με εκχύλισμα στέβιας ζυμωμένο με τις ζύμες *RH* και *L48* έχουν σχεδόν ίδια τιμή pH με την καθαρή μύρα (pH=4.31). Η μεγαλύτερη τιμή pH είναι των δειγμάτων *L48* (pH=4.38). Αντίθετα, η προσθήκη εκχυλίσματος στέβιας που ζυμώθηκε με *B1* προκαλεί μία ελαφρά μείωση της τιμής του pH της μύρας περίπου κατά 0.25 μονάδες.



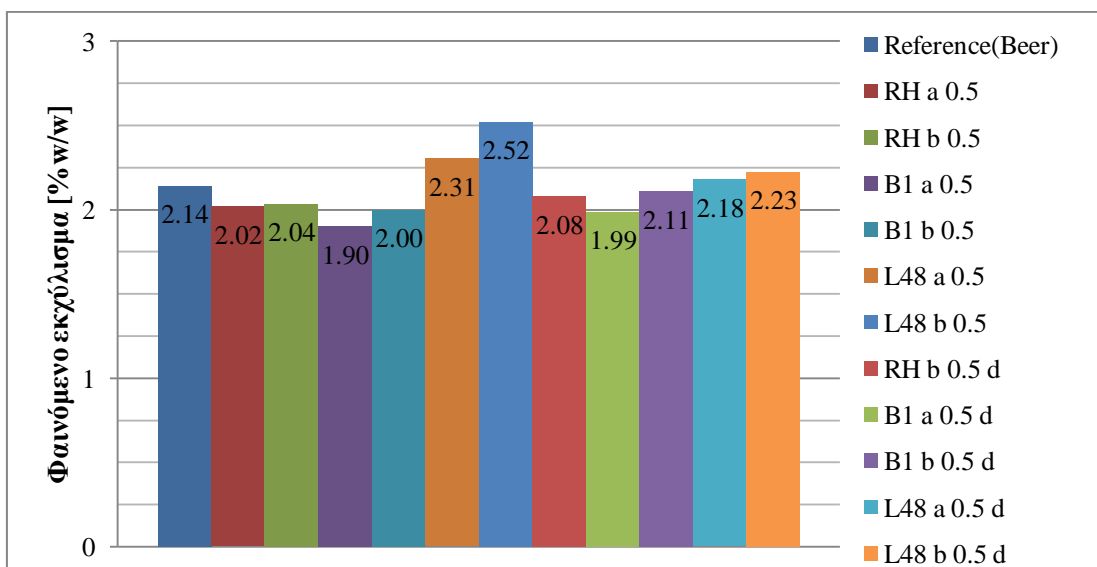
Γράφημα 18: Συγκέντρωση αλκοόλης των δειγμάτων του οργανοληπτικού με 0.5 mL εκχύλισμα γλυκοζιτών στεβιόλης/10 mL μύρα.

Σύμφωνα με το Γράφημα 18 η καθαρή μύρα περιέχει 4.99% αλκοόλ. Όλα τα υπόλοιπα δείγματα μύρας, στα οποία έχει προστεθεί 0.5 mL εκχύλισμα γλυκοζιτών στεβιόλης/10 mL μύρα περιέχουν λιγότερο αλκοόλ, περίπου 4.8%. Τη μεγαλύτερη μείωση στη συγκέντρωση αλκοόλης προκάλεσε το εκχύλισμα στέβιας ζυμωμένο με L48, με τελική συγκέντρωση αλκοόλης 4.64% v/v.



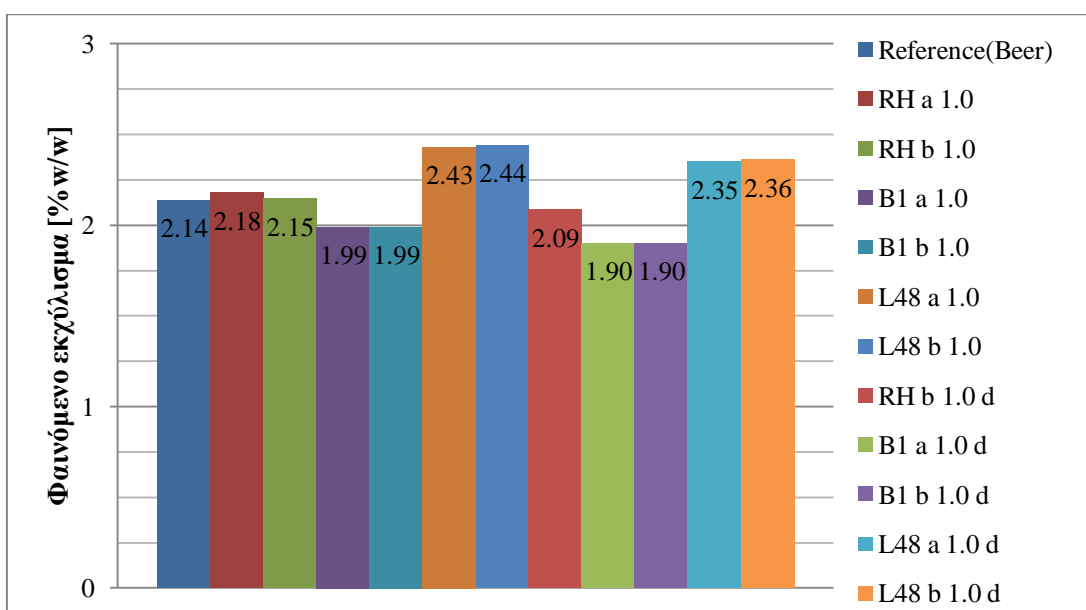
Γράφημα 19: Συγκέντρωση αλκοόλης των δειγμάτων του οργανοληπτικού με 1.0 mL εκχ. γλυκοζιτών στεβιόλης/10 mL μύρα.

Σύμφωνα με το Γράφημα 19 η προσθήκη 1.0 mL εκχ. στέβιας/10 mL μύρα οδήγησε σε μεγαλύτερη μείωση της συγκέντρωσης της αλκοόλης, κατά 0.4-0.5%. Μπορεί επίσης να παρατηρηθεί, ότι όλα τα αποχρωματισμένα δείγματα περιέχουν περισσότερο αλκοόλ από τα αντίστοιχα μη αποχρωματισμένα, αλλά η διαφορά μεταξύ τους δεν ξεπερνά το 0,1%.



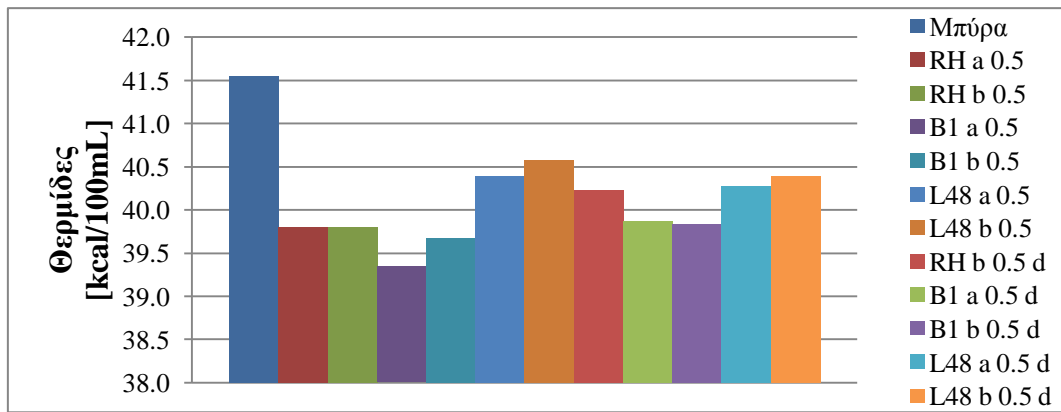
Γράφημα 20: Φαινόμενο εκχύλισμα των δειγμάτων του οργανοληπτικού με 0.5 mL εκχύλισμα γλυκοζιτών στεβιόλης/10 mL μύρα.

Όπως παρουσιάζεται στο Γράφημα 20, το φαινόμενο εκχύλισμα της καθαρής μύρας είναι 2.14% w/w. Αυτή η τιμή μεταβάλλεται με την προσθήκη εκχυλίσματος στέβιας στη μύρα. Μόνο τα δείγματα *L48* εμφανίζουν μεγαλύτερο φαινόμενο εκχύλισμα από την καθαρή μύρα (έως και 2.52%) και μάλιστα τα μη αποχρωματισμένα δείγματα μεγαλύτερο από τα αποχρωματισμένα. Αντίθετα, στα υπόλοιπα δείγματα η ανάμιξη με εκχύλισμα στέβιας μείωσε το φαινόμενο εκχύλισμα της μύρας, με μικρότερη τιμή την 1.90% στο μη αποχρωματισμένο δείγμα *B1_a*.



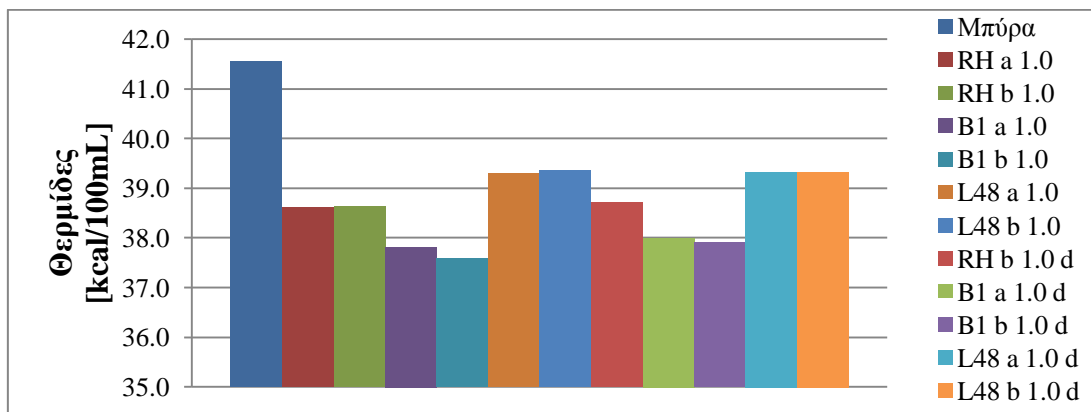
Γράφημα 21: Φαινόμενο εκχύλισμα των δειγμάτων του οργανοληπτικού με 1.0 mL εκχ. γλυκοζιτών στεβιόλης/10 mL μύρα.

Στο Γράφημα 21 φαίνεται πως η μύρα με εκχύλισμα στέβιας που ζυμώθηκε με ζυμομύκητες έχει μεγαλύτερο φαινόμενο εκχύλισμα από αυτή που ζυμώθηκε με λακτοβάκιλλο. Την υψηλότερη τιμή φαινομένου εκχυλίσματος έχουν τα μη αποχρωματισμένα δείγματα *L48* (2.44%), ενώ τη χαμηλότερη τα αποχρωματισμένα δείγματα *B1* (1.90%). Γενικά μπορεί να παρατηρηθεί, ότι η μύρα που αναμίχθηκε με τα αποχρωματισμένα δείγματα έχει χαμηλότερο φαινόμενο εκχύλισμα από τη μύρα με τα αντίστοιχα μη αποχρωματισμένα δείγματα.



Γράφημα 22: Θερμίδες των δειγμάτων του οργανοληπτικού με 0.5 mL εκχύλισμα γλυκοζιτών στεβιόλης/10 mL μύρα.

Σύμφωνα με το Γράφημα 22 οι θερμίδες που περιέχει η καθαρή μύρα είναι 41.5 kcal/100mL. Με την προσθήκη 0.5 mL εκχύλισμα γλυκοζιτών στεβιόλης/10 mL μύρα όλων των ειδών ζύμωσης οι θερμίδες μειώνονται. Τις λιγότερες θερμίδες (39.3 kcal/100mL) περιέχει η μύρα με το μη αποχρωματισμένο εκχύλισμα στέβιας που ζυμώθηκε με *B1*. Τις περισσότερες θερμίδες ανάμεσα στις μύρες αναμεμιγμένες με εκχύλισμα στέβιας περιέχουν τα δείγματα *L48* (περίπου 40.6 kcal/100mL).



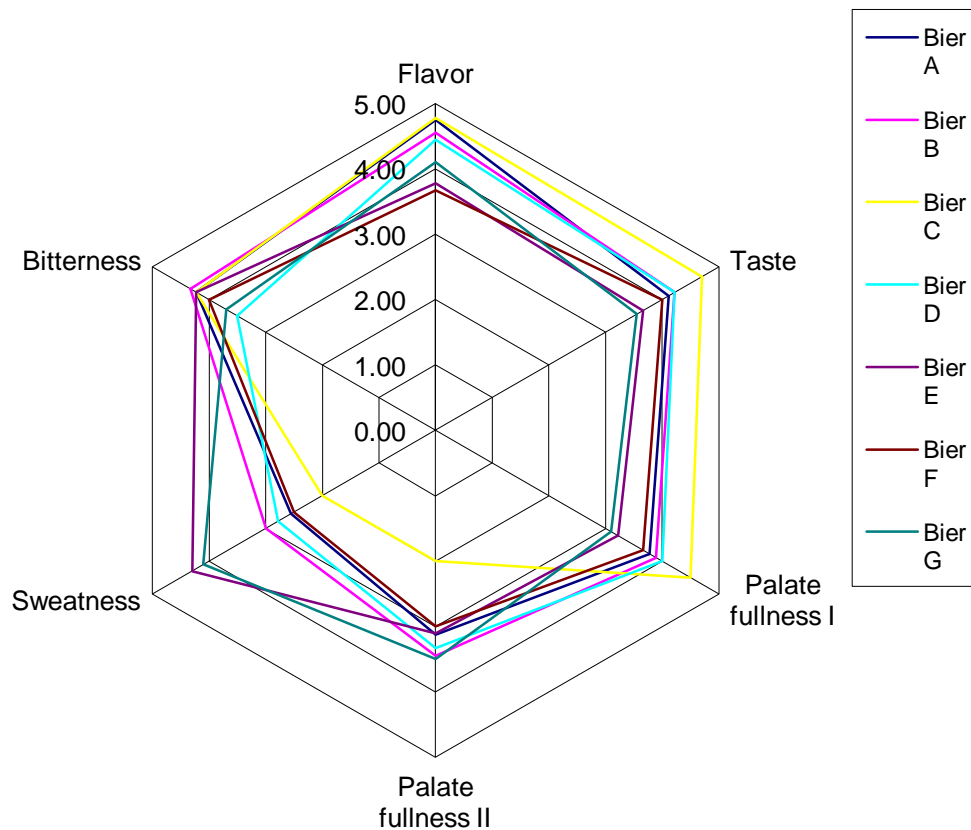
Γράφημα 23: Θερμίδες των δειγμάτων του οργανοληπτικού με 1.0 mL εκχ. γλυκοζιτών στεβιόλης/10 mL μύρα.

Όπως φαίνεται στο Γράφημα 23 –και όπως αναμενόταν– όλες οι μύρες που αναμίχθηκαν με 1.0 mL εκχύλισμα γλυκοζιτών στεβιόλης/10 mL μύρα περιέχουν λιγότερες θερμίδες από την καθαρή μύρα, που περιέχει 41.5 kcal/100 mL. Η διαφορά αυτή κυμαίνεται από περίπου 2 kcal/100 mL για τα δείγματα *L48* έως και 4 kcal/100 mL για τα δείγματα *B1*.

Ακολουθούν οι πίνακες και τα Γραφήματα αξιολόγησης των δειγμάτων του οργανοληπτικού ελέγχου. Κάθε αραχνοειδές Γράφημα αφορά τα δείγματα μύρας με τις δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις εκχυλίσματος στέβιας όμοιας ζύμωσης, δηλαδή το αποχρωματισμένο και μη αποχρωματισμένο δείγμα εκχυλίσματος στέβιας, που είχαν ζυμωθεί με τον ίδιο μικροοργανισμό, εις διπλούν και προστέθηκαν στη μύρα σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις, 0.5mL/10mL και 1.0mL/10mL. Η αξιολόγηση έγινε στην κλίμακα 0-5. Η λεπτομερής περιγραφή της κλίμακας αξιολόγησης παρουσιάζεται στον Πιν. 17.

Πίνακας 17: Περιγραφή κλίμακας αξιολόγησης του οργανοληπτικού ελέγχου.

	Άρωμα	Καθαρότητα της γεύσης	Πλήρωση στόματος (χαρακτηριστική προϊόντος)	Πλήρωση στόματος (ένταση)	Γλυκύτητα	Ποιότητα πικρής γεύσης
5	καθαρό	καθαρή	τυπική του είδους μύρας	πολύ έντονη πλήρωση στόματος	υπερβολικά γλυκιά	πολύ καλή
4	ακόμα καθαρό	ακόμα καθαρή	τυπική	μεγάλη πλήρωση στόματος	πολύ γλυκιά	καλή
3	μικρές αποκλίσεις στο άρωμα	μικρές αποκλίσεις στη γεύση	λίγο τυπική	καλύτερη πλήρωση στόματος	κάπως γλυκιά	παραμένει κάπως στο τέλος
2	έντονες αποκλίσεις στο άρωμα	έντονες αποκλίσεις στη γεύση	όχι τυπική	κανονική πλήρωση στόματος	κανονική γλυκύτητα	παραμένει στο τέλος
1	ξεκάθαρες αποκλίσεις στο άρωμα	ξεκάθαρες αποκλίσεις στη γεύση	καθόλου τυπική	χαμηλότερη πλήρωση στόματος	λιγότερο γλυκιά	παραμένει έντονα στο τέλος



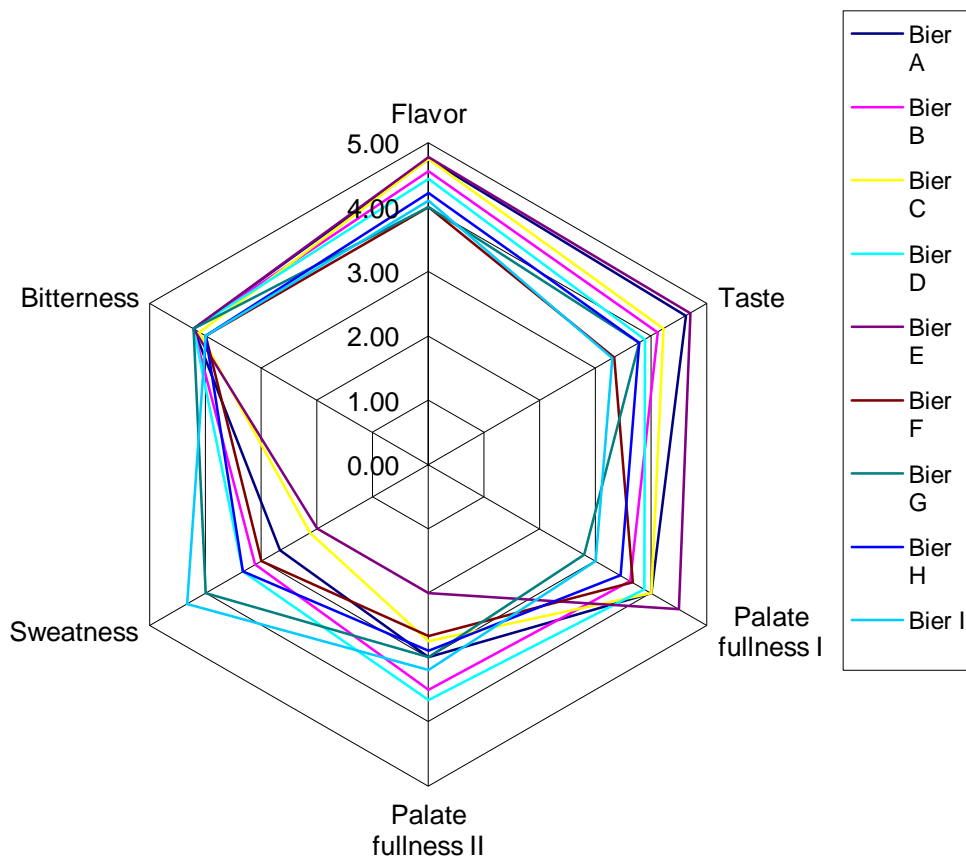
Γράφημα 24: Αξιολόγηση των δειγμάτων μύρας με προσθήκη εκχυλίσματος γλυκοζιτών στεβιόλης ζυμωμένο με τη ζύμη *RH*.

Πίνακας 18: Κωδικοποίηση των δειγμάτων *RH* του οργανοληπτικού ελέγχου

Μπόρα	Δείγμα
Bier A	RHb 0.5d
Bier B	RHb 1.0d
Bier C	Reference
Bier D	RHa 0.5
Bier E	RHa 1.0
Bier F	RHb 0.5
Bier G	RHb 1.0

Στο Γράφημα 24 παρουσιάζεται η αξιολόγηση των δειγμάτων μύρας που περιείχαν εκχύλισμα γλυκοζιτών στεβιόλης που ζυμώθηκε με τη ζύμη *RH*. Στον Πίν.18 παρουσιάζεται η κωδικοποίηση των δειγμάτων του Γρ.24 (αντιστοιχία μύρας A-G με δείγμα *RH* που προστέθηκε). Όπως φαίνεται, όλα τα δείγματα είναι πιο γλυκά και έχουν καλύτερη πλήρωση στόματος από την καθαρή μύρα *Pilsner* (*bier C*). Τα δείγματα μύρας με μη αποχρωματισμένο εκχύλισμα γλυκοζιτών στεβιόλης που είχε ζυμωθεί με τη ζύμη *RH* (1.0 mL εκχ./10 mL μύρα) αξιολογήθηκαν ως «πολύ γλυκά», η μύρα με την ίδια συγκέντρωση σε

αποχρωματισμένο δείγμα RH_b χαρακτηρίστηκε ως «κάπως γλυκό» και τα 3 δείγματα με 0.5 mL εκχύλισμα γλυκοζιτών στεβιόλης/10 mL μύρα πλησίαζαν περισσότερο την κανονική γλυκύτητα της μύρας. όλα τα δείγματα είχαν βελτιωμένη πλήρωση στόματος, η οποία αξιολογήθηκε από τους δοκιμαστές ως «λιγότερο- όχι τυπική» από αυτή της καθαρής μύρας. Τη μεγαλύτερη απόκλιση παρουσίασαν τα δείγματα μύρας με 1.0 mL εκχ. $RH/10$ mL μύρα. Αυτά τα δύο δείγματα δεν έχουν και τόσο ξεκάθαρη γεύση κατά τους δοκιμαστές, χωρίς όμως να εμφανίζουν αποκλίσεις. Στα υπόλοιπα δείγματα οι δοκιμαστές αναγνώριζαν ακόμα την καθαρότητα της γεύσης, παρά την ανάμιξη με εκχύλισμα γλυκοζιτών στεβιόλης. Το ίδιο καθαρό κρίνουν οι δοκιμαστές το άρωμα των δειγμάτων, ενώ και η πικρή γεύση φαίνεται να είναι «καλή», όμοια με τη μύρα αναφοράς.



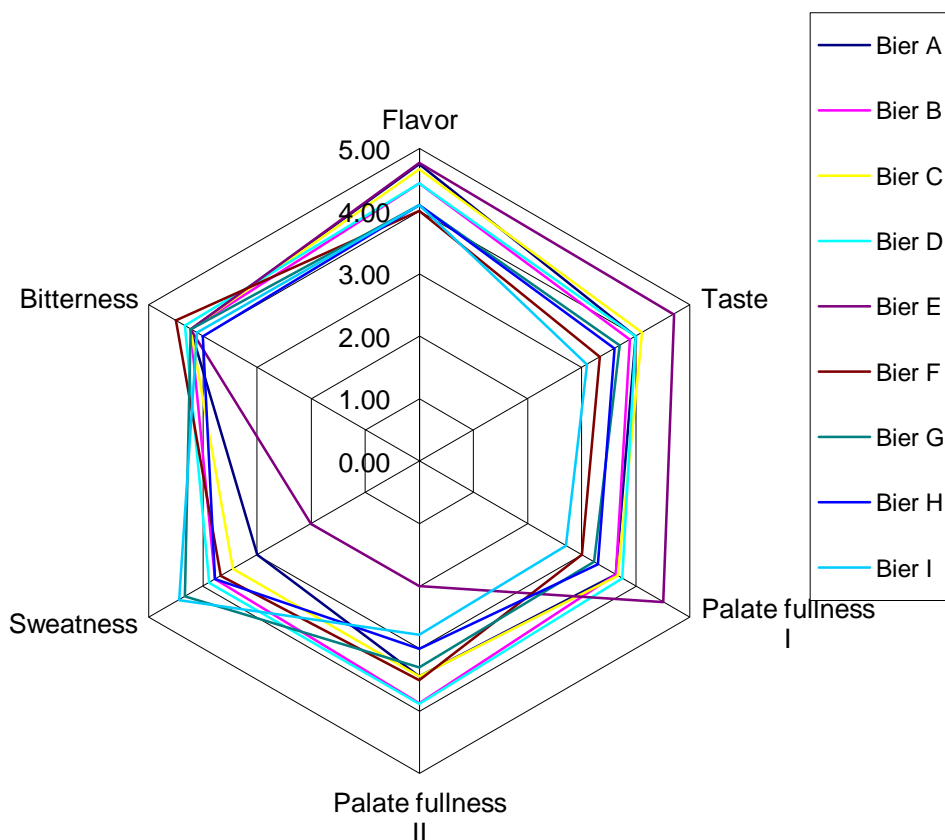
Γράφημα 25: Αξιολόγηση των δειγμάτων μύρας με προσθήκη εκχυλίσματος γλυκοζιτών στεβιόλης ζυμωμένο με τη ζύμη L48.

Πίνακας 19: Κωδικοποίηση των δειγμάτων L48 του οργανοληπτικού ελέγχου

Μπύρα	Δείγμα
Bier A	L48a 0.5d
Bier B	L48a 1.0d
Bier C	L48b 0.5d
Bier D	L48b 1.0d
Bier E	Reference
Bier F	L48a 0.5
Bier G	L48a 1.0
Bier H	L48b 0.5
Bier I	L48b 1.0

Στο Γράφημα 25 παρουσιάζεται η αξιολόγηση των δειγμάτων μύρας που περιείχαν εκχύλιση στέβιας ζυμωμένο με L48. Στον Πίν.19 παρουσιάζεται η κωδικοποίηση των δειγμάτων του Γρ.25 (αντιστοιχία μύρας Α-Ι με δείγμα L48 που προστέθηκε). Όπως και στο προηγούμενο Γράφημα η γλυκύτητα όλων των δειγμάτων είναι μεγαλύτερη και η πλήρωση στόματος καλύτερη από αυτή της καθαρής μύρας. Συγκεκριμένα, τα μη αποχρωματισμένα εκχυλίσματα γλυκοζιτών στεβιόλης που προστέθηκαν σε συγκέντρωση 1.0 mL εκχ./10 mL μύρα ήταν εξαιρετικά γλυκά, ενώ τα περισσότερα από τα υπόλοιπα χαρακτηρίστηκαν «κάπως γλυκά». Μόνο η μύρα με το αποχρωματισμένο δείγμα L48_b (0.5 mL εκχ. γλυκοζιτών στεβιόλης/10 mL μύρα)

πλησιάζει την κανονική γλυκύτητα της καθαρής μύρας. Η πλήρωση στόματος κυμαίνεται μεταξύ καλύτερης και μεγαλύτερης από αυτή της μύρας αναφοράς για όλα τα δείγματα, ενώ χαρακτηρίστηκε ως «λίγο τυπική» για τα περισσότερα, μέχρι και «όχι τυπική» για την υψηλή συγκέντρωση των μη αποχρωματισμένων. Οι δοκιμαστές έκριναν τη γεύση στα περισσότερα δείγματα «ακόμα καθαρή». Η μύρα με το αποχρωματισμένο δείγμα *L48_a* (0.5 mL εκχύλισμα γλυκοζιτών στεβιόλης/10 mL) μύρα πλησιάζει περισσότερο τη γεύση της καθαρής μύρας, ενώ τη μεγαλύτερη απόκλιση με ίσως κάποια λάθη στην καθαρότητα της γεύσης παρουσιάζουν τα δείγματα *L48_a* 1.0d *L48_b* 1.0. Το άρωμα κανενός δείγματος δεν έχει «λάθη», ενώ πολλά πλησιάζουν σε καθαρότητα αρώματος της μύρας αναφοράς. Τέλος στην πικρή γεύση δεν παρατηρούνται αξιοσημείωτες διαφορές μεταξύ της καθαρής μύρας και αυτής αναμεμιγμένης με εκχύλισμα ζυμωμένο με *L48*.



Γράφημα 26: Αξιολόγηση των δειγμάτων μύρας με προσθήκη εκχυλίσματος γλυκοζιτών στεβιόλης ζυμωμένο με το λακτοβάκιλλο *B1*.

Πίνακας 20: Κωδικοποίηση των δειγμάτων *B1* του οργανοληπτικού ελέγχου

Μύρα	Δείγμα
Bier A	B1a 0.5d
Bier B	B1a 1.0d
Bier C	B1b 0.5d
Bier D	B1b 1.0d
Bier E	Reference
Bier F	B1a 0.5
Bier G	B1a 1.0
Bier H	B1b 0.5
Bier I	B1b 1.0

Στο Γράφημα 26 παρουσιάζεται η αξιολόγηση των δειγμάτων μύρας που περιείχαν εκχύλισμα γλυκοζιτών στεβιόλης ζυμωμένο με το λακτοβάκιλλο *B1*. Στον Πίν.20 παρουσιάζεται η κωδικοποίηση των δειγμάτων του Γρ.26 (αντιστοιχία μύρας A-I με δείγμα *B1*, που προστέθηκε). Σύμφωνα με το Γράφημα 26 η ανάμιξη της μύρας *Pilsner* με εκχύλισμα στέβια που ζυμώθηκε με *B1* αύξησε τη γλυκύτητα και την πλήρωση στόματος της μύρας, μείωσε πολύ την καθαρότητα της γεύσης και ελαφρώς την καθαρότητα του αρώματος, ενώ δεν επηρέασε ιδιαίτερα την πικρή γεύση. Συγκεκριμένα

οι μύρες με 1.0 mL εκχ./10 mL μύρα μη αποχρωματισμένο εκχύλισμα στέβιας ήταν «πολύ έως υπερβολικά» γλυκές, ενώ μόνο η μύρα με 0.5 mL αποχρωματισμένο δείγμα BI_a /10 mL ήταν «κάπως γλυκιά» και πλησιέστερα από όλα τα υπόλοιπα στην κανονική γλυκύτητα της μύρας. Η πλήρωση στόματος κυμαίνεται για όλα τα δείγματα από καλύτερη έως μεγαλύτερη. Αξιοπρόσεχτο είναι το γεγονός ότι το δείγμα BI_b 1.0 με τη μεγαλύτερη γλυκύτητα έχει τη μικρότερη και όχι τυπική πλήρωση στόματος. Στα περισσότερα δείγματα η πλήρωση στόματος χαρακτηρίστηκε από τους δοκιμαστές «λίγο τυπική». Η καθαρότητα της γεύσης είναι ακόμα καθαρή για όλα τα αποχρωματισμένα δείγματα BI , ενώ για τα μη αποχρωματισμένα πλησιάζει τα «μικρές αποκλίσεις». Το άρωμα αντίθετα αξιολογήθηκε σε όλα τα δείγματα «καθαρό» έως «ακόμα καθαρό». Η ποιότητα της πικρής γεύσης τέλος είναι παρόμοια και «καλή» σε όλα τα δείγματα.

7 ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν να βρεθεί ένα σύνολο διεργασιών για την παραγωγή ενός εκχυλίσματος από το φυτό *Stevia rebaudiana bertonii* που να μπορεί να προστεθεί σε ποτά ως γλυκαντικό και μέσο οξίνισης. Το παραγόμενο εκχύλισμα έπρεπε να είναι απαλλαγμένο από την χαρακτηριστική πικρή γεύση των γλυκοζιτών στεβιόλης, να έχει χαμηλή τιμή pH και ελαφρώς υποκίτρινο χρώμα. Για να επιτευχθεί αυτό, πραγματοποιήθηκε κρύα εκχύλιση ξηρών φύλλων στέβιας, ζύμωση του εκχυλίσματος με ζύμες και λακτοβάκιλλους, συμπύκνωση σε περιστροφικό εξαμιστήρα και αποχρωματισμός με ενεργό άνθρακα. Τέλος, πραγματοποιήθηκε οργανοληπτικός έλεγχος του παραγόμενου εκχυλίσματος γλυκοζιτών στεβιόλης αναμεμιγμένο με μύρα τύπου *Pilsner*.

Πρώτα πραγματοποιήθηκαν αρχικά πειράματα, που έδειξαν ότι το κρύο εκχύλισμα φύλλων στέβιας είχε καλύτερη γεύση -έντονη γλυκύτητα και χαμηλή πικρή γεύση- σε σχέση με τα υπόλοιπα που εξετάστηκαν (υγρό εκχύλισμα, ενζυμικά επεξεργασμένη σκόνη, θρυμματισμένα φύλλα στέβιας). Επίσης, μόνο στην περίπτωση του κρύου εκχυλίσματος η γεύση παρέμεινε σταθερή με το βρασμό, ενώ σε όλα τα υπόλοιπα η πικρή γεύση αυξήθηκε πολύ με την αύξηση του χρόνου βρασμού. Τέλος, η εκχύλιση *Soxhlet* τόσο με νερό όσο και με αιθανόλη απορρίφθηκε, διότι οδήγησε στη δημιουργία πάρα πολλών ανεπιθύμητων αρωμάτων και πικρών ουσιών. Όσον αφορά στη ζύμωση, τα δείγματα που περιείχαν μόνο γλυκόζη έφτασαν σε πιο χαμηλές τιμές pH (περίπου **pH=3.5**), σε αντίθεση με τα δείγματα με ζυθογλεύκος, που είχαν τελικές τιμές pH μεγαλύτερες από 4, καθώς και μια πολύ δυσάρεστη πικρή-ξινή γεύση. Τέλος, η διήθηση τόσο με ενεργό άνθρακα όσο και με *PVPP* οδήγησε σε ελαφρύ αποχρωματισμό των δειγμάτων, αλλά προκάλεσε και μια επιμέρους απώλεια της γλυκιάς γεύσης. Η *PVPP* ωστόσο απορρίφθηκε γιατί η ανώτατη επιτρεπτή συγκέντρωση των 50 g/hL δεν οδήγησε σε επαρκή αποχρωματισμό του εκχυλίσματος.

Με βάση τα συμπεράσματα από το αρχικό πείραμα, αποφασίστηκε η συνέχιση του πειράματος με απλή κρύα εκχύλιση, ζύμωση με 3 ζύμες *S. cerevisiae* (*RH*, *Hebru*, *L48*) και 2 λακτοβάκιλλους *L.plantarum* (*B1*, *210*), προσθήκη μόνο γλυκόζης στη ζύμωση, συμπύκνωση σε περιστροφικό εξατμιστήρα και μελέτη του αποχρωματισμού με ενεργό άνθρακα.

Η ζύμωση του εκχυλίσματος στέβιας, με αρχική τιμή **pH=6.19**, με όλα τα είδη μικροοργανισμών προκάλεσε μείωση της τιμής του pH μεγαλύτερη από 2 μονάδες. Συγκρίνοντας τις ζύμες με τους λακτοβάκιλλους, οι δεύτεροι προκάλεσαν μεγαλύτερη μείωση του pH του εκχυλίσματος στέβιας. Συγκεκριμένα, οι ζύμες έφτασαν περίπου την τιμή **pH=4**, ενώ οι λακτοβάκιλλοι είχαν στο τέλος της ζύμωσης σχεδόν **pH=3.5**. Αυτό ισχύει για τα δείγματα που περιείχαν τις υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης (8% w/v οι ζύμες και 2% w/v οι λακτοβάκιλλοι). Συγκρίνοντας τις 2 διαφορετικές ποσότητες γλυκόζης, τα δείγματα που περιείχαν χαμηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης (4% για τις ζύμες και 0% για τους λακτοβάκιλλους αντίστοιχα) είχαν υψηλότερη τιμή pH σε όλα τα στάδια του κυρίως πειράματος, σε σχέση με τα αντίστοιχα δείγματα όμοιας ζύμωσης με περισσότερη γλυκόζη.

Όσον αφορά τη διάρκεια της ζύμωσης, οι τιμές pH των λακτοβάκιλλων έδειξαν ότι μετά από 6 ημέρες η ζύμωση είχε ολοκληρωθεί, αφού είχε φτάσει περίπου την τιμή **pH=3.5**. Ο βαθμός της ζύμωσης (degree of attenuation) για τις ζύμες όμως ήταν πολύ χαμηλός, περίπου 20%, γι' αυτό, η ζύμωση των ζυμών συνεχίστηκε για 9 ημέρες σε υψηλότερη θερμοκρασία (16°C αντί των 12°C), μέχρι περίπου την τιμή **pH=4.5**.

Η ζύμωση με ζύμες, σε αντίθεση με τη γαλακτική ζύμωση, οδήγησε σε παραγωγή αιθανόλης, όπως αναμενόταν. Μετά από 15 ημέρες αλκοολικής ζύμωσης το εκχύλισμα περιείχε **1-1.5% v/v** αλκοόλη, με εξαίρεση το δείγμα *L48 4%* στο οποίο η συγκέντρωση της αλκοόλης ήταν 0.4% v/v. Γενικά, η προσθήκη μεγαλύτερης ποσότητας γλυκόζης στη ζύμωση οδήγησε σε υψηλότερες περιεκτικότητες σε αλκοόλ, όπως και σε χαμηλότερες τιμές pH.

Το φαινόμενο εκχύλισμα σχετίζεται με την ποσότητα της αιθανόλης που παράχθηκε, άρα και της γλυκόζης που καταναλώθηκε από τις ζύμες και αποτελεί ένα δείκτη της πορείας της αλκοολικής ζύμωσης. Έτσι, στην αρχή της ζύμωσης οι τιμές του φαινομένου εκχυλίσματος ουσιαστικά είναι οι συγκεντρώσεις γλυκόζης που προστέθηκαν στο κάθε δείγμα (8%, 4%, 2% και 0% w/v). Συγκρίνοντας τη ζύμωση με τους διάφορους

μικροοργανισμούς, στα δείγματα με λακτοβάκιλλους το φαινόμενο εκχύλισμα δε μειώνεται ιδιαίτερα (λιγότερο από 0.5%) γιατί στη γαλακτική ζύμωση δεν παράγεται αιθανόλη. Από τις ζύμες, τα στελέχη *Hebru* και *RH* εμφάνισαν τη μεγαλύτερη μείωση φαινόμενου εκχυλίσματος, περίπου 2-2.5 %, ενώ η αντίστοιχη μείωση για το στέλεχος *L48* ήταν 1-1.5 % (το οποίο είχε και μικρότερη συγκέντρωση αλκοόλης στο τέλος της ζύμωσης).

Γενικώς, η ζύμη *L48* είχε υψηλότερη τιμή pH και εμφανώς μικρότερη συγκέντρωση αλκοόλης σε σχέση με τα άλλα 2 στελέχη *S.cerevisiae* (*Hebru* και *RH*). Αντίθετα τα 2 στελέχη *L. plantarum* (*B1* και *210*) δεν παρουσίασαν διαφορές μεταξύ τους στην πορεία της ζύμωσης.

Όσον αφορά το χρώμα του εκχυλίσματος μετά τη ζύμωση δεν εξάχθηκε κάποιο ασφαλές συμπέρασμα. Η αραιώση 1:10 που πραγματοποιήθηκε πριν τη φωτομέτρηση επηρέασε τη θολότητα των δειγμάτων και κατέστησε τις μετρήσεις χρώματος μη αξιόπιστες, για το λόγο αυτό αποφασίστηκε το φιλτράρισμα των δειγμάτων με φίλτρα σύριγγας πόρων 0.45 mm πριν από τη φωτομέτρηση για τη συνέχεια του πειράματος.

Ωστόσο, παρατηρήθηκε ότι τα δείγματα με λακτοβάκιλλους χωρίς γλυκόζη (0%) ήταν εμφανώς πιο σκουρόχρωμα από τα αντίστοιχα με 2% γλυκόζη. Παρατηρώντας τις τιμές pH αυτών των δειγμάτων, φαίνεται ότι τα δείγματα χωρίς γλυκόζη είχαν pH περίπου 5.2 και εκείνα με 2% γλυκόζη είχαν τιμή pH κοντά στο 3.5.

Η διεργασία της συμπύκνωσης είχε κύριο στόχο την απομάκρυνση όλης της αιθανόλης από τα δείγματα που ζυμώθηκαν με ζύμες και ήταν επιτυχής. Μετά από εξάτμιση σε περιστροφικό εξάτμιστήρα συνολικής διάρκειας 45 min, στους 50°C και σε πίεση 100 mbar όλα τα δείγματα περιείχαν λιγότερο από **0.3% v/v αλκοόλ**, ώστε να θεωρούνται μη αλκοολούχα. Παρ' όλο που τα δείγματα που ζυμώθηκαν με λακτοβάκιλλους δεν περιείχαν αλκοόλ, υπέστησαν και αυτά εξάτμιση 45 λεπτών, ώστε να συμπυκνωθούν εξίσου με τα υπόλοιπα και να είναι συγκρίσιμα στο τέλος.

Η εξάτμιση του διαλύματος-μοντέλου (νερό με 2% αιθανόλη και 4% γλυκόζη) είχε δείξει ότι επαρκής χρόνος για την ολική εξάτμιση του αλκοόλ είναι 15 λεπτά. Ωστόσο, μετά από 15 λεπτά εξάτμισης όλα τα δείγματα που είχαν ζυμωθεί με ζύμες περιείχαν ακόμα περίπου 1% αλκοόλη. Τελικά, όλα τα δείγματα αποστάχθηκαν για 45 λεπτά προκειμένου η συγκέντρωση της αλκοόλης να είναι κάτω από 0.3%. Αυτή η διαφορά μεταξύ του διαλύματος-μοντέλου και του ζυμωμένου εκχυλίσματος στέβιας

μπορεί να αποδοθεί στο διαφορετικό όγκο των δειγμάτων (μοντέλο-διάλυμα: 100 mL., *Stevia*-δείγμα: περίπου 600 mL).

Με την εξάτμιση απομακρύνθηκε και μεγάλη ποσότητα νερού, η οποία ήταν επιθυμητή για τη συμπύκνωση του εκχυλίσματος, ενώ αναπόφευκτα παρασύρθηκε μια μικρή ποσότητα συστατικών του εκχυλίσματος, η οποία όμως ήταν αμελητέα σε σχέση με τον όγκο του δείγματος.

Η συμπύκνωση δεν επηρέασε την τιμή pH του εκχυλίσματος, ενώ προκάλεσε αύξηση στην τιμή του φαινόμενου εκχυλίσματος, εφόσον απομακρύνθηκε νερό και αυξήθηκε η συγκέντρωση των σακχάρων στο εκχύλισμα.

Μετά τη συμπύκνωση πραγματοποιήθηκε μια δοκιμή της γεύσης όλων των δειγμάτων. Τα δείγματα της αλκοολικής ζύμωσης είχαν ευχάριστη, γλυκιά γεύση, εκτός από το εκχύλισμα που ζυμώθηκε με το στέλεχος *Hebru*, του οποίου η γεύση χαρακτηρίστηκε άσχημη. Τα δείγματα με λακτοβάκιλλους *B1*, *210* τόσο με 0% όσο και με 2% γλυκόζη είχαν και τα δύο ευχάριστο άρωμα, ενώ η γεύση του δείγματος *B1* θεωρήθηκε καλύτερη από αυτή του *210*. Έτσι, οι ζύμες *RH*, *L48* και ο λακτοβάκιλλος *B1* επιλέχθηκαν για τη ζύμωση του εκχυλίσματος στέβιας στο επαναληπτικό πείραμα, με προσθήκη γλυκόζης σε χαμηλή συγκέντρωση (4% w/v και 1% w/v για τις ζύμες και το λακτοβάκιλλο αντίστοιχα).

Τέλος έγινε προσπάθεια αποχρωματισμού του εκχυλίσματος στέβιας με ενεργό άνθρακα. Η μελέτη του αποχρωματισμού έδειξε ότι η βέλτιστη συγκέντρωση ενεργού άνθρακα για τον αποχρωματισμό του εκχυλίσματος γλυκοζιτών στεβιόλης είναι **3000-4000 g/hL**. Τα καλύτερα ποσοστά αποχρωματισμού (**80-90%**) με τη μικρότερη βέλτιστη συγκέντρωση ενεργού άνθρακα (3000 g/hL) εμφάνισε το εκχύλισμα που είχε ζυμωθεί με το λακτοβάκιλλο *B1*. Το δεύτερο εκχύλισμα γαλακτικής ζύμωσης (*210*) έφτασε στα ίδια επίπεδα αποχρωματισμού (85%) αλλά με βέλτιστη συγκέντρωση ενεργού άνθρακα 4000 g/hL. Τα δείγματα με ζύμες και 4% γλυκόζη αποχρωματίστηκαν λιγότερο (**50%**) όταν διηθήθηκαν με τη βέλτιστη συγκέντρωση ενεργού άνθρακα (3000 g/hL). Το δείγμα *RH* 8% αποχρωματίστηκε κατά 80% με βέλτιστη συγκέντρωση 4000 g/hL. Για τα άλλα δύο όμοια δείγματα με ζύμες και 8% γλυκόζη δεν υπήρχαν αρκετά δεδομένα για τον προσδιορισμό της βέλτιστης συγκέντρωσης, αλλά οι καμπύλες τους φαίνεται να ακολουθούν την καμπύλη του *RH*. Σημαντικό είναι το γεγονός, ότι η βέλτιστη συγκέντρωση για τον αποχρωματισμό και των τριών μικροοργανισμών που

επιλέχθηκαν για τη ζύμωση στο επαναληπτικό πείραμα (*RH*, *L48* και *BI*) ήταν 3000 g/hL.

Η βέλτιστη συγκέντρωση ενεργού άνθρακα βρέθηκε από το σημείο καμπής στις καμπύλες αποχρωματισμού (Γρ.5-8). Επίσης και στις Εικ. 21-24 φαίνεται το χρώμα μετά τη διήθηση με την εκάστοτε βέλτιστη συγκέντρωση, το οποίο είναι αποδεκτό για την προσθήκη του γλυκαντικού σε ανοιχτόχρωμα/υποκίτρινα αναψυκτικά. Μεγαλύτερη συγκέντρωση από τη βέλτιστη οδηγεί μεν σε μεγαλύτερο αποχρωματισμό, αλλά η κλίση της καμπύλης, δηλαδή ο «ρυθμός» αποχρωματισμού μειώνεται. Έτσι, συμπεραίνεται ότι δεν αξίζει να χρησιμοποιηθεί μεγαλύτερη ποσότητα ενεργού άνθρακα από τη βέλτιστη.

Λαμβάνοντας υπόψη τα συμπεράσματα που ελήφθησαν από το κυρίως πείραμα, πραγματοποιήθηκε ένα επαναληπτικό πείραμα με τις βέλτιστες συνθήκες και συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων, όπως προέκυψαν από το κυρίως πείραμα. Πιο συγκεκριμένα, η διαδικασία της κρύας εκχύλισης παρέμεινε ίδια αφού ήταν επιτυχής και στο κυρίως πείραμα. Στη συνέχεια το κρύο εκχύλισμα γλυκοζιτών στεβιόλης ζυμώθηκε με δύο ζύμες (*RH* και *L48*) και με ένα λακτοβάκιλλο (*BI*) και εις διπλούν για κάθε μικροοργανισμό, ώστε να εξασφαλιστεί η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων. Από τις ζύμες δεν χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *Hebru* λόγω της άσχημης γεύσης που είχε το συγκεκριμένο δείγμα στο τέλος του κυρίως πειράματος, ενώ από τους λακτοβάκιλλους επιλέχθηκε μόνο ο *BI*, παρόλο που και τα δύο στελέχη είχαν παρόμοια συμπεριφορά και είχαν ζυμώσει επιτυχώς το εκχύλισμα στέβιας. Η συγκέντρωση του κάθε μικροοργανισμού στο εκχύλισμα δεκαπλασιάστηκε σε σχέση με το κυρίως πείραμα, ώστε να είναι πιο αποτελεσματική η ζύμωση. Η συγκέντρωση της γλυκόζης ήταν 4% w/v για τις ζύμες και 1% w/v για τους λακτοβάκιλλους. Για τις ζύμες επιλέχθηκε η μικρότερη συγκέντρωση γλυκόζης, 4%, ως πιο οικονομική, μιας και η μεγαλύτερη συγκέντρωση (8%) στο κυρίως πείραμα δεν προκάλεσε πολύ μεγαλύτερη μείωση στην τιμή του pH. Στο λακτοβάκιλλο προστέθηκε 1% γλυκόζη, αφού όπως φάνηκε στο κυρίως πείραμα, η γαλακτική ζύμωση προχωράει επιτυχώς ακόμα και χωρίς γλυκόζη. Ο όγκος του κάθε δείγματος ήταν αυτή τη φορά 1.5 L, ώστε να υπάρχει αρκετή ποσότητα για τη διεξαγωγή περισσότερων αναλύσεων. Η γαλακτική ζύμωση πραγματοποιήθηκε και πάλι στους 28°C, ενώ η αλκοολική ζύμωση στους 18°C, εφ' όσον στο κυρίως πείραμα διαπιστώθηκε καθυστέρηση της ζύμωσης λόγω της χαμηλής

θερμοκρασίας. Οι αναλύσεις αυτή τη φορά έγιναν συχνότερα, κάθε 1-2 μέρες, ώστε να διακοπεί εγκαίρως η ζύμωση. Τέλος πραγματοποιήθηκε συμπύκνωση των εκχυλισμάτων για 60 min και για τον αποχρωματισμό χρησιμοποιήθηκε ενεργός άνθρακας σε συγκέντρωση **3000 g/hL**.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ζύμωση με τη ζύμη *L48* ολοκληρώθηκε στις 4 ημέρες, ενώ η ζύμωση με τους μικροοργανισμούς *RH* και *B1* χρειάστηκε 7 ημέρες για να ολοκληρωθεί, παρ' όλο που η συγκέντρωση του *L48* στο εκχύλισμα ήταν η μισή (10^7 Cells/mL) σε σχέση με τη συγκέντρωση των άλλων δύο μικροοργανισμών (2×10^7 Cells/mL). Η οξύτητα του εκχυλίσματος (αρχική τιμή **pH=5.5**) αυξήθηκε με τη ζύμωση, όπως ήταν επιθυμητό. Ο λακτοβάκιλλος *B1* προκάλεσε, όπως αναμενόταν, μεγαλύτερη μείωση της τιμής του pH (**pH=3.2**) από ότι οι ζύμες (**pH=4-4.5**). Η σημαντικότερη μείωση της τιμής του pH παρατηρήθηκε ήδη από την 1^η ημέρα ζύμωσης. Από τη γαλακτική ζύμωση δεν παράχθηκε αιθανόλη, η ζύμη *L48* παράγαγε 0.5% v/v, όπως και στο κυρίως πείραμα, ενώ το εκχύλισμα με τη ζύμη *RH* είχε τη μεγαλύτερη συγκέντρωση αλκοόλης, **1.3% v/v**. Το φαινόμενο εκχύλισμα στην αρχή της ζύμωσης ουσιαστικά είναι η συγκέντρωση της γλυκόζης που προστέθηκε. Στο τέλος της ζύμωσης, η μείωση του φαινομένου εκχυλίσματος για τις ζύμες *RH* και *L48* είναι 2% και 1% αντίστοιχα. Η ζύμωση επηρέασε και το χρώμα του εκχυλίσματος, το οποίο αρχικά ήταν **1.4 ABS**. Στο τέλος της ζύμωσης όλα τα δείγματα είχαν παραπλήσιο χρώμα **0.72-0.88 ABS**. Θετικό είναι το γεγονός, ότι τα διπλά δείγματα εκχυλίσματος (2 για κάθε μικροοργανισμό) είχαν παρόμοιες τιμές σε όλα τα στάδια της ζύμωσης, το οποίο επιβεβαιώνει την επαναληψιμότητα των μετρήσεων.

Η συμπύκνωση, που αυτή τη φορά διήρκεσε κατευθείαν 60 min για να απομακρυνθεί σίγουρα όλη η ποσότητα αιθανόλης, ήταν επιτυχής, καθώς όλα τα δείγματα περιείχαν στο τέλος λιγότερο από 0.3% v/v αλκοόλη. Το pH φυσικά δεν μεταβλήθηκε, ενώ το φαινόμενο εκχύλισμα κυρίως των ζυμών αυξήθηκε όπως και στο κυρίως πείραμα. Το χρώμα των *B1* και *L48* αυξήθηκε λόγω της συμπύκνωσης κατά 0.24 ABS, ενώ του *RH* λιγότερο από 0.12 ABS.

Ο αποχρωματισμός αυτή τη φορά έγινε κατευθείαν με 3000 g/hL ενεργό άνθρακα. Το εκχύλισμα που ζυμώθηκε με το λακτοβάκιλλο *B1*, όπως αναμενόταν και από τα συμπεράσματα του κυρίως πειράματος, αποχρωματίστηκε περισσότερο από τα

εκχυλίσματα που ζυμώθηκαν με ζύμες, σε ποσοστό σχεδόν **80%**, φτάνοντας τελικό χρώμα **0.2 ABS**. Το δείγμα *L48* έφτασε το μικρότερο ποσοστό αποχρωματισμού, περίπου **50%**, με τελικό χρώμα **0.56 ABS**. Όπως παρατηρείται, το δείγμα αυτό ήταν πιο σκουρόχρωμο από τα υπόλοιπα σε όλα τα στάδια του πειράματος. Τα δύο δείγματα που ζυμώθηκαν με τη ζύμη *RH* παρουσιάζουν διαφορετική τιμή χρώματος μετά τη συμπύκνωση (0.84 και 0.96 ABS), αλλά και διαφορετικά ποσοστά αποχρωματισμού (58 και 67%). Η διαφορά ωστόσο στο τελικό τους χρώμα δεν ήταν σημαντική, αφού είχαν τελικό χρώμα 0.28 και 0.32 ABS αντίστοιχα. Σημαντική διαφορά ωστόσο υπήρχε στη διάρκεια της διήθησης υπό κενό με ενεργό άνθρακα μεταξύ των δύο ειδών μικροοργανισμών. Τα εκχυλίσματα ζυμωμένα με ζύμες χρειάστηκαν περίπου 60 min για να διηθηθούν, ενώ το εκχύλισμα ζυμωμένο με *B1* διηθήθηκε σε μόλις 5 min. Η διεργασία του αποχρωματισμού δεν επηρέασε καθόλου τις τιμές του pH, του αλκοόλ και του φαινόμενου εκχυλίσματος, όπως αναμενόταν.

Στα παραγόμενα από το επαναληπτικό πείραμα εκχυλίσματα στέβιας πραγματοποιήθηκε οργανοληπτικός έλεγχος. Ως μέσο διάλυσης των διαφόρων εκχυλισμάτων που είχαν παραχθεί (δύο εκχυλίσματα ζυμωμένα με κάθε μικροοργανισμό, αποχρωματισμένα και μη αποχρωματισμένα εκχυλίσματα) χρησιμοποιήθηκε μύρα τύπου *Pilsner*, σε δύο συγκεντρώσεις: 0.5 και 1.0 mL εκχ. στέβιας/10 mL μύρα. Καταρχήν για την αξιολόγηση των αντικειμενικών χαρακτηριστικών έγιναν οι συνήθεις ενόργανες αναλύσεις με φωτομέτρηση, μέτρηση τιμής pH και μέτρηση της πυκνότητας του κάθε δείγματος μύρας που συμμετείχε στον οργανοληπτικό έλεγχο.

Όπως προέκυψε, η προσθήκη εκχυλίσματος στέβιας δεν μετέβαλε το χρώμα της μύρας. Το χρώμα της καθαρής μύρας ήταν **6.75 EBC**. Γενικώς η προσθήκη του μη αποχρωματισμένου εκχυλίσματος στέβιας οδήγησε σε χρώμα πλησιέστερο στο χρώμα της μύρας, ενώ το αντίστοιχο αποχρωματισμένο εκχύλισμα μείωσε λίγο το χρώμα. Όπως είναι λογικό, η προσθήκη της μικρότερης συγκέντρωσης εκχυλίσματος στέβιας (0.5 mL εκχ. στέβιας/10 mL μύρα) προκάλεσε μικρότερη μεταβολή στο χρώμα από ότι η μεγαλύτερη συγκέντρωση εκχυλίσματος στέβιας (1.0 mL εκχ. στέβιας/10 mL μύρα). Σε κάθε περίπτωση όμως η μεταβολή στο χρώμα θεωρείται αμελητέα.

Η τιμή του pH της μύρας (**pH=4.3**) μειώθηκε κατά **0.1-0.2** μονάδες μετά την προσθήκη εκχυλίσματος στέβιας που είχε ζυμωθεί με το λακτοβάκιλλο *BI*, ενώ παρέμεινε σταθερό ή αυξήθηκε κατά 0.1 μονάδα μετά την προσθήκη εκχ. στέβιας που είχε ζυμωθεί με ζύμες. Φυσικά η προσθήκη 1.0 mL εκχ. στέβιας/10 mL μύρα προκάλεσε μεγαλύτερη μεταβολή στο pH από την προσθήκη 0.5 mL εκχ. στέβιας/10 mL μύρα, αλλά σε κάθε περίπτωση η **μεταβολή στην τιμή του pH** θεωρείται **αμελητέα**. Αν δεν είχε πραγματοποιηθεί η ζύμωση του εκχυλίσματος στέβιας με τους μικροοργανισμούς, η τιμή του pH του εκχυλίσματος στέβιας θα είχε παραμείνει στην τιμή 5.5 και έτσι η προσθήκη του στη μύρα θα είχε αυξήσει την τιμή του pH. Μία ενδεχόμενη τέτοια αύξηση θα είχε πιθανόν αρνητική επίδραση τόσο στη γεύση του τελικού προϊόντος μύρας όσο και στη διατηρησιμότητά του.

Το φαινόμενο εκχύλισμα της μύρας ήταν 2.14% w/w και δε μεταβλήθηκε σημαντικά με την προσθήκη του εκχυλίσματος στέβιας. Το εκχύλισμα που ζυμώθηκε με τη ζύμη *L48* προκάλεσε μία αύξηση μέχρι 0.4%, ενώ τα άλλα δύο εκχυλίσματα, που είχαν ζυμωθεί με *RH* και *BI* δε μετέβαλαν ή μείωσαν μέχρι 0.25% το φαινόμενο εκχύλισμα της μύρας.

Το θερμιδικό περιεχόμενο της μύρας *Pilsner* ήταν **41,6 kcal/100mL**. Ένα μπουκάλι μύρας (500 mL) περιέχει δηλαδή 208 kcal. Η μύρα αναμεμιγμένη με εκχύλισμα στέβιας περιείχε λιγότερες θερμίδες, γεγονός που είναι θετικό και αναμενόμενο. Με την προσθήκη 0.5 mL εκχ.στέβιας/10 mL μύρας οι θερμίδες μειώθηκαν περίπου κατά 2 kcal/100 mL. Με την προσθήκη 1.0 mL εκχ.στέβιας/10 mL μύρας το θερμιδικό περιεχόμενο μειώθηκε περίπου κατά 3 kcal/100 mL. Τη μεγαλύτερη μείωση προκάλεσε όπως ήταν φυσικό το εκχύλισμα που είχε ζυμωθεί με το λακτοβάκιλλο *BI* και τη μικρότερη το εκχύλισμα ζυμωμένο με τη ζύμη *L48*. Η μείωση 2.4 kcal/100 mL σημαίνει συνολική μείωση 12 kcal σε ένα μπουκάλι μύρας (που περιέχει 208 kcal). Ποσοστιαία δηλαδή η μείωση είναι περίπου 6%, η οποία δεν μπορεί να θεωρηθεί σημαντική.

Η μύρα *Pilsner* που χρησιμοποιήθηκε περιείχε **5% v/v αλκοόλ**, όπως αναγραφόταν στην ετικέτα, αλλά και όπως έδειξε η μέτρηση με το μετρητή πυκνότητας. Το εκχύλισμα γλυκοζιτών στεβιόλης μετά τη συμπύκνωση περιείχε λιγότερο από 0.3% αλκοόλη, με σκοπό να μπορεί να προστεθεί σε μη αλκοολούχα ποτά και αναψυκτικά. Έτσι, η προσθήκη του εκχυλίσματος στη μύρα μείωσε τη συνολική της συγκέντρωση

αλκοόλης. Η μείωση αυτή ήταν **0.1-0.3%** για τη μικρή συγκέντρωση (0.5 mL εκχ.στέβιας/10 mL μύρας) και **0.4-0.5%** για τη μεγαλύτερη συγκέντρωση εκχυλίσματος (1.0 mL εκχ.στέβιας/10 mL μύρας). Διαφορές μεταξύ των εκχυλισμάτων ζυμωμένων με διαφορετικούς μικροοργανισμούς ή μεταξύ αποχρωματισμένων και μη αποχρωματισμένων δειγμάτων δεν παρατηρήθηκαν.

Η οργανοληπτική αξιολόγηση των δειγμάτων μύρας με τα διάφορα εκχυλίσματα στέβιας από τους δοκιμαστές έδειξε ότι η προσθήκη **0.5 mL εκχ.στέβιας/10 mL μύρα** είχε καλύτερο αποτέλεσμα στη γεύση της μύρας από την προσθήκη 1.0 mL εκχ.στέβιας/10 mL μύρας Όλα τα εκχυλίσματα στέβιας που προστέθηκαν σε συγκέντρωση 1 mL/10 mL αύξησαν πολύ έως υπερβολικά τη γλυκύτητα της μύρας, γεγονός που δεν άρεσε στους δοκιμαστές. Επίσης η μύρα με τα αποχρωματισμένα εκχυλίσματα γλυκοζιτών στεβιόλης φαίνεται να είχε καλύτερη, καθαρή γεύση, πλησιέστερη στην κανονική γλυκύτητα της μύρας. Αντίθετα, στα μη αποχρωματισμένα δείγματα οι δοκιμαστές διέκριναν «μικρές αποκλίσεις» στην καθαρότητα της γεύσης. Σίγουρα όλα τα εκχυλίσματα γλυκοζιτών στεβιόλης αύξησαν και βελτίωσαν την πληρότητα στόματος της μύρας, η οποία άρεσε στους δοκιμαστές παρ' όλο που τη χαρακτήρισαν «μη τυπική» για το είδος της μύρας. Θετικό είναι το γεγονός, πως σε καμία μύρα με εκχύλισμα στέβιας δεν παρατηρήθηκε αύξηση της πικρής γεύσης, το οποίο θα μπορούσε να συμβεί, εάν με τη ζύμωση δεν είχε απομακρυνθεί η χαρακτηριστική πικρή γεύση του εκχυλίσματος στέβιας.

Συγκρίνοντας τα εκχυλίσματα στέβιας που ζυμώθηκαν με τους διαφορετικούς μικροοργανισμούς οι δοκιμαστές επέλεξαν το εκχύλισμα που ζυμώθηκε με τον μικροοργανισμό **BI**, γιατί προσέδωσε στη μύρα περισσότερη πληρότητα στόματος και γλυκύτητα, χωρίς να αυξάνει καθόλου την πικρή γεύση. Το συγκεκριμένο εκχύλισμα είχε μετά τη ζύμωση τη μικρότερη τιμή pH (**pH=3.2**) και μετά τη διήθηση με ενεργό άνθρακα έφτασε στο μεγαλύτερο ποσοστό αποχρωματισμού (σχεδόν **80%**).

Προτείνεται το παραγόμενο εκχύλισμα στέβιας να χρησιμοποιηθεί σε ποτά και αναψυκτικά τόσο ως γλυκαντικό, για την πλήρη αντικατάσταση ζάχαρης, η οποία μέχρι σήμερα δεν είναι εφικτή, εξαιτίας της πικρής γεύσης των γλυκοζιτών στεβιόλης στα σκευάσματα του εμπορίου, όσο και ως μέσο οξίνισης. Απώτερος σκοπός θα είναι η μείωση των περιεχόμενων θερμίδων.

Σε επόμενα πειράματα θα μπορούσε να μελετηθεί ο χρόνος ζωής του παραγόμενου εκχυλίσματος γλυκοζιτών στεβιόλης, ώστε να προταθεί η κατάλληλη συσκευασία και οι συνθήκες μεταφοράς του. Επίσης, θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί οργανοληπτικός έλεγχος του παραγόμενου εκχυλίσματος και σε άλλα ποτά ή αναψυκτικά.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε και μία απλή μελέτη κόστους της διεργασίας. Λαμβάνοντας υπόψη την τιμή της πρώτης ύλης, δηλ. των φύλλων στέβιας η οποία κυμαίνεται στα 20€/kg, το κόστος της διεργασίας της ζύμωσης και των συστατικών που προστίθενται προκειμένου να πραγματοποιηθεί (σιρόπι γλυκόζης, καλλιέργειες εκκίνησης) καθώς και του αποχρωματισμού του τελικού εκχυλίσματος με προσθήκη ενεργού άνθρακα κοστολογήθηκε στα 0,45 €/L εκχ. στέβιας. Συμπεριλαμβάνοντας και το κόστος της απαιτούμενης ενέργειας για την παραγωγή ενός λίτρου εκχυλίσματος στέβιας με τις συγκεκριμένες διεργασίες, το συνολικό κόστος ανέρχεται σε 0,50€/L παραγόμενου εκχυλίσματος. Βέβαια, το παραγόμενο εκχύλισμα δεν περιέχει 100% γλυκοζίτες στεβιόλης, άρα δεν έχει 300 φορές τη γλυκύτητα της ζάχαρης, συνεπώς θα απαιτείται μεγαλύτερη ποσότητα για να επιτευχθεί η απαιτούμενη γλυκύτητα στα τελικά προϊόντα που προστίθεται, συνεπώς η αύξηση του κόστους στα τελικά προϊόντα θα πλησιάζει αυτό της εμπορικά διαθέσιμης σκόνης γλυκοζιτών στεβιόλης που κυμαίνεται από 150-200 €/kg, ανάλογα και με την απαιτούμενη γλυκύτητα (βάσει προδιαγραφών για το κάθε προϊόν).

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

αριστ.	αριστερά
αποχρ.	αποχρωματισμένο
βλ.	βλέπε
Γρ.	Γράφημα
δ/μα	διάλυμα
Εικ.	Εικόνα
εκχ.	εκχύλισμα
επεξεργ.	επεξεργασμένη
Παρ.	Παράγραφος
Παράρτ.	Παράρτημα
Πίν.	Πίνακας
activ.	activated
alc.	alcohol
disc.	discolored
dist.	distilled
e.g.	exemplī grātiā (για παράδειγμα)
et al.	et alli (και άλλοι)
<i>L. plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

ΟΝΟΜΑΤΟΛΟΓΙΑ

BI δείγμα εκχυλίσματος στέβιας που ζυμώθηκε με το στέλεχος *BI* του λακτοβάκιλλου *Lactobacillus plantarum* κατά το κυρίως πείραμα.

BI 0% δείγμα *BI* που ζυμώθηκε χωρίς γλυκόζη κατά το κυρίως πείραμα.

BI 2% δείγμα *BI* που ζυμώθηκε με 2% γλυκόζη κατά το κυρίως πείραμα.

BI_a, BI_b δύο δείγματα εκχυλίσματος στέβιας που ζυμώθηκαν με το λακτοβάκιλλο *BI* κατά το επαναληπτικό πείραμα.

BI_{a1}, BI_{a2} δύο όμοια δείγματα *BI_a*, ο όγκος του οποίου χωρίστηκε στα δύο πριν τη συμπύκνωση κατά το επαναληπτικό πείραμα.

BI_{b1}, BI_{b2} δύο όμοια δείγματα *BI_b*, ο όγκος του οποίου χωρίστηκε στα δύο πριν τη συμπύκνωση κατά το επαναληπτικό πείραμα.

BI_{a1,disc}, BI_{a2,disc}, BI_{b1,disc}, BI_{b2,disc} μισή ποσότητα των δειγμάτων *BI_{a1}*, *BI_{a2}*, *BI_{b1}*, *BI_{b2}*, που αποχρωματίστηκαν κατά το επαναληπτικό πείραμα.

BI_a 0,5, BI_b 0,5 δείγματα μύρας του οργανοληπτικού ελέγχου που περιέχουν 0,5 mL εκχ. στέβιας *BI_a* και *BI_b* /10 mL μύρα.

BI_{a,disc} 0,5, BI_{b,disc} 0,5 δείγματα μύρας του οργανοληπτικού ελέγχου που περιέχουν 0,5 mL αποχρωματισμένο εκχ. στέβιας *BI_{a,disc}* και *BI_{b,disc}* /10 mL μύρα.

BI_a 1,0, BI_b 1,0 δείγματα μύρας του οργανοληπτικού ελέγχου που περιέχουν 1,0 mL εκχ. στέβιας *BI_a* και *BI_b* /10 mL μύρα

BI_{a,disc} 1,0, BI_{b,disc} 1,0 δείγματα μύρας του οργανοληπτικού ελέγχου που περιέχουν 1,0 mL αποχρωματισμένο εκχ. στέβιας *BI_{a,disc}* και *BI_{b,disc}* /10 mL μύρα.

cold extr.0+glu κρύο εκχύλισμα στέβιας που δεν έχει υποστεί βρασμό και ζυμώθηκε με γλυκόζη κατά το αρχικό πείραμα

cold extr.30+glu κρύο εκχύλισμα στέβιας που έχει υποστεί βρασμό για 30 min και ζυμώθηκε με γλυκόζη κατά το αρχικό πείραμα

cold extr.0+wort κρύο εκχύλισμα στέβιας που δεν έχει υποστεί βρασμό και ζυμώθηκε με ζυθογλεύκος κατά το αρχικό πείραμα

cold extr.30+wort κρύο εκχύλισμα στέβιας που έχει υποστεί βρασμό για 30 min και ζυμώθηκε με ζυθογλεύκος κατά το αρχικό πείραμα

cold extr.60+wort κρύο εκχύλισμα στέβιας που έχει υποστεί βρασμό για 60 min και ζυμώθηκε με ζυθογλεύκος κατά το αρχικό πείραμα

extr.0+glu υγρό εκχύλισμα στέβιας που δεν έχει υποστεί βρασμό και ζυμώθηκε με γλυκόζη κατά το αρχικό πείραμα

extr.30+glu υγρό εκχύλισμα στέβιας που έχει υποστεί βρασμό για 30 min και ζυμώθηκε με γλυκόζη κατά το αρχικό πείραμα

extr.0+wort υγρό εκχύλισμα στέβιας που δεν έχει υποστεί βρασμό και ζυμώθηκε με ζυθογλεύκος κατά το αρχικό πείραμα

extr.30+wort υγρό εκχύλισμα στέβιας που έχει υποστεί βρασμό για 30 min και ζυμώθηκε με ζυθογλεύκος κατά το αρχικό πείραμα

extr.60+wort υγρό εκχύλισμα στέβιας που έχει υποστεί βρασμό για 60 min και ζυμώθηκε με ζυθογλεύκος κατά το αρχικό πείραμα

Hebru δείγμα εκχυλίσματος στέβιας που ζυμώθηκε με το στέλεχος *Hebru* του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* κατά το κυρίως πείραμα.

Hebru 8% δείγμα *Hebru* που ζυμώθηκε με 8% γλυκόζη κατά το κυρίως πείραμα.

L48 δείγμα εκχυλίσματος στέβιας που ζυμώθηκε με το στέλεχος *L48* του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* κατά το κυρίως πείραμα.

L48 4% δείγμα *L48* που ζυμώθηκε με 4% γλυκόζη κατά το κυρίως πείραμα.

L48 8% δείγμα *L48* που ζυμώθηκε με 8% γλυκόζη κατά το κυρίως πείραμα.

L48_a, L48_b δύο δείγματα εκχυλίσματος στέβιας που ζυμώθηκαν με τη ζύμη **L48** κατά το επαναληπτικό πείραμα.

L48_{a1}, L48_{a2} δύο όμοια δείγματα *L48_a*, ο όγκος του οποίου χωρίστηκε στα δύο πριν τη συμπύκνωση κατά το επαναληπτικό πείραμα.

L48_{b1}, L48_{b2} δύο όμοια δείγματα *L48_b*, ο όγκος του οποίου χωρίστηκε στα δύο πριν τη συμπύκνωση κατά το επαναληπτικό πείραμα.

L48_{a1,disc.}, L48_{a2,disc.}, L48_{b1,disc.}, L48_{b2,disc.} μισή ποσότητα των δειγμάτων *L48_{a1}*, *L48_{a2}*, *L48_{b1}*, *L48_{b2}*, που αποχρωματίστηκαν κατά το επαναληπτικό πείραμα.

L48_a 0,5, L48_b 0,5 δείγματα μύρας του οργανοληπτικού ελέγχου που περιέχουν 0,5 mL εκχ. στέβιας *L48_a* και *L48_b* /10 mL μύρα.

L48_{a,disc.} 0,5, L48_{b,disc.} 0,5 δείγματα μύρας του οργανοληπτικού ελέγχου που περιέχουν 0,5 mL αποχρωματισμένο εκχ. στέβιας *L48_{a,disc.}* και *L48_{b,disc.}*/10 mL μύρα.

L48_a 1,0, L48_b 1,0 δείγματα μύρας του οργανοληπτικού ελέγχου που περιέχουν 1,0 mL εκχ. στέβιας *L48_a* και *L48_b* /10 mL μύρα

L48_{a,disc.} 1,0, L48_{b,disc.} 1,0 δείγματα μύρας του οργανοληπτικού ελέγχου που περιέχουν 1,0 mL αποχρωματισμένο εκχ. στέβιας *L48_{a,disc.}* και *L48_{b,disc.}*/10 mL μύρα.

RH δείγμα εκχυλίσματος στέβιας που ζυμώθηκε με το στέλεχος *RH* του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* κατά το κυρίως πείραμα.

RH 4% δείγμα *RH* που ζυμώθηκε με 4% γλυκόζη κατά το κυρίως πείραμα.

RH 8% δείγμα *RH* που ζυμώθηκε με 8% γλυκόζη κατά το κυρίως πείραμα.

RH_a, RH_b δύο δείγματα εκχυλίσματος στέβιας που ζυμώθηκαν με τη ζύμη *RH* κατά το επαναληπτικό πείραμα.

RH_{a1}, RH_{a2} δύο όμοια δείγματα *RH_a*, ο όγκος του οποίου χωρίστηκε στα δύο πριν τη συμπύκνωση κατά το επαναληπτικό πείραμα.

RH_{b1}, RH_{b2} δύο όμοια δείγματα *RH_b*, ο όγκος του οποίου χωρίστηκε στα δύο πριν τη συμπύκνωση κατά το επαναληπτικό πείραμα.

RH_{a1,disc.}, RH_{a2,disc.}, RH_{b1,disc.}, RH_{b2,disc.} μισή ποσότητα των δειγμάτων *RH_{a1}, RH_{a2}, RH_{b1}, RH_{b2}*, που αποχρωματίστηκαν κατά το επαναληπτικό πείραμα.

RH_a 0,5, RH_b 0,5 δείγματα μύρας του οργανοληπτικού ελέγχου που περιέχουν 0,5 mL εκχ. στέβιας *RH_a* και *RH_b* /10 mL μύρα.

RH_{a,disc.} 0,5, RH_{b,disc.} 0,5 δείγματα μύρας του οργανοληπτικού ελέγχου που περιέχουν 0,5 mL αποχρωματισμένο εκχ. στέβιας *RH_{a,disc.}* και *RH_{b,disc.}*/10 mL μύρα.

RH_a 1,0, RH_b 1,0 δείγματα μύρας του οργανοληπτικού ελέγχου που περιέχουν 1,0 mL εκχ. στέβιας *RH_a* και *RH_b* /10 mL μύρα

RH_{a,disc.} 1,0, RH_{b,disc.} 1,0 δείγματα μύρας του οργανοληπτικού ελέγχου που περιέχουν 1,0 mL αποχρωματισμένο εκχ. στέβιας *RH_{a,disc.}* και *RH_{b,disc.}*/10 mL μύρα

210 δείγμα εκχυλίσματος στέβιας που ζυμώθηκε με το στέλεχος *210* του λακτοβάκιλλου *Lactobacillus plantarum* κατά το κυρίως πείραμα.

210 0% δείγμα *210* που ζυμώθηκε χωρίς γλυκόζη κατά το κυρίως πείραμα.

210 2% δείγμα *210* που ζυμώθηκε με 2% γλυκόζη κατά το κυρίως πείραμα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abou-Arab, A., Abou-Arab, A., & Abu-Salem, M. F. (2010). *Physico-chemical assessment of natural sweeteners steviosides produced from Stevia rebaudiana Bertoni plant*. African Journal of Food Science, 4, 269–281.
- Amzad-Hossain, M., Siddique, A., Mizanur-Rahman, S., & Amzad-Hossain, M. (2010). *Chemical composition of the essential oils of Stevia rebaudiana Bertoni leaves*. Asian Journal of Traditional Medicines, 5, 56–61
- Anton, S., Martin, C., Han, H., Coulon, S., Cefalu, W., Geiselman, P., et al. (2010). *Effects of Stevia, aspartame, and sucrose on food intake, satiety and postprandial glucose and insulin levels*. Appetite, 55, 37–43.
- Barriocanal, L., Palacios, M., Benitez, G., Benitez, S., Jimenez, J., Jimenez, N., et al. (2008). *Apparent lack of pharmacological effect of steviol glycosides used as sweeteners in humans, a pilot study of repeated exposures in some normotensive and hypotensive individuals and in type 1 and type 2 diabetics*. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 51, 37–41.
- Bechthold A. (2010). *Neue Süßstoffe aus der Steviapflanze*. Ernährungslehre und Praxis Nr.8.
- Belitz H.-D., Grosch W., Schieberle P. (2006). *Χημεία Τροφίμων*, Vol.3, Εκδόσεις Τζιόλα, 555, 704-708, 1381-1385
- Bernal, J., Mendiola, J., Ibañez, E., & Cifuentes, A. (2011). *Advanced analysis of nutraceuticals*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 55, 758–774.
- Blauth de Slavutzky, S. (2010). *Stevia and sucrose effect on plaque formation*. Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, 5, 213–216.
- Blumenthal, M. (1996). *Perspectives of FDA'S new Stevia Policy, After four years, the agency lifts its ban-but only partially*. Whole Foods Magazine, February 1–5.
- Bondarev, N., Nosov, A., & Reshetnyak, O. (2001). *Peculiarities of diterpenoid steviol glycoside production in vitro cultures of Stevia rebaudiana Bertoni*. Plant Science, 161, 155–163.

- Brandle, J., & Telmer, P. (2007). *Steviol glycoside biosynthesis*. *Phytochemistry*, 68, 1855–1863.
- Braz de Oliveira, A. J., Correia Gonçaves, R. A., Cantuaria Chierrito, T. P., Móller dos Santos, M., Mera de Souza, L., Gorin, P. A. J., et al. (2011). *Structure and degree of polymerisation of fructooligosaccharides present in roots and leaves of Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni*. *Food Chemistry*, 129, 305–311.
- Carakostas, M., Curry, L., Boileau, A., & Brusick, D. (2008). *Overview: The history, technical function and safety of rebaudioside A, a naturally occurring steviol glycoside, for use in food and beverages*. *Food and Chemical Toxicology*, 46, S1–S10.
- Carneiro, J., Muniz, A., & Guedes, T. (1997). *Greenhouse bedding plant production of Stevia rebaudiana (Bert) bertoni*. *Canadian Journal of Plant Science*, 77, 473–474.
- Chan, L. L., Zhong, X., Qiu, J., Li, P. Y. and Lin, B. (2011), Cellometer Vision as an alternative to flow cytometry for cell cycle analysis, mitochondrial potential, and immunophenotyping. *Cytometry*, 79A: 507–517. doi: 10.1002/cyto.a.21071
- Chatsudthipong, V., & Muanprasat, C. (2009). *Stevioside and related compounds: Therapeutic benefits beyond sweetness*. *Pharmacology & Therapeutics*, 121, 41–54.
- Chang, S. S., & Cook, J. M. (1983). *Stability studies of stevioside and rebaudioside A in carbonated beverages*. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 31, 409–412.
- Crammer, B., & Ikan, R. (1986). *Sweet glycosides from the Stevia plant*. *Chemistry in Britain*, 22, 915–917.
- Crammer, B., & Ikan, R. (1987). *Progress in the chemistry and progress of the rebaudiosides*. In T. Grenby (Ed.), *Developments in Sweeteners* (pp. 45–64). London, UK: Elsevier Applied Science
- EFSA (2011). Statement of EFSA: ‘Revised exposure assessment for steviol glycosides for the proposed uses as a food additive’. *The EFSA Journal* 9(01):1972

- Furtado A., Batista E., Spohr I., Filipe E. *Measurement of density using oscillation type density meters*. Instituto Portugues da Qualidade. Portugal
- Gardana, C., Simonetti, P., Canzi, E., Zanchi, R., & Pietta, P. (2003). *Metabolism of stevioside and rebaudioside A from Stevia rebaudiana extracts by human microflora*. Journal of Agricultural Food Chemistry, 51, 6618–6622.
- Geuns, J. (2003). *Stevioside*. Phytochemistry, 64, 913–921.
- Ghanta, S., Banerjee, A., Poddar, A., & Chattopadhyay, S. (2007). *Oxidative DNA damage preventive activity and antioxidant potential of Stevia rebaudiana (Bertoni) Bertoni, a natural sweetener*. Journal of Agricultural Food Chemistry, 55, 10962–10967.
- Giraldo, C., Marvn, L., & Habeych, D. (2005). *Obtención de Edulcorantes de Stevia rebaudiana Bertoni*. Revista CENIC Ciencias Biológicas, 36, 3–10.
- Holt SHA, Sandona N & Brand-Miller JC (2000). *The effects of sugar-free and sugar-rich beverages on feelings of fullness and subsequent food intake*, International Journal of Food Sciences and Nutrition 51: 59-71
- Ibrahim, I., Nasr, M., Mohammed, B., & El-Zefzafi, M. (2008). *Nutrient factors affecting in vitro cultivation of Stevia rebaudiana*. Sugar Technology, 10, 248–253.
- Jayaraman, S., Manoharan, M., & Illanchezian, S. (2008). *In-vitro antimicrobial and antitumor activities of Stevia rebaudiana (Asteraceae) leaf extracts*. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 7, 1143–1149.
- Katayama, O., Sumida, T., Hayashi, H., & Mitsuhashi, H. (1976). *The practical application of Stevia and research and development data* (pp. 747). Japan: I.S.U. Company
- Kaushik, R., Pradeep, N., Vamshi, V., Geetha, M., & Usha, A. (2010). *Nutrient composition of cultivated Stevia leaves and the influence of polyphenols and plant pigments on sensory and antioxidant properties of leaf extracts*. Journal of Food Science and Technology, 47, 27–33.
- Kennelly, E. (2002). *Sweet and non-sweet constituents of Stevia rebaudiana (Bertoni) Bertoni*. In A. Kinghorn (Ed.). Stevia, the Genus Stevia. Medicinal and aromatic plants—industrial profiles (vol. 19, pp. 68–85). London, NY: Taylor and Francis.

- Kienle, U. (1992). *Method of making a natural sweetener based on Stevia rebaudiana, and use thereof*. US Patent 5112,610
- Kienle, U., (2002) *Comparison of the production of a natural sweetener from Stevia rebaudiana Bertoni with tobacco cultivation*. FAIR 3751, E.U.
- Kim, I., Yang, M., Lee, O., & Kang, S. (2011). *The antioxidant activity and the bioactive compound content of Stevia rebaudiana water extracts*. LWT – Food Science and Technology, 44, 1328–1332.
- Kochikyan V., Markosyan A., Abelyan L., Balayan A., & Abelyan V. (2006). *Combined enzymatic modification of stevioside and rebaudioside A*. Applied Biochemistry and Microbiology, 42, 31–37.
- Kroger M, Meister K, Kava R. (2006). *Low-calorie Sweeteners and Other Sugar Substitutes: A Review of the Safety Issues*. Comp Rev Food Sci Food Saf;5:35–47.
- Lemus-Mondaca R., Vega-Galvez A. , Zura-Bravo L., Ah-Hen K. (2012). *Stevia rebaudiana Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects*. Food Chemistry (132) 1121–1132
- MEBAK, *Methodensammlung der Mitteleuropäischen Brautechnischen Analysenkommission*, Neuauflage, Selbstverlag der MEBAK, Freising-Weißenstephan,2012.
- Metivier, J. and Viana, A.M., 1979. The effect of long and short day length upon the growth of whole plants and the level of soluble proteins, sugars and stevio-side in leaves of *Stevia rebaudiana*. *Journal of Experimental Botany*, 30:1211-1222.
- Mishra, P., Singh, R., Kumar, U., & Prakash, V. (2010). *Stevia rebaudiana – A magical sweetener*. Global Journal of Biotechnology & Biochemistry, 5, 62–74.
- Mohammad, M., Mohammad, U., Sher, M., Habib, A., & Iqbal, A. (2007). *In vitro clonal propagation and biochemical analysis of field established Stevia rebaudiana Bertoni*. Pakistan Journal of Botany, 39, 2467–2474
- Nakamura, S., & Tamura, Y. (1985). *Variation in the main glycosides of Stevia (Stevia rebaudiana Bertoni)*. Japanese Journal of Tropical Agriculture, 29, 109–116.

- Oddone, B. (1997). *How to grow stevia*. Technical manual. Guarani Botanicals, Pawtucket, CT.
- Official Journal of the European Union, COMMISSION REGULATION (EU) No 1131/2011
- PFAN (2010). Scientific Opinion of the Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to food on *the safety of steviol glycosides for the proposed uses as a food additive*. The EFSA Journal: 8(4):1537
- Phelan S, Lang W, Jordan D and Wing RR (2009) *Use of artificial sweeteners and fat-modified foods in weight loss maintainers and always-normal weight individuals*. International Journal of Obesity advance online publication 28 July 2009; doi: 10.1038/ijo.2009.147
- Pol, J., Hohnová, B., & Hyotylainen, T. (2007). *Characterization of Stevia rebaudiana by comprehensive two-dimensional liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 1150, 85–92.
- Pol, J., Ostra, E. V., Karasek, P., Roth, M., Karolinka, B., Kotlarikova, P., et al. (2007). *Comparison of two different solvents employed for pressurised fluid extraction of stevioside from Stevia rebaudiana: Methanol versus water*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 388, 1847–1857.
- Prakash, I., Dubois, G., Clos, J., Wilkens, K., & Fosdick, L. (2008). *Development of rebiana, a natural, non-caloric sweetener*. Food and Chemical Toxicology, 46, S75–S82.
- Puri, M., & Sharma, D. (2011). *Antibacterial activity of stevioside towards food borne pathogenic bacteria*. Engineering in Life Sciences, 11, 326 – 329.
- Puri, M., & Sharma, D., Puri, M., & Sharma, D., Barrow C., Tiwary A.K. (2012). *Optimisation of novel method for the extraction of steviosides from Stevia rebaudiana leaves*, Food Chemistry 132 ,1113 – 1120
- Rahmesh, K., Singh, V., & Megeji, N. (2006). *Cultivation of Stevia (Stevia rebaudiana (Bert) Bertoni): A comprehensive review*. Advances in Agronomy, 89, 137– 177.
- Rank, A., & Midmore, J. (2006). *Stevia – An intense natural sweetener: Laying the groundwork for a new rural industry*; May 2006 RIRDC Publication No. 06/020 RIRDC Project No UCQ-17A.

- Serio, L. (2010). *La Stevia rebaudiana, une alternative au sucre*. *Phytothérapie*, 8, 26–32.
- Shi, Q., Kumar, A., & Kutowi, O. (2000). *Membrane-base separation scheme for processing sweeteners from Stevia leaves*. *Food Research International*, 33, 617–620.
- Shock, C. (1982). *Experimental cultivation of Rebaudi's stevia in California*. University of California – Davis, *Agronomy Progress Report*, April pp. 122.
- Shukla S., Mehta A., Mehta P., Bajpai V. (2012). *Antioxidant ability and total phenolic content of aqueous leaf extract of Stevia rebaudiana Bert.*. *Experimental and Toxicologic Pathology* 64, 807–811
- Singh, S., & Rao, G. (2005). *Stevia: The herbal sugar of 21st Century*. *Sugar Tech*, 71, 17–24.
- Sivaram, L., & Mukundam, U. (2003). *In vitro culture studies on Stevia rebaudiana*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 39, 520–523.
- Soejarto, D. (2002). *Botany of Stevia and Stevia rebaudiana*. In A. Kinghorn (Ed.), *Stevia: The genus Stevia* (pp. 18–39). London, New York: Taylor and Francis
- Starratt, A.N., Kirby, C.W., Pocs, R., Brandle, J.E., 2002. *Rebaudioside F, a diterpene glycoside from S. rebaudiana*. *Phytochemistry*, 59:367-370.
- Tadhani, M., & Subhash, R. (2006a). *Preliminary studies on Stevia rebaudiana leaves: Proximal composition, mineral analysis and phytochemical screening*. *Journal of Medical Sciences*, 6, 321–326.
- Tadhani, M., & Subhash, R. (2006b). *In vitro antimicrobial activity of Stevia rebaudiana Bertoni leaves*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 5, 557–560.
- Tadhani, M., Patel, V., & Subhash, R. (2007). *In vitro antioxidant activities of Stevia rebaudiana leaves and callus*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 323–329.
- University of Ottawa IGEM (2009). *Lactobacillus plantarum*.
- Virendra, V., & Kalpagam, P. (2008). *Assessment of Stevia (Stevia rebaudiana)- natural sweetener: A review*. *Journal of Food Science and Technology*, 45, 467–473.

- White F H. 1995. *Spectrophotometric determination of malt colour*. Journal of the Institute of Brewers, 101:431–433
- WHO (2007). Report of a Joint WHO/FAO/UNU Expert Consultation on *Protein and Amino Acid Requirements in Human Nutrition* (2002: Geneva, Switzerland). WHO Technical Report Series; No. 935.
- Κωνσταντίνου Β., Κουλαδούρος Η. (1999). *Πρακτικά και Θεωρητικά Θέματα Γενικής Χημείας*. ΓΠΑ. σ. 5-6.
- Λιοδάκης Σ. (2003). *Εφαρμοσμένη Ανόργανη Χημεία*. Επιστ. Εκδόσεις Παρισιάνου Α.Ε, σ. 792.
- Λόλας, Π.Χ (2008). *Η στέβια (stevia rebaudiana) ως καινοτόμος εναλλακτική καλλιέργεια – τρόφιμο στην Ελλάδα*. 2^ο Πανελ. Συνέδριο Δ.Ε.Δ.Υ.Τ., 6-8/6/08, Θεσ/νίκη.
- Μπαλατσούρας Γ. (2006). *Μικροβιολογία Τροφίμων*. Εκδόσεις Έμβρυο, σ. 107, 115, 218, 319
- Όξενκιουν-Πετροπούλου Μ. (2006). *Φυσικές Μέθοδοι Ανάλυσης. Φασματομετρικές Μέθοδοι*. Εκδόσεις Συμμετρία, σ.293-298.
- Πολυσίου Μ.Γ. (2001). *Μαθήματα οργανικής στερεοχημείας και ενόργανης ανάλυσης*. ΓΠΑ, σ. 46-47.
- Τζια Κ., Ταούκης Π., Ωραιοπούλου Β., 2009. *Επιστήμη και Μηχανική Τροφίμων: Συστατικά- Ιδιότητες- Ποιότητα- Μικροβιολογία- Ρεολογία- Συσκευασία*. ΕΜΠ, σ. 192-222.
- www.buchi.com
- www.chem.auth.gr
- www.efsa.europa.eu
- www.eufic.org/article/el/health-lifestyle/diet-weight-control/artid/stevia-natural-sweetener-potential-greek/
- www.eufic.org/article/en/page/FTARCHIVE/artid/low-calorie-sweeteners
- www.eur-lex.europa.eu
- www.nexcelom.com
- www.perkinelmer.com

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι: Επιτρεπτά όρια χρήσης των γλυκοζιτών στεβιόλης

Πίνακας Π 1: Επιτρεπτά όρια χρήσης των γλυκοζιτών στεβιόλης ως πρόσθετη γλυκαντική ουσία σε διάφορες κατηγορίες τροφίμων.

(COMMISSION REGULATION (EU) No 1131/2011, Official Journal of the European Union)

Category number	E-number	Name	Maximum level (mg/l or mg/kg as appropriate)	Footnotes	restrictions/exception
01.4	Flavoured fermented milk products including heat treated products				
	E 960	Steviol glycosides	100	(60)	only energy-reduced products or with no added sugar
		(60): expressed as steviol equivalents			
03.	Edible ices				
	E 960	Steviol glycosides	200	(60)	only energy-reduced or with no added sugar
		(60): expressed as steviol equivalents			
04.2.2	Fruit and vegetables in vinegar, oil, or brine				
	E 960	Steviol glycosides	100	(60)	only sweet-sour preserves of fruit and vegetables
		(60): expressed as steviol equivalents			
04.2.4.1	Fruit and vegetable preparations excluding compote				
	E 960	Steviol glycosides	200	(60)	only energy-reduced
		(60): expressed as steviol equivalents			
04.2.5.1	Extra jam and extra jelly as defined by Directive 2001/113/EC				
	E 960	Steviol glycosides	200	(60)	only energy-reduced jams jellies and marmalades
		(60): expressed as steviol equivalents			
04.2.5.2	Jam, jellies and marmalades and sweetened chestnut puree as defined by Directive 2001/113/EC				
	E 960	Steviol glycosides	200	(60)	only energy-reduced jams, jellies and marmalades
		(60): expressed as steviol equivalents			

Category number	E-number	Name	Maximum level (mg/l or mg/kg as appropriate)	Footnotes	restrictions/exception
04.2.5.3	Other similar fruit or vegetable spreads				
	E 960	Steviol glycosides	200	(60)	only dried-fruit-based sandwich spreads, energy-reduced or with no added sugar
		(60): expressed as steviol equivalents			
05.1	Cocoa and Chocolate products as covered by Directive 2000/36/EC				
	E 960	Steviol glycosides	270	(60)	only energy-reduced or with no added sugars
		(60): expressed as steviol equivalents			
05.2	Other confectionery including breath refreshing microsweets				
	E 960	Steviol glycosides	270	(60)	only cocoa or dried fruit based, energy reduced or with no added sugar
	E 960	Steviol glycosides	330	(60)	only cocoa, milk, dried fruit or fat based sandwich spreads, energy-reduced or with no added sugar
	E 960	Steviol glycosides	350	(60)	only confectionary with no added sugar
	E 960	Steviol glycosides	2 000	(60)	only breath-freshening micro-sweets, with no added sugar
	E 960	Steviol glycosides	670	(60)	only strongly flavoured freshening throat pastilles with no added sugar
		(60): expressed as steviol equivalents			
05.3	Chewing gum				
	E 960	Steviol glycosides	3 300	(60)	only with no added sugar
		(60): expressed as steviol equivalents			
05.4	Decorations, coatings and fillings, except fruit based fillings covered by category 4.2.4				
	E 960	Steviol glycosides	330	(60)	only confectionary with no added sugar
	E 960	Steviol glycosides	270	(60)	only cocoa or dried fruit based, energy reduced or with no added sugar
		(60): expressed as steviol equivalents			

Category number	E-number	Name	Maximum level (mg/l or mg/kg as appropriate)	Footnotes	restrictions/exception
06.3	Breakfast cereals				
	E 960	Steviol glycosides	330	(60)	only breakfast cereals with a fibre content of more than 15 %, and containing at least 20 % bran, energy reduced or with no added sugar
		(60): expressed as steviol equivalents			
07.2	Fine bakery wares				
	E 960	Steviol glycosides	330	(60)	only essoblaten - wafer paper
		(60): expressed as steviol equivalents			
09.2.	Processed fish and fishery products including molluscs and crustaceans				
	E 960	Steviol glycosides	200	(60)	only sweet-sour preserves and semi preserves of fish and marinades of fish, crustaceans and molluscs
		(60): expressed as steviol equivalents			
11.4.1	Table Top Sweeteners in liquid form				
	E 960	Steviol glycosides	QS	(60)	
		(60): expressed as steviol equivalents			
11.4.2	Table Top Sweeteners in powder form				
	E 960	Steviol glycosides	QS	(60)	
		(60): expressed as steviol equivalents			
11.4.3	Table Top Sweeteners in tablets				
	E 960	Steviol glycosides	QS	(60)	
		(60): expressed as steviol equivalents			
12.5	Soups and broths				
	E 960	Steviol glycosides	40	(60)	only energy-reduced soups
		(60): expressed as steviol equivalents			

Category number	E-number	Name	Maximum level (mg/l or mg/kg as appropriate)	Footnotes	restrictions/exception
12.6	Sauces				
	E 960	Steviol glycosides	120	(60)	except soy-bean sauce (fermented and non-fermented)
	E 960	Steviol glycosides	175	(60)	only soy-bean sauce (fermented and non-fermented)
		(60): expressed as steviol equivalents			
13.2	Dietary foods for special medical purposes defined in Directive 1999/21/EC (excluding products from food category 13.1.5)				
	E 960	Steviol glycosides	330	(60)	
		(60): expressed as steviol equivalents			
13.3	Dietary foods for weight control diets intended to replace total daily food intake or an individual meal (the whole or part of the total daily diet)				
	E 960	Steviol glycosides	270	(60)	
		(60): expressed as steviol equivalents			
14.1.3	Fruit nectars as defined by Council Directive 2001/112/EC and vegetable nectars and similar products				
	E 960	Steviol glycosides	100	(60)	only energy-reduced or with no added sugar
		(60): expressed as steviol equivalents			
14.1.4	Flavoured drinks				
	E 960	Steviol glycosides	80	(60)	only energy reduced or with no added sugar
		(60): expressed as steviol equivalents			
14.2.1	Beer and malt beverages				
	E 960	Steviol glycosides	70	(60)	only alcohol-free beer or with an alcohol content not exceeding 1,2 % vol.; 'Bière de table/Tafelbier/Table beer' (original wort content less than 6 %) except for 'Obergäriges Einfachbier'; beers with a minimum acidity of 30 milli-equivalents expressed as NaOH; Brown beers of the 'oud bruin' type
		(60): expressed as steviol equivalents			
14.2.8	Other alcoholic drinks including spirits with less than 15 % of alcohol and mixtures of alcoholic drinks with non-alcoholic drinks				
	E 960	Steviol glycosides	150	(60)	
		(60): expressed as steviol equivalents			

Category number	E-number	Name	Maximum level (mg/l or mg/kg as appropriate)	Footnotes	restrictions/exception
15.1	Potato-, cereal-, flour- or starch-based snacks				
	E 960	Steviol glycosides	20	(60)	
		(60): expressed as steviol equivalents			
15.2	Processed nuts				
	E 960	Steviol glycosides	20	(60)	
		(60): expressed as steviol equivalents			
16.	Desserts excluding products covered in category 1, 3 and 4				
	E 960	Steviol glycosides	100	(60)	only energy-reduced or with no added sugar
		(60): expressed as steviol equivalents			
17.1	Food supplements supplied in a solid form including capsules and tablets and similar forms				
	E 960	Steviol glycosides	670	(60)	
		(60): expressed as steviol equivalents			
17.2	Food supplements supplied in a liquid form				
	E 960	Steviol glycosides	200	(60)	
		(60): expressed as steviol equivalents			
17.3	Food supplements supplied in a syrup-type or chewable form				
	E 960	Steviol glycosides	1 800	(60)	
		(60): expressed as steviol equivalents			

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ: Πειραματικές Μετρήσεις

Στους Πίν. Π12-Π12 παρουσιάζονται οι τιμές των ενόργανων μετρήσεων που ελήφθησαν σε όλα τα στάδια του κυρίως και του επαναληπτικού πειράματος, καθώς και στον οργανοληπτικό έλεγχο.

Πίνακας Π 2: Κυρίως πείραμα - Αρχή ζύμωσης (αμέσως μετά τον εμβολιασμό)

Micro-organism	Color [ABS]	Color [EBC]	pH value	Density [g/cm ³]	Alcohol [% v/v]	Real Extract [% w/w]	Apparent Extract [%w/w]	Original Gravity [% w/w]	Degree of Attenuation [% w/w]
Hebru 6%	0.126	31.50	5.38	1.02052	0.12	5.72	5.68	5.91	3.93
Hebru 8%	0.125	31.25	5.47	1.03059	0.09	8.20	8.17	8.34	2.05
RH 4%	0.124	31.00	5.56	1.01614	0.08	4.61	4.58	4.73	3.31
RH 8%	0.119	29.75	5.58	1.03055	0.07	8.18	8.16	8.29	1.61
L48 4%	0.121	30.25	5.48	1.01764	0.07	4.98	4.96	5.09	2.69
L48 8%	0.121	30.25	5.45	1.03330	0.05	8.85	8.83	8.92	1.06
B1 0%	0.124	31.00	5.49	1.00042	0.04	0.58	0.57	0.65	12.60
B1 2%	0.122	30.50	5.50	1.00936	0.02	2.87	2.86	2.90	1.40
210 0%	0.128	32.00	5.69	1.00035	0.03	0.56	0.55	0.61	10.08
210 2%	0.126	31.50	5.66	1.00888	0.03	2.75	2.74	2.80	2.06
pure Extract	0.137	34.25	6.19	1.00045	0.04	0.59	0.58	0.66	12.42

Πίνακας Π 3: Κυρίως πείραμα – 6η ημέρα ζύμωσης

Micro-organism	Color [ABS]	Color [EBC]	pH value	Density [g/cm ³]	Alcohol [% v/v]	Real Extract [% w/w]	Apparent Extract [%w/w]	Original Gravity [% w/w]	Degree of Attenuation [% w/w]
Hebru 6%	0.120	30.00	4.33	1.01666	0.56	4.92	4.71	5.80	18.75
Hebru 8%	0.112	28.00	4.42	1.02709	0.48	7.48	7.31	8.21	10.97
RH 4%	0.115	28.75	4.58	1.01318	0.52	4.03	3.83	4.85	20.92
RH 8%	0.110	27.50	4.46	1.02739	0.49	7.56	7.38	8.30	11.14
L48 4%	0.136	34.00	4.51	1.01474	0.38	4.37	4.23	4.97	14.97
L48 8%	0.126	31.50	4.42	1.02899	0.63	8.01	7.77	8.96	13.30
B1 0%	0.190	47.50	4.51	1.00003	0.03	0.48	0.47	0.53	10.71
B1 2%	0.126	31.50	3.58	1.00853	0.07	2.68	2.65	2.79	4.94
210 0%	0.201	50.13	4.88	0.99995	0.01	0.46	0.45	0.48	5.69
210 2%	0.134	33.50	3.63	1.00799	0.08	2.54	2.51	2.67	5.78

Πίνακας Π 4: Κυρίως πείραμα – 15η ημέρα ζύμωσης

Micro-organism	Color [ABS]	Color [EBC]	pH value	Density [g/cm ³]	Alcohol [% v/v]	Real Extract [% w/w]	Apparent Extract [%w/w]	Original Gravity [% w/w]	Degree of Attenuation [% w/w]
Hebru 6%	0.124	31.00	3.92	1.01007	1.47	3.60	3.04	5.90	48.40
Hebru 8%	0.114	28.50	3.87	1.01924	1.55	5.93	5.35	8.30	35.51
RH 4%	0.120	30.00	4.05	1.00784	1.26	2.96	2.48	4.94	49.87
RH 8%	0.116	29.00	3.89	1.02015	1.48	6.13	5.58	8.40	33.49
L48 4%	0.168	42.00	4.59	1.01432	0.44	4.29	4.12	4.98	17.28
L48 8%	0.155	38.75	4.40	1.02654	0.94	7.52	7.17	8.94	19.80
B1 0%	0.266	66.50	5.03	0.99989	-0.01	0.43	0.43	0.42	-4.78
B1 2%	0.176	44.00	3.56	1.00770	0.15	2.50	2.44	2.75	11.16
210 0%	0.226	56.50	5.30	0.99981	0.00	0.42	0.41	0.42	1.93
210 2%	0.168	42.00	3.61	1.00722	0.14	2.38	2.32	2.61	11.01

Πίνακας Π 5: Κυρίως πείραμα – Μετά τη συμπύκνωση

Micro-organism	Color [ABS]	Color [EBC]	pH value	Density [g/cm ³]	Alcohol [% v/v]	Real Extract [% w/w]	Apparent Extract [%w/w]	Original Gravity [% w/w]	Degree of Attenuation [% w/w]
Hebru	1.01852	0.06	5.2	5.17	5.29	2.11
Hebru	0.203	50.75	3.84	1.02599	0.25	7.13	7.03	7.51	6.36
RH 4%	0.218	54.50	4.02	1.01242	0.16	3.71	3.64	3.97	8.18
RH 8%	0.195	48.75	3.85	1.02573	0.33	7.09	6.97	7.61	8.38
L48 4%	0.250	62.50	4.61	1.01902	0.04	5.32	5.3	5.38	1.41
L48 8%	0.244	61.00	4.40	1.03189	0.16	8.54	8.49	8.78	3.37
B1 0%	0.375	93.75	5.13	1.00024	-0.02	0.52	0.52	0.48	-8.93
B1 2%	0.278	69.50	3.56	1.0103	0.03	3.11	3.1	3.16	1.81
210 0%	0.329	82.25	5.38	0.99999	-0.01	0.46	0.46	0.45	-2.25
210 2%	0.270	67.50	3.61	1.00925	0.04	2.85	2.84	2.92	2.9

Πίνακας Π 6: Επαναληπτικό πείραμα - Αρχή ζύμωσης (αμέσως μετά τον εμβολιασμό)

Micro-organism	Color [ABS]	Color [EBC]	pH value	Density [g/cm ³]	Alcohol [% v/v]	Real Extract [% w/w]	Apparent Extract [%w/w]	Original Gravity [% w/w]	Degree of Attenuation [% w/w]
RH a	1.166	29.15	5.20	1.01638	0.15	4.70	4.64	4.94	6.05
RH b	1.165	29.13	5.17	1.01630	0.15	4.68	4.62	4.92	6.12
B1 a	1.307	32.68	4.88	1.00422	0.00	1.55	1.55	1.55	-0.15
B1 b	1.319	32.98	4.87	1.00417	0.00	1.54	1.54	1.53	-0.30
L48 a	1.202	30.05	5.33	1.01921	0.05	5.37	5.35	5.45	1.83
L48 b	1.195	29.88	5.31	1.01965	0.05	5.48	5.46	5.56	1.80
pure Extract	1.437	35.93	5.66	1.00032	0.01	0.55	0.54	0.56	2.79

Πίνακας Π 7: Επαναληπτικό πείραμα - 1η ημέρα ζύμωσης

Micro-organism	Color [ABS]	Color [EBC]	pH value	Density [g/cm ³]	Alcohol [% v/v]	Real Extract [% w/w]	Apparent Extract [%w/w]	Original Gravity [% w/w]	Degree of Attenuation [% w/w]
RH a	0.946	23.65	4.45	1.01259	0.66	3.94	3.68	4.97	25.89
RH b	0.945	23.63	4.45	1.01239	0.68	3.89	3.63	4.97	26.87
B1 a	1.118	27.95	3.55	1.00403	0.00	1.50	1.50	1.50	0.19
B1 b	1.140	28.50	3.55	1.00394	0.00	1.48	1.48	1.47	-0.51
L48 a	0.905	22.63	4.46	1.01685	0.34	4.88	4.76	5.41	12.05
L48 b	0.883	22.08	4.55	1.01683	0.44	4.92	4.75	5.60	15.20

Πίνακας Π 7: Επαναληπτικό πείραμα - 3η ημέρα ζύμωσης

Micro-organism	Color [ABS]	Color [EBC]	pH value	Density [g/cm ³]	Alcohol [% v/v]	Real Extract [% w/w]	Apparent Extract [%w/w]	Original Gravity [% w/w]	Degree of Attenuation [% w/w]
RH a	0.841	21.03	4.15	1.00900	1.13	3.20	2.77	4.98	44.32
RH b	0.847	21.18	4.18	1.00885	1.14	3.17	2.73	4.97	45.03
B1 a	0.871	21.78	3.26	1.00375	0.01	1.43	1.43	1.45	1.54
B1 b	0.816	20.40	3.29	1.00343	0.04	1.36	1.35	1.43	5.48
L48 a	0.870	21.75	4.37	1.01604	0.44	4.72	4.55	5.41	15.81
L48 b	0.872	21.80	4.43	1.01618	0.53	4.79	4.59	5.62	18.39

Πίνακας Π 8: Επαναληπτικό πείραμα - 4η ημέρα ζύμωσης

Micro-organism	Color [ABS]	Color [EBC]	pH value	Density [g/cm ³]	Alcohol [% v/v]	Real Extract [% w/w]	Apparent Extract [%w/w]	Original Gravity [% w/w]	Degree of Attenuation [% w/w]
RH a	0.827	20.68	4.10	1.00779	1.28	2.95	2.46	4.97	50.37
RH b	0.814	20.35	4.12	1.00772	1.28	2.94	2.45	4.96	50.67
B1 a	0.802	20.05	3.24	1.00344	0.04	1.37	1.35	1.43	5.75
B1 b	0.785	19.63	3.23	1.00308	0.09	1.29	1.26	1.44	12.60
L48 a	0.867	21.68	4.47	1.01600	0.44	4.71	4.54	5.41	15.95
L48 b	0.886	22.15	4.53	1.01614	0.54	4.78	4.58	5.63	18.60

Πίνακας Π 9: Επαναληπτικό πείραμα - 7η ημέρα ζύμωσης

Micro-organism	Color [ABS]	Color [EBC]	pH value	Density [g/cm ³]	Alcohol [% v/v]	Real Extract [% w/w]	Apparent Extract [%w/w]	Original Gravity [% w/w]	Degree of Attenuation [% w/w]
RH a	0.803	20.08	4.09	1.00744	1.35	2.89	2.37	5.01	52.65
RH b	0.819	20.48	4.07	1.00738	1.35	2.87	2.36	5.00	52.84
B1 a	0.757	18.93	3.20	1.00315	0.08	1.31	1.28	1.44	11.21
B1 b	0.742	18.55	3.24	1.00301	0.09	1.28	1.24	1.43	13.11

Πίνακας Π 10: Επαναληπτικό πείραμα – Μετά τη συμπύκνωση και τον αποχρωματισμό

Micro-organism	Color [ABS]	Color [EBC]	pH value	Density [g/cm ³]	Alcohol [% v/v]	Real Extract [% w/w]	Apparent Extract [% w/w]	Original Gravity [% w/w]	Degree of Attenuation [% w/w]
non-discolored									
RH a	0.835	20.88	4.23	1.01174	0.14	3.52	3.47	3.75	7.62
RH b	0.944	23.60	4.22	1.01125	0.23	3.43	3.34	3.79	11.73
B1 a	0.993	24.83	3.19	1.00473	0.04	1.70	1.68	1.77	4.93
B1 b	0.951	23.78	3.23	1.00436	0.06	1.61	1.59	1.70	6.70
L48 a	1.131	28.28	4.55	1.02149	0.00	5.92	5.92	5.92	-0.02
L48 b	1.138	28.45	4.63	1.02199	0.02	6.05	6.04	6.08	0.56
discolored									
RH a	0.336	8.40	4.48	1.01164	0.10	3.48	3.44	3.65	5.53
RH b	0.295	7.38	4.48	1.01103	0.17	3.35	3.29	3.62	9.07
B1 a	0.223	5.58	3.22	1.00409	0.05	1.54	1.52	1.61	5.94
B1 b	0.198	4.95	3.27	1.00373	0.05	1.44	1.42	1.52	6.26
L48 a	0.558	13.95	4.62	1.02105	0.00	5.81	5.81	5.81	0.08
L48 b	0.549	13.73	4.67	1.02193	0.01	6.03	6.03	6.04	0.18

Πίνακας Π 11: Οργανοληπτικός Έλεγχος- Μπόρα με μη αποχρωματισμένο εκχύλισμα γλυκοζιτών στεβιόλης

Micro-organism	Color [ABS]	Color [EBC]	pH value	Density [g/cm ³]	Alcohol [% v/v]	Real Extract [% w/w]	Apparent Extract [% w/w]	Original Gravity [% w/w]	Degree of Attenuation [% w/w]	Calories [kcal/100ml]
RH a 0.5	0.265	6.63	4.34	1.00605	4.79	3.77	2.02	11.09	81.80	166.6
RH a 1.0	0.283	7.08	4.34	1.00668	4.53	3.83	2.18	10.77	79.74	161.5
RH b 0.5	0.266	6.65	4.36	1.00611	4.78	3.78	2.04	11.09	81.67	166.5
RH b 1.0	0.272	6.80	4.36	1.00653	4.55	3.81	2.15	10.77	80.11	161.6
B1 a 0.5	0.258	6.45	4.19	1.00559	4.79	3.65	1.90	10.98	82.70	164.6
B1 a 1.0	0.259	6.48	4.06	1.00592	4.52	3.64	1.99	10.56	81.20	158.2
B1 b 0.5	0.257	6.43	4.21	1.00598	4.79	3.75	2.00	11.06	81.91	166.0
B1 b 1.0	0.263	6.58	4.08	1.00593	4.48	3.63	1.99	10.50	81.06	157.3
L48 a 0.5	0.275	6.88	4.35	1.00717	4.73	4.03	2.31	11.24	79.48	169.0
L48 a 1.0	0.275	6.88	4.38	1.00766	4.50	4.07	2.43	10.94	77.79	164.5
L48 b 0.5	0.317	7.93	4.39	1.00803	4.64	4.21	2.52	11.28	77.62	169.8
L48 b 1.0	0.280	7.00	4.38	1.00769	4.50	4.08	2.44	10.96	77.73	164.7
pure beer	0.269	6.73	4.31	1.00653	4.99	3.95	2.14	11.56	81.47	173.9

Πίνακας Π 12: Οργανοληπτικός Έλεγχος- Μπύρα με αποχρωματισμένο εκχύλισμα γλυκοζιτών στεβιόλης

Micro-organism	Color [ABS]	Color [EBC]	pH value	Density [g/cm ³]	Alcohol [% v/v]	Real Extract [% w/w]	Apparent Extract [% w/w]	Original Gravity [% w/w]	Degree of Attenuation [% w/w]	Calories [kcal/100 ml]
RH b 0.5d	0.249	6.23	4.32	1.00630	4.82	3.84	2.08	11.21	81.42	168.3
RH b 1.0d	0.242	6.05	4.30	1.00630	4.60	3.76	2.09	10.80	80.70	161.9
B1 a 0.5d	0.247	6.18	4.20	1.00594	4.82	3.75	1.99	11.12	82.09	166.8
B1 a 1.0d	0.232	5.80	4.06	1.00559	4.59	3.58	1.90	10.62	82.09	159.0
B1 b 0.5d	0.265	6.63	4.22	1.00639	4.75	3.84	2.11	11.10	81.02	166.7
B1 b 1.0d	0.233	5.83	4.09	1.00558	4.58	3.57	1.90	10.59	82.08	158.6
L48a 0.5d	0.255	6.38	4.30	1.00668	4.78	3.92	2.18	11.22	80.56	168.5
L48a 1.0d	0.259	6.48	4.31	1.00735	4.55	4.01	2.35	10.95	78.53	164.6
L48b 0.5d	0.258	6.45	4.31	1.00685	4.77	3.96	2.23	11.25	80.23	169.0
L48b 1.0d	0.257	6.43	4.28	1.00739	4.54	4.02	2.36	10.95	78.44	164.5

Πίνακας Π 13: Έντυπο οργανοληπτικού ελέγχου

Evaluated characteristic	Points	Description	Evaluation
Flavor	5	pure	
	4	still pure	
	3	light errors	
	2	strong errors	
	1	obvious errors	
Taste	5	pure	
	4	still pure	
	3	light errors	
	2	strong errors	
	1	obvious errors	
Palate fullness 1	5	typical of the variety	
	4	typical	
	3	less typical	
	2	non typical	
	1	very non typical	
Palate fullness 2	5	strong palate fullness	
	4	great palate fullness	
	3	better palate fullness	
	2	normal palate fullness	
	1	lower palate fullness	
Sweetness	5	extremely sweet	
	4	very sweet	
	3	sweeter	
	2	normally sweet	
	1	less sweet	
Bitterness	5	very fine	
	4	fine	
	3	a bit lasting	
	2	lasting	
	1	strong lasting	

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ: Report of the study



TECHNISCHE UNIVERSITÄT BERLIN
SCHOOL III – PROCESS SCIENCES
INSTITUTE OF BIOTECHNOLOGY
Chair Of Brewing Sciences



NATIONAL TECHNICAL UNIVERSITY OF
ATHENS
SCHOOL OF CHEMICAL ENGINEERING
Laboratory of Food Chemistry and Technology

DIPLOMA THESIS

**DEVELOPMENT OF AN ACIDIFICATION- AND SWEETENING
AGENT FOR BEVERAGES ON THE BASIS OF *STEVIA*
*REBAUDIANA***

BY
ZOLOTA NIKI
351495

EVALUATORS: PR. DR.-ING. F.-J. METHNER (TU BERLIN)

PR. P.TAOUKIS (NTUA)

SCIENTIFIC SUPERVISOR: HERR DIPL.-ING. THOMAS KUNZ

DECEMBER 2013

Aknowledgements

This thesis was carried out through ERASMUS Program at the University TU-Berlin, in Chair of Brewing Sciences, in collaboration with the laboratory of Food Chemistry and Technology of the School of Chemical Engineering of NTUA (National Technical University of Athens).

Firstly, I would like to thank Prof. P. Taoukis, who agreed to be supervisor of my thesis, together with Dr.-Pr. Methner, and supported me during the whole process. I also thank warmly Dr G. Katsaros for his valuable advice during the writing of my thesis.

I equally thank Dr.-Pr. Methner, Dipl.-Ing. Kunz and Ph. Wietstock for the opportunity they gave me to carry out my thesis at TUB. I specially thank T. Seewald for his daily support and guidance by the experiments, and all employees and PhDs in the laboratory for their help.

Finally, I sincerely thank my friends and relatives, for their constant love, Despina, who motivated me to participate in Erasmus program and of course Vicky for supporting me like a sister during my stay in Berlin.

ABSTRACT

Replacing sugar with other sweeteners in foods and beverages is a key objective in the food industry, for products that contain fewer calories and are suitable for diabetics. In recent years, a non-caloric natural sweetener, which is used for centuries in Paraguay has attracted much interest. The steviol glycosides, extracted from the leaves of the plant *Stevia rebaudiana Bertoni* have 300 times the sweetness of sugar and almost negligible effect on blood glucose levels. The use of steviol glycosides as a sweetener in foods is approved by the EFSA (European Food Safety Authority) and the food additive is assigned the number «E 960». However, the main drawback of this sweetener is its characteristic bitter taste. This prevents the use of steviol glycosides for total replacement of sugar in foods and beverages. For this reason, most products with steviol glycosides that are already on the market, contain also sugar or other artificial sweeteners.

In this study the objective was to find a set of processes, in order to produce an extract of the plant *Stevia rebaudiana*, free of the characteristic bitter taste and with low pH-value, which can be added as sweetener and acidifier in beverages. The processes that were studied were extraction, fermentation of the extract and then its concentration and discoloration. The study included a pre-trial to select the best extraction and fermentation conditions, the main trial for studying the fermentation and finding optimal conditions for concentration and discoloration and finally a repetition, based on the conclusions of the main trial. The cold extraction of *stevia* leaves followed by filtration was selected as the best extraction method, because the extract had the best taste, which remained stable, even with the increase of the boiling time. The extract was fermented with some strains of yeast *S. cerevisiae* and with some strains of *Lactobacillus L. plantarum*. Through fermentation the bitter taste of the extract was eliminated and its pH-value was also reduced. The concentration by the rotary evaporator led to removal of ethanol, that was produced by alcoholic fermentation, and partial removal of water. Finally, it was found that the optimal concentration of activated carbon for the discoloration of the extract was 3000 g/hL.

After repetition of the main trial, the several extracts, that were produced, were mixed with beer *Pilsner* (0.5 and 1.0 mL extr./10 mL beer) in order to carry out a sensory analysis. The beer samples were evaluated by testers mainly on the sweetness, the bitterness and palate fullness. The discolored *stevia* extract which was fermented with strain *B1* of *L.plantarum* was liked the most by testers, because it increased the sweetness and palate fullness of beer, but not its bitterness. This extract

after fermentation had the lowest pH-value (pH=3.2) and after filtration with activated carbon reached the highest percentage of discoloration (almost 80%).

In conclusion, all processes studied in this experiment resulted in the production of an extract from the plant *Stevia rebaudiana*, free of the bitterness of steviol glycosides, with low pH-value and a slightly yellowish color, suitable for addition to beverages as a sweetener and acidifier.

Contents

ABSTRACT
1 Introduction	1
2 Problem and Objective	2
3 Materials and Methods.....	3
3.1 Laboratory Equipment.....	3
3.2 Devices	4
3.3 Laboratory Analyses.....	5
3.4 Reagents.....	5
3.5 Microorganisms.....	5
3.6 Experimental Procedure.....	6
3.6.1 Pre-Trial	6
3.6.2 Main- Trial	8
3.6.3 Repetition of Main Trial.....	14
3.7 Tasting.....	15
4 Results.....	18
4.1 Pre-trial	18
4.1.1 Extraction and Boiling.....	18
4.1.2 Fermentation	20
4.1.3 New fermentation	22
4.2 Main-trial	23
4.2.1 Extraction-Fermentation-Concentration	23
4.2.2 Discoloration	26
4.3 Repetition of main trial.....	30
4.4 Tasting	35

1 Introduction

The sweet taste exists in many foods and is liked by most people. Humans tried to find the sweet taste in nature, so they recognized the sweetness in honey, in fruit juices and later in sugar. Lately, the increase in obesity and diabetes, diseases that are related to high consumption of calories, led to the composition of artificial low-calorie sweeteners, such as saccharin and aspartame. However, the safety of artificial sweeteners is contested. Therefore, scientists turned their interest to a natural non-caloric sweetener, which has been used for centuries in Paraguay. This is the plant *stevia rebaudiana bertonii*, the "sweet herb" as it is called by the natives in Paraguay, which was botanically classified by Moisis Santiago Bertoni in 1899. *Stevia* leaves contain diterpene glycosides -mainly stevioside and rebaudioside A-, which make *stevia* 300 times sweeter than sugar. In contrast to sugar, *stevia* has a negligible effect on blood glucose levels, so it is suitable for people with obesity, hypertension and diabetes. Toxicological studies have proved the safety of steviol glycosides. In April 2010 the Committee EFSA (European Food Safety Authority) EU approved the use of steviol glycosides (E960) and established as ADI (Acceptable Daily Intake) 4 mg/kg of body weight per day. Steviol glycosides, either as a table-top sweetener or as an additive sweetener in dietetic products have been already marketed. The present study aimed to develop an extract of steviol glycosides with sweetening, coloring and acidic properties. The final product should be light yellowish, non-alcoholic and sweet without the characteristic bitter taste of *stevia*, so it can be added to beverages.

2 Problem and Objective

This study aimed to the development of a coloring-, acidification- and sweetening agent for beverages on the basis of the plant *Stevia rebaudiana bertonii*. Specifically, was studied the extraction of dried *stevia* leaves and then the fermentation, concentration and discoloration of the extract. The final product was added to beer *Pilsner* (0.5 and 1.0 mL *stevia* extr./10 mL beer), in order to be tasted and evaluated.

The purpose of the study was the production of a sweetener of steviol glucosides with low pH-value, slightly yellowish color and improved taste, i.e. without the bitter characteristic taste of *stevia*. More specifically, the aim of fermentation was to decrease bitterness and the pH-value. Through concentration the extract should lose the ethanol produced in the alcoholic fermentation and some water. Finally, the study of discoloration was aimed to find the optimum concentration of activated carbon, which is required to reduce the intense brown-yellow color of the *stevia* extract, so that it can be added to colorless or slightly yellow beverages (beer, lemonade, etc.). The sensoric analysis was aimed to compare several extracts, fermented by different microorganisms discolored and non-discolored extracts, and also to compare pure beer with the beers mixed with 0.5 1.0mL. *stevia* extr./10 mL.

3 Materials and Methods

3.1 Laboratory Equipment

- Cellometer Cell Counting Chambers (Nexcelom Bioscience)
- Cellulose Acetate Filters, pore size 0.45 μm (Sartorius Biolab Products, Lot No: 1211111061102193)
- Centrifuge tubes 50 mL
- Conical flasks 5 L
- Cuvettes Makro PS 1 cm (VWR internat. bvba, B3001 Leuven, Cat No. 634-2500)
- Fermentation tubes
- Flasks 1-2 L
- Folded Filters, 597 1/2, Diam.320 mm, pore size 4-7 μm (GE Healthcare Life Sciences WhatmanTM, Cat No. 10311853, Lot No G1447293)
- Folded Filters, 597 1/2, Diam.185 mm (GE Healthcare Life Sciences WhatmanTM, Cat No. 10311853, Lot No G1447293)
- Glasses 0.1-1.5 L
- Glass funnels
- Glass pipette 10 mL
- Lab-glass bottles 0.1-10 L (SCHOTT)
- Magnets
- Measuring cylinders 0,1-1 L
- Micro-tubes 1.5 mL, non-sterile-clear, (LLG, Art.No:9.409.024)
- Mortar
- Pipettes 20 μL , 10-100 μL and 100-1000 μL
- ep T.I.P.S Reloads 2-200 μL , (original Eppendorf, LOT No. B146364G3702)
- Pipette Tips 50-1000 μL (BRANDS GmbH)
- Plastic Syringes 5 mL
- Syringe Filters 25mm, w/0.45 μm , Cellulose Acetate Membrane (VWR International)
- Volumetric flasks 25 mL

3.2 Devices

- Analytical Scale, A200S (Sartorius analytic)
- Centrifuge Avanti™ J-25, centrifuge cage JLA 16.250 (Beckmann Coulter)
- Cellometer Vision Profiler, (Nexcelom Bioscience LLC)
- Diaphragm Vacuum pump, Type MZ 2C, 1,7m³/h (VACUUBRAND GMBH+CO KG)
- Diaphragm Vacuum pump, Type MZ 2C, 1,9m³/h (VACUUBRAND GMBH+CO KG)
- Fridges 0-2°C, heating cabinet 28°C
- pH-meter 766 Calimatic (Knick)
- Photometer Lambda 25 UV/Vis system (Perkin Elmer)
- Precision densimeter DMA 4500M with Alcoholizer Beer ME, color- and pH-module (Anton Paar)
- Rotary Evaporator
- Scale Mettler PM4000 (Mettler Waagen GmbH)
- Swip VKS 75 (Edmund Bühler)
- Ultrasonic bath Sonorex digital 10P, frequency 35kHz (Bandelin electronic)
- Magnetic Stirrer (Variomag® Telesystem)
- Water Bath with temperature control

3.3 Laboratory Analyses

All analyses were done in the laboratories of TU Berlin, Lab of Brewing Science and were done according to MEBAK (Mittleuropäische Brautechnische Analysenkommision)

- Precision densimeter : cp. MEBAK 2.9.2.3
- Alcohol : cp. MEBAK 2.9.2.3
- Color : cp. MEBAK 2.12.2
- Apparent extract : cp. MEBAK 2.9.3
- pH-value : cp. MEBAK 2.13

3.4 Reagents

- Activated carbon, M=12,01 g/mol (VWR, de.vwr.com, CAS: 7440-44-0)
- Beer:, Berliner Kindl Jubiläums Pilsener Premium, Alc. 5.1% vol., (03L02981G and 14L01581I)
- Deionized water
- Distilled water
- Divergan F crosslinked Polyvinylpyrrolidone, (PVPP), (BASF SE, 67056 Ludwigshafen Germany, www.basf.com, Art. No: 50545184, Lot. No: 28915724U0)
- Ethanol absolute, $\geq 99.9\%$, 0.79kg/L (VWR International S.A.S, 201 Rue Carnot-F-94126-Fontenay-sous-Bois France, fr.vwr.com. , CAS No: 64-17-5)
- Glucose syrup DE40, Sugar 83°Bx (Agrana Zucker GmbH, Austria, www.agrana.at)
- Propidium iodide (PI), $\geq 94,0\%$ M=668.39 g/mol (Sigma Aldrich[®], www.sigmaaldrich.com, CAS No: 25535-16-4)
- *Stevia* leaves, *Stevia*-Blätter aus naturgemäßem Anbau, Zutaten: Getrocknete Blätter der *Stevia rebaudiana bertonii* (Blauer Planet GmbH)
- Sodium chloride (NaCl), $\geq 99.5\%$, M=58.44 g/mol (Merck kGaA, Darmstadt Germany, www.merck.de, 1.06404.0500)

3.5 Microorganisms

- Yeasts: *Saccharomyces cerevisiae*: *Hebru*, *RH*, *L48*
- *Lactobacilli*: *Lactobacillus plantarum*: *B1*, *210*

3.6 Experimental Procedure

3.6.1 Pre-Trial

3.6.1.1 Extraction and Boiling

In the beginning 4 different extracts were produced:

- Enzymatically treated powder 1 g/100 ml dissolved in water.
- Liquid extract 10 g/100 ml diluted with water.
- Crushed leaves 2 g/100 ml.
- Cold extract 2 g/100 ml: crushed leaves poured into water for 10 min and then filtered off through folded filters.

The various solutions were boiled in each case 10, 30 and 60 min. Subsequently, all samples were tasted to evaluate their sweetness and bitterness. After that, the liquid extract and the cold extract were investigated further. This time the liquid extract was undiluted. For the production of the cold extract 2 g leaves were crushed with a mortar and were poured into 50 mL water for 10 min. After that the leaves were filtered off through folded filters and the extract was refilled with 50 mL water more. The two solutions were boiled in each case 10, 30 and 60 min. and then were tasted.

3.6.1.2 Soxhlet extraction



Except of simple extraction, 4 g of *stevia* leaves were ground and extracted in Soxhlet extractor with a) 200 mL ethanol and b) 200 mL water. The extraction time was 30 min. 200 ml water was poured into the ethanol extract, forming a strong turbidity, because of insoluble substances!). Then the ethanol was distilled off.

Pic. 1: Soxhlet extractor

3.6.1.3 Fermentation

The cold extract (2 g/100 mL) and the undiluted liquid extract were fermented with *RH* yeasts, once with glucose and once with wort. Each sample contained 8% extract and its total volume was 500 mL. The fermentation proceeded for 7 days at 16°C.

Four samples were fermented with glucose. Each sample contained 200 mL glucose solution (40 g glucose), 50 mL *RH* yeast and 250 mL:

- cold extract
- cold extract, boiled for 30 min
- extract
- extract, boiled for 30 min

Six samples were fermented with wort. Each sample contained 200 mL wort (mixed with glucose), 50 mL *RH* yeast and 250 mL:

- cold extract
- cold extract, boiled for 30 min
- cold extract, boiled for 60 min
- extract
- extract, boiled for 30 min
- extract, boiled for 60 min

After 7 days of fermentation all samples were analyzed by precision densimeter and tasted. The rest of the fermented samples were sent to the rotary evaporator. First the ethanol and other volatile substances were evaporated at 30 mbar and 40-45°C. With a second evaporation the water was also evaporated and the extract was concentrated.

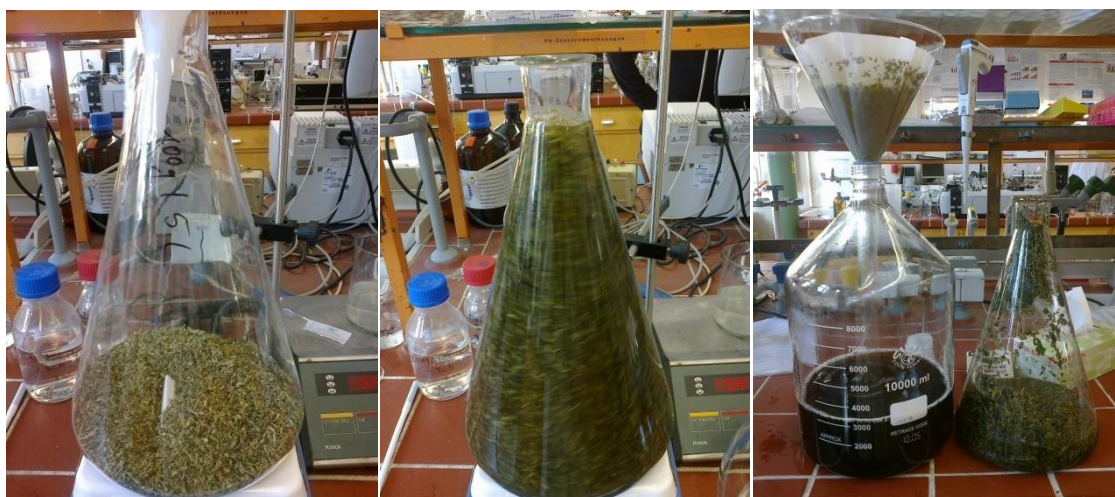
3.6.1.4 New Fermentation

The extract was fermented with 3 different yeasts: *Hebru*, top-fermenting 68 and *RH*. 13 sterile bottles were filled with the rest of the liquid extract, the cold extract (2 g/100 mL) and concentrated cold extract (4 g/100 mL). For the fermentation glucose was added to 8% and 4% extract in the whole sample. The composition of each sample was: 50 mL glucose solution (20 g glucose for 4% and 40 g glucose for 8%), 50 mL yeast, 400 mL extract (liquid/ cold/ concentrated cold). So the total volume of each sample was 500 mL. The samples were fermented for 7 days at 16°C and then were filtered off and tasted. A trial of discoloration took place also. The concentrated sample that was diluted 1:50 was filtered with activated carbon and PVPP.

3.6.2 Main- Trial

3.6.2.1 Cold Extraction

First of all a cold extraction took place. More specifically, 200 g *stevia* leaves were extracted in 10 L distilled water. The extraction took place in two 5 L conical flasks, each of them contained 100 g *Stevia* leaves and 5 L dist. water. The leaves were weighed directly in the flask and then the water was transferred from a 5 L plastic glass into the flask. The extraction lasted 10 min, while the content of each flask was mixed by a magnet stirrer. The extract of both flasks was passed through folded filters and was transferred into a sterile 10 L lab-glass bottle. The filtration of the content of each flask lasted about 70 min. At the end 900mL distilled water were added into the bottle, so that the final volume of the extract was 10 L.



Pic. 2: *stevia* leaves (left), cold extraction-magnetic stirring (middle), filtration with folded filters (right)

3.6.2.2 Fermentation

The *stevia* extract was fermented with 5 different microorganisms: 3 yeasts (*Hebru*, *RH*, *L48*) and 2 *Lactobacilli* (*B1*, *210*). Two different concentrations of glucose were used in each kind of fermentation: 4% and 8% in the yeast fermentation and 0% and 2% in the *Lactobacillus* fermentation. The concentration of each microorganism in the extract was 1×10^6 Cells/mL. The fermentation was carried out in 10 2 L sterile bottles.



Pic. 3: Cellometer Vision

of each microorganism were diluted with 900 μL NaCl and then 20 μL of this solution were diluted with 20 μL PI. At the end 20 μL of the final solution were transferred onto a Cellometer cell counting chamber, which was placed in the Cellometer Vision. This process took place twice, in order to have a double determination for each microorganism. The results from the cell counting and the pitching volume for each microorganism are shown in table 1. The pitching volume of each microorganism was estimated as follows:

Alive Cells/mL = Cells/mL \times Viability / 100.

Pitching volume [mL] = 1000 mL \times 10^6 [Cells/mL] / alive Cells/mL.

Table 1: Cell counting of all microorganisms of the main-trial.

	A	B	average	A	B	average		
Micro-organism	Cells/mL* 10^7	Cells/mL $*10^7$	Cells/mL $*10^7$	Viability %	Viability %	Viability %	Alive cells/mL* 10^7	Pitching volume [mL]
Hebru	5.35	5.79	5.57	93.40	88.20	90.80	5.06	19.77
RH	7.47	6.14	6.81	96.60	96.80	96.70	6.58	15.20
L48	2.42	2.61	2.52	83.00	78.50	80.75	2.03	49.24
B1	30.20	38.00	34.10	79.50	76.60	78.05	26.62	3.76
210	67.10	68.20	67.65	76.00	76.40	76.20	51.55	1.94

The glucose syrup was weighed directly in the bottles that were used for the fermentation. According to manufacturer information glucose syrup DE 40 contained 82-84°Brix soluble solids. For the experiment, a mean value of 83°Brix was assumed. Factor: 1.17. The required mass of glucose syrup for each concentration of glucose (2%, 4% and 8%) is shown in table 2:

Table 2: Mass of glucose DE 40 for concentrations 2, 4, 8% in 1 L *stevia*.

Concentration of glucose	Mass of gl. syrup [g]
2	23.4
4	46.8
8	93.6

Each bottle was first filled with glucose, then with the yeast/ *Lactobacillus* and finally with *stevia* extract till the total volume of 1 L. The bottles with the *Lactobacilli* were closed with plastic caps, while the bottles with the yeasts with fermentation tubes, which were half-filled with water and ethanol. Directly after pitching 100 mL sample were taken from each bottle and from the pure *stevia* extract. All samples were first filtered and then analyzed by the precision densimeter, photometer and pH-meter. Before the analysis with photometer the samples were diluted with water 1:10 (2.5 mL sample in a volumetric flask of 25 mL). The yeasts were fermented at 12°C and the *Lactobacilli* at 28°C. After 6 days of fermentation samples were taken again for analysis. The fermentation was continued for 9 days more, at 16°C for the yeasts and 28°C for the *Lactobacilli*. On the 15th day of fermentation samples were taken for analysis and all bottles with yeasts and *Lactobacilli* were placed in the refrigerator, at 2-4°C. The fermentation tubes of the bottles with the yeasts were replaced by plastic caps.

**Pic. 4: Precision densimeter**

3.6.2.3 Concentration

The fermented samples were concentrated by the rotary evaporator at 50°C and 100 mbar. The temperature of the cold stream was -10°C. After evaporation all samples were filtered with folded filters.

In order to define the sufficient time of distillation for the total removal of alcohol from the samples, a model-solution with 2% EtOH and 4% glucose was concentrated by the rotary evaporator (50°C, 100 mbar, with boiling stones) for different time periods. Each time 100 mL of the model-solution were distilled for 5, 10, 15 or 20 min and then analyzed by the precision densimeter. The alcohol that remained in the solution each time is shown in fig. 1.

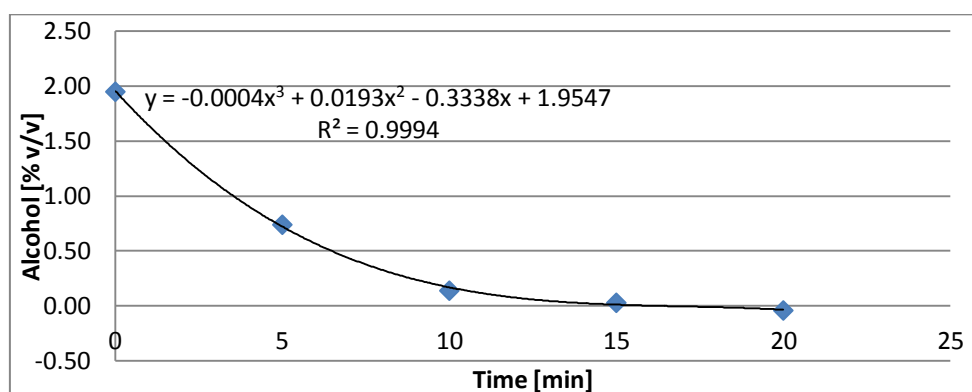


Fig. 1: Concentration of a model-solution, 2% EtOH, 4% glucose (100mbar, 50°C)

The 10 samples with the fermented *stevia* extract were first concentrated for 15 min by the rotary evaporator. The temperature of the water bath was stable at 50°C, while the pressure was gradually decreased from 150 to 100 mbar. The distillate was thrown away, while the condensate of each sample was analyzed by the precision densimeter, pH-meter and photometer. After that, all samples were concentrated again for 30 min at 50°C, 100 mbar, using also boiling stones and were analyzed again.



Pic. 5: Rotary evaporator

3.6.2.4 Discoloration

The concentrated samples were filtered with 6 different concentrations of activated carbon (500, 1000, 2000, 3000, 4000 and 5000 g/hL) by a filtration device with vacuum, in order to get discolored. Before filtration, the required activated carbon was weighed by the analytical scale, was added to 50 mL of *stevia*-sample and the solution was stirred for 10 min by the magnetic stirrer. A 50 mL sample without activated carbon (blank sample) was also filtered by the device.



Pic. 6: Filtration devices



Pic. 7: Membrane after filtration without activ. carbon (left) and with activ. carbon (right).

Finally, the color and the pH-values of all filtrated samples were measured and the discoloration was calculated, using as initial value the color of the sample after concentration.

$$\text{Discoloration} = \frac{\text{color after concentration} - \text{color after filtration}}{\text{color after concentration}} \times 100$$

For the color measurement by the photometer the samples (before and after filtration) were not diluted, but passed through syringe filters with Cellulose Acetate Membrane and pore size 0.45 μm .



Pic. 8: Photometers

3.6.3 Repetition of Main Trial

The trial was repeated faster, based on the conclusions of the main trial. Finally the produced *stevia* extracts were tasted by a sensory analysis.

3.6.3.1 Cold Extraction

The process was identical with the main-trial. 10 L of *stevia* extract were produced.

3.6.3.2 Fermentation

The *stevia* extract was fermented with 3 different microorganisms: 2 yeasts (*RH* and *L48*) and 1 *Lactobacillus* (*B1*). The *stevia* extract was fermented with each microorganism twice (totally 6 samples). The total volume of each sample after pitching and glucose addition was 1.5 L. The concentration of the microorganisms *RH* and *B1* in the extract was 2×10^7 Cells/mL, while the concentration of the yeast *L48* was 1×10^7 Cells/mL. The process of the cell counting was same with the main-trial. The results from the cell counting and the pitching volume for each microorganism are shown in table 3.

Pitching volume [mL] = $1500 \text{ mL} \times 2 \times 10^7 [\text{Cells/mL}] / \text{alive Cells/mL}$. (for *RH* and *B1*)

Pitching volume [mL] = $1500 \text{ mL} \times 10^7 [\text{Cells/mL}] / \text{alive Cells/mL}$. (for *L48*)

Table 3: Cell counting of the microorganisms of the repetition.

	A	B	average	A	B	average		
Micro-organism	Cells/mL* 10^7	Cells/mL $*10^7$	Cells/mL $*10^7$	Viability %	Viability %	Viability %	Alive cells/mL* 10^7	Pitching volume [mL]
RH	48.00	40.40	44.20	89.40	90.50	89.95	39.76	75.46
L48	12.20	14.10	13.15	80.30	79.40	79.85	10.50	142.85
B1	481.00	317.00	399.00	88.20	86.30	87.25	348.13	8.62

The concentration of glucose was 4% by the yeast- and 1% by the *Lactobacillus*-fermentation. The mass of the glucose syrup DE 40 for each glucose concentration was calculated 70.2 g for 4% and 17.6 g for 1%. The calculation steps have been described in the main-trial. This time the glucose syrup was heated in water bath at 60°C, in order to be more “runny” and can be weighed easier. The process of preparing the fermentation and sampling was same with the main-trial. The yeast fermentation (*RH* and *L48*) was carried out this time at 18°C, while the *Lactobacillus* fermentation (*B1*) again at 28°C. The fermentation with *RH* and *B1* lasted 7 days, while the fermentation

with *L48* 4 days. Samples 60 mL were taken for analysis by the precision densimeter, pH-meter and photometer directly after pitching and on the 1st, 3rd, 4th and 7th day of fermentation. The pure *stevia* extract was also analyzed in the beginning. In contrast to the main trial, before photometer the samples were not diluted 1:10, but passed through syringe filters 0.45 µm.

3.6.3.3 Concentration

The concentration was carried out by the rotary evaporator, at 50°C, 100 mbar, using boiling stones. Each fermented sample was divided in two, so that the volume of each sample for concentration was about 600 mL. Flasks of 2 L were used for the concentration and flask of 1 L was used for the distillate. This time the samples were filtered with folded filters before evaporation. The samples were concentrated for 60 min and were analyzed then by the precision densimeter, pH-meter and photometer. The temperature was constant, while the pressure was decreased gradually from 150 to 100 mbar. Specifically, in the first 5 min the pressure was decreased from 150 to 110 mbar, for 10 min it remained at 110 mbar and in the next 10 min it was decreased to 100 mbar, which remained till the end of concentration.

3.6.3.4 Discoloration

The half amount of each of the 12 concentrated samples was discolored with activated carbon 3000 g/hL. The process was identical with the main-trial. The filtration of *B1* lasted only 5 min, while that of *RH* and *L48* over 60 min. Finally the same fermentation samples (eg *RHa1* and *RHa2*) were mixed, so at the end there were 6 discolored and 6 non-discolored samples. After mixing the samples were analyzed again.

3.7 Tasting

Before the tasting of the 12 samples of *stevia* extract, a random sample (*L48b* discolored) was tasted first as pre-trial. Six different concentrations of the sample were added to 10 mL of non alcoholic beer and were evaluated according to sweetness in comparison to the pure beer. The concentrations are shown in table 4.

Table 4: Tasting of *L48b* discolored

Concentration of <i>stevia</i> extract <i>L48b</i> discolored (mL/10 mL beer)	Sweetness
0.25	imperceptibly sweet
0.5	slightly sweet
1.0	sweet, pleasant
2.0	very sweet
3.0	too sweet
4.0	too sweet

The concentrations 0.5 and 1.0 mL *stevia*/10 mL beer were chosen for the tasting of all samples. The *stevia* extract was added to beer Pilsner. Overall, 24 different beers (two concentrations for each of the 6 discolored and 6 non discolored samples) had to be tasted and evaluated in comparison with the pure beer. However, the discolored sample *RHa* was excluded due to moldiness. The total volume of each beer after the mixing with *stevia* was 1 L by the non discolored samples and 500 mL by the discolored samples. In each bottle *stevia* was added first (the precise volume was measured with a pipette) and secondly the beer until the volume of 1 L and 500 mL, respectively. The tasting was carried out in 2 days (one day the non discolored and one day the discolored samples), so that it's easier for the tasters. By the tasting participated 9-10 tasters, who evaluated the flavor, the taste, the palate fullness, the sweetness and the bitterness of beer. The samples were random-numbered to ensure objectivity. The codes of all samples are shown in Table 5.

Table 5: Coding of all tasting samples (left: non discolored, right: discolored).

Sample	Code	Sample	Code
<i>RHa</i> 0.5	357	<i>RHa</i> disc. 0.5	out
<i>RHa</i> 1.0	608	<i>RHa</i> disc. 1.0	out
<i>RHb</i> 0.5	210	<i>RHb</i> disc. 0.5	204
<i>RHb</i> 1.0	853	<i>RHb</i> disc. 1.0	198
<i>B1a</i> 0.5	940	<i>B1a</i> disc. 0.5	502
<i>B1a</i> 1.0	194	<i>B1a</i> disc. 1.0	103
<i>B1b</i> 0.5	291	<i>B1b</i> disc. 0.5	992
<i>B1b</i> 1.0	421	<i>B1b</i> disc. 1.0	877
<i>L48a</i> 0.5	087	<i>L48a</i> disc. 0.5	095
<i>L48a</i> 1.0	972	<i>L48a</i> disc. 1.0	612
<i>L48b</i> 0.5	182	<i>L48b</i> disc. 0.5	705
<i>L48b</i> 1.0	539	<i>L48b</i> disc. 1.0	234

After tasting, all samples, included the pure beer, were placed for 5 min in the ultrasonic bath, then passed through folded filters and finally analyzed by the precision densimeter, pH-meter and photometer as usually.

**Pic. 9: Tasting**

4 Results

4.1 Pre-trial

4.1.1 Extraction and Boiling

Table 6: Tasting the various solutions after boiling.

	cold	boiling time			
		10 min.	30 min.	60 min.	
liquid extract	low	low	low	low (getting „bready“)	sweetness
	low	low	low, but increasing	more increasing	bitterness
	<i>overall too low concentration compared to the others</i>				other
powder	very strong	decreasing	more decreasing	low	sweetness
	low	increasing	strong	very strong	bitterness
	<i>slightly acidic, "palate fullness", ----- > very "slight"</i>				other
leaves	low	increasing	more increasing	more increasing	sweetness
	light	mainly bitter	more increasing	strong	bitterness
	<i>bitterness is strong increasing, at the end astringent</i>				other
cold extract	strong	strong	strong	strong	sweetness
	low, pleasant	low, pleasant	low, pleasant	low, pleasant	bitterness
	<i>bitterness remains constant</i>				other

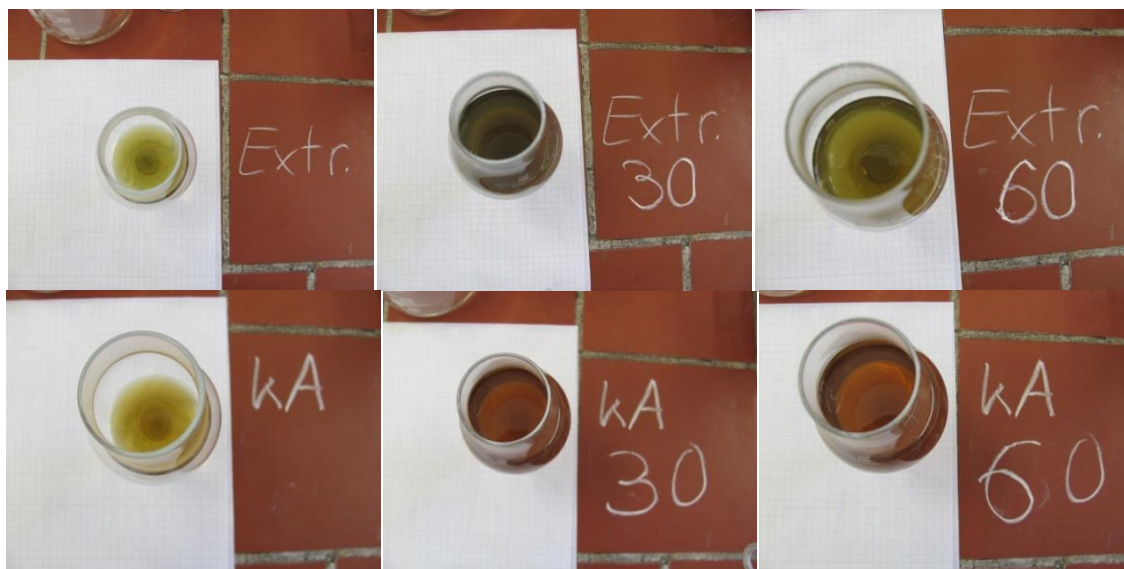
According to table 6 increasing boiling time causes an increase of astringency by all samples. Another point to be mentioned is, that the liquid extract was diluted too much. The enzymatically treated powder should not be investigated further. The leaves

should not be boiled and the procedures for the cold extract should be improved. Next trials require a finer filtration to remove turbidity and a centrifugation before and after boiling.

Table 7: Tasting the liquid and the cold extract.

	cold	boiling time			
		10 min.	30 min.	60 min.	
liquid extract	<i>strong</i>	<i>strong</i>	<i>slightly decreasing</i>	<i>obviously decreasing</i>	sweetness
	<i>low</i>	<i>low, but increasing</i>	<i>more increasing</i>	<i>unpleasant strong</i>	bitterness
	<i>very turbid</i>				other
cold extract	<i>strong</i>	<i>strong</i>	<i>strong</i>	<i>strong</i>	sweetness
	<i>low, pleasant</i>	<i>low, pleasant</i>	<i>low, pleasant</i>	<i>low, pleasant</i>	bitterness
	<i>bitterness and sweetness remain constant</i>				other

The sweetness of the two samples was this time comparable, as the liquid extract was not diluted.



Pic. 10: Liquid extract (above) and cold extract (below) after different boiling times.

4.1.1.1 Soxhlet extraction



Pic. 11: Soxhlet extracts with water and EtOH (left), EtOH after adding 200mL water (right).

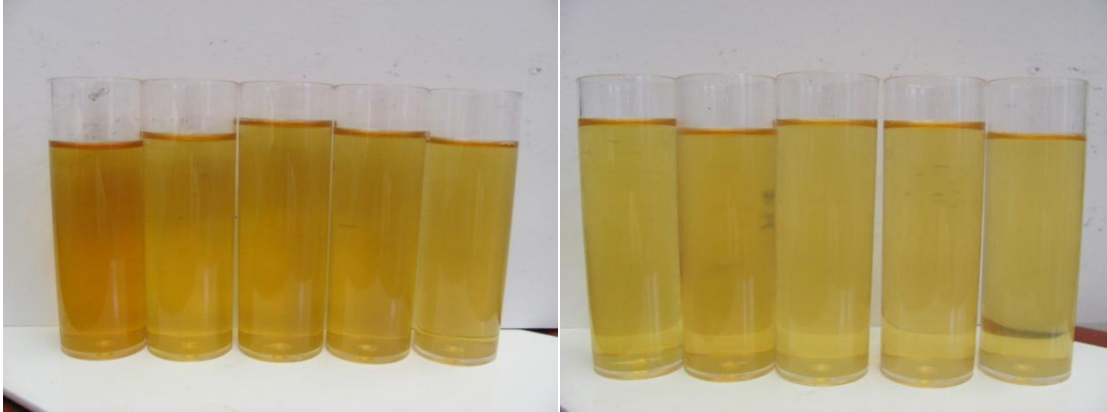
The water extract was clear and very sweet, but also bitter. The ethanol extract after recrystallization smelled very "grassy", was very turbid and bitter. In the distillate were some indefinable flavors.

4.1.2 Fermentation

Table 8: Results of precision densimeter after fermentation

	<i>Density</i> [g/cm ³]	Alcohol (%v/v)	Alcohol (%w/w)	Real extract [%w/w]	Original Gravity (%w/w)	Degree of attenuation [% w/w]	Color [EBC]	pH
extr.0+glu	0.99770	4.82	3.81	1.65	9.15	101.47	12.22	3.57
extr.30+glu	0.99872	4.66	3.69	1.86	9.15	98.57	14.57	3.50
cold	1.00256	4.06	3.20	2.63	8.94	87.44	14.38	3.58
cold	1.00200	4.09	3.22	2.50	8.85	88.93	13.05	3.55
extr.0+wort	1.00340	4.31	3.39	2.91	9.57	86.18	17.04	4.39
extr.30+wort	1.00259	4.50	3.54	2.79	9.74	88.37	14.59	4.16
extr.60+wort	1.00314	4.31	3.39	2.86	9.52	86.63	15.14	4.20
cold								
extr.0+wort	1.00200	4.35	3.43	2.59	9.33	89.51	13.03	4.19
cold								
extr.30+wort	1.00259	4.28	3.37	2.71	9.34	87.86	13.36	4.14
cold								
extr.60+wort	1.00278	4.49	3.53	2.83	9.77	87.91	13.56	4.15

According to table 8 the fermentation was completed (degree of attenuation >85%) by all samples. Remarkable are the very low pH values (about 3.5) of samples with pure glucose.



Pic. 12: Color of the fermented samples from left to right: ex0+wort/ ex0+glu/ ex30+wort/ ex30+glu/ ex60+wort/ cold ex0+wort/ cold ex0+glu/ cold ex30+wort/ cold ex30+glu/ cold ex60+wort.

The samples which were fermented with wort, all had a very unpleasant bitter-sour taste. The samples with glucose had only a sour taste.

After distillation and boiling the glucose samples had a pretty pure, strong sweet taste with bitterness. Further dilution experiments were not meaningful due to musty water.

After evaporation the extract was very sweet and free from unwanted flavors.

4.1.3 New fermentation

Table 9: Evaluation of further use of the fermented samples

sample	g leaves/100ml	yeast	glucose solution (%)	further use
1a	2	<i>Hebru</i>	4	X
2a	2	<i>Hebru</i>	8	X
3a	2	<i>RH</i>	4	X
4a	2	<i>RH</i>	8	X
5a	2	68	4	
6a	2	68	8	
7a	4	<i>Hebru</i>	4	
8a	4	<i>Hebru</i>	8	
9a	4	<i>RH</i>	4	
10a	4	<i>RH</i>	8	
11a	4	68	4	
12a	4	68	8	
13a	liquid extract.	<i>Hebru</i>	8	

According to Table 9 the samples of cold extract fermented with yeasts *Hebru* and *RH* had the best taste.

The filtration with both activated carbon and PVPP led to a slight discoloration, but caused a partly loss of sweetness.

4.2 Main-trial

4.2.1 Extraction-Fermentation-Concentration

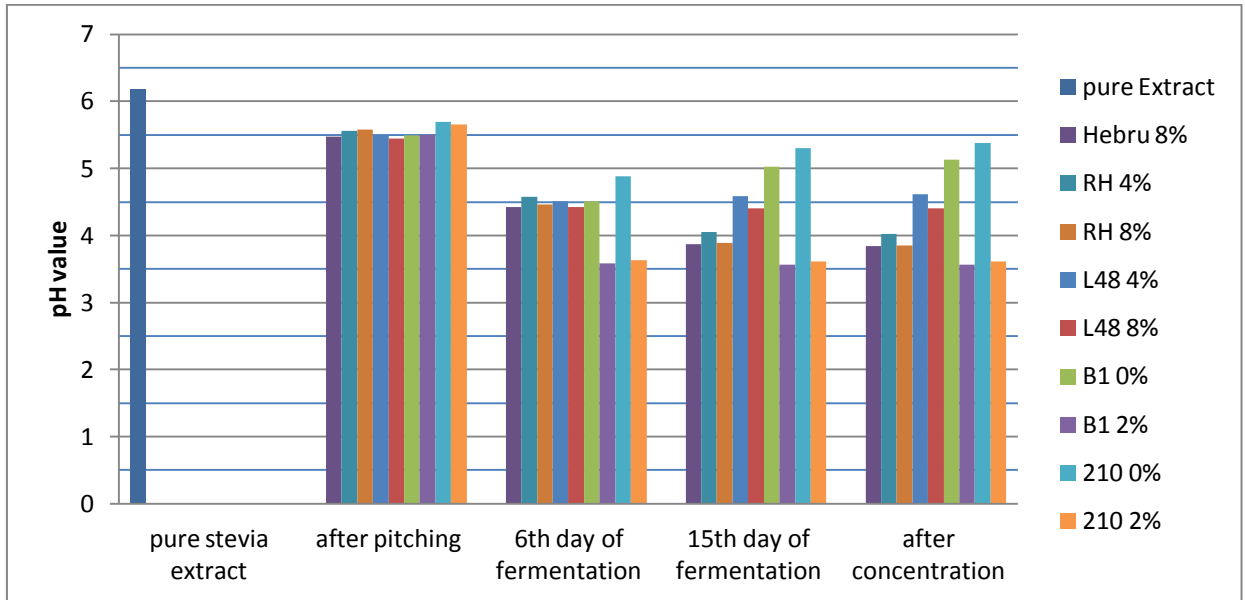


Fig. 2: pH value of all samples during the steps of main-trial.

According to fig. 2 the fermentation of *stevia* extract (pH 6.19) with all microorganisms reduces the pH value. A reduction in pH value of about 0.65 units can be observed directly after pitching. This reduction is quite similar for all microorganisms. After 6 days of fermentation the pH value of samples with yeast fermentation (*RH*, *Hebru*, *L48*) is about 4.50. The sample *210 0%* shows the highest pH value of 4.88. The strongest decrease in the pH value can be observed by *Lactobacillus* fermentation (*B1*, *210*) using 2% glucose addition. Both samples *B1 2%* and *210 2%* have already reached a pH value near 3. After 15 days of fermentation the pH values of yeasts *Hebru* and *RH* decreased about 0.5 units. The pH values of yeasts *L48 4%*, *L48 8%* and *Lactobacilli* (*B1*, *210*) with 2% glucose proportion remained quite the same. Furthermore, an increase about 0.5 units in the pH value of *Lactobacillus* fermentation with 0% glucose addition can be observed. Finally the process of concentration does not influence the pH value in significant amounts. Another point to be mentioned is that the samples with a lower concentration of glucose (4% in *RH*, *L48* and 0% in *B1*, *210*) have higher pH values in all steps, comparing with the same fermentation samples using higher concentrations of glucose (8% and 2% respectively).

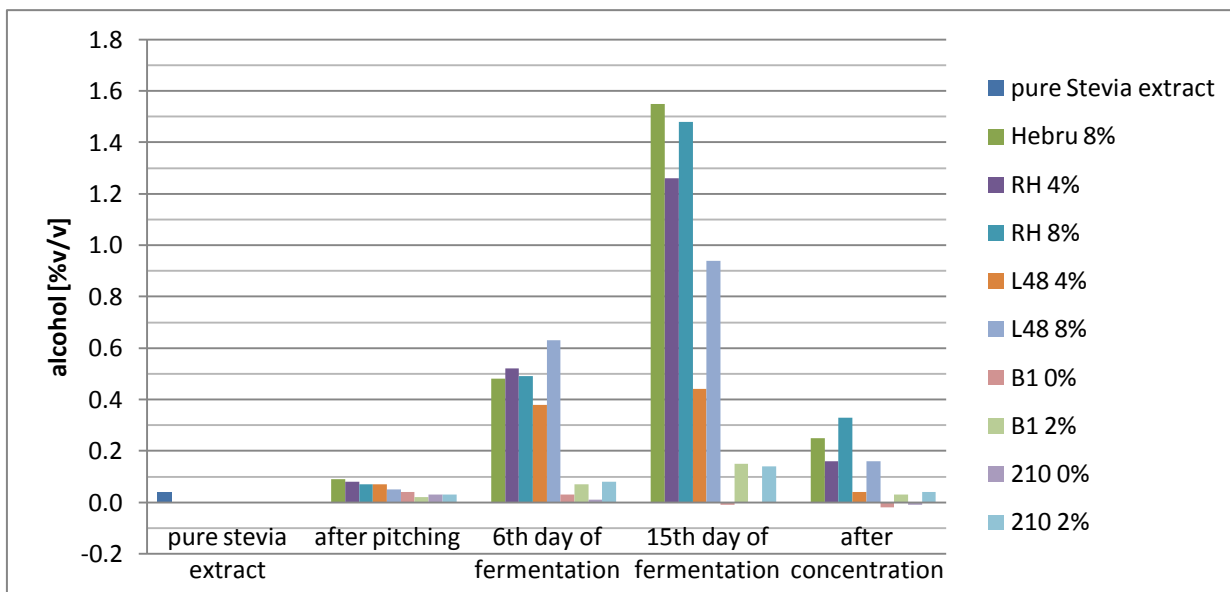


Fig. 3: Alcohol of all samples during the steps of main-trial.

According to fig. 3 yeasts (*Hebru*, *RH*, *L48*), in contrast to *Lactobacilli* (*B1*, *210*), produce alcohol during the fermentation of *stevia* extract (alcohol 0.04% v/v). Directly after pitching the alcohol does not increase significantly by any sample. After 6 days of fermentation the samples with yeast fermentation show an increase in alcohol about 0.5%. After 15 days of fermentation a further increase in alcohol is to be observed by all samples with yeast fermentation except of *L48* 4%. The samples *Hebru* 8% and *RH* 8% show the highest alcohol contents about 1.5% v/v. The samples with *Lactobacillus* fermentation do not contain more than 0.2% v/v alcohol. After concentration the alcohol of all samples decreased under 0.3%. In general the samples with a higher concentration of glucose (8% in *RH*, *L48* and 2% in *B1*, *210*) have higher alcohol contents in all steps, comparing with the same fermentation samples using lower concentrations of glucose (4% and 0% respectively).

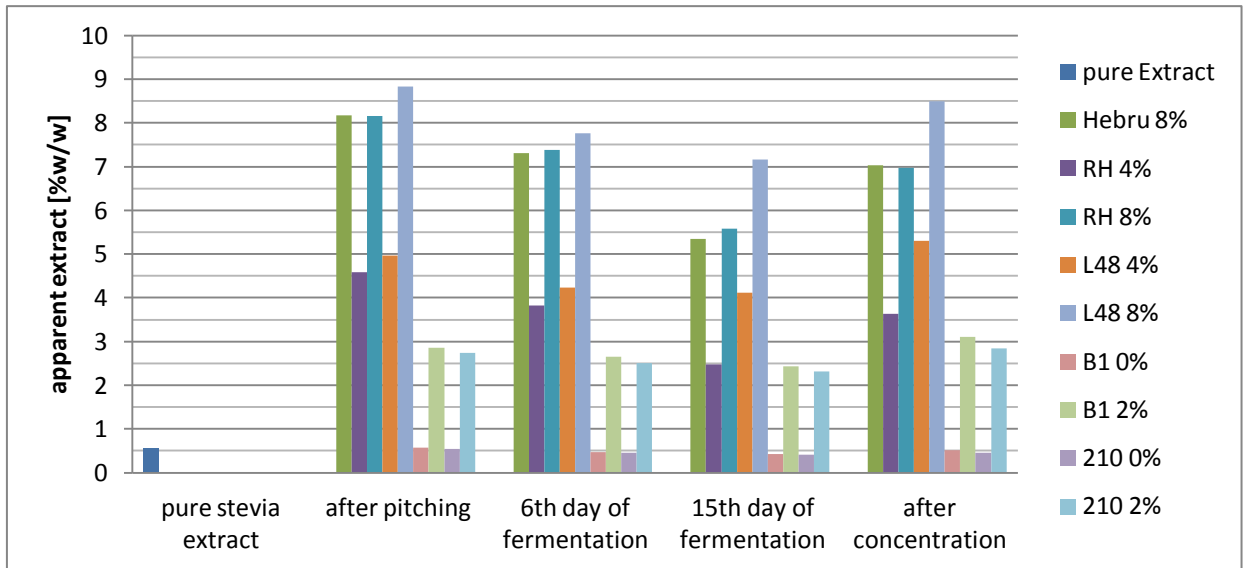


Fig. 4: Apparent extract of all samples during the steps of main-trial.

According to fig. 4 the apparent extract of samples that contain glucose rises after pitching, falls during fermentation and rises again after concentration. After pitching the samples with yeast fermentation (*Hebru*, *RH* and *L48*) with 8% glucose show the highest apparent extract, about 8.5% w/w. The same fermentation samples with 4% glucose have an apparent extract near 5% w/w and the samples with *Lactobacillus* fermentation (*B1*, *210*) with 2% glucose have an apparent extract near 3.0% w/w. After 6 days of fermentation a decrease about 1% can be observed in the apparent extract of yeasts, while the apparent extract of *Lactobacilli* remains quite the same. After 15 days of fermentation the samples *Hebru* 8% and *RH* 4% and 8% show the strongest decrease in apparent extract, about 2%. After concentration an increase about 1.5% and 0.5% is to be observed by the yeasts and the *Lactobacilli* respectively. The only exceptions are the samples *B1* 0% and *210* 0%, that do not contain any glucose. Their apparent extract remains during all steps quite constant and same with that of the pure *stevia* extract (about 0.5% w/w).

4.2.2 Discoloration

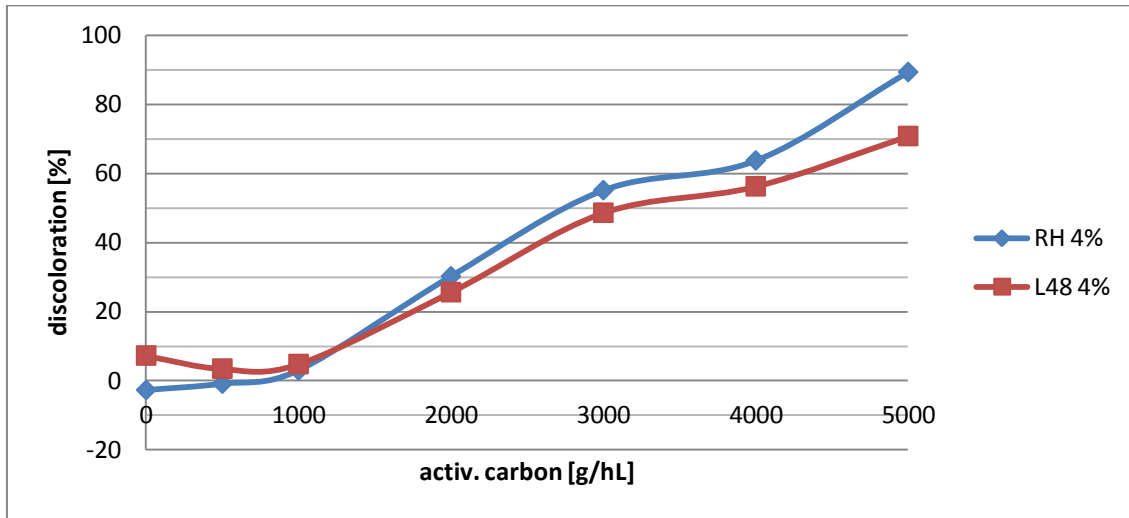


Fig. 5: Discoloration of yeasts 4% with different concentrations of activ. carbon.

According to fig. 5 the optimal concentration of activated carbon for the discoloration of samples *RH* 4% and *L48* 4% is 3000 g/hL. The discoloration of both samples then is near 50%. Concentrations of activated carbon lower than 1000 g/hL do not cause significant discoloration. Using the highest concentration of activated carbon (5000 g/hL), the sample *RH* 4% has reached a discoloration 90%, while the sample *L48* 4% has been discolored by 70%.



Pic. 13: Discoloration of *RH* 4% (left) and *L48* 4% (right).

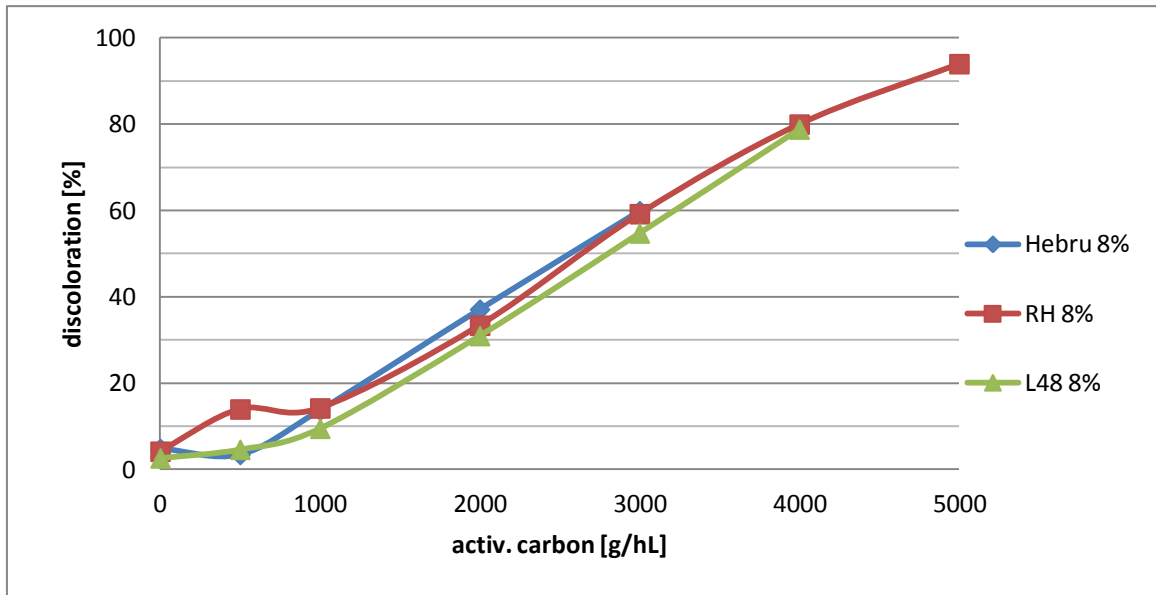


Fig. 6: Discoloration of yeasts 8% with different concentrations of activ. carbon.

According to fig. 6 the optimal concentration of activated carbon for the discoloration of the sample *RH 8%* is 3000 g/hL. The discoloration then is 60%, while with 5000 g/hL activ. carbon the same sample has been discolored over 90%. For the yeasts *Hebru 8%* and *L48 8%* there are not enough points to define the optimal concentration of activ. carbon. *Hebru 8%* has been discolored by 60% and *L48 8%* by 80% using 3000 g/hL and 4000 g/hL activ. carbon respectively.



Pic. 14: Discoloration of *RH 8%* (left) and *L48 8%* (right).

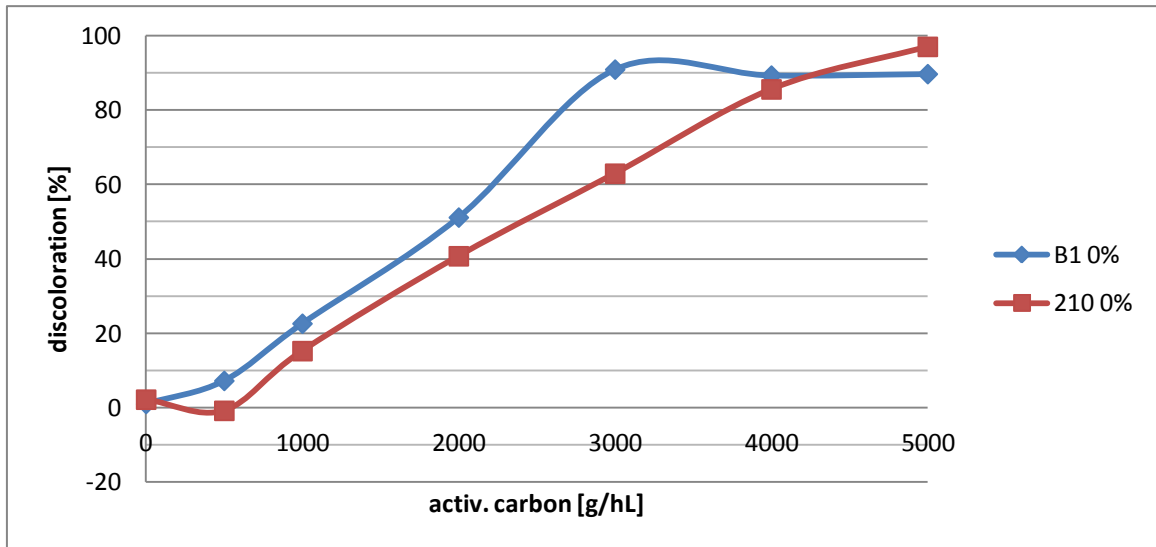
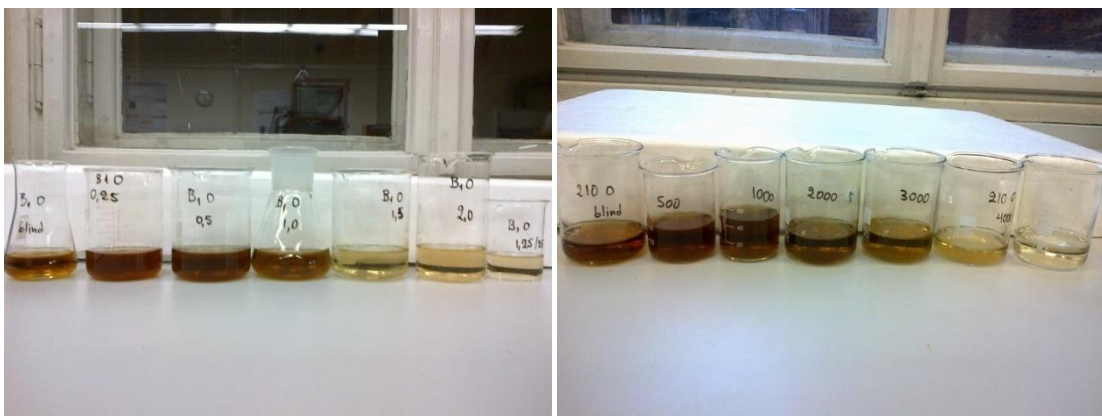


Fig. 7: Discoloration of *Lactobacilli* 0% with different concentrations of activ. carbon.

According to fig. 7 the optimal concentration of activated carbon for the discoloration of *Lactobacillus* B1 0% is 3000 g/hL, when the sample has been discolored by 90%. Higher concentrations of activated carbon do not cause any further discoloration. The *Lactobacillus* 210 0% has reached a discoloration of 85% using 4000 g/hL activated carbon, which is the optimal concentration. In general the sample B1 0% has reached higher discoloration in contrast to the sample 210 0% using the same concentrations of activ. carbon. Only by the highest concentration (5000 g/hL) the 210 0% has been discolored by 97%, while the B1 0% remained at 90%.



Pic. 15: Discoloration of B1 0% (left) and 210 0% (right).

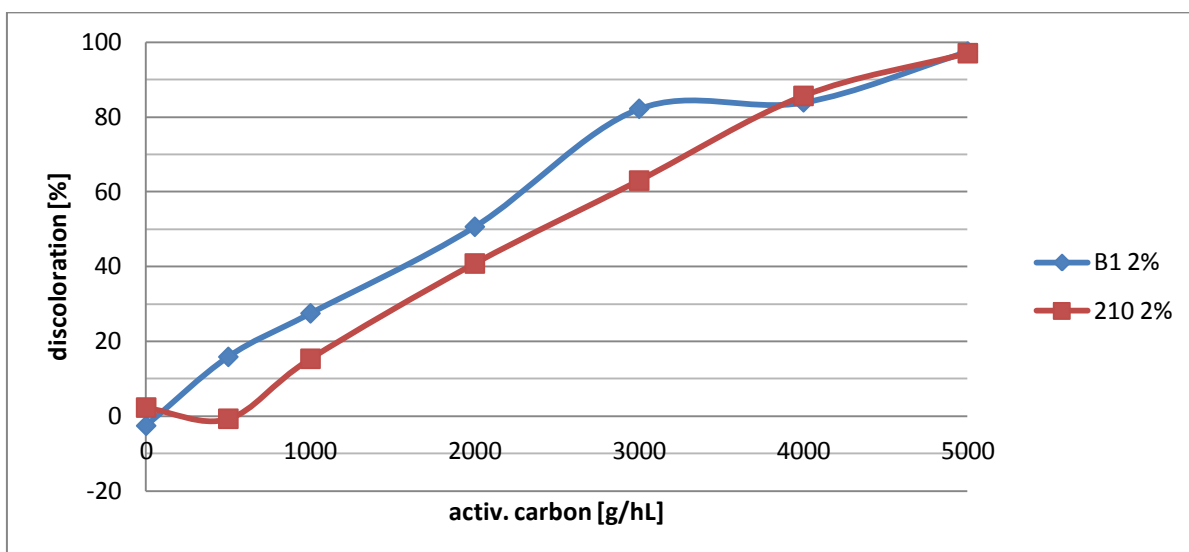
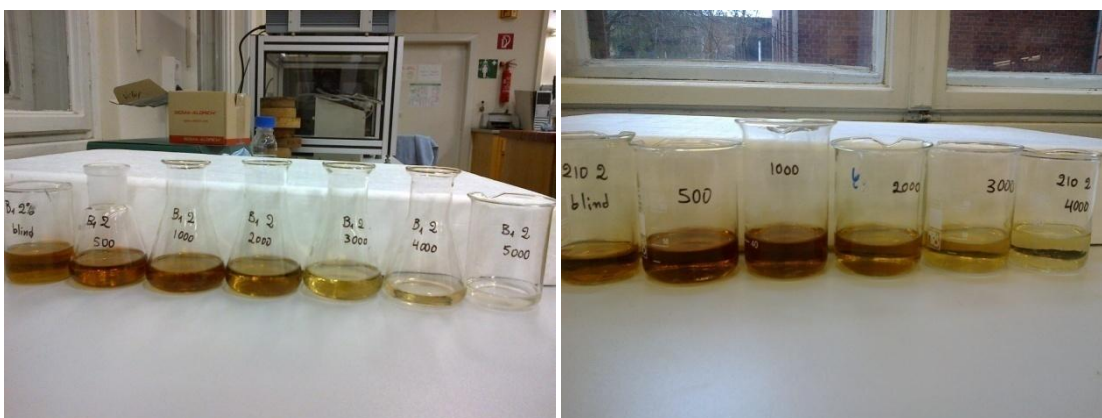


Fig. 8: Discoloration of *Lactobacilli* 2% with different concentrations of activ. carbon.

According to fig. 8 the optimal concentration of activated carbon for the discoloration of sample *B1* 2% is 3000 g/hL, when the sample has been discolored by 82%. Using the same concentration by the sample *210* 2% the discoloration is 62%. The optimal concentration for this sample is 4000 g/hL and the discoloration is 85%. Both samples have reached a discoloration near 100% using 5000 g/hL activ. carbon.



Pic. 16: Discoloration of *B1* 2% (left) and *210* 2% (right).

4.3 Repetition of main trial

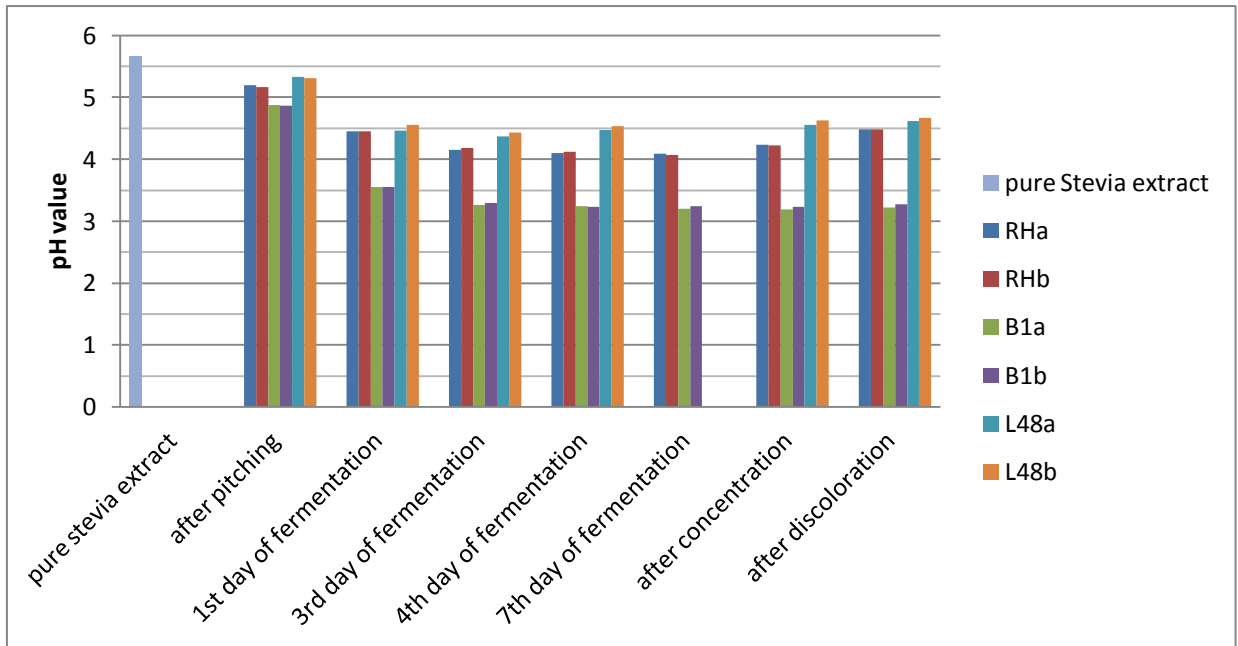


Fig. 9: pH value of all samples during the steps of repetition.

According to fig. 9 the pH value of *stevia* extract (pH 5.66) has been reduced during fermentation. Directly after pitching the samples *B1* show the strongest decrease in pH value, about 0.8 units. On the 1st day of fermentation the pH values of yeasts *RH* and *L48* are near 4.5, while the pH values of *Lactobacilli B1* are near 3.5. The pH value of samples *L48* remains quite the same till the end of the fermentation. The samples *RH* and *B1* show a further decrease in pH value and after 7 days of fermentation their pH values are near 4.0 and 3.0 respectively. The processes of concentration and discoloration do not influence the pH values of samples *B1* and *L48*, but the pH value of *RH* is again near 4.5 after discoloration.

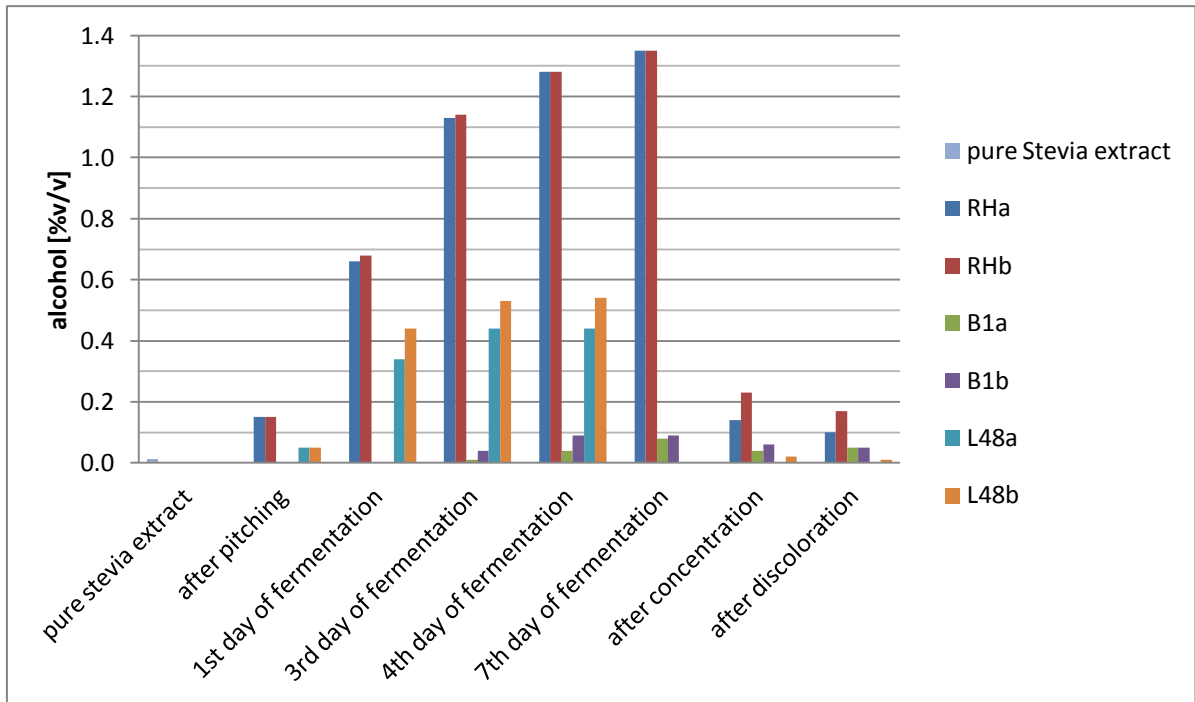


Fig. 10: Alcohol of all samples during the steps of repetition.

According to fig. 10 the yeasts *RH* and *L48* produce alcohol during the fermentation of *stevia* extract (alcohol 0.01% v/v). Directly after pitching the increase in alcohol is not significant. On the 1st day of fermentation the samples *RH* contain about 0.65% v/v alcohol and the samples *L48* about 0.4% v/v. On the 3rd day of fermentation the samples *RH* show an increase in alcohol about 0.5%, while the samples *L48* show an increase about 0.1%. On the 4th day of fermentation the samples *RH* show a further increase, about 0.1%, while the alcohol by the samples *L48* remains near 0.5% v/v. After 7 days of fermentation the samples *RH* contain 1.35% alcohol, while the samples *B1* contain only 0.1% v/v alcohol. After concentration the samples *RH* show a decrease in alcohol over 1% and the samples *L48* about 0.5%. The sample *RH_b* contains the most alcohol (0.23% v/v). The discoloration does not influence the alcohol of any sample significantly.

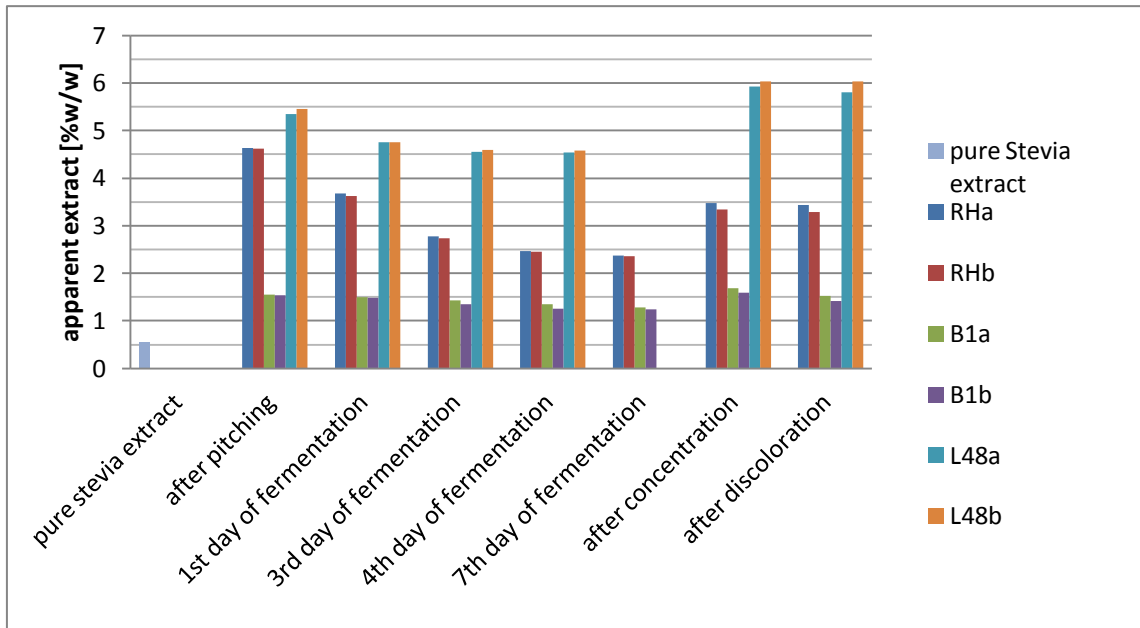


Fig. 11: Apparent extract of all samples during the steps of repetition.

According to fig. 11 the apparent extract of all samples rises after pitching, falls during fermentation and rises again after concentration. The apparent extract of the pure *stevia* extract is 0.5% w/w. After pitching the samples *RH* and *L48*, which contain 4% glucose, have the highest apparent extract, about 4.5% w/w and 5.5% w/w respectively. At the same time the samples *BI*, which contain 1% glucose, have 1.5% w/w apparent extract. Both yeasts (*RH* and *L48*) show a decrease in apparent extract about 1% on the 1st day of fermentation. The samples *RH* show a further decrease about 1% on the 3rd day of fermentation, and a decrease about 0.5% till the 7th day of fermentation (final apparent extract 2.4% w/w). The samples *L48* have quite the same apparent extract (4.5% w/w) till the 4th day of fermentation. The samples *BI* show a total decrease about 0.25% after 7 days of fermentation. After concentration an increase about 1% 1.5% and 0.4% is to be observed by *RH*, *L48* and *BI* respectively. The discoloration does not influence the apparent extract of any sample.

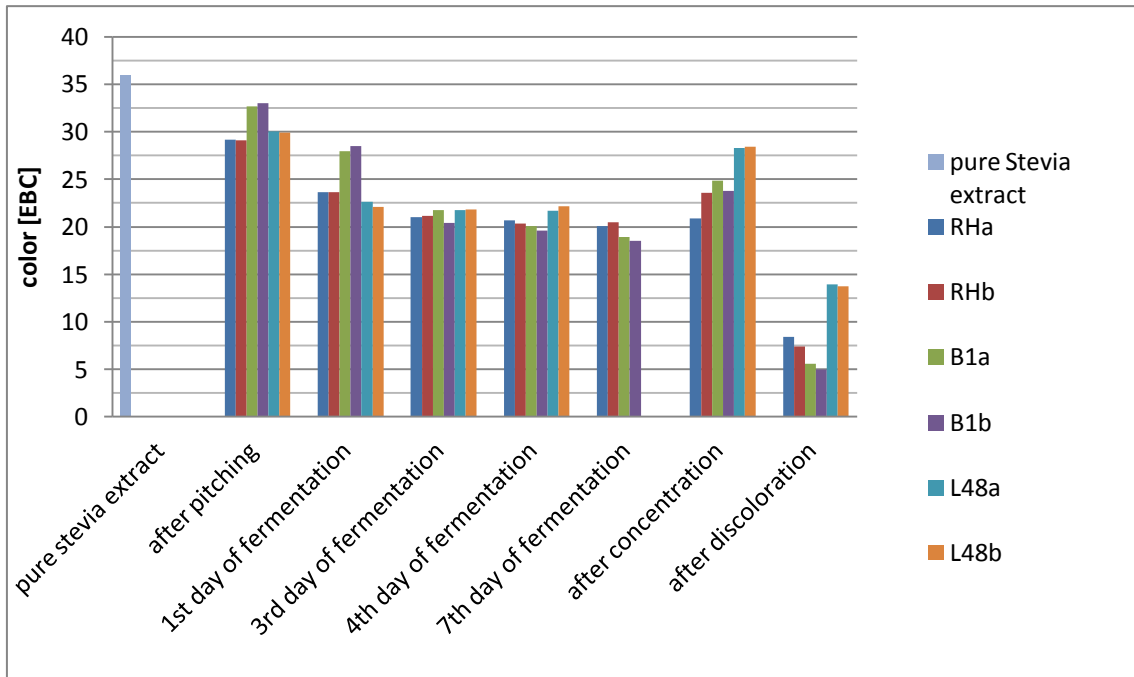


Fig. 12: Color of all samples during the steps of repetition.

According to fig.12 the fermentation with all microorganisms causes a decrease in color of *stevia* extract (color 36 EBC). Directly after pitching the color of yeasts (*RH* and *L48*) is about 30 EBC and the color of *Lactobacilli B1* is about 33 EBC. On the 1st day of fermentation the color of yeasts is about 23 EBC and the color of *B1* is about 28 EBC. On the 3rd day of fermentation the samples *B1* show a further decrease in color and have then similar color with the yeasts, between 20 and 22 EBC. Till the end of fermentation there is no significant change in color to be observed. The concentration causes an increase in color of all samples, but the strongest increase (about 7 EBC) is to be observed by the samples *L48*. After discoloration the samples *L48* are still the most colored samples (14 EBC), then follow the samples *RH* (8 EBC) and finally the *Lactobacilli B1*, which have reached a color about 5 EBC.

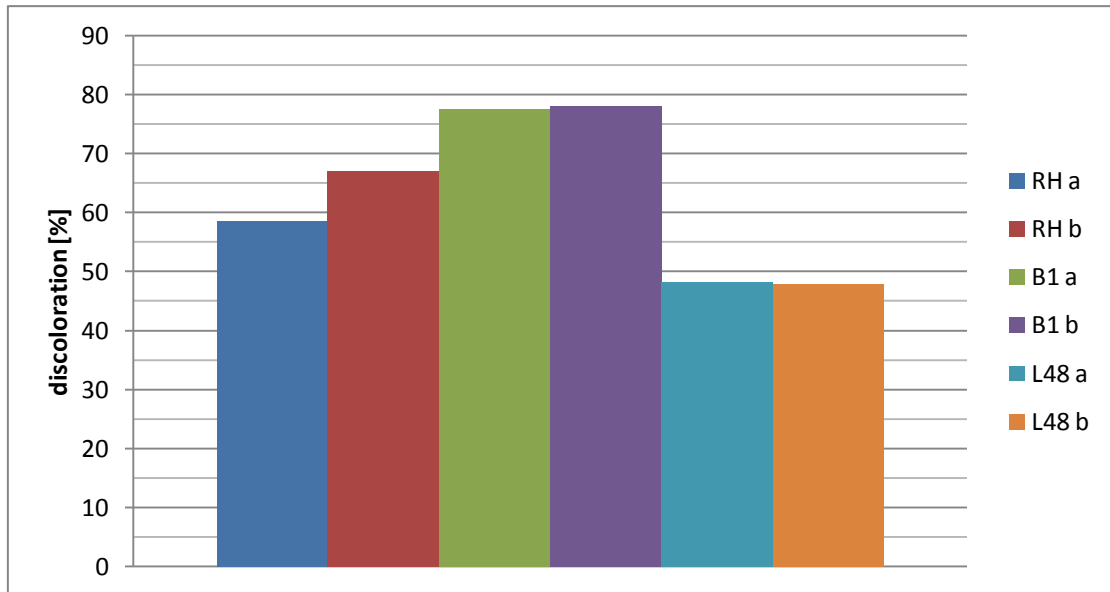
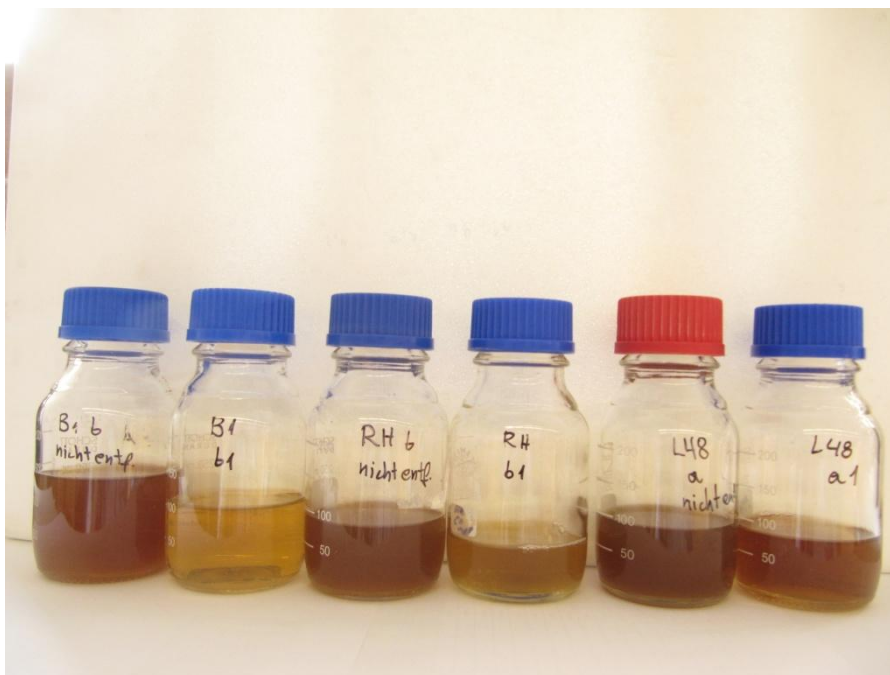


Fig. 13: Discoloration of all samples with 3000 g/hL activ. carbon.

According to fig.13 the samples *B1* show the highest discoloration, about 78%, while the samples *L48* have been discolored at least, about 48%. Remarkable is, that the samples *RH_a* and *RH_b* have reached different discoloration, 58% and 67% respectively.



Pic. 17: Non-discolored (left) and discolored (right) samples *B1b*, *RHb* and *L48a*.

4.4 Tasting

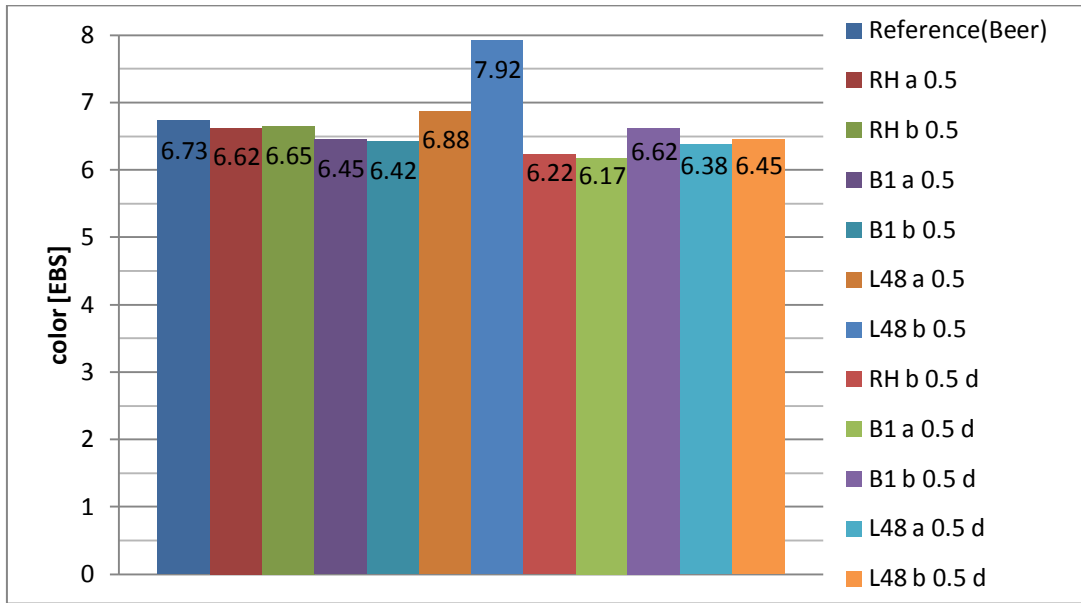


Fig. 14: Color of tasting samples with 5% v/v stevia.

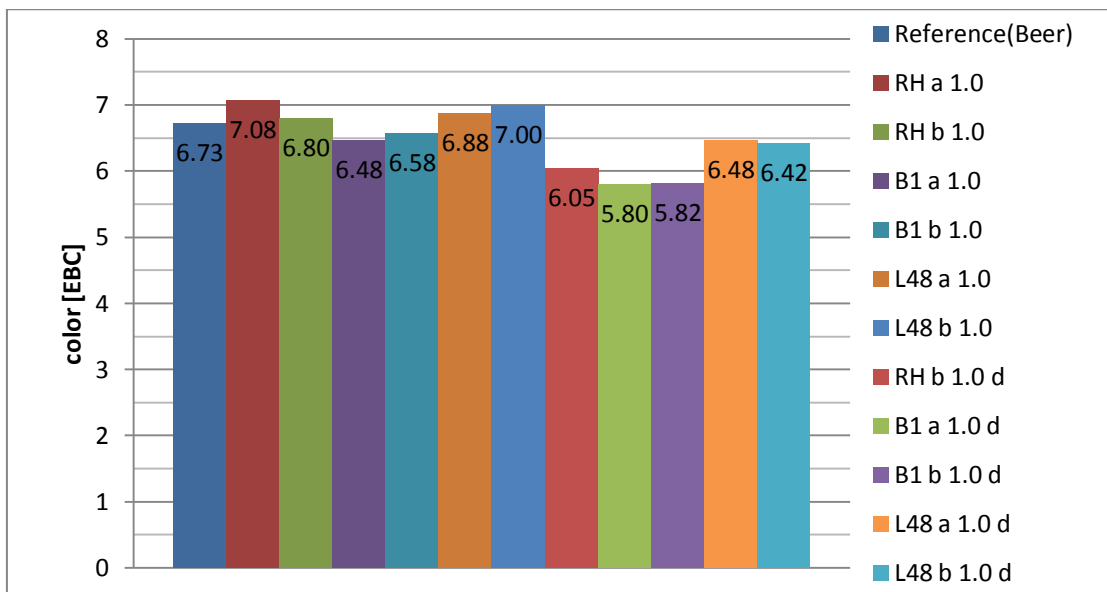


Fig. 15: Color of tasting samples with 10% v/v stevia.

According to Fig.14-15 the color of beer (6.73 EBC) shows no significant change after addition of *stevia* extract. Samples *B1* have the lightest color (5.8 EBC) and samples *L48* are the only ones darker than beer.



Pic. 18: Tasting samples (left: discolored *L48b*, middle: reference-beer, right: non discolored *L48b*)

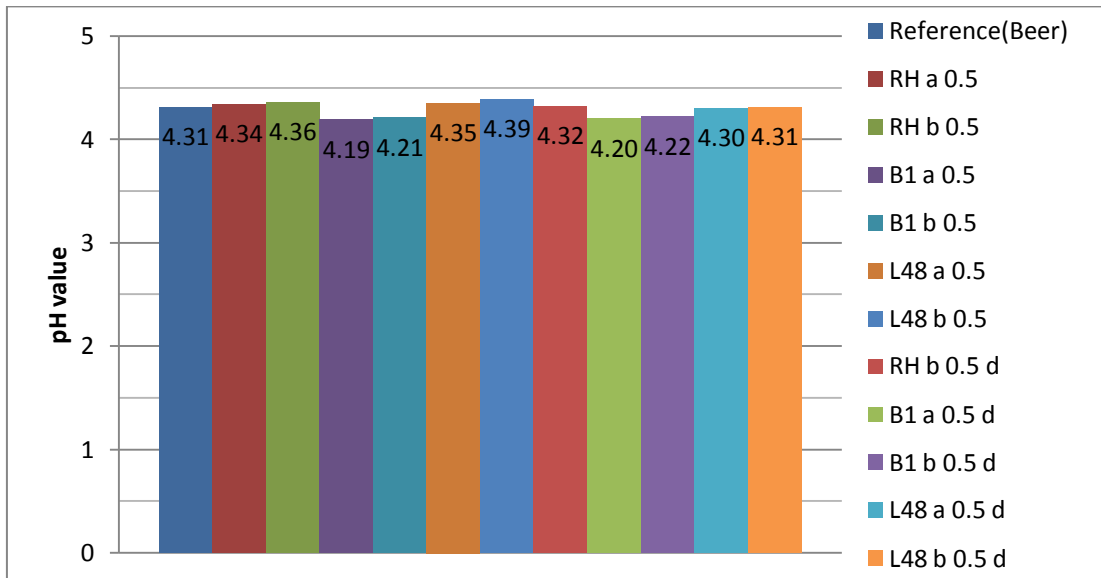


Fig. 16: pH value of tasting samples with 5% v/v stevia.

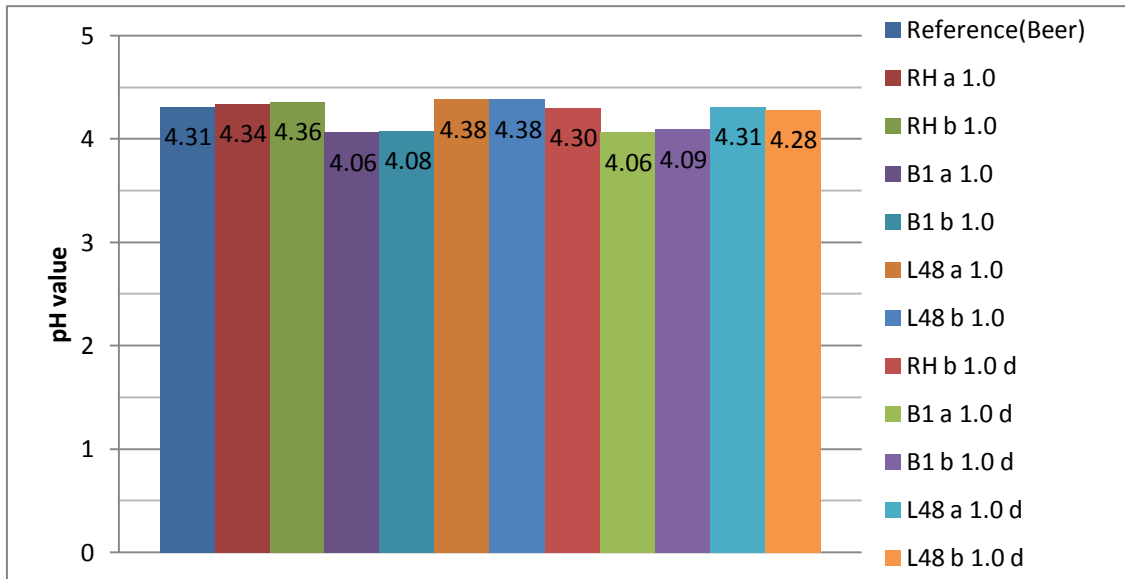


Fig. 17: pH value of tasting samples with 10% v/v *stevia*.

According to Fig. 16-17 the addition of *stevia* extract does not cause a significant reduction of pH-value (beer pH=4.3). However, beer with 10% *stevia* extract, which has been fermented with *B1* has the lowest pH-value, approximately pH=4.

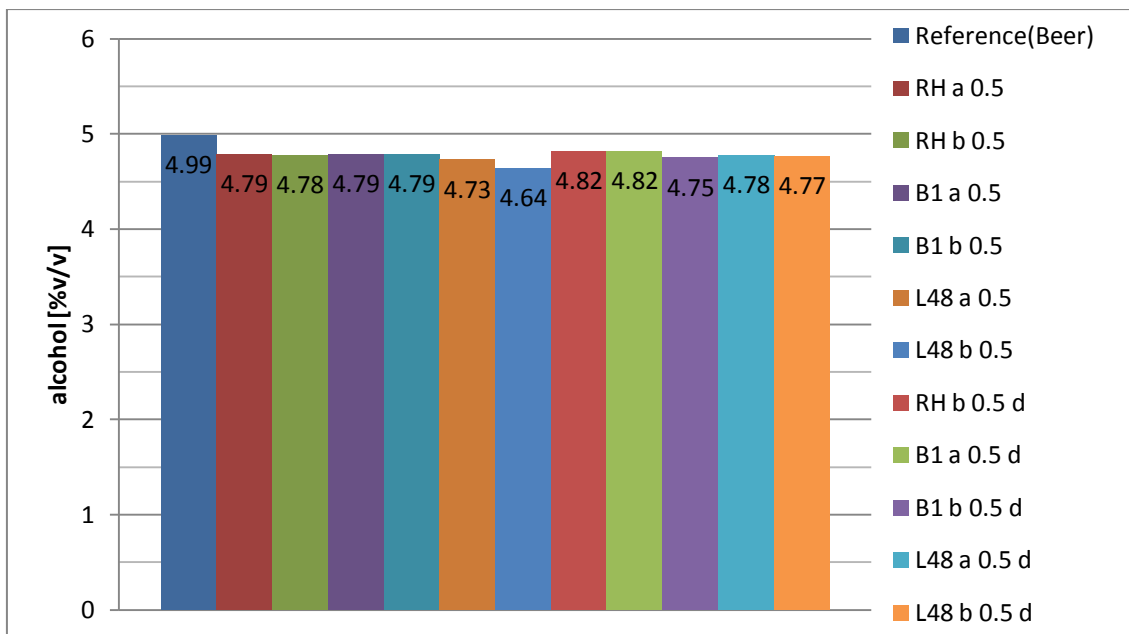


Fig. 18: Alcohol of tasting samples with 5% v/v *stevia*.

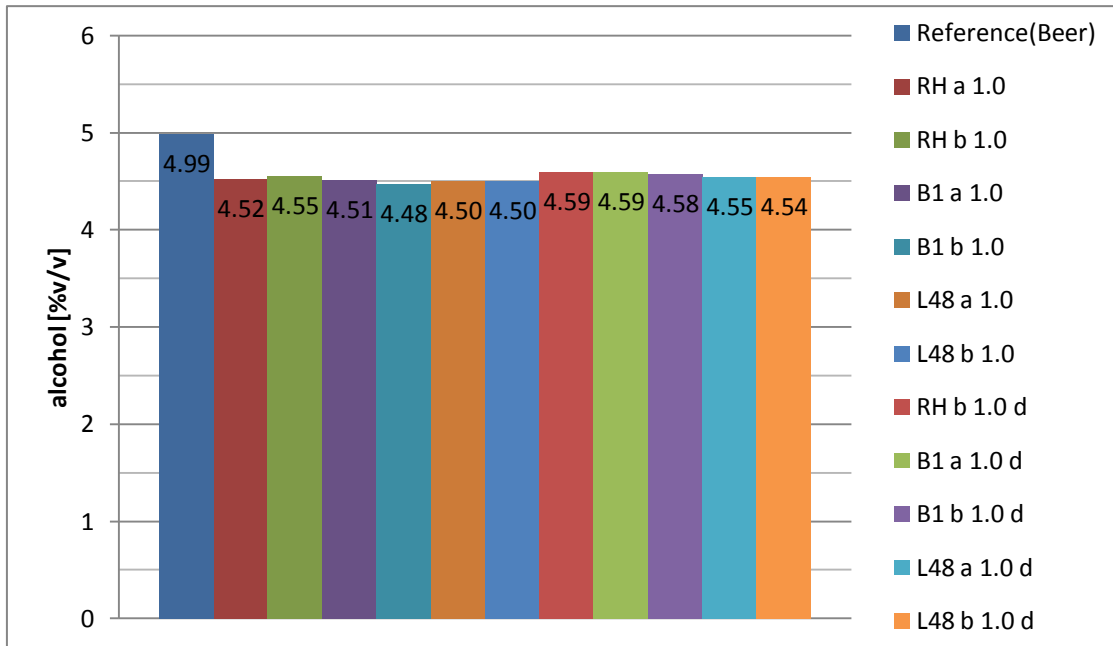


Fig. 19: Alcohol of tasting samples with 10% v/v *stevia*.

As shown in Fig. 18-19 pure beer Pilsner contains 5% v/v alcohol. This content is reduced to 4.8% v/v and 4.5% after addition of 5% and 10% *stevia* extract respectively.

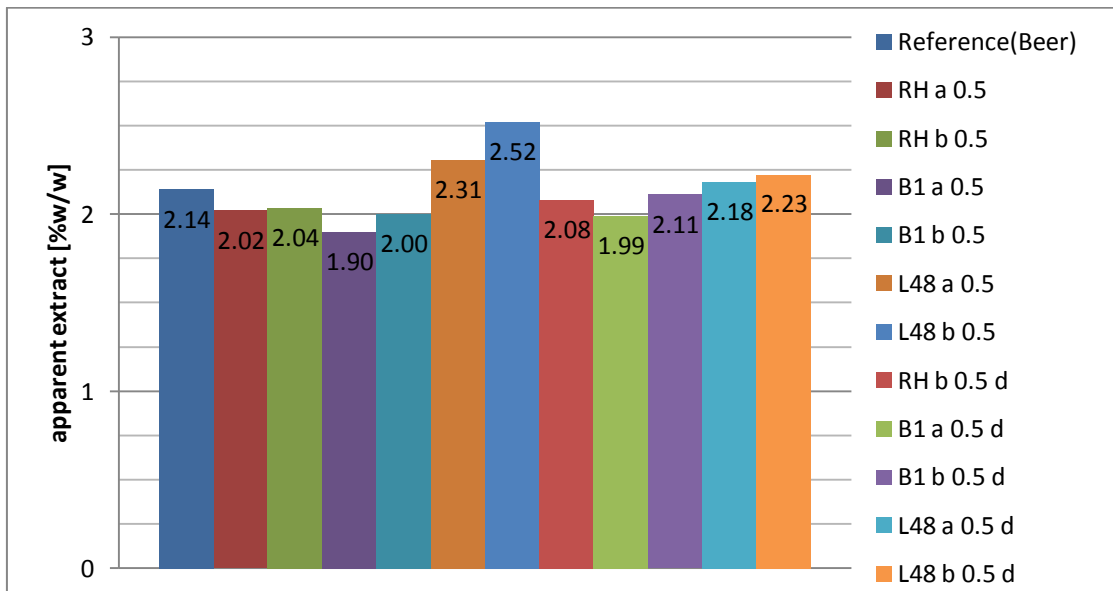


Fig. 20: Apparent extract of tasting samples with 5% v/v *stevia*.

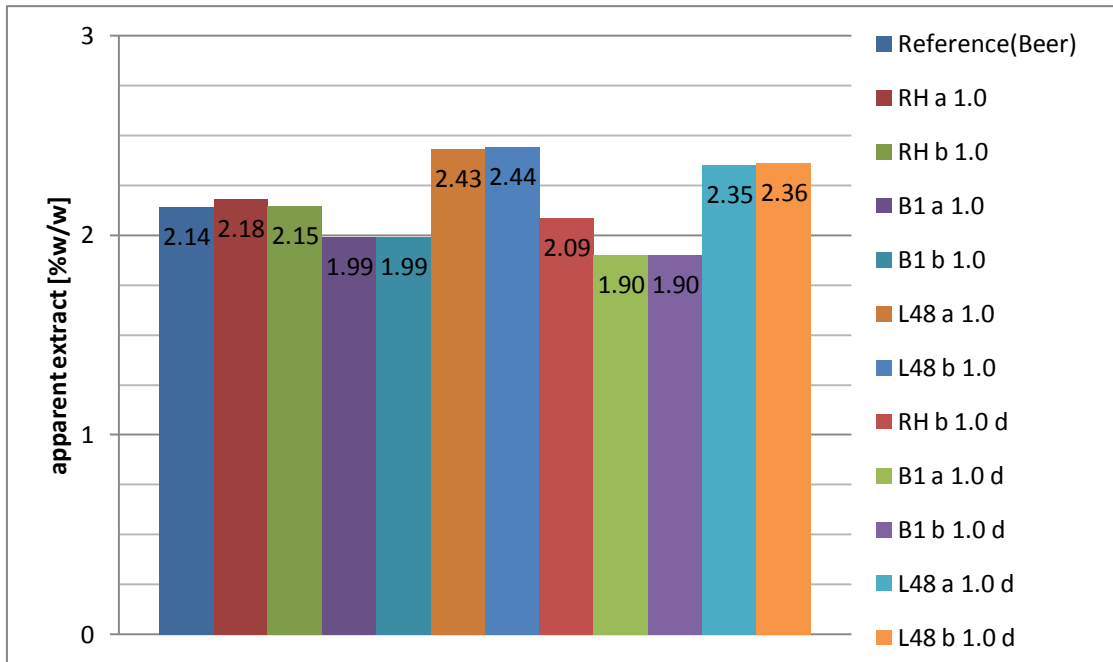


Fig. 21: Apparent extract of tasting samples with 10% v/v stevia.

According to Fig. 20-21 the apparent extract of beer is 2.14% w/w. The *stevia* extract fermented with yeasts has higher apparent extract than the extract fermented with *B1*. Furthermore, all discolored samples have lower apparent extract than their similar non-discolored samples.

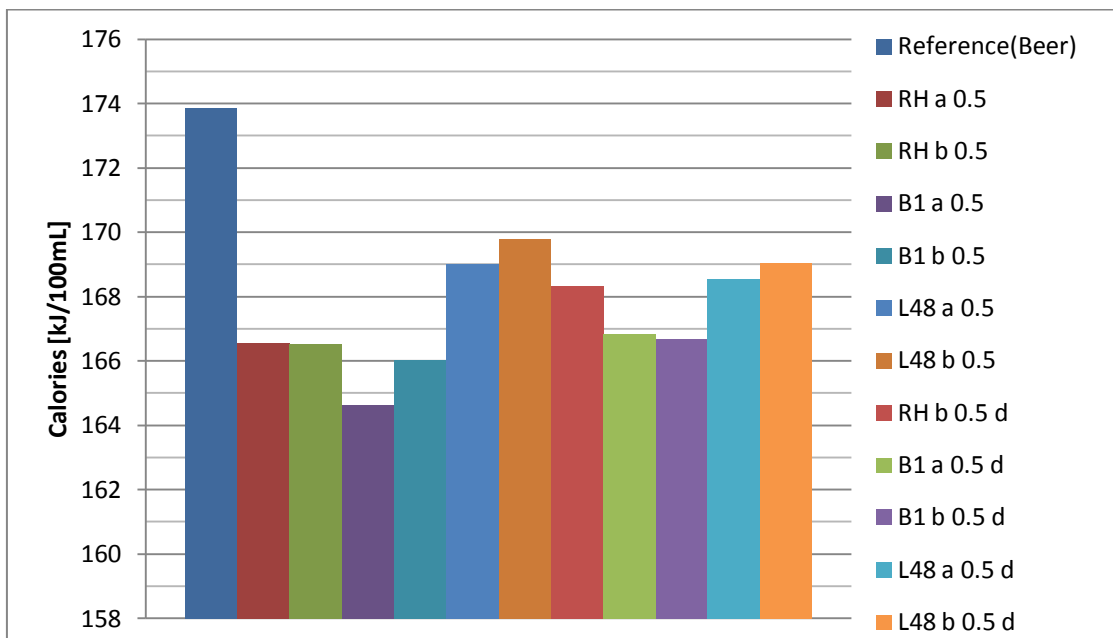


Fig. 22: Calories of tasting samples with 5% v/v stevia.

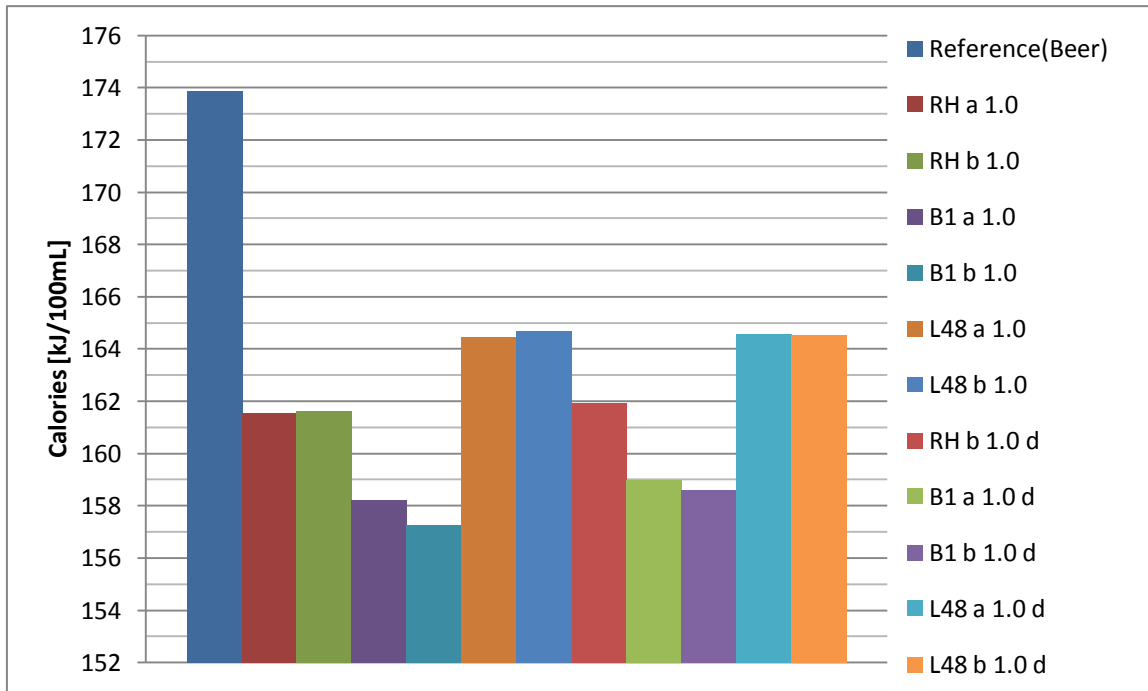


Fig. 23: Calories of tasting samples with 10% v/v *stevia*.

As shown in Fig. 23 all beers mixed with 10% *stevia* contain fewer calories than the pure beer, which contains 174 kJ/100mL. The difference ranges from 10 kJ/100mL by samples *L48* up to 17 kJ/100mL by samples *B1*.

There are following three radar charts of evaluation of samples of sensory control. Each figure presents the evaluation of beers with two different concentrations (5% and 10% v/v) of discolored and non-discolored *stevia*, which was fermented twice. The evaluation scale was 0-5.

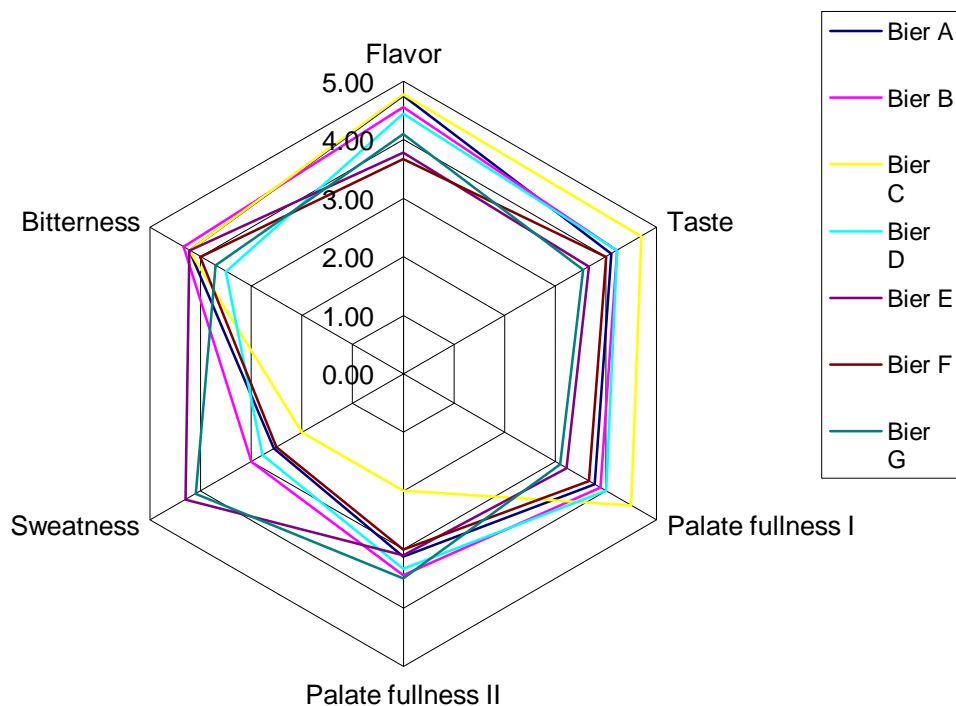


Fig. 24: Tasting control evaluation of beers with all *RH stevia* samples.

Table 10: Coding of beers with *RH* samples in tasting control

Bier	Tasting sample
Bier A	<i>RHb</i> 0.5d
Bier B	<i>RHb</i> 1.0d
Bier C	Reference
Bier D	<i>RHa</i> 0.5
Bier E	<i>RHa</i> 1.0
Bier F	<i>RHb</i> 0.5
Bier G	<i>RHb</i> 1.0

Figure 24 shows the evaluation of beer samples containing steviol glycosides extract fermented with yeast *RH*. In Table 18 is shown the coding of samples of Fig. 24. As shown, all samples are sweeter and have better palate fullness than pure beer Pilsner (Bier C). The samples with 10% non-disc. *stevia* extract were evaluated as "very sweet". The beer with 10% discolored sample *RHb* was characterized as "somewhat sweet". Three samples with 0.5 mL *stevia* extract /10 mL beer are closer to the normal sweetness of beer. All samples had better palate fullness, which was evaluated by the tasters as "not or less typical" than that of pure beer. The largest discrepancy showed samples of beer with 10% *stevia* extract fermented with *RH*. These two samples have no clear taste, but light errors. By the rest of samples, tasters even recognize the purity of taste, rather than mixing beer with *stevia* extract. All tasters did not recognize the bitterness of *stevia* in beer.

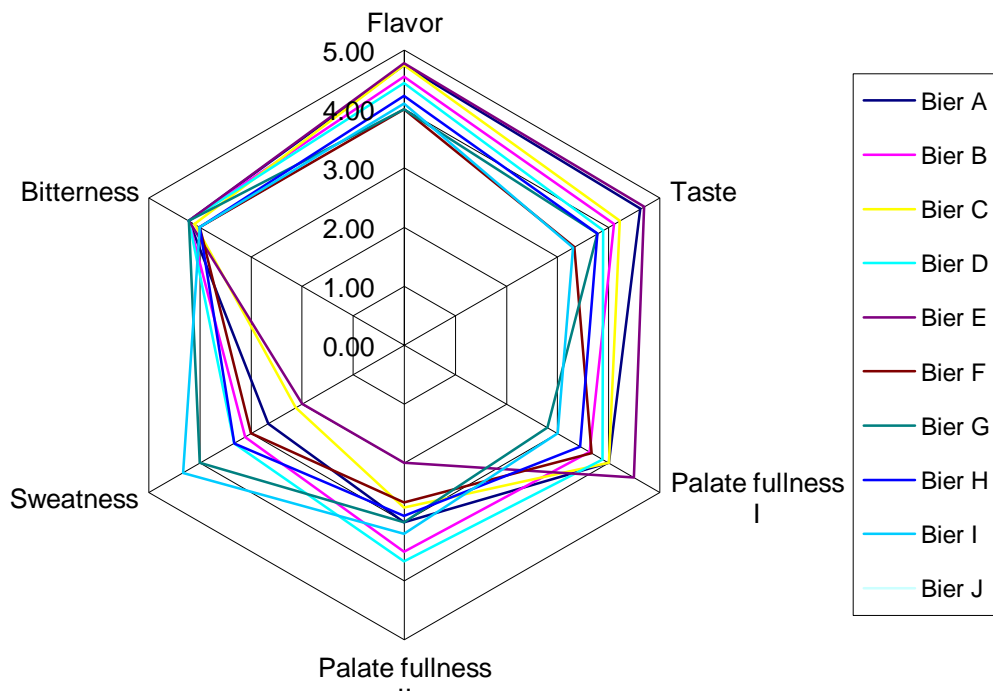


Fig. 25: Tasting control evaluation of beers with all *L48 stevia* samples.

Table 11: Coding of beers with *L48* samples in tasting control.

Bier	Tasting sample
Bier A	<i>L48a</i> 0.5d
Bier B	<i>L48a</i> 1.0d
Bier C	<i>L48b</i> 0.5d
Bier D	<i>L48b</i> 1.0d
Bier E	Reference
Bier F	<i>L48a</i> 0.5
Bier G	<i>L48a</i> 1.0
Bier H	<i>L48b</i> 0.5
Bier I	<i>L48b</i> 1.0

As shown in Fig. 25 the sweetness of all beer samples with *stevia* extract fermented with yeast *L48*, is greater and the palate fullness better than that of pure beer. Specifically, non- discolored steviol glycosides extracts mixed 10% with beer were very sweet. Only beer with the discolored sample *L48b* (5%) approaches the normal sweetness of pure beer. Palate fullness is by all samples better than that of the pure beer, while it is described as "little typical " for the low and" non typical "for the high concentration of non- discolored samples. The beer with the discolored sample *L48a* 5% is closer to the taste of pure beer, while the largest deviation in the purity of taste present samples *L48a* 1.0d *L48b* 1.0. The flavor has no "errors". Finally the bitter taste is not different between the pure beer and one mixed with extract fermented with *L48*.

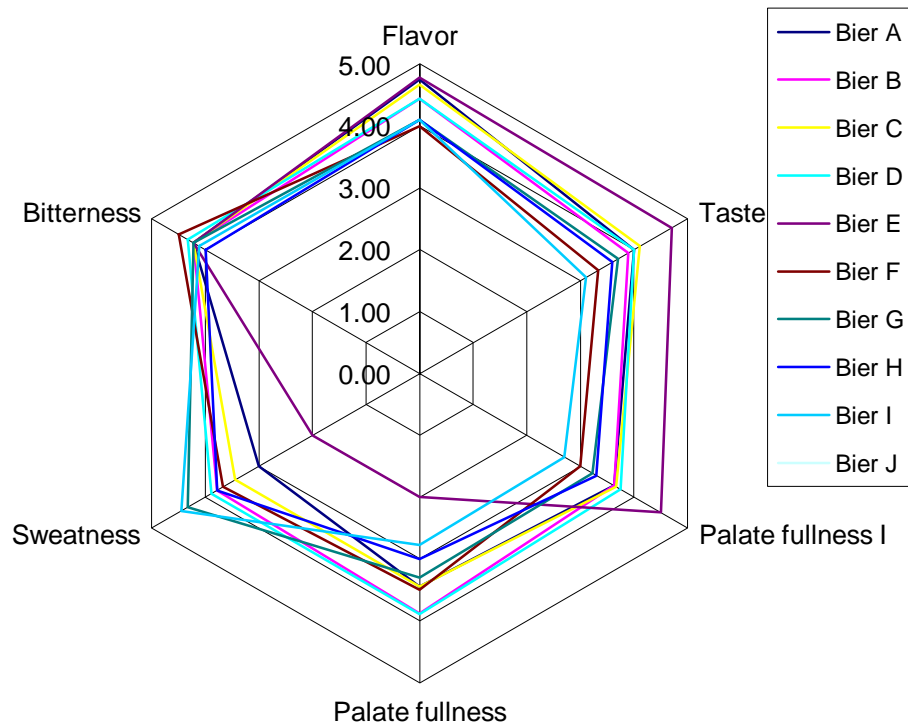


Fig. 26: Tasting control evaluation of beers with all *L48 stevia* samples.

Table 12: Coding of beers with *BI* samples in tasting control.

Bier	Tasting sample
Bier A	<i>BIa</i> 0.5d
Bier B	<i>BIa</i> 1.0d
Bier C	<i>BIb</i> 0.5d
Bier D	<i>BIb</i> 1.0d
Bier E	Reference
Bier F	<i>BIa</i> 0.5
Bier G	<i>BIa</i> 1.0
Bier H	<i>BIb</i> 0.5
Bier I	<i>BIb</i> 1.0

According to Figure 26, mixing Pilsner beer with *stevia* extract fermented with *BI* increased the sweetness and palate fullness of beer, and did not affect the bitter taste. Specifically beers with 10% non-disc. *stevia* extract was “very“ or „extremely“ sweet. Only beer with 5% discolored sample *BIa* was "somewhat sweet" and closer than others to normal sweetness of beer. Palate fullness is characterized by all samples better or higher. By most samples filling palate fullness is characterized by the tasters as „little typical. "The taste is still pure by all discolored samples *BI*, while the non- discolored samples show " minor deviations". The quality of the bitter taste good by all samples.