



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

## **ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Σύγκριση μεθόδων προσδιορισμού σακχάρων σε δείγματα ζύθου**

**ΜΠΑΜΙΑΤΖΟΓΛΟΥ ΑΛΚΜΗΝΗ ΠΟΛΥΞΕΝΗ (ΑΜ18685053)**

**ΒΑΣΙΛΟΠΟΥΛΟΥ ΕΙΡΗΝΗ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ (ΑΜ 18685061)**

**Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Ευαγγέλου Αλεξάνδρα**

**ΑΘΗΝΑ, ΜΑΡΤΙΟΣ 2024**



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

## **BACHELOR THESIS**

**Methods of sugar determination in beer samples– a comparative  
study**

**BAMIATZOGLOU ALKMINI POLYXENI (RN 18685053)**

**VASILOPOULOU EIRINI EVANGELIA (RN 18685061)**

**Supervisor: Evangelou Alexandra**

**ATHENS , MARCH 2024**

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

**ΔΗΛΩΣΗ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ**

Οι υπογράφωντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη διπλωματική εργασία με τίτλο:

**«Σύγκριση μεθόδων προσδιορισμού σακχάρων σε δείγματα ζύθου»**

και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

<b>Ψηφιακή Υπογραφή Επιβλέποντα Καθηγητή (1<sup>ο</sup> Μέλους Επιτροπής)</b>	
<b>Ψηφιακή Υπογραφή Καθηγητή (2<sup>ο</sup> Μέλους Επιτροπής)</b>	
<b>Ψηφιακή Υπογραφή Καθηγητή (3<sup>ο</sup> Μέλους Επιτροπής)</b>	

## ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Οι κάτωθι υπογράφουσες Μπαμιατζόγλου Αλκμήνη-Πολυξένη του Αντωνίου-Παναγιώτου, με αριθμό μητρώου 18685053 και Βασιλοπούλου Ειρήνη-Ευαγγελία του Ανδρέα με αριθμό μητρώου 18685061, φοιτήτριες του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστημών Οίνου, Αμπέλου και Ποτών, δηλώνουμε η κάθε μία υπεύθυνα ότι:

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

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

Η Δηλούσα

Μπαμιατζόγλου Αλκμήνη- Πολυξένη



(Ονοματεπώνυμο & Υπογραφή)

Η Δηλούσα

Βασιλοπούλου Ειρήνη-Ευαγγελία

*Ειρήνη Ευαγγελία Βασιλοπούλου*



(Ονοματεπώνυμο & Υπογραφή)

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο ζύθος είναι ένα αλκοολούχο ποτό, γνωστό από την αρχαιότητα. Παρασκευάζεται με τέσσερις πρώτες ύλες : το νερό, το κριθάρι, τον λυκίσκο και τη ζύμη. Μεταξύ άλλων συστατικών, τα βασικά σάκχαρα που απαντώνται στο ζυθογλεύκος είναι η μαλτόζη, η μαλτοτριόζη, η γλυκόζη, η σακχαρόζη και η φρουκτόζη, ενώ ταυτόχρονα υπάρχουν και δεξτρίνες, που είναι μη ζυμώσιμα σάκχαρα. Τα ποσοστά τους επηρεάζονται από το είδος βύνης, τις θερμοκρασίες πολτοποίησης και άλλους παράγοντες. Ο προσδιορισμός των σακχάρων είναι σημαντικός καθώς κατά την πορεία παραγωγής ζύθου υπολογίζοντας τα σάκχαρα του ζυθογλεύκου εκτιμώνται πληροφορίες για το τελικό προϊόν και για απαραίτητες ενέργειες που χρειάζονται κατά την παραγωγική διαδικασία, ενώ ο προσδιορισμός των σακχάρων στον ζύθο παρέχει διατροφικές πληροφορίες.

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία παρουσιάζονται οι μέθοδοι προσδιορισμού των αναγόντων σακχάρων που απαντώνται στο ζύθο και επιλέχθηκαν τέσσερις μέθοδοι να εφαρμοστούν πειραματικά σε πρότυπα διαλύματα σακχάρων και σε δείγματα ζύθου και ζυθογλεύκου, με σκοπό την μεταξύ τους σύγκριση. Συγκεκριμένα, προσδιορίστηκε η γλυκόζη, η φρουκτόζη, η σακχαρόζη και η μαλτόζη με τις μεθόδους Lane-Eynon, Luff και ενζυμικού προσδιορισμού, ενώ έγιναν μετρήσεις για τη γλυκόζη και φασματοφωτομετρικά με χρήση 2,4-δινιτροφαινόλης. Η μέθοδος Lane Eynon έδωσε σαφή αποτελέσματα για τη γλυκόζη, τη μαλτόζη και τη φρουκτόζη, ενώ για την σακχαρόζη τα αποτελέσματα ήταν ασαφή. Η μέθοδος Luff αποδείχθηκε πως λειτουργεί για τον προσδιορισμό της γλυκόζης και της φρουκτόζης, ενώ για την ιμπερτοποιημένη σακχαρόζη και την ιμπερτοποιημένη μαλτόζη τα αποτελέσματα ήταν ασαφή. Ο φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της γλυκόζης έδωσε αναμενόμενα αποτελέσματα. Ο ενζυμικός προσδιορισμός έδωσε σαφή αποτελέσματα για τη γλυκόζη, τη φρουκτόζη και την σακχαρόζη ενώ δεν λειτούργησε για τη μαλτόζη. Συγκριτικά, η μέθοδος Lane-Eynon φαίνεται ότι είναι η καταλληλότερη για τον προσδιορισμό αναγόντων σακχάρων σε δείγματα ζύθου και ζυθογλεύκου. Βέβαια ένα ερώτημα γεννάται κατά πόσο η ιμπερτοποίηση είναι ένα απαραίτητο στάδιο στην μέθοδο Lane-Eynon, καθώς ως επίσημη μέθοδος δεν αναφέρει κάτι σχετικά, ενώ στην παρούσα εργασία φάνηκε να είναι απαραίτητο. Περαιτέρω μελέτες χρειάζονται προς αποσαφήνιση.

**Λέξεις κλειδιά:** ανάγοντα σάκχαρα, γλυκόζη, φρουκτόζη, μαλτόζη, σακχαρόζη, μέθοδος Luff, μέθοδος Lane-Eynon, φασματοφωτομετρία, ζύθος

## ABSTRACT

Beer is an alcoholic beverage, known since ancient times. It is crafted using four fundamental raw materials: water, barley, hops, and yeast. Among other components in wort, key sugars include maltose, maltotriose, glucose, sucrose and fructose. Additionally, non-fermentable dextrins contribute to the overall composition. Malt type, mashing temperatures, and various brewing factors influence the ratios of these sugars. Sugar determination is important as during the beer production process, the estimation of sugars in wort provides information on the final product and the necessary actions needed during production, while sugar determination in beer provides nutritional information.

This paper outlines the assessment of reducing sugars in beer through four distinct methods, providing a comparative analysis. The Lane-Eynon, Luff and enzymatic methods were employed for determining glucose, fructose, sucrose and maltose. Simultaneously, exclusive measurements for glucose were conducted using 2,4-dinitrophenol in a spectrophotometric approach. The effectiveness of the Luff method was demonstrated in determining glucose and fructose, yet inconclusive for inverted sucrose and inverted maltose. Similarly, the Lane Eynon method yielded clear results for glucose, fructose and inverted maltose, but lacked clarity for inverted sucrose. Spectrophotometric determination of glucose produced the expected results. The enzymatic determination provided clear results for glucose, fructose, and sucrose, while it did not work for maltose. In comparison, the Lane-Eynon method appears to be most suitable for the determination of reducing sugars in beer and wort samples. Of course, a question arises as to whether the inversion is a necessary step in the Lane-Eynon method since as an official method it does not mention anything about it, while in the present work, it appeared to be necessary. Further studies are needed to clarify this question.

**Keywords:** reducing sugars, glucose, fructose, maltose, sucrose, Luff method, Lane-Eynon method, spectrophotometry, beer

## Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Οινικών του τμήματος Επιστημών Οίνου, Αμπέλου και Ποτών της σχολής Επιστημών Τροφίμων του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής υπό την επίβλεψη και καθοδήγηση της Επίκουρης Καθηγήτριας Ευαγγέλου Αλεξάνδρας κατά το ακαδημαϊκό έτος 2023-2024, στα πλαίσια ολοκλήρωσης του κύκλου σπουδών μας.

Αρχικά, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε την επιβλέπουσα Καθηγήτριά μας κυρία Ευαγγέλου Αλεξάνδρα για την ανάθεση του θέματος, την επιστημονική καθοδήγηση καθώς και την διαρκή της προθυμία τόσο για συζήτηση όσο και για παροχή συμβουλών, καθοριστικών για την επιτυχή ολοκλήρωση της εργασίας.

Επιπλέον, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε τον Επίκουρο Καθηγητή κύριο Ταταρίδη Παναγιώτη για την πολύτιμη βοήθεια που προσέφερε, τόσο με την παροχή δειγμάτων ζύθου καθώς και με συμβουλές κατά την εκπόνηση του πειραματικού μέρους της πτυχιακής εργασίας.

Στη συνέχεια θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε η μία την άλλη για την υπομονή και επιμονή μας καθώς και για την όμορφη φιλία που ενισχύθηκε κατά την εκπόνηση της παρούσας πτυχιακής.

Τέλος, ευχαριστούμε πολύ τις οικογένειές μας για τη στήριξη, την ενθάρρυνση και την εμπύχωσή τους κατά τη διάρκεια των σπουδών μας.

## Πίνακας Περιεχομένων

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>Ευχαριστίες</b> .....	<b>iv</b>
<b>Κατάλογος Πινάκων</b> .....	<b>viii</b>
<b>Κατάλογος Εικόνων και Διαγραμμάτων</b> .....	<b>ix</b>
<b>Συντμήσεις, ακρωνύμια, σύμβολα και ορισμοί</b> .....	<b>x</b>
<b>1 Εισαγωγή και Σκοπός της Εργασίας</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Βιβλιογραφική ανασκόπηση</b> .....	<b>3</b>
2.1 Ιστορική Αναδρομή .....	3
2.2 Τα συστατικά του ζύθου.....	5
2.2.1 Νερό.....	5
2.2.2 Κριθάρι.....	7
2.2.3 Λυκίσκος.....	8
2.2.4 Ζύμες.....	9
2.3 Στάδια παραγωγής ζύθου .....	10
2.3.1 Βυνοποίηση.....	10
2.3.2 Ζυθοποίηση.....	11
2.3.2.1 Άλεση .....	11
2.3.2.2 Πολτοποίηση .....	12
2.3.2.3 Διήθηση - Διαύγαση .....	12
2.3.2.4 Βρασμός .....	12
2.3.2.5 Ψύξη .....	13
2.3.2.6 Ζύμωση .....	14
2.3.2.7 Ζύμωση - Ωρίμανση του ζύθου με ακινητοποιημένες ζύμες .....	15
2.3.2.8 Διήθηση - Σταθεροποίηση του Ζύθου .....	16
2.3.2.9 Προσθήκη διοξειδίου του άνθρακα - Παστερίωση - Εμφιάλωση και	



Συσκευασία του ζύθου .....	16
2.4 Σάκχαρα .....	17
2.4.1 Ταξινόμηση των σακχάρων .....	17
2.4.1.1 Μονοσακχαρίτες .....	17
2.4.1.2 Ολιγοσακχαρίτες .....	19
2.4.1.3 Πολυσακχαρίτες ή γλυκάνες .....	20
2.4.2 Ο ρόλος των σακχάρων .....	22
2.4.3 Ανάγοντα σάκχαρα - Ζυμώσιμα .....	22
2.4.3.1 Γλυκόζη .....	22
2.4.3.2 Φρουκτόζη .....	23
2.4.3.3 Μαλτόζη .....	23
2.4.4 Υπολειμματικά σάκχαρα .....	24
2.4.5 Μέθοδοι Προσδιορισμού σακχάρων .....	25
2.4.5.1 Μέθοδοι ποιοτικού προσδιορισμού .....	25
2.4.5.2 Μέθοδοι ποσοτικού προσδιορισμού .....	26
<b>3 Υλικά και Μέθοδοι.....</b>	<b>30</b>
3.1 Μέθοδος Lane-Eynon .....	30
3.1.1 Εξοπλισμός.....	30
3.1.2 Προετοιμασία δειγμάτων.....	30
3.1.3 Πειραματική πορεία.....	33
3.2 Μέθοδος Lüff.....	33
3.2.1 Προετοιμασία δειγμάτων .....	35
3.2.2 Εξοπλισμός .....	36
3.2.3 Πειραματική πορεία.....	37
3.3 Φασματοφωτομετρική Μέθοδος .....	37
3.3.1 Εξοπλισμός.....	37
3.3.2 Προετοιμασία Δειγμάτων .....	38
3.3.3 Πειραματική Πορεία .....	39

3.4	Ενζυμική Μέθοδος.....	40
<b>4</b>	<b>Αποτελέσματα &amp; Συζήτηση .....</b>	<b>41</b>
4.1	Αποτελέσματα Μεθόδου Lane-Eynon .....	41
4.2	Αποτελέσματα Μεθόδου Lüff.....	42
4.3	Αποτελέσματα Φασματοφωτομετρικού Προσδιορισμού.....	44
4.4	Αποτελέσματα Ενζυμικού Προσδιορισμού.....	46
<b>5</b>	<b>Συμπεράσματα.....</b>	<b>47</b>
	<b>Βιβλιογραφία.....</b>	<b>48</b>
	<b>Παραρτήματα.....</b>	<b>53</b>
	<b>Παράρτημα Α :</b> Πίνακας με τους παράγοντες της μεθόδου Lane- Eynon για 25 ml του διαλύματος Soxhlet .....	53
	<b>Παράρτημα Β :</b> Πίνακας για μετατροπή των καταναλώσεων $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ( n-n' ) σε mg αναγόντων σακχάρων / 25 ml δείγματος . Δίνει την τιμή « k ».....	54

## Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1.1 Αποτελέσματα και στατιστική ανάλυση μετρήσεων της μεθόδου Lane– Eynon.....	41
Πίνακας 2.1 Καταναλώσεις μεθόδου Lüff και η στατιστική τους ανάλυση .....	42
Πίνακας 2.2 Χρωματικές αλλαγές με εικόνες κατά τον βρασμό και την τιτλοδότηση.....	43
Πίνακας 2.3 Μετατροπή διαφοράς καταναλώσεων Luff σε gr σακχάρων/L.....	44
Πίνακας 3.1 Αποτελέσματα φασματοφωτομετρικού προσδιορισμού.....	45
Πίνακας 4.1 Αποτελέσματα Ενζυμικού Προσδιορισμού .....	46

## Κατάλογος Εικόνων και Διαγραμμάτων

Εικόνα 1. Μετατροπή του πυροσταφυλικού οξέος σε ακεταλδεΐδη με τη δράση της πυροσταφυλικής αποκαρβοξυλάσης και μετατροπή της ακεταλδεΐδης σε αιθανόλη με τη δράση της αλκοολικής αφυδρογονάσης.....	10
Εικόνα 2 . Παραγωγικά στάδια ζύθου.....	11
Εικόνα 3 και 4 : Μεταβολή παραμέτρων ζύμωσης και ωρίμανσης και μεταβολή περιεκτικότητας δευτερευόντων προϊόντων του μεταβολισμού των ζυμών κατά τη ζύμωση και την ωρίμανση αντίστοιχα.....	15
Εικόνα 5 . Η δομή της γλυκόζης (αλδοεξόζης ) στα αριστερά και η δομή της φρουκτόζης (κετοεξόζης) στα δεξιά.....	18
Εικόνα 6 . Ένωση καρβονυλικής ομάδας με αλκοόλη προς σχηματισμό ημιακετάλης.....	18
Εικόνα 7. Μετατροπή γλυκόζης από προβολή Fischer σε προβολή Haworth.....	19
Εικόνα 8. Δομή των δισακχαριτών σακχαρόζη, λακτόζη και μαλτόζη .....	20
Εικόνα 9 . Διάσπαση πολυσακχαρίτη από α- και β- αμυλάση.....	21
Εικόνα 10. Συνολική περιεκτικότητα των ζυμώσιμων σακχάρων του γλεύκους και (B) το ποσοστό των πέντε ζυμώσιμων σακχάρων σε μη βυνοποιημένο κριθάρι (SB), βύνη του εμπορίου (CM) και τριών διαφορετικών βυνών (SM80, SM90, SM100) που ψήθηκαν σε φούρνο σε θερμοκρασίες 80, 90 και 100 °C αντίστοιχα .....	24
Εικόνα 11. Ποσότητα σακχάρων κατά την διάρκεια της ζύμωσης.....	24
Εικόνα 12. Συσκευή ενζυμικού αναλυτή HyperLab Smart.....	40
Διάγραμμα3.1 Καμπύλη αναφοράς πρότυπων διαλυμάτων γλυκόζης .....	45

## Συντμήσεις, ακρωνύμια, σύμβολα και ορισμοί

K.Y.A.	Κοινή Υπουργική Απόφαση
ATP	Adenosine triphosphate
DNS	Dinitrosalicylic acid
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
HPLC	High-performance liquid chromatography
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
SD	Standard Deviation
TDS	Total dissolved solids
TLC	Thin-layer chromatography



# 1 Εισαγωγή και Σκοπός της Εργασίας

Ο ζύθος αποτελεί ένα από τα παλαιότερα αλκοολούχα ποτά, με μεγάλα ποσά κατανάλωσης ανά τον κόσμο. Παρασκευάζεται με τέσσερις πρώτες ύλες : το νερό, το κριθάρι, τον λυκίσκο και τη ζύμη. Το νερό αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος των πρώτων υλών της παραγωγής, το κριθάρι αποτελεί την πρώτη ύλη για την παραγωγή βύνης, ο λυκίσκος προσδίδει στο ζύθο πικρικές και αρωματικές ουσίες συμβάλλοντας στην αρμονία, τη βιολογική και γευστική σταθερότητα, ενώ η ζύμη μέσω των προϊόντων μεταβολισμού της κατά τη ζύμωση και την ωρίμανση καθορίζει τον οργανοληπτικό χαρακτήρα του ζύθου. Για την πρόβλεψη της πορείας της αλκοολικής ζύμωσης στο ζύθο καθώς και για την πρόβλεψη της απόδοσης σε αλκοόλη, χρησιμοποιούνται μέθοδοι προσδιορισμού των σακχάρων, καθώς με κατανάλωση αυτών παράγεται αλκοόλη και διοξείδιο του άνθρακα, συστατικά βασικά για το τελικό προϊόν. Σαν πρότυπη μέθοδος αναφοράς για τον ποσοτικό προσδιορισμό των σακχάρων στο ζύθο ορίζεται η μέθοδος Lane-Eynon, ενώ συχνά γίνεται χρήση άλλων μεθόδων όπως η Luff και διάφορες άλλες ογκομετρικές, φασματοφωτομετρικές και ενόργανες μέθοδοι.

Ο προσδιορισμός σακχάρων στην πορεία παραγωγής ζύθου είναι ιδιαίτερα σημαντικός. Για παράδειγμα, υπολογίζοντας σάκχαρα σε ζυθογλεύκος μπορεί να εκτιμηθεί ο αλκοολικός τίτλος της παραγόμενης μπίρας, να εκτιμηθεί η ομαλή διεξαγωγή της ζύμωσης, να εκτιμηθεί αν είναι αναγκαία η προσθήκη σακχάρων κατά την ζυθοποίηση, ενώ ο προσδιορισμός σακχάρων στο τελικό προϊόν του ζύθου παρέχει και διατροφικές πληροφορίες, κάτι που πιθανόν μελλοντικά γίνει υποχρεωτικό να αναγράφεται στην ετικέτα του προϊόντος.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η σύγκριση μεθόδων προσδιορισμού σακχάρων ως προς την σαφήνεια, την επαναληψιμότητα και την ακρίβεια των αποτελεσμάτων τους με απώτερο σκοπό την ανάδειξη μίας ή περισσότερων μεθόδων ως κατάλληλες και προτιμώμενες για χρήση κατά τον ποσοτικό προσδιορισμό σακχάρων σε δείγματα ζύθου και ζυθογλεύκους, στο πλαίσιο των αναγκών του Τμήματος. Για την επίτευξη του στόχου αυτού, έγινε χρήση των μεθόδων Luff, Lane-Eynon, της φασματοφωτομετρικής μεθόδου με χρήση 2,4 δινιτροφαινόλης και του ενζυμικού προσδιορισμού σε διαλύματα σακχάρων γνωστής συγκέντρωσης. Ταυτόχρονα έγιναν μετρήσεις και σε δείγματα ζυθογλεύκους και ζύθου.

Ως προς την δομή της εργασίας, παρουσιάζονται αρχικά στο θεωρητικό μέρος κάποια ιστορικά στοιχεία και στη συνέχεια περιγράφονται τα τέσσερα βασικά συστατικά του ζύθου, τα στάδια που ακολουθούνται για την παραγωγή του (στάδια βυνοποίησης και ζυθοποίησης), καθώς γίνεται αναφορά και στα σάκχαρα που απαντώνται σε αυτόν. Επιπρόσθετα

παρουσιάζονται οι τρόποι προσδιορισμού των σακχάρων και πιο συγκεκριμένα των αναγόντων-ζυμώνσιμων σακχάρων.

Περιγράφονται επίσης οι μέθοδοι που εφαρμόστηκαν πειραματικά και έπειτα τα αποτελέσματα που εξήχθησαν στα πλαίσια του πειραματικού μέρους της εργασίας. Τελικά γίνεται μια σύγκριση ως προς την αξιοπιστία και την επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων των μεθόδων κατά την εφαρμογή τους σε αναλύσεις σακχάρων σε υδατικά διαλύματα και δείγματα ζύθου.



## 2 Βιβλιογραφική ανασκόπηση

### 2.1 Ιστορική Αναδρομή

Οι ρίζες της μύρας μπορούν να ανιχνευθούν περίπου το 6000 π.Χ., κατά τη διάρκεια της Νεολιθικής περιόδου, όπου στη Μεσοποταμία, ανακαλύφθηκε η τέχνη της ζυθοποίησης. Ξεχνώντας στον ήλιο ένα δοχείο που περιείχε νερό και κομμάτια ψημένου ψωμιού από κριθάρι, εκδηλώθηκε κάποια μορφή ζύμωσης. Η διαδικασία επαναλήφθηκε εσκεμμένα, με αποτέλεσμα οι Σουμέριοι τελικά να παρασκευάζουν 16 είδη ζύθου.<sup>1, 6</sup> Οι Βαβυλώνιοι αύξησαν τα είδη ζύθου σε 20, ενώ ο Κώδικας του Χαμουραμί το 1750-1730 π.Χ. αναγνώρισε την οικονομική και κοινωνική σημασία της μύρας. Οι Αιγύπτιοι παρασκευάζοντας ζύθο χρησιμοποιούσαν ψωμί από κριθάρι αλλά και ψωμί από Emmer, που αφορά αρχαία ποικιλία σιταριού. Η παραγωγή ζύθου στην αρχαία Αίγυπτο χρονολογείται στα 5500-3100 π. Χ. <sup>1, 8</sup>

Οι αρχαίοι Έλληνες και Ρωμαίοι προτιμούσαν το κρασί από τη μύρα. Οι διαδικασίες παραγωγής παρουσιάζουν κοινά, στη ζυθοποίηση, όμως, η κύρια πρώτη ύλη, το κριθάρι, περιλαμβάνει άμυλο αντί γλυκόζης ή φρουκτόζης, απαιτώντας ένα προπαρασκευαστικό στάδιο για τη μετατροπή του σε βύνη και την πολτοποίησή της.

Στην κεντρική Ευρώπη, η ζυθοποίηση εξελίχθηκε με τη συνεισφορά των Κελτών, Γαλατών, και Γερμανών, ενώ οι μοναστηριακές ζυθοποιίες παρασκεύαζαν αρχικά μικρές ποσότητες για εσωτερική κατανάλωση, αλλά επεκτάθηκαν και στο εμπόριο. Μια κληρονομιά που άφησαν οι Ρωμαίοι ήταν η ιδέα ότι, τουλάχιστον σε ορισμένες κελτικές φυλές, η μύρα ήταν για τον "κοινό λαό," ενώ το κρασί ήταν για τους αρχηγούς.<sup>2</sup>

Η σημασία της βύνης αναγνωρίστηκε, οδηγώντας στη δημιουργία εξειδικευμένων ζυθοποιείων. Αν και ο λυκίσκος χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά στη Βαυαρία στα τέλη του ογδόου αιώνα, χρειάστηκαν αρκετοί αιώνες για να επικρατήσει ως αρωματικό. Ο όρος "Ale" χρησιμοποιήθηκε αρχικά για να περιγράψει το προϊόν που δεν περιείχε λυκίσκο, ενώ ο όρος "beer" αυτό που είχε λυκίσκο.<sup>2</sup>

Μέχρι τον δέκατο έκτο αιώνα, η μύρα ale (που αργότερα ενσωμάτωσε λυκίσκο) ήταν το κυρίαρχο στυλ μύρας παγκοσμίως. Αυτές παράγονταν σε ανοικτά δοχεία, με αφροζύμες. Η ζύμωση με βυθοζύμες πιθανότατα ξεκίνησε στα βαυαρικά μοναστήρια στις αρχές του δέκατου έκτου αιώνα. Τα προϊόντα από αφροζύμες είχαν παρασκευαστεί σε θερμές συνθήκες, αλλά τώρα αυτά από βυθοζύμες παρασκευάζονταν το χειμώνα, με τη μύρα να αποθηκεύεται μέχρι το επόμενο φθινόπωρο, όταν ξεκινούσε η ζυθοποίηση ξανά.<sup>2</sup>

Το 1516 στη Βαυαρία, ο Δούκας Wilhelm IV και ο Ludwig X εισήγαγαν το Reinheitsgebot

για να απαγορεύσουν τη χρήση ανεπιθύμητων υλικών στη ζυθοποίηση. Αυτός ο νόμος εξακολουθεί να ισχύει στη Γερμανία για την εγχώρια παραγωγή, περιορίζοντας τα είδη πρώτων υλών της ζυθοποίησης σε βύνη, λυκίσκο, μαγιά και νερό. <sup>2,7</sup>

Η Βιομηχανική Επανάσταση επέτρεψε στις ζυθοποιίες να επεκτείνουν τη διανομή τους. Η διεθνής διανομή αυξήθηκε, με προϊόντα όπως η India Pale Ale να διατηρούν τη φρεσκάδα τους για μεγάλες αποστάσεις. Οι ατμοκινητήρες του James Watt (1765) και το τεχνητό ψυγείο του von Linde (1876) βελτίωσαν την αποτελεσματικότητα και επέτρεψαν την παραγωγή της lager. <sup>10,11</sup>

Η εισαγωγή των κυλινδροκωνικών δοχείων με διπλώματα ευρεσιτεχνίας του Nathan (1899-1905) επέτρεψε τη μεγάλης κλίμακας ζύμωση της μύρας. Τα πρώτα κουτιά για γέμισμα με μύρα παράχθηκαν από την American Can Company το 1934 <sup>2</sup>. Σημαντικές προόδους έγιναν στην επεξεργασία του κριθαριού και του λυκίσκου έως τα 1950 (κριθάρι) και τα 1970 (λυκίσκο).

Η εναλλαγή αέρα μεταξύ βυθίσεων σε νερό για το κριθάρι μείωσε τον χρόνο βυθοποίησης και αύξησε την παραγωγή. Ο λυκίσκος επωφελήθηκε από την τεχνολογία pellet και την εξαγωγή των ουσιών με χρήση υγρού διοξειδίου του άνθρακα, βελτιώνοντας τη χρήση των ρητινών και των ελαίων. <sup>2</sup>

Όσον αφορά τη χώρα μας, η ιστορία της μύρας στην Ελλάδα χρονολογείται από τα τέλη του 19ου αιώνα, μετά την απελευθέρωση της χώρας από την οθωμανική κυριαρχία. Το πρώτο ζυθοποιείο στην Αθήνα ιδρύθηκε το 1840 από Γερμανούς. Το 1885, υπήρχαν επτά ζυθοποιεία που παρήγαγαν σημαντικές ποσότητες μύρας. Βαυαροί ζυθοποιοί, όπως οι Melcher, Fischer, Waweck και Seel (Ζελ), έπαιξαν σημαντικό ρόλο στην εισαγωγή των χειροκίνητων ζυθοποιείων στην Αθήνα την περίοδο 1840-1850. Ο John Georg. Fix, Βαυαρός ζυθοποιός, έφτασε το 1850 και εισήλθε στον κλάδο της ζυθοποιίας, αποκτώντας το ζυθοποιείο του Melcher το 1866. <sup>3</sup>

Άλλα γερμανικά ζυθοποιεία λειτουργούσαν στην Αθήνα, ενώ Έλληνες, όπως ο Λορέντζος Μάμος στην Πάτρα, μίμησαν αργότερα την επιτυχία τους. Ακολούθησαν και τα ζυθοποιεία-ζυθοπωλεία Κωστή και Δαμιανού στην Αθήνα και του Τσοκαρόπουλου στο Νέο Φάληρο/Πειραιά. Το 1866, ο John Georg. Fix ίδρυσε ένα μικρό ζυθοποιείο στο Ηράκλειο Αττικής, που αργότερα μετατράπηκε σε μεγάλο εργοστάσιο με ατμοκίνηση, εισάγοντας προηγμένα μηχανήματα από τη Βαυαρία. Το ζυθοποιείο Fix έγινε σύμβολο καινοτομίας, εισάγοντας την παραγωγή τεχνητού πάγου το 1900 και αποκτώντας εργοστάσιο βύνης το 1901. <sup>3</sup>

Το 1963 ιδρύθηκε η Αθηναϊκή Ζυθοποιία, το 1965 ξεκίνησε η παραγωγή και λανσαρίστηκε η ΑΜΣΤΕΛ στην Ελληνική αγορά, το 1981 η HEINEKEN, ενώ το 1990-1998 εισήχθησαν μάρκες από όλο τον κόσμο. Οι ΑΛΦΑ και FISHER λανσαρίστηκαν το 1999-2000 στην Ελληνική αγορά, το 2017 η ΜΑΜΟΣ. <sup>4</sup> Από τότε μέχρι σήμερα έχει παρατηρηθεί εκθετική άνοδος στον αριθμό των μικρών επιχειρήσεων μικροζυθοποιίας που έχουν ιδρυθεί τα τελευταία χρόνια στην χώρα μας, με

τον ζύθο να αποτελεί πλέον σημαντικό εμπορικό προϊόν .

## 2.2 Τα συστατικά του ζύθου

Σύμφωνα με τον νόμο της καθαρότητας οι πρώτες ύλες για την παραγωγή ζύθου περιλάμβαναν νερό, κριθάρι, λυκίσκο και ζύμες. Ωστόσο, πρόσφατα, η ελληνική νομοθεσία προσαρμόστηκε στην ευρωπαϊκή πραγματικότητα, επιτρέποντας τη χρήση άλλων πηγών σακχάρων και αμύλου. Σύμφωνα με τις νέες διατάξεις, επιτρέπεται η χρήση ζάχαρης, σιροπιού γλυκόζης ή/και μαλτόζης, ρυζιού, βύνης σίτου, και άλλων παρόμοιων υλικών (αβυνοποίητα δημητριακά) ως πρώτες ύλες στην παρασκευή μύρας.<sup>5,6</sup>

### 2.2.1 Νερό

Το νερό είναι το κυριότερο σε ποσοστό συστατικό για την παρασκευή ζύθου. Χρησιμοποιείται για διάφορους σκοπούς, όπως η ζυθοποίηση, οι αραιώσεις, η θέρμανση, η παραγωγή ατμού, η ανάκτηση ενέργειας, η ψύξη (μόνο του ή με ψυκτικά υγρά-γλυκόλη), οι καθαρισμοί, και άλλα στάδια επεξεργασίας όπως το φιλτράρισμα, η συσκευασία, κλπ.<sup>13,14</sup>

Αρχικά, η διαθεσιμότητα του νερού κάθε περιοχής επηρέασε τη δημιουργία διαφορετικών στυλ μύρας που αναπτύχθηκαν σε κάθε περιοχή. Με την εξέλιξη της τεχνολογίας επεξεργασίας νερού, τα ζυθοποιεία ανεξαρτητοποιήθηκαν από την ποιότητα του τοπικού νερού.<sup>14</sup>

Η ανάπτυξη των μεγάλων ζυθοποιείων συνδέεται στενά με τις εξελίξεις στην επεξεργασία νερού, καθώς η ποιότητα του διαφέρει ακόμα και στην ίδια περιοχή ανάλογα με την προέλευση, όπως δημοτικό νερό, γεώτρηση (υπόγειο), πηγή (επιφανειακό), βρόχινο, επεξεργασμένο νερό αποβλήτων.

Τα θέματα ποιότητας περιλαμβάνουν φυσικοχημικά χαρακτηριστικά, μικροβιολογικά χαρακτηριστικά, διαβρωτική ικανότητα, απαιτήσεις σύστασης για κάθε τύπο ζύθου, κ.ά.

Για την παραγωγή ζύθου είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί είτε υπόγειο νερό, που αντλείται από ιδιωτικά πηγάδια ή με γεωτρήσεις<sup>6</sup>, είτε επιφανειακό νερό, που προέρχεται από ποτάμια και λίμνες, με την ποσότητά του να εξαρτάται από τις κλιματολογικές συνθήκες και η ποιότητά του από τα συστατικά της ατμόσφαιρας, είτε νερό δικτύου, που προέρχεται από πηγάδια ή επιφανειακές πηγές και κυρίως αποτελείται από νερό βροχής.<sup>6</sup>

Το νερό επίσης κατηγοριοποιείται ανάλογα με τη χρήση του. Το "νερό ζυθοποίησης" είναι το κύριο συστατικό για την παραγωγή του ζύθου και υφίσταται επεξεργασία για να ανταποκρίνεται στις απαιτήσεις κάθε είδους ζύθου. Το "νερό των διεργασιών" χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό και την αποστείρωση του εξοπλισμού και, επιπλέον, για την παστερίωση και τη ψύξη του προϊόντος.

Αυτό το νερό πρέπει να είναι πόσιμο και αποσκληρυσμένο. Το "νερό γενικής χρήσης" χρησιμοποιείται για τον γενικό καθαρισμό του ζυθοποιείου. Τέλος, το "νερό υπηρεσίας" χρησιμοποιείται ως ατμός από τους λέβητες και πρέπει να είναι μαλακό ή πλήρως απιονισμένο.<sup>6</sup>

Συστατικά του νερού ζυθοποίησης:

Το νερό για την παραγωγή ζύθου θα πρέπει να είναι πόσιμο (ΟΔΗΓΙΑ 98/83/ΕΚ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ της 3ης Νοεμβρίου 1998 σχετικά με την ποιότητα του νερού ανθρώπινης κατανάλωσης').

Η οδηγία αναφέρει: το νερό ανθρώπινης κατανάλωσης είναι υγιεινό και καθαρό εφόσον:

- α) είναι απαλλαγμένο μικροοργανισμών και παρασίτων, και οποιωνδήποτε ουσιών, σε αριθμούς και συγκεντρώσεις, που αποτελούν ενδεχόμενο κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία και
- β) πληροί τις ελάχιστες απαιτήσεις του παραρτήματος Ι μέρη Α και Β,

(Κ.Υ.Α. 2600/01, όπως τροποποιήθηκε με την Κ.Υ.Α. 38295/07 (οδηγία 98/83 ΕΚ)

Τα μεταλλικά στοιχεία στο νερό επηρεάζουν το pH, και η παρουσία τους εξαρτάται από το γεωλογικό προφίλ της περιοχής. Η σκληρότητά του χαρακτηρίζεται από την περιεκτικότητα σε άλατα μαγνησίου και ασβεστίου. Συγκεκριμένα η ολική σκληρότητα (συγκέντρωση διττανθρακικών, ανθρακικών και θεικών αλάτων του μαγνησίου και του ασβεστίου), ορίζεται ως το άθροισμα της παροδικής και της μόνιμης σκληρότητας. Η παροδική σκληρότητα οφείλεται στην παρουσία υδρογονανθρακικών αλάτων, ενώ η μόνιμη στην παρουσία ευδιάλυτων αλάτων, κυρίως θεικών αλλά και χλωριούχων αλάτων, νιτρικών κ.ά που δεν απομακρύνονται με βρασμό. Το νερό υψηλής αλκαλικότητας θεωρείται σκληρό, με υψηλό pH, και χρησιμοποιείται για την παραγωγή σκουρόχρωμης μύρας, ενώ το νερό χαμηλής αλκαλικότητας είναι πιο μαλακό με χαμηλότερο pH και χρησιμοποιείται για ανοιχτόχρωμες μύρες. Η περιεκτικότητα σε μεταλλικά στοιχεία μπορεί να προσαρμοστεί με προσοχή για να αποφευχθούν ανεπιθύμητες αντιδράσεις. Σημαντικές ουσίες που πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν είναι το χλώριο και οι ενώσεις του, καθώς μπορούν να προκαλέσουν ανεπιθύμητες οσμές. Η καθαρότητα του νερού είναι κρίσιμη, αποκλείοντας μολυσματικούς παράγοντες, όπως τα βακτήρια, για την ασφαλή ζυθοποίηση. Γενικά το νερό ζυθοποίησης πρέπει να είναι απαλλαγμένο από παθογόνους μικροοργανισμούς, από παράσιτα, καθώς και από ουσίες που δύνανται να αποτελέσουν κίνδυνο για την υγεία.<sup>15,16</sup> Για να θεωρείται καλό το νερό πρέπει να είναι μικροβιολογικά ασφαλές, χημικά ασφαλές και οργανοληπτικά αποδεκτό. Πριν τη χρήση του γίνονται έλεγχοι ως προς την γεύση και την οσμή του, το pH, την αγωγιμότητα, τα ολικά διαλυμένα στερεά (TDS) και την αλκαλικότητα.

Υπόκειται επεξεργασία, συνήθως με φιλτράρισμα με ενεργό άνθρακα. Έτσι, αφαιρούνται χλωραμίνες και χλώριο άρα αποφεύγεται η δημιουργία χλωροφαινολών καθώς και οργανικές

ενώσεις και οσμές. Το φιλτράρισμα αυτό μπορεί να συνδυαστεί με αποστείρωση με υπεριώδεις φως. Συχνά γίνεται και μείωση της αλκαλικότητας, με όξυνση για εξουδετέρωση, αυξάνοντας τα όξινα ιόντα. Αυτό μπορεί να γίνει για παράδειγμα με προσθήκη γαλακτικού οξέος. Επιλέγεται η ιοντοανταλλαγή για επιλεκτική αφαίρεση ιόντων και η αντίστροφη ώσμωση και επιλεκτική προσθήκη. Μπορεί επίσης να γίνει ισχυρή ανάδευση και ιζηματογένεση με αποτέλεσμα να καταβυθιστούν ανεπιθύμητες ουσίες και να απομακρυνθούν με διήθηση.<sup>17,18</sup>

## 2.2.2 Κριθάρι

Από το κριθάρι παράγεται η βύνη, η οποία αποτελεί το βασικό υλικό για τη ζυθοποίηση. Τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά ενός κριθαριού που προορίζεται για βυνοποίηση είναι η υψηλή βλαστική ικανότητα και η ενεργότητά του. Τα λέπυρά του, που διατηρούνται ακόμα και μετά τη μετατροπή σε βύνη, χρησιμεύουν ως βοηθητική στοιβάδα διαύγασης του βυνογλεύκου. Εναλλακτικά, όταν δεν τηρούνται οι κανονισμοί της καθαρότητας και για μείωση του κόστους, χρησιμοποιούνται και άλλα αβυνοποίητα δημητριακά όπως ρύζι, αραβόσιτος, βρώμη, σίκαλη κ.ά. Ωστόσο, η χρήση καθαρής βύνης από κριθάρι έχει υπεροχή στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της παραγόμενης μύρας.<sup>19</sup>

Το κριθάρι πρέπει να προέρχεται από αποδεκτή ποικιλία και να είναι απαλλαγμένο από επιμολύνσεις, μούχλα, έντομα, ξένα σώματα, επεξεργασμένους κόκκους και δυσάρεστες οσμές, με περιεκτικότητα όχι περισσότερο από 5% αποφλοιωμένων ή σπασμένων κόκκων. Πρέπει να έχει πλήρως ωριμάσει και να διαθέτει υψηλή βλαστική ικανότητα σε προβλέψιμο χρονικό διάστημα. Ο κόκκος πρέπει να είναι γεμάτος και μεγάλος, με ομοιόμορφο σχήμα, χωρίς βαθιά σημάδια γήρανσης, και χαμηλή περιεκτικότητα σε άζωτο. Η πρωτεΐνη σε ξηρό βάρος πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 10,5% και 13%, με μέγιστη υγρασία 13,5%. Επιπλέον, θα πρέπει να μην έχει επηρεαστεί από υψηλή θερμοκρασία ή παγετό, να μην περιέχει ουσίες που επηρεάζουν την υγρασία, και να μην έχει υποστεί ξήρανση με τεχνητά μέσα<sup>6,20</sup>.

Η χημική σύσταση του κριθαριού, περιλαμβάνει διάφορα συστατικά. Κυρίως ο κόκκος κριθαριού περιλαμβάνει υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, λίπη, βιταμίνες, μέταλλα και νερό<sup>21</sup>. Η ακριβής χημική σύσταση μπορεί να ποικίλει ανάλογα με την ποικιλία του κριθαριού και τις καλλιεργητικές συνθήκες.

Η επιλογή του κατάλληλου κριθαριού που θα χρησιμοποιηθεί για βυνοποίηση βασίζεται στα εξωτερικά του γνωρίσματα: στο χρώμα, την παρουσία ξένων υλών, την ύπαρξη σπασμένων κόκκων, το σχήμα και το μέγεθος των κόκκων, την οσμή τους, την υφή των λεπύρων, καθώς και την ομοιογένεια που παρουσιάζει η ποικιλία<sup>6</sup>.

### 2.2.3 Λυκίσκος

Ο λυκίσκος επιστημονικά ονομάζεται *Humulus lupulus*, αποτελεί πολυετές, αναρριχώμενο δίοικο φυτό της οικογένειας των κανναβοειδών, ενώ χαρακτηρίζεται από μεγάλη ευαισθησία<sup>22,9</sup>. Υπάρχουν φυτά που έχουν μόνο θηλυκά και άλλα που έχουν μόνο αρσενικά άνθη<sup>23</sup>. Στην βάση κάθε μικρού φύλλου υπάρχουν μικροί σάκοι που αποτελούν αδένες λουπουλίνης και περιέχουν πικρικά οξέα, ρητίνες και αιθέρια έλαια συμβάλλοντας στον πικρικό χαρακτήρα του ζύθου<sup>6</sup>. Στη ζυθοποιία γίνεται χρήση μόνο των θηλυκών ανθών του λυκίσκου για τον αρωματισμό της μύρας.<sup>22</sup> Ο λυκίσκος θεωρείται ο «πράσινος χρυσός» της ζυθοποίησης<sup>6</sup> και είναι όμοιος με την τσουκνίδα και την κάνναβη.<sup>12</sup> Προσφέρει πικρή γεύση, εξισορροπώντας τη γλυκύτητα της βύνης.<sup>5,9</sup> Στην Ελλάδα καλλιεργείται κυρίως στην Ήπειρο με το όνομα “Αγιόκλημα”. Συνεισφέρει στην παραγωγή ζύθου προδίδοντας αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες, πικρή γεύση, αρωματικό χαρακτήρα και γευστική σταθερότητα, ενώ δρα ταυτόχρονα ως φυσικό διαυγαστικό.<sup>6</sup>

Ο λυκίσκος διαθέτει πολλές ποικιλίες που χωρίζονται βάση του αρώματος και της πικρικής δύναμης. Κατηγορίες περιλαμβάνουν τις αρωματικές ποικιλίες με υψηλή περιεκτικότητα σε αρωματικές ουσίες, χαμηλότερα α-οξέα και χρήση στο τέλος της ζυθοποίησης. Οι πικρές ποικιλίες, αντίθετα, έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε α-οξέα, λιγότερο άρωμα και χρησιμοποιούνται κατά τη διάρκεια του βρασμού ή μετά τον βρασμό του ζυθογλεύκου. Οι δύο αυτές κατηγορίες μπορούν να συνδυαστούν, προσθέτοντας την πικρή ποικιλία στην αρχή και την αρωματική στο τέλος της ζυθοποίησης. Υπάρχουν επίσης ποικιλίες διπλού σκοπού<sup>24,26</sup> που συνδυάζουν και τις δύο χαρακτηριστικές κατηγορίες.<sup>2</sup>

Ο λυκίσκος, για την παραγωγή μύρας, παρουσιάζεται σε τρεις μορφές. Τα άνθη λυκίσκου, γνωστά και ως κώνοι, μπορούν να χρησιμοποιηθούν φρέσκα ή αποξηραμένα. Τα σφαιρίδια λυκίσκου (pellets)<sup>26</sup>, επεξεργασμένα άνθη, χρησιμοποιούνται λόγω της ευκολότερης μετακίνησης και αποθήκευσής τους. Η επεξεργασία αυτή προστατεύει το φυτό από την οξείδωση, αποτρέπει απώλειες ελαίων και ρητινών, και ολοκληρώνεται με ξήρανση έως 60 °C, με στόχο την μείωση της υγρασίας από 80% σε 8-10%<sup>6,26</sup> και ψύξη στους -30°C. Επιλέγονται συνήθως σφαιρίδια λυκίσκου ή αποξηραμένα άνθη. Η αποθήκευση του λυκίσκου πρέπει να γίνεται σε δροσερό, αεροστεγές περιβάλλον, Η αποθήκευση γίνεται υπό κενό σε σακούλες αλουμινίου με ιδανική θερμοκρασία αποθήκευσής τους 0-3°C, προκειμένου να διατηρηθούν η πικράδα, τα αρώματα και τα α-οξέα του λυκίσκου.<sup>26</sup>

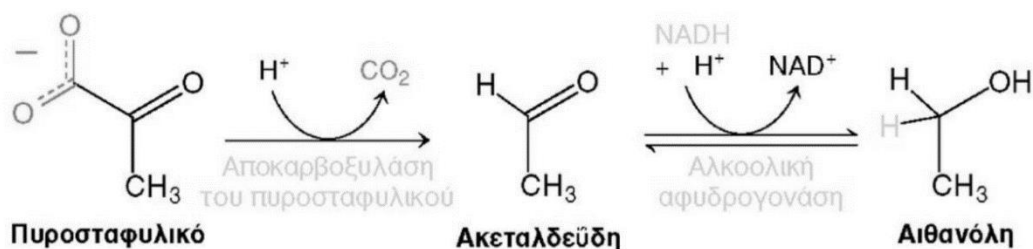
Ο λυκίσκος περιέχει πολλά συστατικά όπως ρητίνες, έλαια, πρωτεΐνες, λίπη, τανίνες, λιγνίνη και κυτταρίνη. Τα πιο σημαντικά από αυτά είναι οι ρητίνες<sup>6,27</sup> και τα έλαια.<sup>5,6,25-31</sup>

## 2.2.4 Ζύμες

Οι ζύμες ανήκουν στο Βασίλειο των Μυκήτων και αποτελούν ευκαρυωτικούς μονοκύτταρους οργανισμούς. Αποτελούν περίπου το 1% των ειδών των μυκήτων, με τουλάχιστον 1500 είδη που έχουν αναγνωρισθεί μέχρι το 2006. Είναι γνωστοί και ως σακχαρομύκητες λόγω της ικανότητάς τους να ζυμώνουν υδατάνθρακες (σάκχαρα) σε αιθυλική αλκοόλη και διοξείδιο του άνθρακα, μέσω του μεταβολικού μονοπατιού που ονομάζεται αλκοολική ζύμωση.<sup>32,33,34</sup> Ο όρος "ζύμη" δεν αποτελεί μια ταξινομική βαθμίδα, αλλά περιγράφει ένα ευρύ φάσμα οργανισμών που κατατάσσονται σε δύο διαφορετικά φύλα: τους Ασκομύκητες και τους Βασιδιομύκητες. Οι ζύμες ανήκουν στους Ασκομύκητες και κατατάσσονται στην Τάξη των *Saccharomycetales*. Ένα από τα πιο γνωστά είδη ζύμης είναι ο *Saccharomyces cerevisiae*, που ανήκει στο φύλο των Ασκομυκήτων<sup>36,38</sup> και χρησιμοποιείται στην παραγωγή άρτου, αλκοολούχων ποτών<sup>37</sup> και ως οργανισμός-μοντέλο σε ερευνητικές μελέτες κυτταρικής βιολογίας. Επιπλέον, ορισμένες ζύμες έχουν χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή αιθανόλης ως βιοκαύσιμο. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι όχι όλοι οι ζυμομύκητες είναι ωφέλιμοι για τον άνθρωπο.

### Α) Μεταβολισμός των ζυμών και αλκοολική ζύμωση

Οι ζυμομύκητες κατά την αλκοολική ζύμωση διασπούν τα σάκχαρα προς παραγωγή κυτταρικής ενέργειας, αιθανόλης και διοξειδίου του άνθρακα. Ως προαιρετικά αναερόβιοι οργανισμοί δύνανται να αποικοδομούν την γλυκόζη παρουσία ή απουσία οξυγόνου. Η ειδοποιός διαφορά είναι πως απουσία οξυγόνου γίνεται η αλκοολική ζύμωση και παράγεται αιθανόλη. Αναλυτικά κατά την αποικοδόμηση της γλυκόζης- γλυκόλυση- γίνονται εννέα αντιδράσεις, με παραγωγή δύο μορίων πυροσταφυλικού οξέος, δυο μορίων ATP και NADH. Το κάθε μόριο πυροσταφυλικού οξέος μετατρέπεται σε ακεταλδεΐδη με τη δράση του ενζύμου πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση, ενώ ταυτόχρονα απελευθερώνεται διοξείδιο του άνθρακα. Η ακεταλδεΐδη με τη δράση του ενζύμου αλκοολική αφυδρογονάση μετατρέπεται σε αιθανόλη. Έτσι τελικά παράγονται δύο μόρια αιθανόλης.



Εικόνα 1. Μετατροπή του πυροσταφυλικού οξέος σε ακεταλδεΐδη με τη δράση της πυροσταφυλικής αποκαρβοξυλάσης και μετροπή της ακεταλδεΐδης σε αιθανόλη με τη δράση της αλκοολικής αφυδρογονάσης.<sup>35</sup>

Οι ζύμες που χρησιμοποιούνται στην ζυθοποιία κατατάσσονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: τις αφροζύμες και τις βυθοζύμες. Αφροζύμες ονομάζονται τα στελέχη των σακχαρομυκήτων που τείνουν να επιπλέουν κατά το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης. Ταξινομούνται ως *Saccharomyces cerevisiae* και χρησιμοποιούνται στην παραγωγή ζύθων Ale. Το παραγόμενο προϊόν χαρακτηρίζεται από φρουτώδη αρώματα και γεμάτη γεύση, ενώ η θερμοκρασία ζύμωσης για τις αφροζύμες διατηρείται μεταξύ 15°C και 20°C με μέγιστη τους 24°C. Από την άλλη πλευρά, βυθοζύμες ονομάζονται τα στελέχη των σακχαρομυκήτων που τείνουν να καταβυθίζονται κατά το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης. Ταξινομούνται ως *Saccharomyces pastorianus* και χρησιμοποιούνται στην παραγωγή ζύθων Lager. Το παραγόμενο προϊόν χαρακτηρίζεται από διαύγεια, με απαλό και κομψό χαρακτήρα -ουδετερότητα.

## 2.3 Στάδια παραγωγής του ζύθου

Η παραγωγή του ζύθου διακρίνεται σε δύο στάδια, αυτό της βυνοποίησης που προηγείται, κι αυτό της ζυθοποίησης.

### 2.3.1 Βυνοποίηση

Κατά την βυνοποίηση, από την παραλαβή των κόκκων κριθαριού (ή άλλης αμυλούχας πρώτης ύλης) στόχος είναι η δημιουργία της βύνης. Βύνη καλείται η μορφή του κριθαριού που έχει βλαστήσει μερικώς, είναι πλούσιο σε ένζυμα και έχει ξηρανθεί και αποτελεί την πρώτη ύλη για την παραγωγή του ζύθου, μαζί με τον λυκίσκο, το νερό και τις ζύμες. Η βύνη είναι εύθρυπτη, εύγευστη, περιέχει υγρασία περίπου 4% και μπορεί να αποθηκευτεί χωρίς αλλοιώσεις.

Συνοπτικά, η βυνοποίηση περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια<sup>6, 25</sup>:

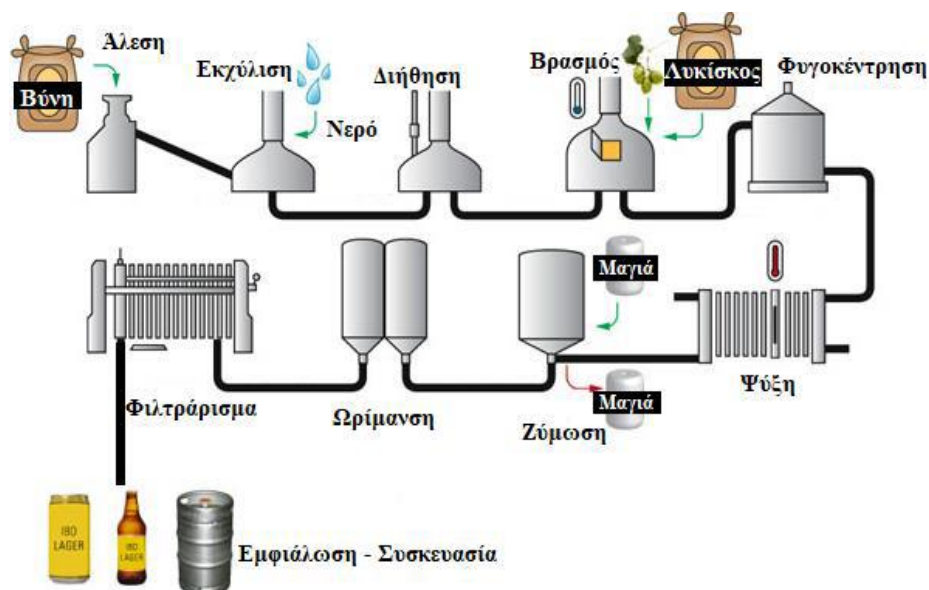
- Παραλαβή, καθαρισμό και ταξινόμηση των κόκκων
- Διαβροχή
- Βλάστηση
- Ξήρανση

Γίνεται συλλογή του κριθαριού, ζύγιση και καθαρισμός από τις ξένες ύλες. Γίνεται έλεγχος ως προς τις προδιαγραφές καταλληλότητας καθώς και χημικοτεχνικές αναλύσεις και μακροσκοπική εξέταση. Αποθηκεύεται, καθαρίζεται ξανά, ταξινομείται ανάλογα με το μέγεθος με τη χρήση παλλόμενων κοσκίνων και τελικά ζυγίζεται ξανά.<sup>6</sup>



## 2.3.2 Ζυθοποίηση

Μετά το στάδιο της βυνοποίησης, ακολουθεί η ζυθοποίηση, τα ενδιάμεσα στάδια της οποίας φαίνονται και στην Εικόνα 5 και συνοπτικά περιγράφονται παρακάτω.



Εικόνα 2. Παραγωγικά στάδια ζύθου.<sup>22</sup>

### 2.3.2.1 Άλεση

Η διαδικασία της άλεσης της βύνης επιδιώκει την αύξηση της επιφάνειάς της, επιτρέποντας έτσι τη δράση των ενζύμων που περιέχει. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, ο φλοιός διαχωρίζεται από τον σπόρο, διαμορφώνοντας το βυνάλευρο. Ο επιλεγόμενος βαθμός άλεσης επηρεάζει ουσιαστικά την τελική ποιότητα του προϊόντος, ενώ καθορίζεται από την ευθρυπτότητα της βύνης.<sup>6</sup>

### 2.3.2.2 Πολτοποίηση

Η μετατροπή των αδιάλυτων ουσιών της βύνης σε διαλύτες αποτελεί κρίσιμο στάδιο στην παραγωγή μύρας, καθώς οι διαλύτες ουσίες αποτελούν το κύριο υπόστρωμα για τη ζύμωση και παραγωγή μύρας. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της πολτοποίησης, όπου τα ένζυμα της βύνης ενεργοποιούνται και προκαλούν τον χαρακτήρα της μύρας. Οι παράμετροι που επηρεάζουν αυτήν τη διαδικασία είναι η θερμοκρασία, το pH και ο χρόνος. Η πολτοποίηση συμβάλλει στη δημιουργία ζυθογλεύκους με επιθυμητή σύσταση, που θα διασφαλίζει τις κατάλληλες προϋποθέσεις για την παραγωγική διαδικασία και υψηλή ποιότητα ζύθου. Κατά την πολτοποίηση, το άμυλο αναδεικνύεται ως ο κύριος δότης εκχυλίσματος, αποικοδομούμενο πλήρως σε σάκχαρα και δεξτρίνες. Τα ένζυμα που παίζουν καίριο ρόλο περιλαμβάνουν την  $\alpha$  και  $\beta$ -αμυλάση, την αμυλογλυκοζιδάση και την

πουλουλανάση (1,6 γλυκοζιδάση), τις πρωτεάσες, τις γλυκανάσες, πεντοζανάσες και τέλος τις φωσφατάσες.<sup>6</sup>

### 2.3.2.3 Διήθηση – Διαύγαση

Μετά την ολοκλήρωση της πολτοποίησης, ο πολτός περιέχει διαλυτές και αδιάλυτες ουσίες, το βυνογλεύκος και τα βυνοϋπολείμματα. Τα βυνοϋπολείμματα περιλαμβάνουν τα λέπυρα, το βλαστίδιο, και άλλες ουσίες που δεν έχουν αποικοδομηθεί στο στάδιο της πολτοποίησης.<sup>6</sup>

Για να διαχωριστεί το βυνογλεύκος από τα βυνοϋπολείμματα, χρησιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι. Μία από αυτές είναι το δοχείο με ψευδοπυθμένα (Lauter), όπου υπάρχουν σήτες που επιτρέπουν το υγρό μέρος (γλεύκος) να διηθείται, ενώ το στερεό (βυνοϋπόλειμμα) κρατείται. Μια άλλη μέθοδος είναι η χρήση φίλτρων πλακών (φιλτρόπρεςσες).<sup>6</sup>

Η διαύγαση, δηλαδή ο χωρισμός του υγρού μέρους από το στερεό, είναι κρίσιμη στην παραγωγή της μύρας. Επηρεάζει την σταθεροποίηση και την εμφάνιση της μύρας στο ποτήρι. Η διαύγαση πρέπει να έχει σωστή ισορροπία για να διατηρηθούν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά που καθιστούν τη μύρα ξεχωριστή.

### 2.3.2.4 Βρασμός

Μετά τη διαύγαση, το βυνογλεύκος υποβάλλεται σε βρασμό, κατά τον οποίο προστίθεται επίσης λυκίσκος. Ο βρασμός συνήθως διαρκεί στους 100°C για περίπου 90-120 λεπτά. Κατά τη διάρκεια αυτού του σταδίου επιτυγχάνονται διάφοροι στόχοι:

α) Καταστροφή όλων των ενζύμων, οριστικοποίηση της επιθυμητής σύστασης του ζυθογλεύκους και αποστείρωση του βυνογλεύκους.

β) Διάλυση και μετατροπή των ουσιών του λυκίσκου. Ο λυκίσκος προστίθεται σε διάφορες μορφές όπως πέλλετς, άνθη, εκχύλισμα κ.ά και περιλαμβάνει πικρικές ουσίες όπως χουμουλόνη, α-πικρικά οξέα (κυρίως) και λουπουλόνη, β-πικρικά οξέα (μερικώς), που προσδίδουν την χαρακτηριστική πικράδα και αρωματικό χαρακτήρα στη μύρα, καθώς και αιθέρια έλαια που προσδίδουν αρωματικό χαρακτήρα. Κατά τη διάρκεια του βρασμού, τα πικρικά οξέα μετατρέπονται σε ισομερή, ισο-α και ισο-β οξέα αυξάνοντας τη διαλυτότητά τους και, συνεπώς, τον βαθμό πικρότητας του ζυθογλεύκους. Ζυθοποιητική αξία έχουν βασικά τα α-οξέα.

Ταυτόχρονα, κατά τη διάρκεια του βρασμού του βυνογλεύκου, επιτυγχάνονται διάφοροι στόχοι, όπως αποστείρωση και καταστροφή ενζύμων. Ο βρασμός οδηγεί στην αποστείρωση του βυνογλεύκους, καθώς οι υψηλές θερμοκρασίες καταστρέφουν τα ένζυμα που μπορεί να περιέχονται. Επίσης επιτυγχάνεται απομάκρυνση πρωτεϊνών και πολυφαινολικών ενώσεων. Σχηματίζονται κροκιδώματα και θερμό ίζημα, τα οποία περιέχουν πρωτεΐνες και σύμπλοκα πρωτεϊνών-

πολυφαινολικών ενώσεων. Αυτά απομακρύνονται για να βελτιωθεί η ποιότητα του τελικού προϊόντος. Προκύπτει επίσης αύξηση σε σάκχαρα, καθώς το βυνογλεύκος βράζει, εξατμίζεται νερό, και ως αποτέλεσμα, η συγκέντρωση των σακχάρων σε αυτό αυξάνεται.

Ο βρασμός πραγματοποιείται με διάφορα συστήματα, όπως ανοιχτά δοχεία βρασμού με διπλό πυθμένα, δοχεία βρασμού με εσωτερικό ή εξωτερικό βραστήρα, δοχεία με συμπίεση και επαναχρησιμοποίηση υδρατμών, και συστήματα βρασμού υψηλής θερμοκρασίας.

Με την ολοκλήρωση του βρασμού, το θερμό ίζημα πρέπει να απομακρύνεται για να διατηρηθεί η δομή και η θερμοκρασία του γλεύκους και να αποφευχθεί η αύξηση του ιξώδους η οποία έχει επίδραση στο στάδιο του διαχωρισμού. Οι τρόποι απομάκρυνσης του θερμού ιζήματος περιλαμβάνουν τη φυγοκέντρωση με φυγόκεντρο Dekanter ή Whirlpool, και το φιλτράρισμα.<sup>6</sup>

### 2.3.2.5 Ψύξη

Μετά την απομάκρυνση του θερμού ιζήματος, το ζυθογλεύκος ψύχεται και γίνεται προσθήκη αέρα.

Μέσω της ψύξης επιτυγχάνεται η ρύθμιση της θερμοκρασίας του ζυθογλεύκους, διευκολύνοντας έτσι την έναρξη και την εξέλιξη της ζύμωσης. Γίνεται επίσης κορεσμός του ζυθογλεύκους με οξυγόνο με προσθήκη αέρα, βήμα σημαντικό για τη διατήρηση των αναγκαίων συνθηκών για τη ζύμωση. Ταυτόχρονα γίνεται απομάκρυνση του ψυχρού ιζήματος.<sup>6,25</sup> Η διαδικασία απομάκρυνσης του ψυχρού ιζήματος είναι κρίσιμη για την ποιότητα του τελικού προϊόντος. Επιτυγχάνεται με τη χρήση φίλτρων, με τη μέθοδο περλίτη-διατομίτη μικρής κοκκομετρίας ή με τη μέθοδο επίπλευσης. Η απομάκρυνση του ψυχρού ιζήματος συνοδεύεται από τον έλεγχο του μεγέθους των σωματιδίων, που συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 0,5-1,0 μικρομέτρων.

Η επιλογή της μεθόδου απομάκρυνσης εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένου του κόστους λειτουργίας και της ταχύτητας διήθησης. Η επίπλευση αποτελεί ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο λόγω της ικανότητάς της να διατηρεί την ολοκληρότητα της γεύσης της μύρας ενώ επιτυγχάνεται ολική απομάκρυνση του θερμού ιζήματος και μερική απομάκρυνση (50-65%) του ψυχρού ιζήματος. Τα σωματίδια του ψυχρού ιζήματος, αν δεν απομακρυνθούν, τοποθετούνται πάνω στα κύτταρα των ζυμών, μειώνοντας την επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης από την οποία διέρχονται οι μεταβολίτες, προκαλώντας καθυστέρηση της αλκοολικής ζύμωσης.<sup>6</sup>

### 2.3.2.6 Ζύμωση

Μετά την ψύξη του γλεύκους στην επιθυμητή θερμοκρασία ακολουθεί η προσθήκη ζυμών για την έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης. Βασική διεργασία κατά τη ζύμωση είναι να αναπτυχθούν οι

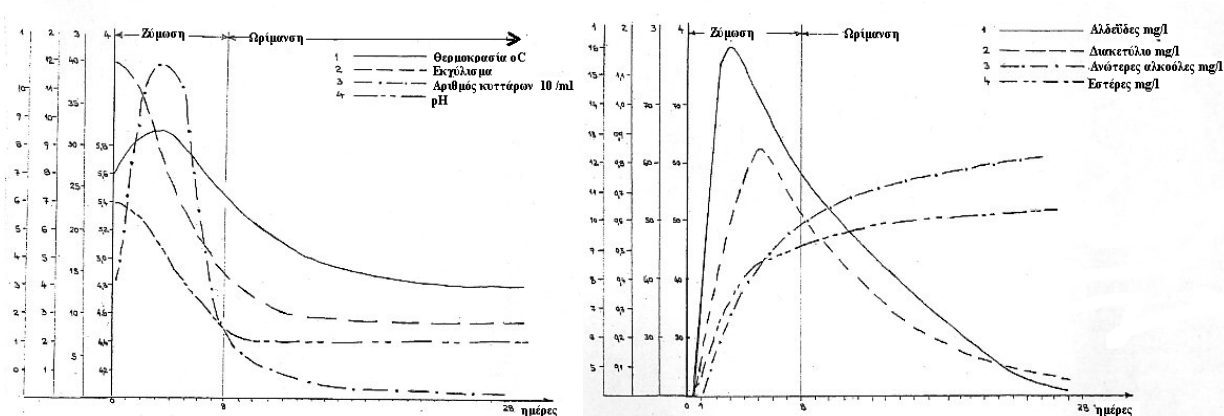
ζύμες καταναλώνοντας το ζυμώσιμο εκχύλισμα - τα σάκχαρα- σε αιθυλική αλκοόλη και διοξείδιο του άνθρακα. Ταυτόχρονα σχηματίζονται δευτερεύοντα προϊόντα με επίδραση στο άρωμα και τη γεύση του ζύθου. Αυτά αποτελούν κυρίως εστέρες, ανώτερες αλκοόλες, αλδεΐδες, διακετύλιο, θειούχες ενώσεις κ.ά. Η θερμοκρασία της ζύμωσης και της ωρίμανσης επηρεάζει σημαντικά τον οργανοληπτικό χαρακτήρα του ζύθου, ενώ χαμηλές θερμοκρασίες τείνουν να επιφέρουν θετικά αποτελέσματα. Σήμερα για μείωση του χρόνου ζύμωσης εφαρμόζονται υψηλότερες θερμοκρασίες ενώ υπάρχει ανάγκη για έλεγχο της σύστασης του ζυθογλεύκου, του στελέχους της ζύμης, της ποσότητάς της, της διασποράς των κυττάρων, της θερμοκρασίας και της πίεσης. Οι ποσότητες του εμβολίου ζύμης διαφέρουν ανάλογα με το στέλεχος και το είδος του ζύθου που θα παραχθεί.

### **2.3.2.7 Ζύμωση - Ωρίμανση του ζύθου με ακινητοποιημένες ζύμες**

Μετά το τέλος της ζύμωσης, η μύρα παραμένει στη δεξαμενή για τουλάχιστον δύο εβδομάδες σε χαμηλή θερμοκρασία, συνήθως από -2 έως 0°C, ενώ μπορεί να πραγματοποιηθεί και στους +2 και +3°C. Η χαμηλή θερμοκρασία αυτή συμβάλλει θετικά στην ποιότητα του τελικού προϊόντος και στην σταθεροποίησή του.<sup>22</sup>

Η μύρα μετά τη ζύμωση, που ονομάζεται πράσινη ή μη ώριμη μύρα, είναι θολή και περιέχει διάφορες ουσίες. Αυτό είναι επιθυμητό στην περίπτωση παραγωγής αφιλτράριστης και μη παστεριωμένης μύρας. Σε κάθε άλλη περίπτωση είναι αναγκαίο να φιλτραριστεί. Σκοπός της ωρίμανσης ή αλλιώς δεύτερης ζύμωσης είναι η πλήρης ζύμωση- αποζύμωση των εναπομεινάντων σακχάρων, η ανάπτυξη επιθυμητών ουσιών που συμβάλλουν στον αρωματικό χαρακτήρα καθώς και η αποικοδόμηση ανεπιθύμητων ουσιών. Επίσης, γίνεται παραγωγή φυσικού διοξειδίου του άνθρακα και αυξάνεται η γευστική αρμονία του ζύθου.

Η χρήση ακινητοποιημένων ζυμών στη ζύμωση και την ωρίμανση της μύρας προσφέρει ορισμένα πλεονεκτήματα, όπως η μείωση χρόνου λόγω της πυκνότητας της βιομάζας των ακινητοποιημένων ζυμών, της αυξημένης αποδοτικότητας, και της αυτοματοποίησης των διαδικασιών.



Εικόνα 3,4 : Μεταβολή παραμέτρων ζύμωσης και ωρίμανσης και μεταβολή περιεκτικότητας δευτερευόντων προϊόντων του μεταβολισμού των ζυμών κατά τη ζύμωση και την ωρίμανση αντίστοιχα. <sup>6</sup>

### 2.3.2.8 Διήθηση -Σταθεροποίηση του Ζύθου

Η διαύγεια της μύρας, μαζί με τη γεύση και τον αφρό, αποτελεί ένα από τα κύρια οργανοληπτικά χαρακτηριστικά που επηρεάζουν σημαντικά την εμπειρία του καταναλωτή. Η διαύγεια αυτή, που σχετίζεται με τη χημικοφυσική και βιολογική σταθερότητα, πρέπει να διατηρηθεί για παρατεταμένο χρονικό διάστημα, το οποίο αποτελεί το χρόνο ζωής της μύρας.

Κατά τη διήθηση, ο στόχος είναι να απομακρυνθούν τα θολώματα που προκύπτουν από τη συσσωμάτωση κολλοειδών. Αυτά τα θολώματα αποτελούνται κυρίως από πολυπεπτίδια, πολυφαινόλες, μεγαλομοριακούς υδατάνθρακες (δεξτρίνες, γλυκάνια) και σύμπλοκα αυτών με μεταλλικά ιόντα, καθώς και βιολογικά θολώματα που περιέχουν ζύμες, άγριες ζύμες και βακτήρια.

Τα κολλοειδή της μύρας, λόγω της μοριακής κίνησης κατά Brown, δημιουργούν συσσωματώματα μεταξύ τους καθώς και γέφυρες υδρογόνου. Με την πάροδο του χρόνου, ενώνονται όλο και περισσότερα μεγαλομοριακά μεταξύ τους, οδηγώντας στο σχηματισμό εμφανούς θολώματος. Το ψυχρό θόλωμα, υπό την επίδραση του οξυγόνου, της θερμότητας, της παρουσίας βαρέων μετάλλων, του φωτός και του pH, με τον χρόνο μετατρέπεται σε μόνιμο θόλωμα. Για να αποφευχθεί ο σχηματισμός μόνιμου θολώματος στη μύρα, απαιτείται η απομάκρυνση εν μέρει ή εντελώς των δύο κύριων συστατικών του (πρωτεϊνικά - φαινολικά) ή η αποφυγή παραγόντων που τον ευνοούν. Επιπλέον, με μέτρα σε διάφορα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας, μπορεί να ελαχιστοποιηθεί ο σχηματισμός του.<sup>6</sup>

### 2.3.2.9 Προσθήκη διοξειδίου του άνθρακα - Παστερίωση - Εμφιάλωση και Συσκευασία του ζύθου

Η παστερίωση αποτελεί θερμική επεξεργασία που υφίσταται ο ζύθος με σκοπό να εξασφαλιστεί η βιολογική του σταθερότητα.<sup>25</sup> Συνήθως, διεξάγεται στους 60°C. Εναλλακτικά, μπορεί να πραγματοποιηθεί μετά την εμφιάλωση, διαδικασία η οποία χαρακτηρίζεται από υψηλό

κόστος λειτουργίας, συνολικά μεγάλο χρόνο και υψηλή κατανάλωση νερού και θερμότητας, ενώ είναι πιο αποτελεσματική. Η αποτελεσματικότητα της παστερίωσης εξαρτάται επίσης από τη συγκέντρωση των μικροοργανισμών, επομένως είναι σημαντικό να διατηρείται καθαρός και προστατευμένος όλος ο εξοπλισμός που έρχεται σε επαφή με τον ζύθο.

Υπάρχουν επίσης ζύθοι που δεν υφίστανται παστερίωση, θεωρούνται να έχουν ποιοτική υπεροχή σε σχέση με τις παστεριωμένες, καθώς η παστερίωση υποβαθμίζει ποιοτικά το προϊόν. Ωστόσο, έχουν μικρότερη διάρκεια ζωής.<sup>22</sup>

Έπειτα γίνεται η προσθήκη διοξειδίου του άνθρακα υπό πίεση (ενανθράκωση). Επειδή το οξυγόνο είναι εχθρός της μύρας, η εμφιάλωση πραγματοποιείται παρουσία διοξειδίου του άνθρακα. Πριν το γέμισμα της φιάλης, αφαιρείται ο αέρας και αντικαθίσταται από διοξείδιο του άνθρακα, βελτιώνοντας την ποιότητα του ζύθου.

Τελευταίο στάδιο αποτελεί η εμφιάλωση και η συσκευασία, όπου η μύρα τοποθετείται σε γυάλινα μπουκάλια, κουτάκια αλουμινίου ή βαρέλια.<sup>9</sup> Η συσκευασία περιλαμβάνει το γέμισμα των φιαλών, το σφράγισμα τους, τον έλεγχο για τη σωστή πλήρωση και πιθανά ελαττώματα στα μέσα συσκευασίας, την τοποθέτηση ετικετών και πωμάτων, καθώς και την τοποθέτηση σε πλαστικά ή χάρτινα δοχεία.<sup>6</sup> Η τελική αποθήκευση της μύρας απαιτεί δροσερό περιβάλλον, ελλείψει ηλίου και υψηλών θερμοκρασιών.<sup>9</sup>

## 2.4 Σάκχαρα

Τα σάκχαρα, ή αλλιώς υδατάνθρακες, είναι μία ευρεία κατηγορία πολυυδροξυλιωμένων αλδεϋδών και κετονών.<sup>40</sup> Πρόκειται δηλαδή για οργανικά μόρια που αποτελούνται από άτομα άνθρακα ενωμένα με άτομα υδρογόνου και οξυγόνου, σε αναλογία ατόμων συνήθως  $H:O=2:1$ , με την γλυκόζη να αποτελεί τον πλέον γνωστό υδατάνθρακα. Πιο συγκεκριμένα, οι υδατάνθρακες που είναι διαλυτοί στο νερό και έχουν γλυκιά γεύση αποτελούν τα σάκχαρα με γενικό χημικό τύπο  $C_n(H_2O)_n$ . Οι υδατάνθρακες συντίθενται φυσικά μέσω της διαδικασίας της φωτοσύνθεσης.

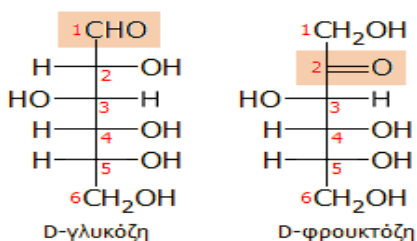
### 2.4.1 Ταξινόμηση των σακχάρων

Οι υδατάνθρακες ταξινομούνται ευρέως σε τρεις μεγάλες κατηγορίες, με βάση τον αριθμό των σακχαρικών μονάδων: τους μονοσακχαρίτες, τους ολιγοσακχαρίτες και τους πολυσακχαρίτες.

#### 2.4.1.1 Μονοσακχαρίτες

Οι μονοσακχαρίτες αποτελούν την πιο απλή μορφή υδατανθράκων με γενικό χημικό τύπο  $C_n(H_2O)_n$ . Μερικοί εκπρόσωποί τους είναι η γλυκόζη και η φρουκτόζη, οι οποίες δεν υδρολύονται σε απλούστερα μόρια, αποτελώντας επομένως βασική δομική μονάδα για τον σχηματισμό πιο

σύνθετων ενώσεων. Η χημική δομή τους αποτελείται από υδροξυλομάδες και μια καρβονυλομάδα, η οποία μπορεί να είναι είτε αλδευδομάδα (-CH=O), είτε κετονομάδα (C=O) και τις διαχωρίζει σε αλδόζες και κετόζες αντίστοιχα. Ανάλογα με τον αριθμό των ατόμων άνθρακα, διακρίνονται σε τριόζες, τετρόζες, πεντόζες, εξόζες και ούτω καθεξής. Για παράδειγμα, η φρουκτόζη είναι μια κετοεξόζη, δηλαδή αποτελείται από έξι άτομα άνθρακα και μία κετονομάδα, ενώ η γλυκόζη είναι μια αλδοεξόζη με έξι άτομα άνθρακα και μια αλδευδομάδα.<sup>41</sup> ( Εικόνα 5 ).



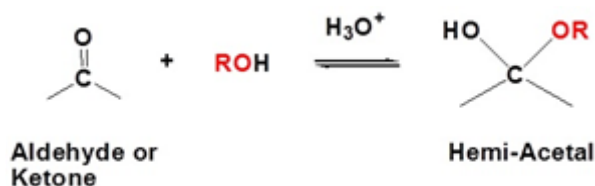
Εικόνα 5 . Η δομή της γλυκόζης (αλδοεξόζης ) στα αριστερά και η δομή της φρουκτόζης (κετοεξόζης) στα δεξιά<sup>42</sup>

### A ) Ιδιότητες των μονοσακχαριτών

Ένας μονοσακχαρίτης χαρακτηρίζεται από λευκό χρώμα και γλυκιά γεύση, είναι στερεός σε κρυσταλλική μορφή και έχει την ιδιότητα να διαλύεται στο νερό με σχετική ευκολία. Ο μεγάλος αριθμός υδροξυλομάδων, τους προσδίδει μια σειρά διαφόρων ιδιοτήτων όπως την ικανότητα τους να δημιουργήσουν γλυκοζιτικό δεσμό, ο οποίος διαμορφώνεται με την συμπύκνωση ενός ανωμερικού υδροξυλίου με ένα υδροξύλιο διαφορετικού σακχάρου ή ένωσης με αποβολή ενός μορίου νερού. Οι ενώσεις που έχουν γλυκοζιτικό δεσμό ονομάζονται γλυκοζίτες. Σε αυτούς ανήκουν οι ολιγοσακχαρίτες και οι πολυσακχαρίτες.<sup>40,43</sup>

Οι μονοσακχαρίτες μπορούν εύκολα να οξειδωθούν, ακόμα και με ήπια οξειδωτικά όπως τα αντιδραστήρια Fehling (διάλυμα CuSO<sub>4</sub> σε NaOH) και Tollens (διάλυμα AgNO<sub>3</sub> σε NH<sub>3</sub>). Όσα σάκχαρα μπορούν να οξειδωθούν από τα διαλύματα αυτά αποτελούν τα ανάγοντα σάκχαρα.<sup>43</sup>

Οι μονοσακχαρίτες σε αλκοολικό περιβάλλον σχηματίζουν ημιακετάλες ή ημικετάλες λόγω της ύπαρξης της καρβονυλομάδας, η οποία ενώνεται αντιστρεπτά με τις αλκοόλες. (Εικόνα 6) Όταν το καρβονύλιο και το υδροξύλιο είναι στο ίδιο μόριο, δημιουργείται κυκλική ημιακετάλη ή ημικετάλη. Οι πενταμελείς και οι εξαμελής ημιακετάλες είναι πολύ σταθερά μόρια, όπως είναι η κυκλική μορφή της γλυκόζης, η πυρανόζη, που κυριαρχεί σε αλκοολικό διάλυμα.<sup>40,43</sup>



Εικόνα 6 . Ένωση καρβονυλικής ομάδας με αλκοόλη προς σχηματισμό ημιακετάλης<sup>44</sup>

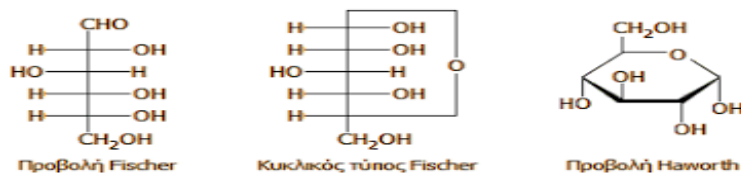
## B) Ειδή Δομών

### Δομή Fischer

Οι προβολές Fischer είναι η πιο απλή αναπαράσταση του υδατάνθρακα. Ο υδατάνθρακας προβάλετε ως επίπεδη, γραμμική κάθετη αλυσίδα των ανθράκων, με τον μόνο άνθρακα που αναπαρίσταται αυτόν της υδροξυμεθυλομάδας (CH<sub>2</sub>OH) και των δεσμών τους με άλλα στοιχεία. Η καρβονυλομάδα απεικονίζεται στο πάνω μέρος της αλυσίδας. Ανάλογα με την θέση της υδροξυλομάδας, δεξιά ή αριστερά του πιο απομακρυσμένου ασύμμετρου άνθρακα από αυτόν της καρβονυλομάδας, διακρίνεται σε D- ή L- στερεοδομή αντίστοιχα. Τα περισσότερα φυσικά σάκχαρα είναι D- ισομερή.<sup>40,43,45,46</sup>

### Δομές Haworth

Οι δομές Haworth προκύπτουν από την κυκλοποίηση των δομών Fischer. Οι πεντόζες και οι εξόζες μπορούν να κυκλοποιηθούν με την ένωση ενός OH με το καρβονύλιο δίνοντας αντίστοιχα φουρανόζη (πενταεδρικός δακτύλιος με τέσσερα άτομα C και ένα άτομο O) και πυρανόζη (δακτύλιος με πέντε άτομα C και ένα O). (Εικόνα 7). Έτσι, η κυκλική δομή αποκτά ένα ακόμα ασύμμετρο άνθρακα με δύο στερεοϊσομερή\* τα ανωμερή α και β ανάλογα με την θέση του ημιακεταλικού -OH, κάτω ή πάνω του δακτυλίου αντίστοιχα. Ακόμα, η υδροξυμεθυλομάδα αναπαρίσταται στην πάνω αριστερή μεριά του δακτυλίου και το διακρίνει σε L- ή D- ισομερές (κάτω ή πάνω του δακτυλίου ανάλογα). Ειδικότερα, η γλυκόζη κυκλοποιείται αντιστρεπτά σε υδατικό διάλυμα σχηματίζοντας μίγμα ανωμερών με αναλογία 36:64. Το α-ανωμερές (α-D-γλυκοπυραζόνη) σχηματίζεται σε μικρότερη αναλογία από το β-ανωμερές (β-D-γλυκοπυραζόνη).<sup>40,43,45,47</sup>



Εικόνα 7. Μετατροπή γλυκόζης από προβολή Fischer σε προβολή Haworth<sup>42</sup>

### Δομή ανάκλιντρου

Σε σχέση με τις προβολές Haworth, η προβολή ανακλίντρου αναπαριστά με μεγαλύτερη ακρίβεια τον γλυκοπυρανοζικό δακτύλιο. Η τετραεδρική φύση των ανθράκων ωθεί τα πυρανοζικά σάκχαρα στην δημιουργία δομών ανακλίντρου ή λουτήρα.<sup>40</sup>

#### 2.4.1.2 Ολιγοσακχαρίτες

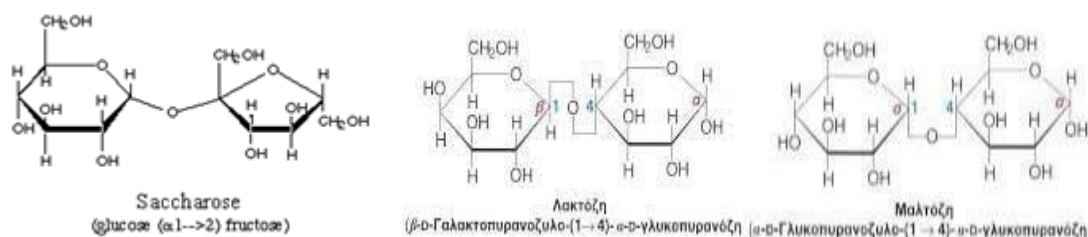


Οι ολιγοσακχαρίτες αποτελούνται από την ένωση δύο έως δέκα μονοσακχαριτών. Ανάλογα με το τον αριθμό τους, ένας ολιγοσακχαρίτης ονομάζεται δι-, τρι-, τετρασακχαρίτης και ούτω καθεξής. Οι πιο σημαντικοί είναι οι δισακχαρίτες με χημικό τύπο  $C_{12}H_{22}O_{11}$ , οι οποίοι προκύπτουν από την ένωση δύο απλών μονοσακχαριτών στην κυκλική τους μορφή με γλυκοζιτικό δεσμό σε  $\alpha$ - ή  $\beta$ - διαμόρφωση ( $\alpha$ -γλυκοζιτικός και  $\beta$ - γλυκοζιτικός δεσμός). Οι γλυκοζιδάσες και τα οξέα ευθύνονται για την διάσπαση τους. Μετά την δημιουργία του δισακχαρίτη, το ανωμερικό OH του ενός μονοσακχαρίτη είναι δεσμευμένο μέσα στον γλυκοζιτικό δεσμό, όμως το ανωμερικό OH του δεύτερου μονοσακχαρίτη μπορεί να παραμένει ελεύθερο, δίνοντας, υπό κατάλληλες συνθήκες, την άκυκλη (ανοιχτή) μορφή του στην οποία εμφανίζει την αλδευδομάδα ( $CH=O$ ) ελεύθερη. Άρα μπορεί να οξειδωθεί από τα αντιδραστήρια Fehling και Tollens.<sup>45</sup> Επομένως αν μένει το ανωμερικό OH ελεύθερο, καθιστά τον ολιγοσακχαρίτη ανάγοντα. Μέσω υδρόλυσης χωρίζονται στους μονοσακχαρίτες τους.

Ο πιο διαδεδομένος δισακχαρίτης είναι η σακχαρόζη (ή σουκρόζη), η οποία αποτελείται από την ένωση  $\alpha$ -D- γλυκόζης και  $\beta$ -D-φρουκτόζης με γλυκοζιτικό δεσμό μεταξύ των ανωμερικών -OH.<sup>43</sup> (Εικόνα 9) Είναι σάκχαρο χωρίς αναγωγικές ιδιότητες, καθώς δεν έχει ελεύθερο κανένα ανωμερικό υδροξύλιο. Άρα, δεν οξειδώνεται από τα αντιδραστήρια Fehling και Tollens.<sup>45</sup>

Πολύ σημαντικός δισακχαρίτης είναι και η μαλτόζη. Δημιουργείται από την ένωση δύο μορίων D-γλυκόζης κατά την αποικοδόμηση του αμύλου, με τον γλυκοζιτικό δεσμό να σχηματίζεται ανάμεσα στο ανωμερές OH της  $\alpha$ -D-γλυκόζης και του OH του C4 της άλλης D- γλυκόζης<sup>43</sup>, καθιστώντας το ένα ανωμερικό του OH ελεύθερο ώστε να μπορεί να οξειδωθεί από τα αντιδραστήρια Fehling και Tollens. Επομένως, η μαλτόζη είναι ανάγον σάκχαρο.

Η λακτόζη είναι ο δισακχαρίτης που αποτελείται από ένα μόριο  $\beta$ -D-γαλακτόζης που συνδέεται με  $\beta$ -1,4 γλυκοζιτικό δεσμό με ένα μόριο D-γλυκόζης και την συναντάμε στο γάλα.<sup>40</sup> (Εικόνα 8)



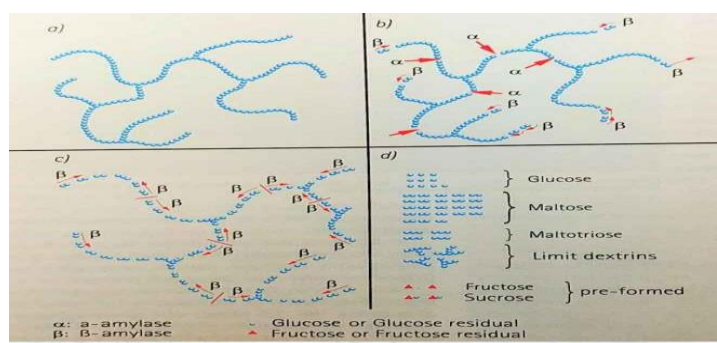
Εικόνα 8. Δομή των δισακχαριτών σακχαρόζη<sup>49</sup>, λακτόζη και μαλτόζη<sup>48</sup>. (δεξιά προς αριστερά).

### 2.4.1.3 Πολυσακχαρίτες ή γλυκάνες

Πολυσακχαρίτες καλούνται οι υδατάνθρακες που αποτελούνται από δέκα και περισσότερους μονοσακχαρίτες, ενωμένων με γλυκοζιτικό δεσμό και χημικό τύπο  $(C_6H_{12}O_6)_n$ . Διακρίνονται σε ομοπολυσακχαρίτες (ή ομογλυκάνες), οι οποίοι αποτελούνται από πολυμερή του ίδιου μονομερούς

και τους ετεροπολυσακχαρίτες ( ή γλυκάνες ), που είναι πολυμερή από διαφορετικά είδη μονοσακχαριτών.<sup>45</sup> Παρουσιάζουν είτε γραμμική είτε διακλαδιζόμενη δομή, καθώς ο γλυκοζιτικός δεσμός μπορεί να δημιουργηθεί μεταξύ οποιουδήποτε διαθέσιμου OH. Επειδή δεν υπάρχουν ελεύθερα ανωμερικά υδροξύλια, εκτός από αυτό του άκρου της πολυμερούς αλυσίδας, οι πολυσακχαρίτες δεν είναι αναγωγικά σάκχαρα ούτε έχουν γλυκιά γεύση, όμως είναι εξαιρετικά υδρόφιλες ενώσεις. Οι δύο βασικοί ρόλοι τους στην φύση είναι να λειτουργούν ως δομικά υλικά και η αποθήκευση ενέργειας. Από τους πολυσακχαρίτες, οι πιο σημαντικοί ανήκουν στους ομοπολυσακχαρίτες και είναι το άμυλο, η κυτταρίνη και το γλυκογόνο.<sup>41</sup>

**Άμυλο:** Η μοριακή σύσταση του αμύλου συντίθεται από ένα μίγμα δύο πολυσακχαριτών, της αμυλόζης ( 20-30% )και της αμυλοπηκτίνης (70-80%), οι οποίες αποτελούνται από την ένωση μορίων α-D-γλυκόζης . Είναι υδατοδιαλυτό, συναντάται σε υψηλά ποσοστά σε φυτικούς ιστούς και λειτουργεί ως την κύρια αποθήκη ενέργειάς τους. Η αμυλόζη συντίθεται από χιλιάδες μόρια α-D-γλυκόζης ενωμένα γραμμικά με α(1,4) γλυκοζιτικό δεσμό. Σε νερό, η αμυλόζη παίρνει μορφή έλικας στην όποια κατά την προσθήκη ιωδίου (I<sub>2</sub>), αυτό εγκλωβίζεται και δίνει ένα χαρακτηριστικό μπλε χρώμα που υποδηλώνει την ύπαρξη αμύλου.<sup>40</sup> Η αμυλοπηκτίνη είναι ένας διακλαδιζόμενος ομοπολυσακχαρίτης από α-D-γλυκόζες ενωμένες με α(1,4) γλυκοζιτικό δεσμό στο γραμμικό μέρος και ανά 20-30 μόρια γλυκόζης παρουσιάζουν διακλάδωση. Εκεί, η ένωση γίνεται με α(1,6) γλυκοζιτικό δεσμό. Οι διακλαδώσεις κάνουν την αμυλοπηκτίνη συμπαγή, ενώ παράλληλα προσφέρουν στα ένζυμα περισσότερες θέσεις για αποικοδόμηση.<sup>40</sup> Τα σημαντικότερα πεπτικά ένζυμο του αμύλου είναι η α- και η β- αμυλάση. ( Εικόνα 9 ) Με την θέρμανση του αμύλου παράγονται δεξτρίνες, οι οποίες επίσης μπορούν να συγκρατήσουν το ιώδιο παίρνοντας ένα ερυθρόμορφο ιώδες χρώμα.<sup>43,45</sup>



Εικόνα 9 . Διάσπαση πολυσακχαρίτη από α- και β- αμυλάση<sup>50</sup>

**Γλυκογόνο :** Είναι η κύρια προσωρινή αποθήκη ενέργειας των ζωικών οργανισμών. Είναι παρόμοιο με την αμυλοπηκτίνη με μεγαλύτερο μοριακό βάρος και πιο πυκνές διακλαδώσεις που επιτρέπουν την γρήγορη απελευθέρωση της γλυκόζης από πολλά σημεία.<sup>45</sup>

**Κυτταρίνη** : Είναι ένας μη υδατοδιάλυτος πολυσακχαρίτης που δομεί τα φυτικά κύτταρα καθώς είναι το κύριο συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος. Αποτελείται από μόρια β-D-γλυκόζης ενωμένα γραμμικά με β-1,4-γλυκοζιτικούς δεσμούς.<sup>43</sup> Ακόμα, σχηματίζει συμπαγείς ευθείες αλυσίδες, δημιουργώντας μικροϊνίδια κυτταρίνης που αποτελούν τον στηρικτικό ιστό των φυτών.<sup>40</sup>

## 2.4.2 Ο ρόλος των σακχάρων

Τα σάκχαρα αποτελούν μια πολύ βασική πηγή ενέργειας για κάθε ζωντανό οργανισμό αλλά και γεμίζουν τις ενεργειακές αποθήκες. Υπολογίζεται πως μετά την καύση τους απελευθερώνονται 4 Kcal για κάθε 1 g γλυκόζης. Παράλληλα, αρκετά από αυτά λειτουργούν ως πρόδρομες ουσίες για την βιοσύνθεση ποικίλων οργανικών ενώσεων, όπως λιπιδίων, αμινοξέων και νουκλεϊκών οξέων. Ακόμα, αποτελούν δομικό συστατικό της κυτταρικής μεμβράνης και της κυτταρίνης των φυτών, συμμετέχοντας μάλιστα σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες. Για τους ανθρώπινους οργανισμούς, αποτελούν την μόνη πηγή ενέργειας του εγκεφάλου, συντελούν στην ρύθμιση του νευρικού ιστού και του ανοσοποιητικού συστήματος, ενώ προάγουν τις λειτουργίες πέψης.<sup>43,45</sup>

## 2.4.3 Ανάγοντα σάκχαρα – ζυμώσιμα

Ως ανάγοντα ή αλλιώς ζυμώσιμα σάκχαρα ορίζονται οι υδρογονάνθρακες που μπορούν να οξειδωθούν από ήπια οξειδωτικά, όπως τα αντιδραστήρια Fehling και Tollens, στα οποία προκαλούν αναγωγή. Για να μπορεί ωστόσο να γίνει η οξείδωση, θα πρέπει να έχουν ελεύθερο το ανωμερικό τους OH, ώστε να μετατρέπεται στην ανοιχτή μορφή που απελευθερώνει την καρβονυλομάδα για να αντιδράσει. Στα ζυμώσιμα σάκχαρα συγκαταλέγονται όλοι οι μονοσακχαρίτες, με πιο γνωστούς την γλυκόζη και την φρουκτόζη, μερικοί από τους ολιγοσακχαρίτες και τους πολυσακχαρίτες. Οι κετόζες πρέπει πρώτα μετατραπούν σε αλδόζες και για να μπορούν να λειτουργήσουν ως ανάγοντα σάκχαρα. Οι πιο γνωστοί δισακχαρίτες με αναγωγική ιδιότητα είναι η λακτόζη και η μαλτόζη. Η σουκρόζη ωστόσο έχει τον ανωμερικό της OH δεσμευμένο στον γλυκοζιτικό δεσμό. Άρα παραμένει στην κυκλική της μορφή και είναι μη ανάγον σάκχαρο.<sup>51</sup>

### 2.4.3.1 Γλυκόζη

Η γλυκόζη είναι μονοσακχαρίτης και είναι η κύρια πηγή ενέργειας οργανικού άνθρακα των οργανισμών. Επιπρόσθετα, στα κύτταρα τροφοδοτεί την αερόβια και την αναερόβια κυτταρική αναπνοή. Όπως προαναφέρθηκε, είναι μια αλδόζη, αποτελείται από έξι άτομα C και μια αλδεϋδική ομάδα (-CHO) με χημικό τύπο C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>. Αποτελεί δομικό συστατικό των γλυκοζιτών αλλά και των δισακχαριτών, όπως της λακτόζης και της σακχαρόζης, επομένως και των μεγαλύτερων δομών που

σχηματίζουν. Σημαντικότερος πολυσακχαρίτης αποκλειστικά γλυκόζης είναι το άμυλο. Το ανθρώπινο σώμα αποθηκεύει με την μορφή γλυκογόνου την περίσσεια γλυκόζης για τις ενεργειακές του ανάγκες. Η γλυκόζη είναι απαραίτητη για την ομοιόσταση των οργανισμών όποτε υπάρχουν πολλές πηγές άντλησης της όπως μέσω της γλυκογένεσης από την διάσπαση λιπαρών και πρωτεϊνών και της φωτοσύνθεσης. Στη φύση εντοπίζουμε το ζεύγος των ισομερών της γλυκόζης, D- γλυκόζη και L-γλυκόζη με την L- γλυκόζη να εντοπίζεται σπάνια, σε αντίθεση με την D- γλυκόζη ή διαφορετικά δεξτρόζη που υπάρχει σε αφθονία.<sup>52</sup>

Η γλυκόζη εντοπίζεται στη βύνη με την μορφή άμυλου. Ακόμα, η γλυκόζη λειτουργεί ως το βασικότερο υπόστρωμα για τις ζύμες, την οποία μετέπειτα θα μετατρέψουν σε αλκοόλη και CO<sub>2</sub> κατά την αλκοολική ζύμωση. Τέλος, το ζυθογλεύκος περιέχει περίπου 7% γλυκόζη και 20% μαλτοτριόζη, η οποία αποτελείται από τρία μόρια γλυκόζης.<sup>6</sup> (Εικόνες 11 και 12 )

#### 2.4.3.2 Φρουκτόζη

Η φρουκτόζη ανήκει στις κετόζες, αποτελείται από έξι άτομα άνθρακα και είναι συντακτικά ισομερής της γλυκόζης. Με την ένωση της με την γλυκόζη, δημιουργούν τον δισακχαρίτη σουκρόζη, γνωστή ως απλή ζάχαρη. Ακόμα, αποτελεί βασικό συστατικό της ινσουλίνης.<sup>54</sup> Στην φύση, υπάρχει κυρίως υπό την μορφή D-φρουκτόζης, συνήθως με την μορφή πυρανόζης. Μεγάλη συγκέντρωση φρουκτόζης συναντάται στο μέλι, στα φρούτα και στα λαχανικά που συνεισφέρουν αρκετά στην συνολική ατομική πρόσληψη φρουκτόζης.<sup>53</sup>

Στην βιομηχανία, συχνή είναι η χρήση σιροπιού καλαμποκιού με υψηλή περιεκτικότητα σε φρουκτόζη για την παραγωγή αναψυκτικών και τροφίμων.<sup>53</sup> Τα σιρόπια αυτά προέρχονται από την μετατροπή της γλυκόζης του αμύλου ενζυμικά στην ισομερή της φρουκτόζη. Σε σχέση με τα υπόλοιπα σάκχαρα παρουσιάζει μεγαλύτερη γλυκύτητα και για τον λόγο αυτό, συχνά χρησιμοποιείται σαν το γλυκαντικό των προϊόντων διαίτης.<sup>54</sup>

#### 2.4.3.3 Μαλτόζη

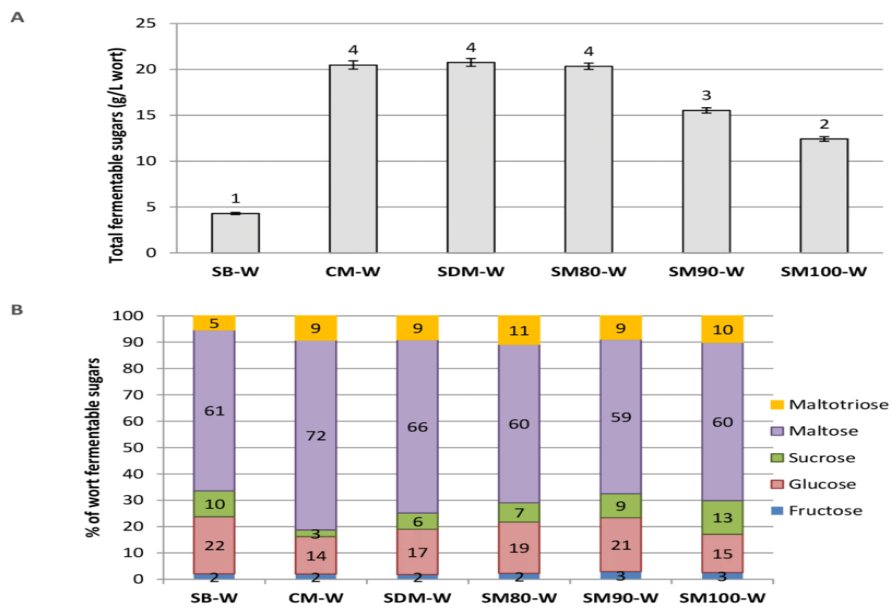
Η μαλτόζη ανήκει στους δισακχαρίτες με χημικό τύπο C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub> και σχηματίζεται από δύο μόρια γλυκόζης ενωμένα με α(1,4) γλυκοζιτικό δεσμό. Σχηματίζει είτε α-μαλτόζη, που δημιουργείται από δύο μόρια α-γλυκόζης, είτε β-μαλτόζη, η οποία έχει μια α- και μια β- γλυκόζη. Έχει το ανωμερικό της OH ελεύθερο, επομένως συγκαταλέγεται στα ανάγοντα σάκχαρα.<sup>54</sup> Προέρχεται από την υδρόλυση του πολυσακχαρίτη αμυλόζη, με την επίδραση του ενζύμου αμυλάση. Η μαλτοτριόζη αποτελεί προϊόν προσθήκης μιας γλυκόζης στην μαλτόζη, ενώ πολλές γλυκόζες ενωμένες συντάσσουν τις δεξτρίνες. Στην φύση απαντάται σε μεγάλη περιεκτικότητα σε ώριμους αμυλούχους

καρπούς. Ακόμα, δεν είναι τόσο γλυκιά όσο η σακχαρόζη.<sup>55</sup>

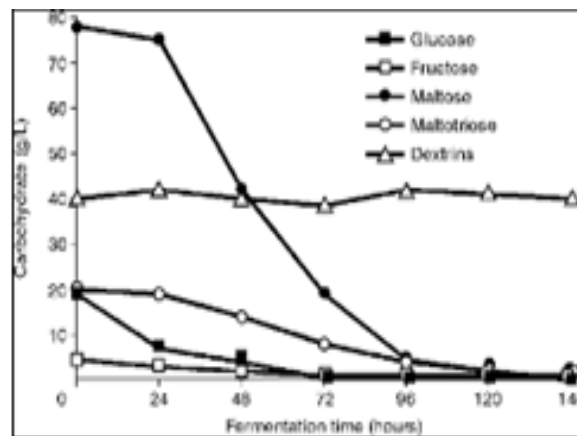
Καθώς η μαλτόζη είναι δομικός λίθος του αμύλου διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή ζύθου. Κατά την πολτοποίηση, το άμυλο υδρολύεται από την β-αμυλάση παράγοντας μαλτοτριόζες και δεξτρίνες. Μεγάλες ποσότητες μαλτόζης προέρχονται από τη υδρόλυση του αμύλου, που ανέρχονται στο 45% της συνολικής σακχαροπεριεκτικότητας του βυνογλεύκου. Στο στάδιο της ζύμωσης, οι ζύμες μεταβολίζουν την μαλτόζη σε CO<sub>2</sub> και αιθανόλη.<sup>6</sup>

#### **2.4.4 Υπολειμματικά σάκχαρα**

Πέρα από τα ζυμώσιμα σάκχαρα, στο ζύθο εντοπίζουμε και σάκχαρα που δεν δύνανται να μετατραπούν σε αλκοόλη και CO<sub>2</sub>. Παρόλο που δεν συμμετέχουν στον αλκοολικό τίτλο, η ύπαρξη τους συνεισφέρει στην γεύση και στην αίσθηση στόματος και η διαχείριση των επιπέδων τους οδηγεί σε παραγωγή υψηλής ποιότητας ζύθου. Κατά την παραγωγική διαδικασία, αν επικρατεί πολύ υψηλή θερμοκρασία ή δεν υπάρχει καλή ομοιογένεια του πολτού, αυτό μπορεί να οδηγήσει στην ατελή μετατροπή κάποιας ποσότητας αμύλου, με το τελικό προϊόν να περιλαμβάνει σάκχαρα που δεν έχουν ζυμωθεί. Πολλοί παράγοντες είναι εκείνοι που επηρεάζουν την ποσότητα των υπολειμματικών σακχάρων όπως ο τύπος των κόκκων, η θερμοκρασία του πολτού και η χρονική διάρκεια της ζυθοποίησης. Οι πιο σκουρόχρωμες μύρες και κόκκοι έχουν περισσότερα αζύμωτα σάκχαρα, με αποτέλεσμα μια πιο παχύρρευστη και κρεμώδη υφή. Σε αυτά συγκαταλέγονται οι δεξτρίνες, η μαλτοτριόζη, η μαλτόζη και σε μικρές ποσότητες η φρουκτόζη και η γλυκόζη. Οι δεξτρίνες προσφέρουν ήπια γλυκύτητα και εξισορροπούν την πικρή γεύση του λυκίσκου. Ενώ η ύπαρξη τους είναι ωφέλιμη, υπερβολικά μεγάλη ποσότητα δίνει υπερβολική γλυκύτητα και πολύ γεμάτη αίσθηση στόματος, αλλά μπορεί και να προκαλέσει δυσκολία στην ζύμωση και χαμηλή συγκέντρωση αλκοόλης. Η συγκέντρωση του στις τυπικές μύρες του εμπορίου εκφρασμένη ως γλυκόζη, κυμαίνεται μεταξύ 0,89 – 5,98% w/v. Ο εντοπισμός του υπολειμματικού αζύμωτου σακχάρου μπορεί να γίνει με ποικίλες χημικές και ενόργανες μεθόδους.<sup>56</sup>



Εικόνα 10(A) Συνολική περιεκτικότητα των ζυμώσιμων σακχάρων του γλεύκους και (B) το ποσοστό των πέντε ζυμώσιμων σακχάρων σε μη βυνοποιημένο κριθάρι (SB), βύνη του εμπορίου (CM) και τριών διαφορετικών βυνών (SM80, SM90, SM100) που ψήθηκαν σε φούρνο σε θερμοκρασίες 80, 90 και 100 °C αντίστοιχα.<sup>57</sup>



Εικόνα 11. Ποσότητα σακχάρων κατά την διάρκεια της ζύμωσης.<sup>58</sup>

## 2.4.5. Μέθοδοι προσδιορισμού σακχάρων

Ο εντοπισμός των σακχάρων και ο ποσοτικός προσδιορισμός τους μπορεί να γίνει με την χρήση διάφορων εργαστηριακών δοκιμών. Σε αυτές συγκαταλέγονται ογκομετρικές, ενόργανες και φασματοφωτομετρικές μέθοδοι.

### 2.4.5.1 Μέθοδοι ποιοτικού προσδιορισμού

#### 1 . Μέθοδος Benedict

Εντοπίζει τους μονοσακχαρίτες και κάποιους δισακχαρίτες ενώ για τους πολυσακχαρίτες προηγείται η διάσπαση τους. Με θέρμανση, τα ανάγοντα σάκχαρα ανάγουν τα  $\text{Cu}^{+2}$  του διαλύματος Benedict σε  $\text{Cu}^+$  προκαλώντας την αλλαγή από βαθύ-μπλε σε πορτοκαλί-κεραμέρυθρο χρώμα και τον σχηματισμό ίζηματος. Όσο περισσότερα είναι τα ανάγοντα σάκχαρα, τόσο έντονο είναι το χρώμα με περισσότερο ίζημα. Δεν λειτουργεί για το άμυλο και τη σακχαρόζη.<sup>59,60</sup>

#### 2. Barfoed 's Test

Το αντιδραστήριο Barfoed περιλαμβάνει οξικό χαλκό σε αραιό διάλυμα οξικού οξέος και αντιδρώντας με τους μονοσακχαρίτες παράγεται κεραμοκόκκινο ίζημα από την αναγωγή του οξικού χαλκού (II) σε οξειδίο του χαλκού (I). Για την ανίχνευση δισακχαριτών προηγείται υδρόλυση τους, οπότε η αντίδραση διαρκεί περισσότερο. Το ίζημα που παράγεται στα πρώτα 1-2 λεπτά αντιστοιχεί στους μονοσακχαρίτες, ενώ στο διάστημα των 7-8 λεπτών σε δισακχαρίτες.<sup>61</sup>

#### 3. Μέθοδος Molisch

Ανιχνεύει υδατάνθρακες μεγαλύτερους από τετρώζες. Σε διάλυμα α-ναφθόλης σε αιθανόλη αναμιγνύεται το σακχαρικό διάλυμα και προστίθενται σταγόνες πυκνού θειικού οξέος. Οι υδατάνθρακες αφυδατώνονται από το οξύ και σχηματίζουν αλδεΐδη, η οποία συμπυκνώνεται με την α-ναφθόλη και δημιουργεί μια ιώδη-μοβ στρώση που υποδηλώνει την ύπαρξη υδατανθράκων.<sup>60</sup>

#### 4. Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC)

Η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας είναι μια τεχνική κατανομής υγρού-στερεού που θεμελιώνεται στην χρωματογραφία στήλης. Η στερεή φάση αποτελείται από το πλακίδιο λεπτής στοιβάδας στο οποίο έχει επαλειφτεί με προσροφητικό υλικό, συνήθως  $\text{SiO}_2$  ή αλουμίνα. Έπειτα τοποθετείται κηλίδα δείγματος στη βάση του και τοποθετείται μέσα σε διαλύτη, ο οποίος το κατανέμει. Το λιγότερο πολικό υλικό, ανέρχεται γρηγορότερα. Ακολουθεί ξήρανση και εμφάνιση των κηλίδων με έκθεσή σε υπεριώδες ακτινοβολία ή ατμούς ιωδίου. Για το εντοπισμό των σακχάρων χρησιμοποιούνται τα διαλυτικά συστήματα βουτανόλη / αιθανόλη / νερό (3:2:1) και πυριδίνη / οξικός αιθυλεστέρας/οξικό οξύ/νερό (5:5:3:1). Τα σάκχαρα κατόπιν ανιχνεύονται και διαχωρίζονται

με την χρήση των  $R_f$ , δηλαδή τον λόγο της απόστασης που κάλυψε το κάθε σάκχαρο προς την απόσταση που κάλυψε ο διαλύτης έκλυσης.<sup>62,63</sup>

## 5. Μέθοδος Fehling

Η μέθοδος Fehling ανιχνεύει και διαχωρίζει τους υδατάνθρακες μεταξύ αναγόντων και μη αξιοποιώντας την ικανότητα οξειδωσής τους. Το αντιδραστήριο Fehling (φελίγγειο υγρό), έχει βαθύ-μπλε χρώμα και είναι αποτέλεσμα ανάμειξης πενταένυδρου θειικού χαλκού με διάλυμα τετραένυδρου τρυγικού καλιονατρίου και ισχυρού αλκαλίου, συνήθως υδροξείδιο του νατρίου, σε ίσους όγκους. Με θέρμανση παρουσία σακχάρων, οι αλδόζες οξειδώνονται σε αλδονικά οξέα και ο  $\text{Cu}^{+2}$  ανάγεται σε οξείδιο του χαλκού, που καταβυθίζεται ως κοκκινωπό ίζημα υποδηλώνοντας την ύπαρξη αναγόντων σακχάρων. Με θέρμανση απουσία σακχάρων, καταβυθίζεται μαύρο ίζημα οξειδίου του χαλκού, ενώ αν δεν έχει αναγωγικά σάκχαρα το αρχικό χρώμα παραμένει ίδιο.<sup>60</sup>

## 6. Μέθοδος Tollens

Κατά τη μέθοδο Tollens το σύμπλοκο διαμίνης αργύρου(I)  $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$  οξειδώνει την αλδεΐδη των αναγόντων σακχάρων προς σχηματισμό αλδοϊκού οξέος και τα ιόντα αργύρου ανάγονται σε στοιχειακό άργυρο ο οποίος καθιζάνει στα τοιχώματα του δοχείου σχηματίζοντας το «ασημένιο κάτοπτρο» που υποδηλώνει την ύπαρξη αναγόντων σακχάρων.<sup>64</sup>

### 2.4.5.2 Μέθοδοι ποσοτικού προσδιορισμού

#### A) Ογκομετρικές μέθοδοι

##### 1. Μέθοδος Rebelein

Σε αλκαλικό διάλυμα θειικού χαλκού, ο  $\text{Cu}^{+2}$  ανάγεται σε  $\text{Cu}^+$  από τα οξειδωμένα ανάγοντα σάκχαρα. Ο χαλκός που δεν οξειδώθηκε, αντιδρά με  $\text{KI}$  αλλά και το σχηματιζόμενο ιώδιο. Τέλος, γίνεται τιτλοδότηση με θειοθειικό νάτριο όπου το μπλε χρώμα αλλάζει σε πορτοκαλί-κόκκινο.<sup>65,66</sup>

Αντίδραση χαλκού με ιώδιο:  $2\text{Cu}^{2+} + 2\text{I}^- \rightarrow 2\text{Cu}^+ + \text{I}_2$

Αντίδραση τιτλοδότησης:  $\text{I}_2 + 2\text{S}_2\text{O}_3^{2-} \rightarrow 2\text{I}^- + \text{S}_4\text{O}_6^{2-}$

##### 2. Μέθοδος Bertrand

Είναι βασισμένη στην αναγωγική δράση των σακχάρων σε αλκαλικό διάλυμα τρυγικού συμπλόκου με ιόντα χαλκού, σχηματίζοντας οξείδιο του χαλκού το οποίο διαλύεται σε θερμό διάλυμα θειικού σιδηροαμμωνίου προκαλώντας την αναγωγή του σε  $\text{FeSO}_4$ . Ακολουθεί τιτλοδότηση του  $\text{FeSO}_4$  με υπερμαγγανικό Κάλιο ( $\text{KMnO}_4$ ). Με την χρήση πινάκων υπολογίζεται η αντιστοιχία του  $\text{Cu}^+$  με τα ανάγοντα σάκχαρα.<sup>67</sup>



### 3. Μέθοδος του ινστιτούτου του Βερολίνου

Προσδιορίζει την περιεκτικότητα της ημίλευκης ζάχαρης σε ανάγοντα σάκχαρα, εκφρασμένα ως ιμβερτοσάκχαρο. Στηρίζεται στην αναγωγή του  $\text{Cu}^{+2}$  του αντιδραστηρίου Müller σε οξείδιο του χαλκού, από τα ανάγοντα σάκχαρα. Το σχηματιζόμενο οξείδιο του χαλκού οξειδώνεται με διάλυμα ιωδίου σε περίσσεια, η οποία υπολογίζεται με τιτλοδοτημένο διάλυμα θειοθειικού νατρίου. Ανάλογα με την κατανάλωση του ιωδίου, υπολογίζεται η περιεκτικότητα σε ιμβερτοσάκχαρο.<sup>68</sup>

### 4. Μέθοδος Knight and Allen

Η μέθοδος υπολογίζει την περιεκτικότητα ζάχαρης σε ιμβερτοσάκχαρο. Στο διάλυμα προστίθεται περίσσεια αντιδραστηρίου της μεθόδου που περιέχει  $\text{Cu}^{+2}$ , ανάγοντάς το σε  $\text{Cu}^{+}$ . Ο  $\text{Cu}^{+2}$  που δεν ανάχθηκε επαναογκομετρείται με διάλυμα EDTA. Έπειτα, κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς με γνωστές ποσότητες ιμβερτοσακχάρου όπου μέσω του όγκου EDTA που καταναλώθηκε, υπολογίζεται το ποσοστό επί της εκατό του σακχάρου στο διάλυμα.<sup>68</sup>

### 5. Μέθοδος Lüff

Γνωστή ποσότητα διαλύματος με σάκχαρα αντιδράει με αλκαλικό διάλυμα χαλκού, επίσης γνωστής ποσότητας που ανάγουν τον  $\text{Cu}^{+2}$  σε  $\text{Cu}^{+}$ . Με την προσθήκη KI, η ποσότητα  $\text{Cu}^{+2}$  που δεν ανάχθηκε αντιδρά με το  $\text{I}^{-}$  δίνοντας  $\text{I}_2$  και  $\text{Cu}^{+}$  σε όξινο περιβάλλον σύμφωνα με την αντίδραση:  $2\text{I}^{-} + 2\text{Cu}^{++} \rightarrow \text{I}_2 + 2\text{Cu}^{+}$ . Έπειτα τα ιόντα  $\text{I}_2$  προσδιορίζονται με τιτλοδοτημένο πρότυπο διάλυμα θειοθειικού νατρίου, βάση της αντίδρασης:  $\text{I}_2 + 2\text{S}_2\text{O}_3^{-2} \rightarrow 2\text{I}^{-} + \text{S}_4\text{O}_6^{-2}$ . Ο δείκτης αμόλυο σχηματίζει κυανό σύμπλοκο με το  $\text{I}_2$  το οποίο αποχρωματίζεται στο τελικό σημείο της αντίδρασης και προστίθεται μετά την αναγωγή του μεγαλύτερου μέρους του  $\text{I}_2$  ώστε να είναι πιο ευδιάκριτη η αλλαγή του χρώματος. Απαραίτητη προϋπόθεση είναι η κατάλληλη αραιώση του δείγματος με απιονισμένο νερό ώστε η συγκέντρωση των αναγόντων σακχάρων να μην ξεπερνά τα 2,5 g/l.<sup>68,69,70</sup>

### 6. Μέθοδος Lane-Eynon

Στη μέθοδο Lane-Eynon το δείγμα τιτλοδοτείται με διάλυμα Soxhlet, που είναι μίγμα διαλύματος θειικού χαλκού (Fehling A) και διαλύματος τρυγικού καλιονατρίου (Fehling B) αναμιγμένα σε ίσους όγκους αμέσως πριν την αντίδραση. Το διάλυμα Soxhlet τίθεται σε βρασμό και σε αυτό προστίθεται δείκτης μπλε του μεθυλενίου. Με την σταδιακή προσθήκη των σακχάρων αποσπάται οξυγόνο και παράγεται διοξείδιο του χαλκού, το οποίο μετατρέπεται αμέσως σε  $\text{Cu}_2\text{O}$ . Η συνολική αντίδραση της ογκομέτρησης είναι:  $\text{RCHO} + \text{Cu}(\text{OH})_2 + \text{NaOH} \rightarrow \text{RCOONa} + \text{Cu}_2\text{O} + 3\text{H}_2\text{O}$ . Μόλις όλη η ποσότητα των αναγόντων σακχάρων έχει αντιδράσει με τον θειικό χαλκό, κάθε επόμενη προσθήκη σακχάρων θα αντιδράσει με τον δείκτη, προκαλώντας τον αποχρωματισμό του, φανερώνοντας το κεραμοκόκκινο χρώμα του  $\text{Cu}_2\text{O}$ . Η χρωματική αλλαγή δηλώνει το τέλος της

αντίδρασης και σημειώνεται η κατανάλωση των σακχάρων. Πριν την διεξαγωγή του πειράματος, δημιουργείται καμπύλη αναφοράς με πρότυπα σακχαρικά διαλύματα γνωστής περιεκτικότητας σακχάρων. Η Lane-Eynon εξαρτάται από τους ακριβείς χρόνους των αντιδράσεων, την συγκέντρωση των αντιδραστηρίων και την θερμοκρασία. Η μέθοδος δεν προσφέρει αμεσότητα και αδυνατεί να διακρίνει τους τύπους αναγόντων σακχάρων. <sup>71,72,73,74</sup>

## **7. Μέθοδος Munson and Walker**

Είναι βαρομετρική και βασίζεται στην οξείδωση των σακχάρων που ανάγουν τον χαλκό σε  $\text{Cu}^{+2}$  καθώς συμπεριλαμβάνει το αντιδραστήριο Soxhlet. Σε περίσσεια θεικού χαλκού και τρυγικού αλκαλικού άλατος, οι υδατάνθρακες οξειδώνονται λόγω θερμότητας και σχηματίζουν ίζημα  $\text{Cu}_2\text{O}$ . Η συγκέντρωση του ιζήματος προσδιορίζεται βαρομετρικά με φιλτράρισμα, ξήρανση και ζύγιση. Το ίζημα πριν την ξήρανση πλένεται με νερό, αλκοόλη και αιθέρα. Το τελικό ίζημα είναι ανάλογο της αρχικής ποσότητας των σακχάρων και η τιμή τους υπολογίζεται από το βάρος του ιζήματος σε χιλιοστογραμμάρια (mg) μέσω του πίνακα Munson and Walker. <sup>71,72</sup>

## **B) Ενόργανες μέθοδοι**

### **1. Nelson-Somogyi**

Η μέθοδος χρησιμοποιεί σπεκτροφωτόμετρο για τον εντοπισμό των αναγόντων σακχάρων μέσω του σε έγχρωμου συμπλόκου που δημιουργείται μεταξύ των οξειδωμένων από χαλκό σακχάρων και του αρσενομολυβδαινικού που έχει απορρόφηση στα 520nm. <sup>75</sup>

### **2. Μέθοδος 3,5 δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS)**

Βασίζεται στην αναγωγή του 3,5 δινιτροσαλικυλικού οξέως μέσω της αντίδρασής του με τα ανάγοντα σάκχαρα σε 3-αμινο-5-νιτροσαλικυλικό οξύ που παρουσιάζει απορρόφηση σε 540nm στο φασματοφωτόμετρο. <sup>60</sup>

### **3. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)**

Η μέθοδος της υγρής χρωματογραφίας είναι εξαιρετικά ακριβής καθώς προσδιορίζει ξεχωριστά τα συστατικά ενός μείγματος. Βασίζεται στην χρωματογραφία στήλης, όμως είναι πιο ειδική καθώς χρησιμοποιεί υψηλές πιέσεις που ωθούν πολύ γρηγορότερα τα μείγματα μέσα από τη στήλη. Ο διαλύτης συνήθως είναι μείγμα οργανικών διαλυτών και μιας υδατικής φάσης. Μόλις εξέλθουν από την στήλη, οι ουσίες ανιχνεύονται από ειδικό ανιχνευτή, παράγοντας σήμα που αντικατοπτρίζει την συγκέντρωση των συστατικών ως κορυφές πάνω σε μια γραφική παράσταση σε συνάρτηση με τον χρόνο, το χρωματογράφημα. Η HPLC χρησιμοποιείται για προσδιορισμό αναγόντων σακχάρων που έχουν προηγουμένως διαλυτοποιηθεί έως 20g/l και για σουκρόζη έως 40 g/l. Για αυτά

χρησιμοποιείται στήλη αλκυλαμίνης και ως ανιχνευτής ο δείκτης διάθλασης.<sup>76,77</sup>

#### 4. Μέθοδος Kolthoff

Η μέθοδος Kolthoff είναι μία ιωδιομετρική δοκιμή που προσδιορίζει αλδόζες καθώς με την οξειδωσή τους, μετατρέπονται στα αντίστοιχα αλδονικά οξέα, ενώ οι κετόζες παραμένουν σχεδόν οι ίδιες. Το σακχαρικό διάλυμα τίθεται σε αλκαλικές συνθήκες και εκεί κατεργάζεται με περίσσεια διαλύματος ιωδίου. Έπειτα το περιβάλλον γίνεται όξινο με την προσθήκη υδροχλωρίου είτε θειικού οξέος προκαλώντας περίσσεια  $I_2$ , η οποία ογκομετρείται με  $Na_2S_2O_3$ . Τα μη ανάγοντα σάκχαρα υπολογίζονται από την διαφορά της αναγωγικής ικανότητας των σακχαρούχου διαλύματος πριν και μετά την υδρόλυση των σακχάρων.<sup>78</sup>

#### 5. Ενζυμικός προσδιορισμός

Ο ενζυμικός προσδιορισμός εκμεταλλεύεται την ικανότητα των ενζύμων να καταλύουν συγκεκριμένες αντιδράσεις. Στο εμπόριο υπάρχουν ενζυμικά κιτ ανάλυσης που χρειάζονται μικρή προετοιμασία δείγματος. Η εξειδίκευση τους, η αμεσότητα και υψηλή τους ευαισθησία σε χαμηλές συγκεντρώσεις τα καθιστούν ιδανικά για τον προσδιορισμό σακχάρων. Για τα σάκχαρα δύο μέθοδοι εφαρμόζονται πιο συχνά. Η πρώτη εφαρμόζεται μετά το τέλος της αντίδρασης όπου μετριέται η συγκέντρωση του τελικού προϊόντος που είναι ανάλογη με την συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος. Η δεύτερη αφορά μέτρηση του αρχικού ρυθμού αντίδρασης που καταλύει το ένζυμο που είναι ανάλογος της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Ο ενζυμικός προσδιορισμός της μαλτόζης και της σουκρόζης γίνεται μόνο αφού διασπαστούν και έχει προηγηθεί ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της γλυκόζης και της φρουκτόζης. Συχνά χρησιμοποιείται το συνένζυμο NADP<sup>+</sup>/NADPH, το ένζυμο εξοκινάση, ενώ αναγκαίο είναι και το ATP. Όμως, η α-γλυκοζιδάση διασπά κι άλλα σάκχαρα, οπότε το είδος των σακχάρων δεν ξεχωρίζεται εύκολα οπότε η μέθοδος χρησιμοποιείται μόνο όταν είναι γνωστός ο τύπος του υδατάνθρακα.<sup>71</sup>

Η επίσημη μέθοδος αναφοράς για τον ποσοτικό προσδιορισμό των σακχάρων που περιέχονται στην μύρα είναι η μέθοδος Lane- Eynon. Ωστόσο, συχνά στα ζυθοποιεία για τον προσδιορισμό αυτό χρησιμοποιείτε και η μέθοδος Lüff, η οποία δεν είναι πρότυπη μέθοδος. Επομένως κρίθηκε αναγκαία η εργαστηριακή εξέτασή τους και σύγκρισή τους ώστε να προσδιοριστεί η ακρίβεια, επαναληψιμότητα και η αξιοπιστία τους. Οι δοκιμές γίνανε για τα σάκχαρα γλυκόζη, φρουκτόζη, μαλτόζη και σακχαρόζη.

## 3 Υλικά και Μέθοδοι

### 3.1 Μέθοδος Lane-Eynon

#### 3.1.1. Εξοπλισμός

- Σιφόνια των 5 ml ,10 ml, 50ml
- Σιφόνια πληρώσεως 25 ml , 50ml
- Ποτήρια ζέσεως
- Αναλυτικός ζυγός
- Ογκομετρικές φιάλες των 100ml,200ml, 500ml ,1000ml
- Διηθητικό χαρτί
- Προχοΐδα των 100 ml
- Κωνικές φιάλες των 300 ml
- Λίχνος Bunsen
- Τρίποδο με μεταλλικό πλέγμα
- Πουάρ
- Γυάλινη ράβδος ανάμειξης

#### 3.1.2. Προετοιμασία Δειγμάτων

##### Αντιδραστήρια

μπλε του μεθυλενίου 1%w/v

πρότυπο διάλυμα ιμβερτοποιημένης ζάχαρης (σακχαρόζης)

Διαλύματα Fehling A και B

##### Παρασκευή αντιδραστηρίων

##### Τροποποίηση του διαλύματος Fehling από το Soxhlet

##### Διάλυμα Fehling A

Για την παρασκευή του διαλύματος Fehling A ζυγίστηκαν 34,6394 γραμμάρια στερεού πενταένυδρου θειικού χαλκού  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  τα οποία διαλύθηκαν σε ποτήρι ζέσεως με απιονισμένο νερό. Έπειτα μεταφέρθηκαν ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη 500 ml και στην συνέχεια η φιάλη πληρώθηκε με απιονισμένο νερό μέχρι την χαραγή. Αυτό το διάλυμα πωματίστηκε, αναδεύτηκε και αφέθηκε σε ηρεμία για δύο μέρες.

### Διάλυμα Fehling B

Για την παρασκευή του διαλύματος Fehling B ζυγίστηκαν 172,9995 γραμμάρια στερεού τετραένυδρου τρυγικού καλιονάτριου  $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  τα οποία διαλύθηκαν σε ποτήρι ζέσεως με απιονισμένο νερό και έπειτα μεταφέρθηκαν ποσοτικά σε μια ογκομετρική φιάλη 500 ml. Στη συνέχεια ζυγίστηκαν 50,0008 γραμμάρια στερεού καυστικού νατρίου  $\text{NaOH}$  τα οποία διαλύθηκαν σε ποτήρι ζέσεως με απιονισμένο νερό. Έπειτα μεταφέρθηκαν ποσοτικά στην ίδια ογκομετρική φιάλη των 500 ml που έχουν ήδη μεταφερθεί το τετραένυδρο τρυγικό καλιονάτριο  $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  και στην συνέχεια η φιάλη πληρώθηκε με απιονισμένο νερό μέχρι την χαραγή. Αυτό το διάλυμα πωματίστηκε, αναδεύτηκε και αφέθηκε σε ηρεμία για δύο μέρες.

Μετά το πέρας των δύο ημερών τα διαλύματα Fehling A και Fehling B φιλτραρίστηκαν με την χρήση διηθητικού χαρτιού και επανατοποθετήθηκαν στις αρχικές τους ογκομετρικές φιάλες, οι οποίες πωματίστηκαν. Τα διαλύματα είναι έτοιμα για χρήση.

### Διάλυμα Soxhlet

Το διάλυμα Soxhlet παρασκευάστηκε με την ανάμιξη ίσων όγκων από τα διαλύματα θειικού χαλκού ( διάλυμα Fehling A) και διαλύματος τρυγικού καλιονατρίου ( διάλυμα Fehling B) αμέσως πριν από την χρήση του.

### Διάλυμα $\text{NaOH}$ 0,5N

Μέσω του μοριακού βάρους του καυστικού νατρίου υπολογίστηκε ότι για την παρασκευή 100 ml διαλύματος  $\text{NaOH}$  0,5 N απαιτούνται 2 γραμμάρια στερεού καυστικού νατρίου. Σε αναλυτικό ζυγό ζυγίστηκε ποσότητα 2,03 γραμμαρίων στερεού καυστικού νατρίου ( $\text{NaOH}$ ), η οποία διαλύθηκε σε απιονισμένο νερό. Στην συνέχεια μεταφέρθηκε ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 100ml και συμπληρώθηκε με απιονισμένο νερό έως όγκου 100ml.

### Πρότυπο διάλυμα ιμβερτοποιημένης σακχαρόζης 0,5%

Για το πρότυπο διάλυμα ιμβερτοποιημένης ζάχαρης ζυγίστηκαν 9,5003 γραμμάρια καθαρής σακχαρόζης και διαλύθηκαν σε 95ml απιονισμένου νερού εκ των όποιων κάποια ml χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτική μεταφορά τους σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml. Στην ίδια ογκομετρική φιάλη προστέθηκαν 5 ml πυκνού υδροχλωρίου  $\text{HCl}$  37%. Το διάλυμα αυτό πωματίστηκε, αναδεύτηκε και στη συνέχεια αφέθηκε σε ηρεμία σε συνθήκες θερμοκρασίας δωματίου (20–25°C) για διάστημα τριών ημερών. Κατόπιν μεταφέρθηκε ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 1000ml και στην συνέχεια συμπληρώθηκε έως την χαραγή με απιονισμένο νερό. Το διάλυμα που παρασκευάστηκε είναι πολύ όξινο με περιεκτικότητα 1% σε ιμβερτοποιημένο σάκχαρο, επομένως για αρκετούς μήνες παραμένει πολύ σταθερό. Για την εξουδετέρωση του διαλύματος 1% ιμβερτοποιημένου σακχάρου λήφθηκαν 50 ml αυτού με σιφόνιο πλήρωσεως και τοποθετήθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 100ml. Στην ίδια φιάλη προστέθηκαν και 7 ml  $\text{NaOH}$  0,5N και έπειτα

συμπληρώθηκε με απιονισμένο νερό έως την χαραγή. Το πρότυπο διάλυμα ιμβερτοποιημένης σακχαρόζης που παρασκευάστηκε είχε περιεκτικότητα 0,5% σε ιμβερτοποιημένο σάκχαρο. Επομένως, 1ml του παρασκευασθέντος διαλύματος περιείχε 5mg ιμβερτοποιημένου σακχάρου.

### Διάλυμα μπλε του μεθυλενίου 1% σε νερό

#### Προετοιμασία δειγμάτων

##### Γλυκόζη 5g/l

Σε αναλυτικό ζυγό, σε ποτήρι ζέσεως ζυγίστηκαν 1,0004 γραμμάρια γλυκόζης τα οποία διαλύθηκαν με απιονισμένο νερό. Έπειτα, μεταφέρθηκαν ποσοτικά με απιονισμένο νερό σε ογκομετρική φιάλη των 200 ml. Στη συνέχεια η ογκομετρική φιάλη συμπληρώθηκε με απιονισμένο νερό έως τη χαραγή, πωματίστηκε και ανακινήθηκε.

##### Φρουκτόζη 5g/l

Σε αναλυτικό ζυγό, σε ποτήρι ζέσεως ζυγίστηκαν 0,9999 γραμμάρια φρουκτόζης τα οποία διαλύθηκαν με απιονισμένο νερό. Έπειτα, μεταφέρθηκαν ποσοτικά με απιονισμένο νερό σε ογκομετρική φιάλη των 200 ml. Στη συνέχεια η ογκομετρική φιάλη συμπληρώθηκε με απιονισμένο νερό έως τη χαραγή, πωματίστηκε και ανακινήθηκε.

##### Σακχαρόζη 5g/l

Σε αναλυτικό ζυγό, σε ποτήρι ζέσεως ζυγίστηκαν 1,0003 γραμμάρια σακχαρόζης τα οποία διαλύθηκαν με απιονισμένο νερό. Έπειτα, μεταφέρθηκαν ποσοτικά με απιονισμένο νερό σε ογκομετρική φιάλη των 200 ml. Στη συνέχεια η ογκομετρική φιάλη συμπληρώθηκε με απιονισμένο νερό έως τη χαραγή, πωματίστηκε και ανακινήθηκε.

##### Μαλτόζη 5g/l

Σε αναλυτικό ζυγό, σε ποτήρι ζέσεως ζυγίστηκαν 1,0003 γραμμάρια άνυδρης μαλτόζης τα οποία διαλύθηκαν με απιονισμένο νερό. Έπειτα, μεταφέρθηκαν ποσοτικά με απιονισμένο νερό σε ογκομετρική φιάλη των 200 ml. Στη συνέχεια η ογκομετρική φιάλη συμπληρώθηκε με απιονισμένο νερό έως τη χαραγή, πωματίστηκε και ανακινήθηκε.

##### Ιμβερτοποιημένη ένυδρη μαλτόζη 0,5%

Για το πρότυπο διάλυμα ιμβερτοποιημένης μαλτόζης ζυγίστηκαν 10 γραμμάρια ένυδρης σακχαρόζης και διαλύθηκαν σε 95ml απιονισμένου νερού εκ των οποίων κάποια ml χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτική μεταφορά τους σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml. Στην ίδια ογκομετρική φιάλη προστέθηκαν 5 ml πυκνού υδροχλωρίου HCl 37%. Το διάλυμα αυτό πωματίστηκε, αναδεύτηκε και στη συνέχεια αφήθηκε σε ηρεμία σε συνθήκες θερμοκρασίας δωματίου (20 – 25°C ) για διάστημα τριών ημερών. Κατόπιν μεταφέρθηκε ποσοτικά σε ογκομετρική

φιάλη των 1000ml και στην συνέχεια συμπληρώθηκε έως την χαραγή με απιονισμένο νερό. Το διάλυμα που παρασκευάστηκε είναι πολύ όξινο με περιεκτικότητα 1% σε ιμβερτοποιημένη μαλτόζη, επομένως για αρκετούς μήνες παραμένει πολύ σταθερό. Για την εξουδετέρωση του διαλύματος 1% ιμβερτοποιημένης μαλτόζης λήφθηκαν 50 ml αυτού με σιφόνιο πλήρωσεως και τοποθετήθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 100ml. Στην ίδια φιάλη προστεθήκαν και 7 ml NaOH 0,5N και έπειτα συμπληρώθηκε με απιονισμένο νερό έως την χαραγή. Το πρότυπο διάλυμα ιμβερτοποιημένης μαλτόζης που παρασκευάστηκε έχει περιεκτικότητα 0,5% σε ιμβερτοποιημένο σάκχαρο. Επομένως, 1ml του παρασκευασθέντος διαλύματος περιείχε 5mg ιμβερτοποιημένης μαλτόζης.

### Δείγμα μύρας

Απαλλαγμένο από διοξείδιο του άνθρακα

Δείγμα 1: μύρας εμπορίου με αραίωση 1/2

Λήφθηκαν 50 ml από την μύρα που ήταν απαλλαγμένη από διοξείδιο του άνθρακα και τοποθετήθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml. Στη συνέχεια αραιώθηκε έως την χαραγή με απιονισμένο νερό, πωματίστηκε και αναδεύτηκε καλά.

Δείγμα 2 : μύρας εμπορίου χωρίς αραίωση

Δείγμα 3 : μύρα εργαστηρίου με αραίωση 1/2

Λήφθηκαν 50 ml από την μύρα που ήταν απαλλαγμένη από διοξείδιο του άνθρακα και τοποθετήθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml. Στη συνέχεια αραιώθηκε έως την χαραγή με απιονισμένο νερό, πωματίστηκε και αναδεύτηκε καλά.

### **3.1.3. Πειραματική πορεία**

#### Τιτλοδότηση του διαλύματος Soxhlet

Προχοΐδα των 100 ml γεμίστηκε με το πρότυπο διάλυμα ιμβερτοποιημένης σακχαρόζης 0,5%. Σε κωνική φιάλη των 300ml, με την χρήση σιφονίου πλήρωσεως των 25 ml μεταφέρθηκαν 25 ml από το αντιδραστήριο Soxhlet και στην ίδια φιάλη προστέθηκαν 24 ml από το πρότυπο διάλυμα ιμβερτοποιημένης σακχαρόζης 0,5% σε περιεκτικότητα και αναδεύτηκαν καλά. Αυτά είναι αρκετά για την αναγωγή του χαλκού. Κατόπιν, στήθηκε διάταξη με λίκνο Bunsen και μεταλλικό πλέγμα όπου τοποθετήθηκε η κωνική φιάλη και θερμάνθηκε μέχρι βρασμού. Ο βρασμός διήρκησε 2 λεπτά υπό συνεχή ανάδευση. Καθώς υπήρχε πιθανότητα υπερχειλίσεως του μείγματος, μειώθηκε η φωτιά κατάλληλα. Μετά το πέρας των δύο λεπτών, προστέθηκαν στην κωνική φιάλη 2-5 σταγόνες από μπλε του μεθυλενίου, χωρίς να απομακρυνθεί το μείγμα από την εστία. Ολοκληρώθηκε η τιτλοδότηση του διαλύματος με το πρότυπο διάλυμα ιμβερτοποιημένης σακχαρόζης έως τον πλήρη

αποχρωματισμό του δείκτη σε συνολικό χρόνο βρασμού 3 λεπτών και σημειώθηκε η κατανάλωση. Η διαδικασία επαναλήφθηκε συνολικά τρεις φορές και από τις καταναλώσεις που καταγράφηκαν, υπολογίστηκε ο μέσος όρος. Για την τιτλοδότηση 25 ml του διαλύματος Soxhlet, ο μέσος όρος των καταναλώσεων του διαλύματος ιμβερτοποιημένου σακχάρου 0,5% πρέπει να είναι περίπου ίσος με 24,8 ml, που ισοδυναμεί με 124 mg ιμβερτοποιημένου σακχάρου. Η σύνθεση των αντιδραστηρίων ή διακυμάνσεις σε μεμονωμένη διαδικασία δύναται να προκαλέσουν μικρές αποκλίσεις στις τιμές.

### **Προσδιορισμός δειγμάτων**

Για κάθε δείγμα ακολουθήθηκε ακριβώς η ίδια διαδικασία.

(Δείγματα γλυκόζης 5 %, φρουκτόζης 5%, μαλτόζης 5%, σακχαρόζης 5%, ιμβεροποιημένης μαλτόζης 0,5%, ιμβερτοποιημένης σακχαρόζης 0,5% )

Προχοΐδα των 100 ml γεμίστηκε με το δείγμα προς προσδιορισμό. Σε κωνική φιάλη των 300ml, με την χρήση σιφωνίου πληρώσεως των 25 ml μεταφέρθηκαν 25 ml από το αντιδραστήριο Soxhlet και στην ίδια φιάλη προστέθηκαν 21 ml από το δείγμα και αναδεύτηκαν καλά. Κατόπιν, στήθηκε διάταξη με λίκνο Bunsen και μεταλλικό πλέγμα όπου τοποθετήθηκε η κωνική φιάλη και θερμάνθηκε μέχρι βρασμού. Ο βρασμός διήρκησε 2 λεπτά υπό συνεχή ανάδευση. Καθώς υπήρχε πιθανότητα υπερχέλισης του δείγματος, μειώθηκε η φωτιά κατάλληλα. Μετά το πέρας των δύο λεπτών, προστέθηκαν στην κωνική φιάλη 2-5 σταγόνες από μπλε του μεθυλενίου, χωρίς να απομακρυνθεί το μείγμα από την εστία. Ολοκληρώθηκε η τιτλοδότηση του διαλύματος με το δείγμα έως τον πλήρη αποχρωματισμό του δείκτη σε συνολικό χρόνο βρασμού 3 λεπτών και σημειώθηκε η κατανάλωση. Η διαδικασία επαναλήφθηκε συνολικά τρεις φορές και από τις καταναλώσεις που καταγράφηκαν, υπολογίστηκε ο μέσος όρος.

### **Προσδιορισμός δείγματος μύρας**

Χρησιμοποιήθηκε μύρα του εμπορίου η οποία απαλλάχθηκε από διοξείδιο του άνθρακα . Με αυτήν συμπληρώθηκε προχοΐδα των 100 ml. Σε κωνική φιάλη των 300ml, με την χρήση σιφωνίου πληρώσεως των 25 ml μεταφέρθηκαν 25 ml από το αντιδραστήριο Soxhlet και στην ίδια φιάλη προστέθηκαν 15ml από την μύρα που υπήρχε στην προχοΐδα και αναδεύτηκαν καλά. Κατόπιν, στήθηκε διάταξη με λίκνο Bunsen και μεταλλικό πλέγμα όπου τοποθετήθηκε η κωνική φιάλη και θερμάνθηκε μέχρι βρασμού. Ο βρασμός διήρκησε 15 δευτερόλεπτα υπό συνεχή ανάδευση, ύστερα προστέθηκαν ταχύτερα και άλλες ποσότητες μύρας και αφέθηκε σε βρασμό για λίγα δευτερόλεπτα ωστόσο παρέμεινε ένα ελαφρώς αισθητό μπλε χρώμα. Προστέθηκαν στην κωνική φιάλη 2-5 σταγόνες από μπλε του μεθυλενίου, χωρίς να απομακρυνθεί το μείγμα από την εστία. Η τιτλοδότηση του διαλύματος ολοκληρώθηκε προσθέτοντας στάγδην την μύρα που υπήρχε στην προχοΐδα έως



τον πλήρη αποχρωματισμό του δείκτη και σημειώθηκε η κατανάλωση.

Το σφάλμα αυτής της τιτλοδότησης ήταν μικρότερο από 1%.

Η διαδικασία επαναλήφθηκε συνολικά τρεις φορές και από τις καταναλώσεις που καταγράφηκαν, υπολογίστηκε ο μέσος όρος.

Το τελικό σημείο πρέπει να βρίσκεται μεταξύ 15 και 50 ml.

## 3.2 Μέθοδος Lüff

### 3.2.1 Προετοιμασία δειγμάτων

Αρχικά παρασκευάστηκαν τα 5 αντιδραστήρια που απαιτούνται. Για τη ζύγιση χρησιμοποιήθηκε αναλυτικός ζυγός.

#### 1. Αλκαλικό διάλυμα $\text{CuSO}_4$ 25% (Διάλυμα Z1)

Παρασκευάστηκε με ανάμιξη τριών διαλυμάτων

A) 25,0002 γραμμάρια  $\text{CuSO}_4$  διαλύθηκαν σε λίγο απιονισμένο νερό το οποίο είχε βράσει. Το διάλυμα μεταφέρθηκε ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 100ml και συμπληρώθηκε μέχρι την χαραγή με απιονισμένο νερό. Έπειτα αφέθηκε να ψυχθεί.

B) 50,0002 γραμμάρια κιτρικού οξέος διαλύθηκαν σε περίπου 300ml απιονισμένο νερό.

Γ) 144 γραμμάρια άνυδρου  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  διαλύθηκαν σε 300ml απιονισμένο νερό το οποίο είχε προθερμάνει στους  $40^\circ\text{C}$ . Η διαδικασία έγινε υπό ισχυρή ανάδευση και έπειτα το διάλυμα αφέθηκε για να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου.

Τέλος, τα διαλύματα Β και Γ αναμίχθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 1000ml προσέχοντας τον αφρισμό. Έπειτα προστέθηκε σιγά σιγά σε αυτό το διάλυμα Α και συμπληρώθηκε μέχρι την χαραγή με απιονισμένο νερό. Το διάλυμα αποθηκεύτηκε σε σκουρόχρωμη φιάλη.

#### 2. Διάλυμα KI 30% (Διάλυμα Z2)

30,0003 γραμμάρια KI διαλύθηκαν σε απιονισμένο νερό με κατόπιν ποσοτική μεταφορά σε ογκομετρική φιάλη των 100ml η οποία πληρώθηκε μέχρι την χαραγή με απιονισμένο νερό.

#### 3. Διάλυμα $\text{H}_2\text{SO}_4$ 25%

Σε ογκομετρική φιάλη των 200ml προστέθηκαν περίπου 80ml απιονισμένο και μετά σιγά σιγά προστέθηκαν 50ml πυκνού θεικού οξέος (97%). Έπειτα συμπληρώθηκε με απιονισμένο νερό μέχρι

τη χαραγή. Το διάλυμα αφέθηκε να ψυχθεί καθώς λόγω της εξώθερμης αντίδρασης είχε ανέβει σημαντικά η θερμοκρασία.

#### 4. Διάλυμα Αμύλου 5%

Ζυγίστηκαν 5,0035 γραμμάρια άμυλο. Έπειτα, λίγο απιονισμένο νερό θερμάνθηκε στους 40 °C περίπου και έγινε σιγά σιγά προσθήκη αμύλου (μορφή πούδρας) υπό ισχυρή ανάδευση με ταυτόχρονη προσθήκη μικρής ποσότητας NaCl, περίπου δύο κουταλάκια του γλυκού. Η διαδικασία διήρκησε περίπου 15' μέχρι να διαλυθεί το άμυλο. Το διάλυμα μεταφέρθηκε ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 100ml και συμπληρώθηκε με απιονισμένο νερό μέχρι τη χαραγή.

#### 5. Διάλυμα Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Ζυγίστηκαν 6,2020 γραμμάρια Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O (99,5% καθαρότητα) και τα διαλύθηκαν σε λίγο απιονισμένο νερό. Έπειτα μεταφέρθηκε ποσοτικά σε μία ογκομετρική φιάλη των 250ml και συμπληρώθηκε με απιονισμένο νερό μέχρι τη χαραγή.

### 3.2.2 Εξοπλισμός

- Μία σφαιρική φιάλη βρασμού όγκου 250 ml με σμύρισμα.
- Κάθετος ψυκτήρας με σμύρισμα.
- Σιφώνια πλήρωσεως των 5,10, 25 και 50 ml.
- Προχοΐδα των 100 ml.
- Θερμαντική πλάκα
- Μαγνητικό αναδευτήρα.

Τα διαλύματα γλυκόζης και φρουκτόζης που είχαν παρασκευαστεί και χρησιμοποιήθηκαν για την μέθοδο Lane-Eynon, αραιώθηκαν έτσι ώστε αντί για 5gr/L να έχουν συγκέντρωση μικρότερη από 2,5 gr/L. Η αραιώση που έγινε ήταν ¼. Με σιφώνια πλήρωσεως λήφθηκαν 25 ml γλυκόζης και φρουκτόζης αντίστοιχα και μεταφέρθηκαν σε ογκομετρικές φιάλες των 100 ml οι οποίες συμπληρώθηκαν με απιονισμένο νερό έως τη χαραγή. Για τα διαλύματα ιμβερτοποιημένης σακχαρόζης και μαλτόζης δεν έγινε κάποια αραιώση, ενώ η θεωρητική συγκέντρωσή τους ήταν 9,5gr/L.

### 3.2.3 Πειραματική πορεία

Τα δείγματα ανακινήθηκαν πριν από κάθε χρήση.

Για το κάθε δείγμα λήφθηκαν 25 ml με σιφώνι πλήρώσεως και μεταφέρθηκαν σε σφαιρική φιάλη. Έπειτα, προστέθηκαν 25 ml του διαλύματος Z1 και ένα μαγνητάκι για ανάδευση.

Η φιάλη τοποθετήθηκε στην θερμαντική πλάκα, συνδέθηκε με τον κάθετο ψυκτήρα και ανοίχτηκε η παροχή του νερού για να γίνεται επαναρροή. Όταν το περιεχόμενο της σφαιρικής έφτασε σε βρασμό ξεκίνησε χρονομέτρηση για 10'.

Μετά το πέρας αυτών, αφαιρέθηκε η σφαιρική φιάλη με ειδικό γάντι από την θερμαντική πλάκα, διακόπηκε η παροχή νερού και αποσυνδέθηκε ο ψυκτήρας. Το περιεχόμενο της φιάλης ψύχθηκε σε δροσερό νερό για μερικά λεπτά.

Στη συνέχεια προστέθηκε με σιφώνια πλήρώσεως με την ακόλουθη σειρά 10 ml διαλύματος Z2 (KI), 25 ml διαλύματος Z3(H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) - με μεγάλη προσοχή στον αφρισμό- και 5 ml διαλύματος Z4 (αμύλου).

Τέλος, τιτλοδοτήθηκε με συνεχή ανάδευση με το διάλυμα Z5 (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) που προηγουμένως είχε τοποθετηθεί στην προχοΐδα. Σημειώθηκε η κατανάλωση και η χρωματική αλλαγή για κάθε δείγμα. Για το κάθε δείγμα έγιναν τρεις τιτλοδοτήσεις.

Για το τυφλό-δείγμα νερού ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με τη μοναδική διαφορά ότι παραλείφθηκε ο βρασμός.

Με n συμβολίζουμε την κατανάλωση του Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O

Με n' συμβολίζουμε την κατανάλωση του τυφλού.

### **3.3 Φασματοφωτομετρική Μέθοδος**

#### **3.3.1.Εξοπλισμός**

- Αναλυτικό ζυγό
- Ποτήρια ζέσεως
- ογκομετρικές φιάλες 250 ml ,200ml , 50 ml, 25ml
- πώματα
- σιφώνια 20ml,10 ml , 5ml ,1 ml
- σιφώνι πλήρώσεως 25ml
- πιπέτα
- πουάρ
- θερμαντική πλάκα

- parafilm
- δοκιμαστικοί σωλήνες pyrex
- φασματοφωτόμετρο
- κυψελίδες πλαστικές ή γυάλινες

### Αντιδραστήρια

2,4-δινιτροφαινόλη

## **3.3.2. Προετοιμασία Δειγμάτων**

### Διερεύνηση γλυκόζης

#### Πρότυπα διαλύματα

##### Γλυκόζη 10 g/l

Παρασκευάστηκε με αραιώση. Λήφθηκαν 12,5 ml από το διάλυμα γλυκόζης 40g/l με την χρήση σιφωνίου και τοποθετήθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 50ml. Συμπληρώθηκε με απιονισμένο νερό έως την χαραγή, πωματίστηκε και ανακινήθηκε.

##### Γλυκόζη 5 g/l

Παρασκευάστηκε με αραιώση. Λήφθηκαν 6,25 ml από το διάλυμα γλυκόζης 40g/l με την χρήση σιφωνίου και πιπέτας και τοποθετήθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 50ml. Συμπληρώθηκε με απιονισμένο νερό έως την χαραγή, πωματίστηκε και ανακινήθηκε.

##### Γλυκόζη 2 g/l

Παρασκευάστηκε με αραιώση. Λήφθηκαν 2,5 ml από το διάλυμα γλυκόζης 40g/l με την χρήση σιφωνίου και τοποθετήθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 50ml. Συμπληρώθηκε με απιονισμένο νερό έως την χαραγή, πωματίστηκε και ανακινήθηκε.

##### Γλυκόζη 1 g/l

Παρασκευάστηκε με αραιώση. Λήφθηκαν 1,25 ml από το διάλυμα γλυκόζης 40g/l με την χρήση σιφωνίου και πιπέτας και τοποθετήθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 50ml. Συμπληρώθηκε με απιονισμένο νερό έως την χαραγή, πωματίστηκε και ανακινήθηκε.

### Διαλύματα που εξετάστηκαν

#### Δείγμα Γλυκόζης 5g/l που χρησιμοποιήθηκε στην μέθοδο Lüff

Σε αναλυτικό ζυγό, σε ποτήρι ζέσεως ζυγίστηκαν 1,004 γραμμάρια γλυκόζης τα οποία διαλύθηκαν με απιονισμένο νερό. Έπειτα, μεταφέρθηκαν ποσοτικά με απιονισμένο νερό σε ογκομετρική φιάλη των 200 ml. Στη συνέχεια η ογκομετρική φιάλη συμπληρώθηκε με απιονισμένο νερό έως τη χαραγή, πωματίστηκε και ανακινήθηκε.

### Δείγμα ζυθογλεύκους

### Δείγμα ζυθογλεύκους με αραιώση

Το ζυθογλεύκους αραιώθηκε σε αναλογία 1:10.

10 ml ζυθογλεύκους λήφθηκαν με σιφόνιο των 10 ml και τοποθετήθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml. Στην συνέχεια η φιάλη συμπληρώθηκε με απιονισμένο νερό έως τη χαραγή, πωματίστηκε και ανακινήθηκε.

### **3.3.3. Πειραματική Πορεία**

Σε δοκιμαστικό σωλήνα rygex τοποθετήθηκε 1 ml από το δείγμα. Σε αυτό, προστέθηκαν 3ml 2,4-δινιτροφαινόλης. Έκλεισε ο δοκιμαστικός σωλήνας με parafilm και αναδεύτηκε το περιεχόμενο. Ο δοκιμαστικός σωλήνας τέθηκε σε ζέον υδατόλουτρο στο οποίο παρέμεινε για διάστημα ακριβώς 5 λεπτών. Κατόπιν ψύχθηκε σε παγόλουτρο και στη συνέχεια μεταφέρθηκε όλη η ποσότητα ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 25 ml. Προστέθηκε απιονισμένο νερό μέχρι την χαραγή. Πωματίστηκε και αναδεύτηκε.

Ακολουθήθηκε την ίδια διαδικασία για το κάθε δείγμα

### Παρασκευή τυφλού διαλύματος 0g/l

Σε δοκιμαστικό σωλήνα rygex τοποθετήθηκε 1 ml απιονισμένο νερό. Σε αυτό, προστέθηκαν 3ml 2,4-δινιτροφαινόλης. Έκλεισε ο δοκιμαστικός σωλήνας με parafilm και αναδεύτηκε. Ο δοκιμαστικός σωλήνας τέθηκε σε ζέον υδατόλουτρο στο οποίο παρέμεινε για διάστημα ακριβώς 5 λεπτών. Κατόπιν ψύχθηκε σε παγόλουτρο και στη συνέχεια μεταφέρθηκε όλη η ποσότητα ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 25 ml. Προστέθηκε απιονισμένο νερό μέχρι την χαραγή. Πωματίστηκε και αναδεύτηκε.

### **Προσδιορισμός Δειγμάτων**

Μηδενίζεται το φασματοφωτόμετρο με το τυφλό διάλυμα σε πλαστική ή γυάλινη κυψελίδα και ρυθμίστηκε να μετρήσει απορρόφηση στα 550nm.

Στο φασματοφωτόμετρο μετράται η απορρόφηση του κάθε δείγματος στα 550nm με πλαστική κυψελίδα ή γυάλινη.

Από τα πρότυπα διαλύματα γλυκόζης κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς.

## **3.4 Ενζυμική Μέθοδος**

Ο προσδιορισμός των σακχάρων με ενζυμικό τρόπο πραγματοποιήθηκε με χρήση αυτόματου ενζυμικού αναλυτή HyperLab Smart της Steroglass ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Προσδιορίστηκαν τα σάκχαρα γλυκόζη, φρουκτόζη, ιμπερτοποιημένη σακχαρόζη και

μβερτοποιημένη μαλτόζη.



Εικόνα 12. Συσκευή ενζυμικού αναλυτή HyperLab Smart <sup>79</sup>

## 4 Αποτελέσματα & Συζήτηση

### 4.1 Μέθοδος Lane-Eynon

Για κάθε δείγμα έγιναν τρεις διαδοχικές μετρήσεις και ο πίνακας 1.1 δείχνει τα αποτελέσματά τους μαζί με της στατιστική τους ανάλυση.

Για τον υπολογισμό των g αναγόντων σακχάρων /L για 25ml διαλύματος Soxhlet χρησιμοποιήθηκε ο πίνακας του παραρτήματος Α.

Οι υπολογισμοί γίνανε με χρήση εργαλείου Microsoft Excel.

Πίνακας 1.1 Αποτελέσματα και στατιστική ανάλυση μετρήσεων της μεθόδου Lane – Eynon

	V <sub>1</sub> (ml)	V <sub>2</sub> (ml)	V <sub>3</sub> (ml)	Μέσος όρος (ml)	g αναγόντων σακχάρων /L για 25ml διαλύματος Soxhlet
Σακχαρόζη ιμβερτοποιήμενη 5 g/L	25	24,9	25,1	25	4,73 ± 0,1
Σακχαρόζη μη ιμβερτοποιήμενη 5 g/L	27	26,8	26,9	26,9	4,4 ± 0,1
Μαλτόζη ιμβερτοποιήμενη 5 g/L	26,7	26,5	27,8	27	4,66 ± 0,7
Μαλτόζη μη ιμβερτοποιήμενη 5 g/L	31	31,1	30,9	31	2,6 ± 0,1
Γλυκόζη 5 g/L	24,6	24,1	23,6	24,1	5,0 ± 0,5
Φρουκτόζη 5 g/L	25,8	25,9	26	25,9	4,7 ± 0,1
Μπίρα τύπου lager χωρίς CO <sub>2</sub> αραιωμένη	δεν λειτούργησε				
Μπίρα τύπου lager χωρίς CO <sub>2</sub> μη αραιωμένη	20,6	21,6	18,8	20,33	9,27 ± 1,4
Γλεύκος αραιώση 1/10					25,8

Για τον υπολογισμό των γραμμαρίων αναγόντων σακχάρων ανά λίτρο που αντιστοιχούν σε 25 ml διαλύματος Soxhlet χρησιμοποιήθηκε ο τύπος :

$$(L/1000) * (d/sp.gr*T)*100, \text{ όπου}$$

L : παράγοντας Lane-Eynon ως mg μαλτόζης

d: συντελεστής αραιώσης , ml αραιωμένο δείγμα /ml δείγμα

sp gr : ειδικό βάρος

T: ml αραιωμένου δείγματος που χρησιμοποιείται για τιτλοδότηση 25 ml διαλύματος Soxhlet

Η μέθοδος Lane- Eynon λειτούργησε για τα δείγματα γλυκόζης, φρουκτόζης, ιμβεροποιημένης σακχαρόζης και ιμβερτοποιημένης μαλτόζης, ενώ έβγαλε και αρκετά καλά αποτελέσματα για το δείγμα της μη ιμβερτοποιημένης σακχαρόζης. Αντιθέτως, δεν μπόρεσε να λειτουργήσει για το δείγμα της μη ιμβερτοποιημένης μαλτόζης. Οι δισακχαρίτες πρέπει πρώτα να υδρολύονται στους μονοσακχαρίτες τους για να μπορέσει να λειτουργήσει αυτή η μέθοδος για τον προσδιορισμό τους. Όσο αναφορά τον ζύθο εμπορίου τύπου lager, ο οποίος απαλλάχθηκε από το διοξείδιο του άνθρακα, η μέθοδος λειτούργησε για το μη αραιωμένο προϊόν με ωστόσο μεγάλη τυπική απόκλιση. Επομένως, για να εφαρμοστεί αυτή η μέθοδος για την μέτρηση αναγόντων σακχάρων σε δείγματα ζύθου, πιθανώς να πρέπει αυτά να μην έχουν υποστεί αραίωση. Η μέθοδος έδωσε αποτέλεσμα και για το δείγμα γλεύκους μύρας με αραίωση 1:10.

## 4.2. Μέθοδος Lüff

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2.1) φαίνονται οι καταναλώσεις του κάθε δείγματος και σχόλια και παρατηρήσεις κατά την πειραματική διαδικασία.. Για κάθε δείγμα έγιναν τρεις διαδοχικές μετρήσεις.







Πίνακας 2.1 Καταναλώσεις μεθόδου Lüff και η στατιστική τους ανάλυση.



ΔΕΙΓΜΑ	V1	V2	V3	Μέσος όρος	SD	Παρατηρήσεις / Σχόλια
Ιμβεροποιημένη σακχαρόζη 9,5g/L						Το χρώμα στην αρχή της τιτλοδότησης ήταν ανοιχτό γκριζο-καραμελέ. Με προσθήκη μεγάλης ποσότητας (>50 ml) δεν έγινε καμία χρωματική αλλαγή.
Ιμβερτοποιημένη μαλτόζη 10,5gr/L						Το χρώμα στην αρχή της τιτλοδότησης ήταν ανοιχτό γκριζο-καραμελέ και δεν έγινε καμία αλλαγή στο χρώμα.
Γλυκόζη 1,25 gr/L	11,8	12,0	11,9	11,9	±0,1	Μπλε → Καφέ → Μελιτζανί (φαίνονταν σκουρόχρωμο ίζημα) Αλλαγή από μουσταρδί σε ανοιχτό γκριζο χρώμα.
Φρουκτόζη 1,25gr/L	11,8	12,1	12,0	12,0	±0,15	Ίδια με την γλυκόζη. Αλλαγή από μουσταρδί σε ανοιχτό γκριζο χρώμα.
Μύρα εμπορίου τύπου Lager						Το χρώμα πριν την τιτλοδότηση ήταν караμελέ. Κατά τον βρασμό υπήρχε έντονος αφρισμός. Καμία χρωματική αλλαγή, το χρώμα παρέμεινε σκούρο караμελέ
Τυφλό	22,3	22,3	22,2	22,3	±0,06	Δεν έγινε βρασμός, από έντονο μουσταρδί-χρώμα κουρκουμά έγινε ανοιχτό γκριζο-γαλακτερό.
Γλεύκος με αραίωση 1/4						Χρώμα караμελέ πριν την τιτλοδότηση. Πετρόλ → Φωτεινό πράσινο → Πρασινοκίτρινο → Πορτοκαλοκόκκινο. Καμία αλλαγή, караμελέ χρώμα.
Γλεύκος χωρίς αραίωση						Πορτοκαλί χρώμα, έντονος αφρισμός κατά τον οποίο ο αφρός πέρασε στον ψυκτήρα. Κατά την προσθήκη μικρής ποσότητας H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> άφρισε και ξεχειλίσε. Δεν έγινε προσθήκη αμύλου και τιτλοδότηση.



Ίδιο γλεύκος που είχε αρχίσει να ζυμώνει με αραίωση 1/2						Σκούρο γκριζοπράσινο χρώμα πριν την τιτλοδότηση , με προσθήκη <50 ml δεν έγινε καμία αλλαγή στο χρώμα.
Γλεύκος με αραίωση 1/10	0,6	0,4	0,5	0,5	±0,1	Από σκούρο γκριζοκόκκινο σε ανοιχτό γκρι-γαλακτερό.

Πίνακας 2.2 Χρωματικές αλλαγές με εικόνες κατά τον βρασμό και την τιτλοδότηση

ΔΕΙΓΜΑ	ΧΡΩΜΑΤΙΚΗ ΑΛΛΑΓΗ ΚΑΤΑ ΤΟΝ ΒΡΑΣΜΟ	ΧΡΩΜΑΤΙΚΗ ΑΛΛΑΓΗ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΤΙΤΛΟΔΟΤΗΣΗ
Ιμβερτοποιημένη σακχαρόζη 9,5g/L		
Ιμβερτοποιημένη μαλτόζη (10,5gr/L)		
Γλυκόζη 1,25 gr/L		
Φρουκτόζη 1,25gr/L		
Μπύρα εμπορίου τύπου Lager		
Τυφλό		
Γλεύκος αραίωση 1/4		

Γλεύκος χωρίς αραιώση		
Ίδιο γλεύκος – Έχει αρχίσει να ζυμώνει Αραιώση 1/2		
Γλεύκος χωρίς αραιώση		
Γλεύκος αραιώση 1/10		

Στον παρακάτω πίνακα ( Πίνακας 2.3 ) φαίνεται η ποσότητα των σακχάρων σε mg που υπάρχουν σε 25 ml δείγματος η οποία υπολογίστηκε μέσω του πίνακα του παραρτήματος Β που έχει μετατραπεί σε gr σακχάρων/L.

Πίνακας 2.3 Μετατροπή διαφοράς καταναλώσεων Luff σε gr σακχάρων/L

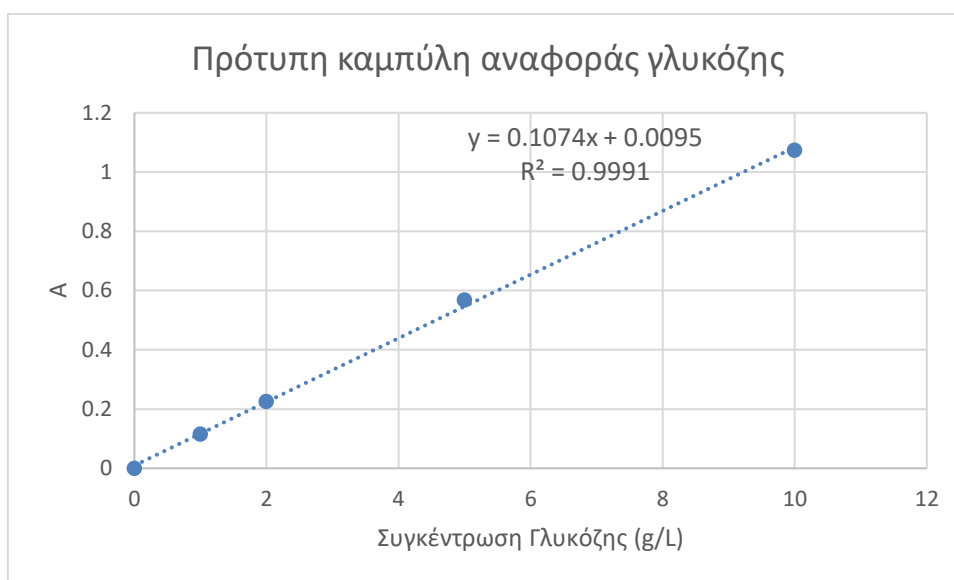
ΔΕΙΓΜΑ	n	n' (τυφλό)	n' - n	g αναγόντων σακχάρων / L
ΓΛΥΚΟΖΗ 1,25 gr/L	11,90	22,30	10,40	1,041
ΦΡΟΥΚΤΟΖΗ 1,25gr/L	12,00	22,30	10,30	1,031
ΓΛΕΥΚΟΣ ΑΡΑΙΩΣΗ 1/10	0,50	22,30	21,80	23,39

Η μέθοδος Luff λειτούργησε για την μέτρηση των μονοσακχαριτών γλυκόζη και φρουκτόζη με μικρή τυπική απόκλιση σε σχέση με τις πραγματικές τιμές. Αντίθετα, για τα δείγματα μβερτοποιημένης σακχαρόζης και μαλτόζης, αλλά και για το δείγμα της μύρας εμπορίου τύπου lager το πείραμα δεν έδωσε μετρήσεις καθώς δεν προκαλούνταν χρωματική αλλαγή κατά την τιτλοδότηση. Σχετικά με τις μετρήσεις του γλεύκου ζύθου, το πείραμα έδωσε μόνο αποτελέσματα για το γλεύκος που είχε υποστεί αραιώση 1:10. Για να γίνει εφικτή η μέτρηση των αναγόντων σακχάρων πιθανώς να πρέπει τα δείγματα γλεύκου να έχουν υποστεί μεγάλη αραιώση ώστε το πειραματικό δείγμα να έχει μικρή συγκέντρωση αναγόντων σακχάρων, λιγότερη από 2,5 g/l .

### 4.3. Φασματοφωτομετρική Μέθοδος

Από τα πρότυπα διαλύματα γλυκόζης κατασκευάστηκε η καμπύλη αναφοράς. Η πρότυπη καμπύλη αναφοράς της γλυκόζης ( Διάγραμμα 3.1 ) σχεδιάστηκε με χρήση εργαλείου Microsoft Excel.

Συγκέντρωση γλυκόζης g/ L	0	1	2	5	10
Απορρόφηση στα 550 nm	0	0,115	0,225	0,568	1,073



Διάγραμμα 3.1 Καμπύλη αναφοράς πρότυπων διαλυμάτων γλυκόζης

Χρησιμοποιώντας την εξίσωση της ευθείας βρέθηκε η συγκέντρωση της γλυκόζης στα δείγματα που φαίνονται στον Πίνακα 3.1. με τυπική απόκλιση  $R^2=0,9991$ .

Η γλυκόζη είναι η ίδια που χρησιμοποιήθηκε στην μέθοδο Lüff.

Πίνακας 3.1 Αποτελέσματα φασματοφωτομετρικού προσδιορισμού

Δείγμα	A (nm)	Συγκέντρωση σε g/L
Γλυκόζη 5 gr/l	0,532	4,86
Ζυθογλεύκος με αραιώση 1:10	0,784	7,21

Με τον φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό εξετάστηκε μόνο δείγμα γλυκόζης και έδωσε σχετικά ακριβές αποτέλεσμα για αυτήν. Ακόμα, εξετάστηκε και δείγμα γλεύκους ζύθου με αραιώση

1:10 για το οποίο το αποτέλεσμα έχει μεγάλη διαφορά σε σχέση με τα αντίστοιχα των μεθόδων Lane-Eynon και Lüff.

#### 4.4 . Ενζυμική Μέθοδος

Τα διαλύματα σακχάρων μετρήθηκαν και με χρήση ενζυμικού αυτόματου αναλυτή με χρήση ενζυμικού kit για το προσδιορισμός γλυκόζης και φρουκτόζης και τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 4.1.

Πίνακας 4.1 Αποτελέσματα Ενζυμικού Προσδιορισμού

Δείγματα	g σακχάρων / L
Γλυκόζη 5 g/l	5,45
Φρουκτόζη 5 g/l	5,16
Σακχαρόζη ιμπερτοποιημένη 5 g/l	4,88
Μαλτόζη ιμπερτοποιημένη 5 g/l	0,08

Τα αποτελέσματα του ενζυμικού προσδιορισμού έδειξαν πως η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την μέτρηση γλυκόζης και φρουκτόζης, αλλά και ιμπερτοποιημένης σακχαρόζης με μικρή απόκλιση. Τα αποτελέσματα για την ιμπερτοποιημένη μαλτόζη ωστόσο είχαν μεγάλη διαφορά από την πραγματική τους τιμή. Για να γίνει η μέτρηση της μαλτόζης και της σακχαρόζης πρέπει πρώτα να υδρολυθούν στα συστατικά τους. Πιθανόν, η ιμπερτοποίηση της μαλτόζης να μην είχε γίνει ικανοποιητικά στο παρόν πείραμα ή το kit του ενζυμικού έλεγχου να μην είναι κατάλληλο για τον ποσοτικό προσδιορισμό της μαλτόζης. Δείγμα ζύθου και γλεύκους δεν προσδιορίστηκε πειραματικά ως προς την περιεκτικότητα των αναγόντων σακχάρων, καθώς η άνω μέθοδος χρησιμοποιείται μόνο όταν το είδος του σακχάρου είναι γνωστό και δεν συνυπάρχει με άλλα.

## 5 Συμπεράσματα

Συγκριτικά, όλες οι μέθοδοι που εξετάστηκαν λειτουργούν καλά για τον προσδιορισμό των μονοσακχαριτών, ενώ για την μέτρηση των δισακχαριτών, η μαλτόζη δεν προσδιορίστηκε από τις μεθόδους, πέρα από την Lane-Eynon, πιθανόν λόγω μη επαρκούς υδρόλυσης της. Ακόμα, η σακχαροπεριεκτικότητα του γλεύκους που μετρήθηκε με την μέθοδο Lane-Eynon ήταν αρκετά παρόμοια με εκείνη της μεθόδου Lüff με μικρή απόκλιση μεταξύ τους, όμως και οι δυο έχουν μεγάλη απόκλιση από το αποτέλεσμα της μεθόδου του φασματοφωτομετρικού προσδιορισμού. Επομένως οι δύο πρώτες είναι κατάλληλες για τον προσδιορισμό αναγόντων σακχάρων στο γλεύκος. Η μέθοδος Lane-Eynon επιπρόσθετα λειτούργησε για δείγμα μύρας εμπορίου τύπου lager.

Σύμφωνα με τα πειραματικά αποτελέσματα, η μέθοδος Lane-Eynon φαίνεται ότι είναι η καταλληλότερη για τον προσδιορισμό αναγόντων σακχάρων σε δείγματα ζύθου και ζυθογλεύκους. Μάλιστα, φάνηκε να πλεονεκτεί στον προσδιορισμό δισακχαριτών και των αναγόντων σακχάρων στο δείγματα ζύθου που προσδιορίστηκε. Βέβαια ένα ερώτημα γεννάται κατά πόσο η ιμβερτοποίηση είναι ένα απαραίτητο στάδιο στην μέθοδο Lane-Eynon, καθώς ως επίσημη μέθοδος δεν αναφέρει κάτι σχετικά, ενώ στην παρούσα εργασία φάνηκε να είναι απαραίτητο. Περαιτέρω μελέτες χρειάζονται προς αποσαφήνιση.

# Βιβλιογραφία

## Ελληνική και ξένη βιβλιογραφία

1. Hornsey, I.S. (2016). Beer: History and Types. Encyclopedia of Food and Health (pp. 345-354). Academic Press
2. <https://zythos.webnode.gr/>
3. [https://www.beeroskopio.com/2014/05/blog-post\\_5701.html](https://www.beeroskopio.com/2014/05/blog-post_5701.html) Παναγιώτης Στεφανιδάκης - Ιστορία της μύρας στην Ελλάδα - beeroskopio.com
4. <https://athenianbrewery.gr/mia-elliniki-istoria/> Αθηναϊκή ζυθοποιία- Μια ελληνική ιστορία- athenianbrewery.gr
5. <https://www.ellinikienosizithopoion.gr/ta-panta-gia-thn-mpyra/#>
6. Νεραντζής Η., Ταταρίδης Π., Κεχαγιά Δ., (2014). Τεχνολογίες Βύνης και Ζύθου. Βιβλιοθήκη του ζύθου.
7. <https://www.newsbeast.gr/world/arthro/669941/i-istoria-tis-buras>
8. <https://winewalker.gr/index.php/blog/322-2019-01-14-07-31-44>
9. <https://www.houseofwine.gr/how/>
10. <http://www.euro-glass.com.gr/Article/i-istoria-tis-empfialomenis-mpuras-WCN-00337>
11. <https://delphipages.live/el/%CE%B4%CE%B9%CE%AC%CF%86%CE%BF%CF%81%CE%B1/emile-christian-hansen>
12. <https://enallaktikidrasi.com/2018/11/likiskos-therapeutikes-idiotites-tropoi-xrisis/>
13. Moll, M., (1979). Water in malting and brewing. Brewing science, 1, Academic Press, London, 1979, pp. 539-577.
14. Taylor, T. G., (1988). The impact of water quality on beer quality. The Brewer 74:532-536
15. Hardwick, W. A., (1995). Handbook of Brewing, Marcel Dekker, New York.
16. Griffiths, A. R., (1998). Water quality in the food and drink industries. Chandos Publishing (Oxford) Ltd, Oxford, 1998, pp.8-13
17. Taylor, D. G., (1989). The treatment of water at the brewery, Ferment, 2:76-79.
18. Verlag, H. C., (2001). Water in Brewing. Manual of Good Practice, Vol. 8. Nuernberg.
19. [https://web.archive.org/web/20090425092509/http://www.minagric.gr/Greek/agro\\_pol/Maps/kri thari1.htm](https://web.archive.org/web/20090425092509/http://www.minagric.gr/Greek/agro_pol/Maps/kri thari1.htm)
20. Stoskopf, N. C., (1985). Cereal grain crops. Reston Publishing Company inc.
21. <https://zythopedia.eu/zythopedia>
22. Bamforth, C.W. (2003). BEERS | History and Types. Encyclopedia of Food Sciences and

- Nutrition (Second Edition) (pp. 418-419). University of California, Davis, CA, USA Academic Press.
23. <https://docplayer.gr/5999464-O-ellinikos-aytofyis-lykiskos-kai-i-dynatotita-kalliergeias-toy-lykiskoy-stin-ellada.html>
  24. [http://www.beer.gr/articles/ingredients-hops/?fbclid=IwAR1fFnNnLav5B3TjGJHlarNLfNYExOQXwcoyWGYKL7kXAlvDAQYDT45\\_Eal](http://www.beer.gr/articles/ingredients-hops/?fbclid=IwAR1fFnNnLav5B3TjGJHlarNLfNYExOQXwcoyWGYKL7kXAlvDAQYDT45_Eal)
  25. <https://www.beercatalog.gr/>
  26. Briggs, D. E., Brookes, P. A., Stevens, R. B. C. A., & Boulton, C. A. (2004). *Brewing: science and practice* (Vol. 108). Woodhead Publishing.
  27. <https://beerandbrewing.com/dictionary/uHRqqHXWGJ/>
  28. <https://www.beeroskopio.com/2017/04/hops-oils.html>
  29. Verzele, M. (1986). 100 years of hop chemistry and its relevance to brewing. *Journal of the Institute of Brewing*, 92(1), 32-48.
  30. Steinhaus, M., Wilhelm, W., & Schieberle, P. (2007). Comparison of the most odour-active volatiles in different hop varieties by application of a comparative aroma extract dilution analysis. *European Food Research and Technology*, 226(1), 45-55.
  31. Irwin, A. J., Murray, C. R., & Thompson, D. J. (1985). An investigation of the relationships between hopping rate, time of boil, and individual alpha-acid utilization. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 43(3), 145-152.
  32. Kurtzman, C. P., & Piškur, J. (2006). Taxonomy and phylogenetic diversity among the yeasts. In *Comparative Genomics* (pp. 29-46). Springer, Berlin, Heidelberg.
  33. Kurtzman, C. P., & Fell, J. W. (2006). Yeast systematics and phylogeny—implications of molecular identification methods for studies in ecology. In *Biodiversity and ecophysiology of yeasts* (pp. 11-30). Springer, Berlin, Heidelberg.
  34. Hoffman, C. S., Wood, V., & Fantes, P. A. (2015). An ancient yeast for young geneticists: a primer on the *Schizosaccharomyces pombe* model system. *Genetics*, 201(2), 403-423.
  35. [http://archive.eclass.uth.gr/eclass/modules/document/file.php/SEYB132/6\\_%CE%93%CE%BB%CF%85%CE%BA%CF%8C%CE%BB%CF%85%CF%83%CE%B7\\_%CE%B3%CE%BB%CF%85%CE%BA%CE%BF%CE%BD%CE%B5%CE%BF%CE%B3%CE%AD%CE%BD%CE%B5%CF%83%CE%B7.pdf](http://archive.eclass.uth.gr/eclass/modules/document/file.php/SEYB132/6_%CE%93%CE%BB%CF%85%CE%BA%CF%8C%CE%BB%CF%85%CF%83%CE%B7_%CE%B3%CE%BB%CF%85%CE%BA%CE%BF%CE%BD%CE%B5%CE%BF%CE%B3%CE%AD%CE%BD%CE%B5%CF%83%CE%B7.pdf)
  36. Kurtzman, C. P. (1994). Molecular taxonomy of the yeasts. *Yeast*, 10(13), 1727-1740.
  37. Legras, J. L., Merdinoglu, D., Cornuet, J. M., & Karst, F. (2007). Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. *Molecular ecology*, 16(10), 2091-2102.

38. Özer Uyar, G. E. (2009). Cloning and characterization of trehalose-6-phosphate synthase gene from *rhizopus oryzae*.
39. Fonseca, A., & Inácio, J. (2006). Phylloplane yeasts. In Biodiversity and ecophysiology of yeasts (pp. 263-301). Springer, Berlin, Heidelberg
40. [https://users.auth.gr/klitinas/%CE%93%CE%B5%CE%BD%CE%B9%CE%BA%CE%AE%20%CE%A7%CE%B7%CE%BC%CE%B5%CE%AF%CE%B1%20%CE%94%CE%B1%CF%83%CE%BF%CE%BB%CE%BF%CE%B3%CE%AF%CE%B1%CF%82/%CE%94%CE%B1%CF%83%CE%BF%CE%BB%CE%BF%CE%B3%CE%AF%CE%B1%CE%A3%CE%AC%CE%BA%CF%87%CE%B1%CF%81%CE%B1\\_%CE%9B%CE%B9%CF%80%CE%AF%CE%B4%CE%B9%CE%B1.pdf](https://users.auth.gr/klitinas/%CE%93%CE%B5%CE%BD%CE%B9%CE%BA%CE%AE%20%CE%A7%CE%B7%CE%BC%CE%B5%CE%AF%CE%B1%20%CE%94%CE%B1%CF%83%CE%BF%CE%BB%CE%BF%CE%B3%CE%AF%CE%B1%CF%82/%CE%94%CE%B1%CF%83%CE%BF%CE%BB%CE%BF%CE%B3%CE%AF%CE%B1%CE%A3%CE%AC%CE%BA%CF%87%CE%B1%CF%81%CE%B1_%CE%9B%CE%B9%CF%80%CE%AF%CE%B4%CE%B9%CE%B1.pdf)
41. Khadka, Yagya Rath. "CARBOHYDRATES-A Brief Deliberation with Bio-aspect." COGNITION: A Peer Reviewed Transdisciplinary Research Journal, vol. 4, no. 1, January 2022, ISSN: 2392-462
42. [http://195.134.76.37/chemicals/chem\\_glucose.htm](http://195.134.76.37/chemicals/chem_glucose.htm)
43. Σπηλιόπουλος Ι., Βάκρος Ι., Ξαπλαντέρη Μ., (2015). Χημεία. Στοιχεία γενικής, οργανικής και βιολογικής χημείας. Υδατάνθρακες. Ελληνικά ακαδημαϊκά ηλεκτρονικά συγγράμματα και βοηθήματα, σελ.313-328
44. [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic\\_Chemistry/Map%3A\\_Organic\\_Chemistry\\_%28Vollhardt\\_and\\_Schore%29/17%3A\\_Aldehydes\\_and\\_Ketones\\_-\\_The\\_Carbonyl\\_Group/17.07%3A\\_Addition\\_of\\_Alcohols\\_to\\_Form\\_Hemiacetals\\_and\\_Acetals](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Map%3A_Organic_Chemistry_%28Vollhardt_and_Schore%29/17%3A_Aldehydes_and_Ketones_-_The_Carbonyl_Group/17.07%3A_Addition_of_Alcohols_to_Form_Hemiacetals_and_Acetals)
45. <http://archive.eclass.uth.gr/eclass/modules/document/file.php/SEYC199/%CE%94%CE%99%CE%91%CE%9B%CE%95%CE%9E%CE%95%CE%99%CE%A3/5.%20%CE%9C%CE%9F%CE%9D%CE%9F%CE%A3%CE%91%CE%9A%CE%A7%CE%91%CE%A1%CE%99%CE%A4%CE%95%CE%A3%20-%CE%A3%CE%A5%CE%9D%CE%98%CE%95%CE%A4%CE%9F%CE%99%20%CE%A5%CE%94%CE%91%CE%A4%CE%91%CE%9D%CE%98%CE%A1%CE%91%CE%9A%CE%95%CE%A3%20%CE%9A%CE%91%CE%99%20%CE%A0%CE%91%CE%A1%CE%91%CE%93%CE%A9%CE%93%CE%91.pdf>
46. Novak, I. (2008). Group Theory and Fischer Projections. Chemical Educator, 13(1), 1-2. Retrieved from <http://chemeducator.org/bibs/0013001/13080001in.htm>
47. Mak, C.H. (2018) ‘A simple paper model illustrates how to cyclize monosaccharides from Fischer projections to Haworth’, Journal of Chemical Education, 95(8), pp. 1336–1339
48. [https://eclass.uth.gr/modules/document/file.php/VET\\_U\\_214/7\\_%CE%A5%CE%B4%CE%B1%CF%84%CE%AC%CE%BD%CE%B8%CF%81%CE%B1%CE%BA%CE%B5%CF%82.pdf](https://eclass.uth.gr/modules/document/file.php/VET_U_214/7_%CE%A5%CE%B4%CE%B1%CF%84%CE%AC%CE%BD%CE%B8%CF%81%CE%B1%CE%BA%CE%B5%CF%82.pdf)



49. <https://www.food-info.net/gr/qa/qa-fi31.htm>
50. Windhausen, A. B. (Year). Basic Brewing Enzymology: A beginner's primer on enzymes in beer. Presented at the Craft Brewers Conference and BrewExpo America, Brewers Association.
51. Karki, P., Andrew and Aryal, S. (2023) Reducing sugars- definition, characteristics, examples, uses, Microbe Notes.
52. Hantzidiamantis PJ, Awosika AO, Lappin SL. Physiology, Glucose. [Updated 2022 Sep 19]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-.
53. Dholariya SJ, Orrick JA. Biochemistry, Fructose Metabolism. [Updated 2022 Oct 17]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-.
54. Σεχάντε. Α. Νικολού. Β. ( 2021) "Προέλευση και προσδιορισμός βασικών ενώσεων." Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής. Σχολή Επιστημών Τροφίμων. Τμήμα Επιστημών Οίνου, Αμπέλου και Ποτών. Χημεία Οίνων και Ποτών.
55. <https://byjus.com/jee/maltose-structure/>
56. Healey, D. (2023) *Non-fermentable sugar – a vital component of brewing, Winning Homebrew.*
57. Influence of kilning temperature on chemical composition of a Greek barley malt and its wort properties - Scientific Figure on ResearchGate.
58. The Production of Secondary Metabolites with Flavour Potential during Brewing and Distilling Wort Fermentations - Scientific Figure on ResearchGate.
59. Aryal, S. (2022). Benedict's Test: Principle, Composition, Preparation, Procedure and Result Interpretation.
60. Tiwari, A. (2015). Practical Biochemistry: A Student Companion. LAP Lambert Academic Publishing. Pp 4-16
61. Sapkota, A. (2022). Barfoed's Test: Definition, Principle, Procedure, Result, Uses. Edited by S. Aryal.
62. Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. (2022). Κεφάλαιο Εργαστηρίου 8 Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας [PDF αρχείο] Σελίδες 200-224 .
63. Bosch-Reig, F., Macon, M. J., Minana, M. D., & Cabello, M. L. (1992). Separation and identification of sugars and maltodextrines by thin layer chromatography: Application to biological fluids and human milk. *Talanta*, 39(11), 1493-1498.
64. Sapkota, A. (2022) Tollens' Test- Definition, Principle, Procedure, Result, Uses. Edited By Aryal, S. [Online] Microbe Notes.
65. Sirromet Wines Pty Ltd. Determination of Reducing Sugar Content: Clinitest, Benedict's Solution and the Rebelein Titration.
66. Schliessmann, C. (2015). Determination of sugar according to Dr. Rebelein.

67. Chandraju, S., Kumar, C. S. C., & Venkatesh, R. (2014). Estimation of reducing sugar by acid hydrolysis of black grape (*Vitis vinifera* L.) peels by standard methods. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 6(5), 862-866. University of Mysore. [www.jocpr.com](http://www.jocpr.com)
68. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EL/TXT/HTML/?uri=CELEX:31979L0796&from=ES>
69. Κοτσερίδης Γ., Εργαστηριακές Σημειώσεις- Κεφάλαιο VII. ΜΕΤΡΗΣΗ ΑΝΑΓΟΝΤΩΝ ΣΑΚΧΑΡΩΝ – LUF Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
70. OIV. (2009). Reducing Substances (Method OIV-MA-AS311-01A, Type IV method). In *Compendium of International Methods of Analysis-OIV (Resolution Oeno 377/2009)*.
71. <https://people.umass.edu/~mcclemen/581Carbohydrates.html>
72. American Society of Brewing Chemists. Beer-12: Reducing Sugars (Copper Reducing Substances)
73. Japan Customs. (2001). Japan Customs Analysis Method No. 114-R1: Quantitative Analysis of Reducing Sugars in Sugar Preparations Consisting of Sugar and Dextrin (Issued in June 1999, Updated in May 2001).
74. SASTA. (2005). Method 3.9: Reducing Sugars (L&E) - Juices: Reducing Sugars by the Lane and Eynon Method. Revised July 2005.
75. Kaczmarek, M. (n.d) . Estimation of reducing sugar by Nelson-Somogyi method.
76. International Organisation of Vine and Wine (OIV). (2016). Dosage of sugars in wine by HPLC (Method OIV-MA-AS311-03, Type II method). In *Compendium of International Methods of Analysis-OIV (Resolution Oeno 526/2016)*.
77. Microbiology Note. (2023). High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Microbiology Note.
78. Ρούσσης .Ι. Μπαδέκα . Α. (2020). Σημειώσεις Εργαστηρίου Ανάλυσης και Τεχνολογίας Τροφίμων Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Τμήμα Χημείας σελίδες 11-16
79. <https://www.steroglass.it/en/multiparametric-analyzer-hyperlab-smart>

## Παραρτήματα

**Παράρτημα Α.** Πίνακας με τους παράγοντες της μεθόδου Lane-Eynon<sup>1</sup> για 25ml του διαλύματος Soxhlet<sup>2</sup>

Διάλυμα σακχάρου που απαιτείτε για την ογκομέτρηση (ml)	Ιμβερτοποιημένο σάκχαρο σε απουσία της σουκρόζης	Ιμβερτοποιημένο σάκχαρο σε παρουσία 1 γραμμαρίου σουκρόζης ανά 100 ml	Δεξτρόζη	Άνυδρη Μαλτόζη C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>
15	123,6	122,6	120,2	197,8
16	123,6	122,7	120,2	197,4
17	123,6	122,7	120,2	197,0
18	123,7	122,7	120,2	196,7
19	123,7	122,8	120,3	196,5
20	123,8	122,8	120,3	196,2
21	123,8	122,8	120,3	195,8
22	123,9	122,9	120,4	195,5
23	123,9	122,9	120,4	195,1
24	124,0	122,9	120,5	194,8
25	124,0	123,0	120,5	194,5
26	124,1	123,0	120,6	194,2
27	124,1	123,0	120,6	193,9
28	124,2	123,1	120,7	193,6
29	124,2	123,1	120,7	193,3
30	124,3	123,1	120,8	193,0
31	124,3	123,2	120,8	192,8
32	124,4	123,2	120,8	192,5
33	124,4	123,2	120,9	192,2
34	124,5	123,3	120,9	191,9
35	124,5	123,3	121,0	191,7
36	124,6	123,3	121,0	191,4
37	124,6	123,4	121,1	191,2
38	124,7	123,4	121,2	191,0
39	124,7	123,4	121,2	190,8
40	124,8	123,4	121,2	190,5
41	124,8	123,5	121,3	190,3
42	124,9	123,5	121,4	190,1
43	124,9	123,5	121,4	189,8
44	125,0	123,6	121,5	189,6
45	125,0	123,6	121,5	189,4
46	125,1	123,6	121,6	189,2
47	125,1	123,7	121,6	189,0
48	125,2	123,7	121,7	188,9
49	125,2	123,7	121,7	188,8
50	125,3	123,8	121,8	188,7

<sup>1</sup>Παραγοντες που αντιπροσωπεύουν το βάρος σε μιλιγραμμάρια των σακχάρων που απαιτούνται για να μειώσουν 25 ml από το διάλυμα Soxhlet

<sup>2</sup>Βασισμένο σε δεδομένα που δόθηκαν από το U.S. Bureau of Standards, Circular No. 44.

**Παράρτημα Β.** Πίνακας για μετατροπή των καταναλώσεων  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  ( n' - n ) σε mg αναγόντων σακχάρων / 25 ml δείγματος . Δίνει την τιμή « k ».

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 N (mL)	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
0	0,00	0,24	0,48	0,72	0,96	1,20	1,44	1,68	1,92	2,16
1	2,40	2,64	2,88	3,12	3,36	3,60	3,84	4,08	4,32	4,56
2	4,80	5,05	5,30	5,55	5,80	6,05	6,30	6,55	6,80	7,05
3	7,20	7,45	7,70	7,95	8,20	8,45	8,70	8,95	9,20	9,45
4	9,70	9,95	10,20	10,45	10,70	10,95	11,20	11,45	11,70	11,95
5	12,20	12,45	12,70	12,95	13,20	13,45	13,70	13,95	14,20	14,45
6	14,70	14,95	15,20	15,45	15,70	15,95	16,20	16,45	16,70	16,95
7	17,20	17,46	17,72	17,98	18,24	18,50	18,76	19,02	19,28	19,54
8	19,80	20,06	20,32	20,58	20,84	21,10	21,36	21,62	21,88	22,14
9	22,40	22,66	22,92	23,18	23,44	23,70	23,96	24,22	24,48	24,74
10	25,00	25,26	25,52	25,78	26,04	26,30	26,56	26,82	27,08	27,34
11	27,60	27,87	28,14	28,41	28,68	28,95	29,22	29,49	29,76	30,03
12	30,30	30,57	30,84	31,11	31,38	31,65	31,92	32,19	32,46	32,73
13	33,00	33,27	33,54	33,81	34,08	34,35	34,62	34,89	35,16	35,43
14	35,70	35,98	36,26	36,54	36,82	37,10	37,38	37,66	37,94	38,22
15	38,50	38,78	39,06	39,34	39,62	39,90	40,18	40,46	40,74	41,02
16	41,30	41,59	41,88	42,17	42,46	42,75	43,04	43,33	43,62	43,91
17	44,20	44,49	44,78	45,07	45,36	45,65	45,94	46,23	46,52	46,81
18	47,10	47,39	47,68	47,97	48,26	48,55	48,84	49,13	49,42	49,71
19	50,00	50,30	50,60	50,90	51,20	51,50	51,80	52,10	52,40	52,70
20	53,00	53,30	53,60	53,90	54,20	54,50	54,80	55,10	55,40	55,70
21	56,00	56,31	56,62	56,93	57,24	57,55	57,86	58,17	58,48	58,79
22	59,10	59,41	59,72	60,03	60,34	60,65	60,95	61,27	61,58	61,89