



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

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Σύγκριση μεθόδων Ανάλυσης Αναγόντων Σακχάρων στη Μύρα

Κουκοβίνη Αικατερίνη,
ΑΜ: 718141043
Κριτή Ειρήνη – Αικατερίνη,
ΑΜ: 718141052

Επιβλέπων: Σεχάντε Αντνάν

ΑΘΗΝΑ, ΙΟΥΛΙΟΣ – 2022

ΔΗΛΩΣΗ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

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

«Σύγκριση μεθόδων Ανάλυσης Αναγόντων Σακχάρων στη Μύρα»

και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

<p>Ψηφιακή Υπογραφή Επιβλέποντα Καθηγητή (1^ο Μέλους Επιτροπής) Σεχάντε Αντνάν</p>	
<p>Ψηφιακή Υπογραφή Καθηγητή (2^ο Μέλους Επιτροπής) Ταταρίδης Παναγιώτης</p>	
<p>Ψηφιακή Υπογραφή Καθηγητή (3^ο Μέλους Επιτροπής) Ευαγγέλου Αλεξάνδρα</p>	

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΩΝ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Οι κάτωθι υπογράφουσες Κουκοβίνη Αικατερίνη του Ιωάννη, με αριθμό μητρώου 718141043 και Κριτή Ειρήνη – Αικατερίνη του Θεοδώρου, με αριθμό μητρώου 718141052 φοιτήτριες του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστημών Οίνου, Αμπέλου και Ποτών, δηλώνουμε υπεύθυνα ότι:

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

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

Η Δηλούσα

Κουκοβίνη Αικατερίνη

(Ονοματεπώνυμο & Υπογραφή)

Η Δηλούσα

Κριτή Ειρήνη – Αικατερίνη

(Ονοματεπώνυμο & Υπογραφή)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μύρα είναι ένα αλκοολούχο ποτό, γνωστό από την αρχαιότητα. Έχει ως πρώτες ύλες το νερό που αποτελεί το 90%, το κριθάρι ως αμυλούχο υπόστρωμα το οποίο μετά την υδρόλυσή του θα δώσει τα σάκχαρα, το λυκίσκο, ο οποίος προσδίδει γεύση και άρωμα και τις ζύμες που είναι απαραίτητες στην αλκοολική ζύμωση. Στην διαδικασία της βυνοποίησης, η βύνη απελευθερώνει φυσικά ένζυμα που χρησιμοποιούνται για να μετατρέψουν το άμυλο σε σάκχαρα. Τα σάκχαρα αυτά, κατά τη ζύμωση, καταναλώνονται και μεταβολίζονται από τις ζύμες σε αλκοόλη και διοξείδιο του άνθρακα. Συγκεκριμένα, στο γλεύκος μύρας υπάρχει μαλτόζη σε ποσοστό 50% των υδατανθράκων του γλεύκους, μαλτοτριόζη 18%, γλυκόζη 10%, σακχαρόζη 8% και φρουκτόζη 2%, ενώ υπάρχουν και δεξτρίνες που καταλαμβάνουν το 12% των εναπομείναντων υδατανθράκων.

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία, θα παρουσιαστεί ο προσδιορισμός των αναγόντων σακχάρων που υπάρχουν στην μύρα με δύο μεθόδους καθώς και η σύγκριση των μεθόδων αυτών. Ειδικότερα, προσδιορίστηκαν τα ανάγοντα σάκχαρα γλυκόζη, φρουκτόζη και μαλτόζη και το μη ανάγον σάκχαρο σακχαρόζη με τη μέθοδο Luff και Lane – Eynon. Οι δύο αυτές μέθοδοι βασίζονται στην ιδιότητα των αναγόντων σακχάρων να οξειδώνονται κατά την αντίδραση με διάλυμα θειικού χαλκού.

Η μέθοδος Luff φάνηκε ότι λειτουργεί για τον προσδιορισμό της γλυκόζης, της φρουκτόζης και της σακχαρόζης, ενώ για την μαλτόζη οι τιμές δεν ήταν αναμενόμενες. Ομοίως, η μέθοδος Lane – Eynon φάνηκε ότι λειτουργεί για τα ίδια σάκχαρα, ενώ για τη μαλτόζη τα αποτελέσματα δεν ήταν ικανοποιητικά.

Συγκρίνοντας και τις δύο μεθόδους, συμπεραίνεται ότι η μέθοδος Luff και Lane – Eynon δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να προσδιορίσουν τα ανάγοντα σάκχαρα στη μύρα καθώς όπως αποδείχθηκε δεν λειτουργούν σε υδατικά διαλύματα.

Λέξεις κλειδιά: ανάγοντα σάκχαρα, γλυκόζη, μαλτόζη, μέθοδος Lane – Eynon, μέθοδος Luff, μύρα, σακχαρόζη, φρουκτόζη.

ABSTRACT

Beer is an alcoholic beverage, known since ancient times. Its raw materials are water, 90% of beer, barley, as a starchy substrate that releases sugars from its hydrolysis, hops, which imparts flavor and aroma, and the yeasts necessary for alcoholic fermentation. In the malting process, the malt releases natural enzymes that are used to convert starch into sugars. These sugars are consumed and metabolized by the yeasts into alcohol and carbon dioxide during fermentation. Specifically, the percentage of the carbohydrates in beer wort is 50% maltose, 18% maltotriose, 10% glucose, 8% sucrose and 2% fructose, while there are also dextrans that occupy 12% of the remaining carbohydrates.

This thesis presents and compares two methods used for the determination of the reducing sugars in beer. Specifically, Luff and Lane – Eynon methods were utilized for measuring the reducing sugars glucose, fructose and maltose and the non-reducing sugar sucrose. Both of these methods are based on the ability of the reducing sugars to be oxidized in the presence of copper sulfate.

From the utilized methods, both the Luff and the Lane–Eynon methods appeared to be effective for the quantification of glucose, fructose and sucrose but not of maltose. Specifically, the results from measuring maltose via the Lane–Eynon method were unsatisfactory. However, the comparison of the methods showed that both Luff and Lane–Eynon methods cannot be used in beer as they do not work efficiently in aqueous solutions.

Keywords: reducing sugars, glucose, maltose, Lane – Eynon method, Luff method, beer, sucrose, fructose.

*Αφιερώνουμε αυτή την πτυχιακή
η μία στην άλλη με πολλή αγάπη!!*

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Οινικών του τμήματος Επιστημών Οίνου, Αμπέλου και Ποτών, της σχολής Επιστημών Τροφίμων, του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή Σεχάντε Αντνάν κατά το ακαδημαϊκό έτος 2021 – 2022, στα πλαίσια ολοκλήρωσης του κύκλου σπουδών μας στη σχολή.

Αρχικά, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε τον υπεύθυνο της διπλωματικής εργασίας μας κύριο Σεχάντε Αντνάν για την ανάθεση του θέματος, την επιστημονική του καθοδήγηση και τη διαρκή προθυμία του για συζήτηση και επιπλέον συμβουλές που ήταν καθοριστικά για την επιτυχή ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

Θα θέλαμε επιπλέον να ευχαριστήσουμε τον κύριο Ταταρίδη Παναγιώτη διότι μας προσέφερε και εκείνος την πολύτιμη βοήθεια του σε προβλήματα που προέκυψαν, την κυρία Χατζηλαζάρου Αρχοντούλα, την κυρία Ευαγγέλου Αλεξάνδρα καθώς επίσης και την κυρία Ξηρογιάννη Αικατερίνη για τη συνεργασία και το κλίμα αλληλεγγύης που επέδειξαν.

Κλείνοντας, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε η μία την άλλη καθώς και όλους τους αγαπημένους φίλους μας που μας γέμισαν τα φοιτητικά μας χρόνια με γλυκές αναμνήσεις.

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

Πίνακας περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	i
ABSTRACT	ii
Αφιέρωση	iii
Ευχαριστίες.....	iv
Κατάλογος Πινάκων.....	vii
Κατάλογος Εικόνων	viii
Συντμήσεις, ακρωνύμια, σύμβολα και ορισμοί	ix
1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1
1.1. Εισαγωγή.....	1
1.2. Ιστορική αναδρομή	1
1.2.1. Η μύρα στην Ελλάδα.....	4
1.3. Συστατικά μύρας	4
1.3.1. Νερό	4
1.3.2. Κριθάρι.....	7
1.3.3. Λυκίσκος.....	11
1.3.4. Ζύμες.....	14
1.4. Στάδια παραγωγής της Μύρας	16
1.4.1. Στάδια βυνοποίησης.....	16
1.4.2. Στάδια ζυθοποίησης	17
1.5. Σάκχαρα	23
1.5.1. Ταξινόμηση των σακχάρων	23
1.5.2. Ο ρόλος των σακχάρων.....	28
1.5.3. Ανάγοντα σάκχαρα – ζυμώσιμα.....	28
1.5.4. Αζύμωτο σάκχαρο.....	30
1.5.5. Μέθοδοι προσδιορισμού σακχάρων.....	31
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	36
2.1. Μέθοδος Luff.....	36
2.1.1. Αντιδραστήρια	36
2.1.2. Εξοπλισμός.....	36

2.1.3. Παρασκευή αντιδραστηρίων	37
2.1.4. Προετοιμασία δειγμάτων	38
2.1.5. Πειραματική πορεία	40
2.1.6. Υπολογισμός αναγόντων σακχάρων	41
2.2. Μέθοδος Lane – Eynon.....	42
2.2.1. Αντιδραστήρια	42
2.2.2. Εξοπλισμός.....	42
2.2.3. Παρασκευή αντιδραστηρίων	43
2.2.4. Προετοιμασία δειγμάτων	44
2.2.5. Πειραματική πορεία	45
2.3. Μέθοδος Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πιέσεως (HPLC).....	46
2.3.1. Εξοπλισμός.....	46
2.3.2. Προετοιμασία δειγμάτων	46
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ	49
3.1. Αποτελέσματα μεθόδου Luff	49
3.2. Αποτελέσματα μεθόδου Lane – Eynon.....	52
3.3. Αποτελέσματα μεθόδου HPLC	53
3.4. Συζήτηση – Σύγκριση αποτελεσμάτων	53
Βιβλιογραφία	55

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1.1 Εξωτερική όψη και χρώμα κριθαριού.	9
Πίνακας 2.1 Πίνακας μετατροπής των καταναλωθέντων mL Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 N (n' - n) σε ανάγοντα σάκχαρα (mg). Η 1η στήλη (1,2,3...22,22) είναι το ακέραιο μέρος της διαφοράς (n' - n) , ενώ η 1η γραμμή (0,0...0,9) δείχνει το δεκαδικό μέρος της διαφοράς αυτής. Το σημείο όπου τέμνονται οι δύο αριθμοί εκφράζει την τιμή « k ».....	41
Πίνακας 3.1 Αποτελέσματα μεθόδου Luff και στατιστική ανάλυση.	49
Πίνακας 3.2 Κατανάλωση διαλύματος θειοθειικού νατρίου Na ₂ S ₂ O ₃ που αντιστοιχεί στα δείγματα, κατανάλωση διαλύματος θειοθειικού νατρίου Na ₂ S ₂ O ₃ που αντιστοιχεί στο τυφλό, διαφορά των δύο αυτών τιμών και αντιστοιχεία σε mg αναγόντων σακχάρων.....	51
Πίνακας 3.3 Πραγματική συγκέντρωση σακχάρων και αποτελέσματα προσδιορισμού σακχάρων με την μέθοδο Luff.	51
Πίνακας 3.4 Αποτελέσματα μεθόδου Lane - Eynon και στατιστική ανάλυση.	52
Πίνακας 3.5 Καταναλώσεις δειγμάτων εκφρασμένες σε g αναγόντων σακχάρων που αντιστοιχούν στα 25mL διαλύματος Soxhlet, της μεθόδου Lane – Eynon.....	53

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1. Κατά μήκος τομή κόκκου κριθαριού.....	9
Εικόνα 2. Μορφές λυκίσκου. Άνθη, pellets και εκχύλισμα, από τα αριστερά προς τα δεξιά..	12
Εικόνα 3. Μετατροπή πυροσταφυλικού σε ακεταλδεΐδη με τη δράση της πυροσταφυλικής αποκαρβοξυλάσης και τη μετατροπή της ακεταλδεΐδης σε αιθανόλη με τη δράση της αλκοολικής αφυδρογονάσης.	15
Εικόνα 4. Στάδια παραγωγής μπύρας.	22
Εικόνα 5. Η εικόνα της γλυκόζης (αλδοεξόζης) αριστερά και η εικόνα της φρουκτόζης (κετόζης) δεξιά.	23
Εικόνα 6. Η εικόνα της α-d-γλυκόζης αριστερά και η εικόνα της β-d-γλυκόζης δεξιά.....	25
Εικόνα 7. Δομές Σακχαρόζης, Μαλτόζης και Λακτόζης, από τα αριστερά προς τα δεξιά.....	26

Συντμήσεις, ακρωνύμια, σύμβολα και ορισμοί

ATP	Adenosine triphosphate
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNS.....	Dinitrosalicylic acid
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
HPLC.....	High-performance liquid chromatography
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide
NADP ⁺	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NADPH.....	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
RNA	Ribonucleic acid
TLC	Thin-layer chromatography
UV	Ultraviolet

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία αναλύονται τα τέσσερα βασικά συστατικά της μύρας, τα στάδια παραγωγής της καθώς επίσης και τα σάκχαρα που συναντώνται σε αυτή. Επιπλέον, αναφέρονται οι τρόποι προσδιορισμού των σακχάρων και ειδικότερα των αναγόντων που αποτελούν και αντικείμενο της παρούσας εργασίας. Ακολουθεί η περιγραφή των μεθόδων που εφαρμόστηκαν πειραματικά και τέλος τα αποτελέσματα της εργασίας.

1.2 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Δεν έχει χρονολογηθεί με ακρίβεια το πότε ξεκίνησε η παρασκευή της μύρας και από ποιον.¹ Οι ιστορικοί, ωστόσο, αποδίδουν την γέννησή της στους Σουμέριους, περίπου το 4000 π.Χ.² Οι οποίοι τυχαία ανακάλυψαν την ζύμωση,³ μέσω της παραγωγής ψωμιού⁴ από κριθάρι. Ειδικότερα, οι Σουμέριοι πρόσθεταν στους άρτους επαρκή ποσότητα νερού μετά το ψήσιμό τους. Μια ημέρα, το υγρό αυτό μίγμα ξεχάστηκε στον ήλιο με αποτέλεσμα, μετά από λίγο καιρό, να ξεκινήσει να ζυμώνει. Έτσι λοιπόν, χωρίς να το καταλάβουν, κατάφεραν να δημιουργήσουν ένα ποτό με χαμηλό αλκοολικό τίτλο, το οποίο είχε ευχάριστη γεύση και βοηθούσε στην καλή λειτουργία του εντέρου.² Οι Σουμέριοι, μέσω αυτής της τυχαίας ανακάλυψης κατόρθωσαν να παράγουν 16 διαφορετικά είδη μύρας.⁵

Το 2000 π.Χ. οι Βαβυλώνιοι διαδέχτηκαν τους Σουμέριους.³ Γνωρίζοντας ήδη από τους Σουμέριους την διαδικασία παραγωγής μύρας, αύξησαν τον αριθμό των διαφορετικών ειδών μύρας στα είκοσι, εκ των οποίων τα οκτώ παράγονταν από δίκοκκο σιτάρι, οκτώ από κριθάρι και τέσσερα από μίγμα σπόρων. Οι μύρες τους όμως είχαν κάποια ελαττώματα. Δεν χαρακτηρίζονταν από την ίδια διαύγεια με τις σύγχρονες, παρέμεναν αφιλτράριστες και είχαν πικρή γεύση. Ωστόσο, κάτι τέτοιο δεν τους στάθηκε εμπόδιο για εξαγωγή της μύρας τους μέχρι και την Αίγυπτο, 1000 χιλιόμετρα μακριά.²

Μετά τους Βαβυλώνιους και σύμφωνα με τα όσα έγραψε ο αρχαίος Έλληνας ιστορικός Ηρόδοτος, η Αίγυπτος είναι η επόμενη στάση στην ιστορία της παραγωγής μύρας. Οι

Αιγύπτιοι γνώριζαν περίπου τέσσερα είδη μύρας. Όμως, προκειμένου να αναβαθμίσουν την γεύση της, πρόσθεταν χουρμάδες.²

Σειρά στην ιστορία της μύρας έχουν οι Ρωμαίοι. Στην αρχαία Ρώμη, η μύρα χαρακτηριζόταν ως το ποτό των βαρβάρων, διότι τότε, ξεκίνησε να ανεβαίνει η δημοτικότητα του κρασιού, το οποίο και αποκαλούσαν ποτό των θεών. Γι' αυτόν τον λόγο, η παραγωγή μύρας λάμβανε χώρα στις επαρχίες της Ρωμαϊκής αυτοκρατορίας, όπου δηλαδή δεν ήταν εφικτή η καλλιέργεια ή η προμήθεια σταφυλιών και η εισαγωγή κρασιού.^{1,2}

Η παλαιότερη απόδειξη κατασκευής μύρας είναι ένας αμφορέας που χρονολογείται από το 800 π.Χ., και βρέθηκε κοντά στην σημερινή πόλη της Γερμανίας Kulmbach.³ Οι αρχαίοι Γερμανοί (Τεύτονες) είχαν την μύρα, όχι μόνο για προσωπική χρήση, αλλά και για προσφορά στους θεούς κατά τις θυσίες τους.²

Στις αρχές της 1^{ης} χιλιετίας μ.Χ., οι μοναχοί ξεκίνησαν να ασχολούνται με την παραγωγή μύρας και έφτασαν μέχρι και το εμπόριο της, καθώς οι ποσότητες που παρήγαγαν ήταν υπεράριθμες για εσωτερική κατανάλωση. Οι μύρες αυτές ήταν εύγευστες, θρεπτικές και επιτρεπτές για την νηστεία. Ακόμα, χαρακτηρίζονταν από εξαιρετική ποιότητα και ανταποκρίθηκαν άμεσα στις ανάγκες των καταναλωτών, φέρνοντας έσοδα στα μοναστήρια που ήταν αρκετά για την συντήρησή τους.⁴ Ωστόσο, οι τότε ανώτατοι άρχοντες, βλέποντας την επιτυχία αυτού του προϊόντος, επέβαλαν φόρους στην παραγωγή και το εμπόριο της μύρας καθώς και υψηλά πρόστιμα. Οι μοναχοί όμως, δεν είχαν την οικονομική ευχέρεια να τα πληρώσουν, κι αυτό είχε ως επακόλουθο την συρρίκνωση των ζυθοποιείων τους (1368 – 1437 μ.Χ.).²

Τον 15^ο αιώνα, χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά ο λυκίσκος από τους Φλαμανδούς, οι οποίοι τον εισήγαγαν από την Αγγλία.³ Στο τέλος του 16^{ου} αιώνα (1591 μ.Χ.), ο λυκίσκος χρησιμοποιήθηκε και καθιερώθηκε ως συντηρητικό και αρωματικό συστατικό στην μύρα. Με αυτόν, η μύρα αποκάλυψε τον «πραγματικό της χαρακτήρα», ο οποίος είναι γνωστός μέχρι σήμερα. Ο λυκίσκος θεωρείται από την αρχαιότητα μέχρι σήμερα ένα φυτό με φαρμακευτικές και θεραπευτικές ιδιότητες. Συγκεκριμένα, θεραπεύει τις εντερικές ασθένειες και την φυματίωση, βοηθάει στην αντιμετώπιση του άγχους, της αϋπνίας και των ελκών, ενώ παράλληλα είναι τονωτικό, αντιπυρετικό και διουρητικό.⁶ Σήμερα καλλιεργείται σε όλο τον κόσμο και κυρίως στα ψυχρά κλίματα, ενώ γίνεται προσπάθεια για συστηματική καλλιέργεια και στην Ελλάδα.⁷

Η παραγωγή μύρας γνώρισε μεγάλη άνθιση στην Γερμανία η οποία εξήγαγε, μέσω της Βρέμης, μύρες σε άλλες χώρες όπως Αγγλία, Ολλανδία, Σκανδιναβικές χώρες, ενώ πόλεις της όπως το Αμβούργο είχαν εκατοντάδες ζυθοποιεία.² Το 1516 μ.Χ. ο Βαυαρός Δούκας Γουλιέλμος Δ', καθιέρωσε τον «Νόμο περί καθαρότητας»,^{1,2} σύμφωνα με τον οποίο οι πρώτες ύλες που έπρεπε να συμπεριλαμβάνονται στις μύρες ήταν το νερό, το κριθάρι και ο λυκίσκος. Δεν αναφέρθηκε κάτι για την μαγιά, εφόσον η επιστήμη δεν είχε προχωρήσει τόσο ώστε να γίνουν γνωστές οι ζύμες. Η ζύμωση γινόταν «στην τύχη» με την βοήθεια ζυμών αέρα.^{3,4}

Ο Ολλανδός Antoni van Leeuwenhoek, παρά το γεγονός ότι ήταν στο επάγγελμα υφασματέμπορος, είχε στην κατοχή του συλλογή από μεγεθυντικούς φακούς. Με τη χρήση αυτών το 1680 παρατήρησε ζυμομύκητες και σημείωσε ότι αποτελούνται από λεπτά σφαιρικά σωματίδια. Έτσι έγινε ο πρώτος άνθρωπος ο οποίος περιέγραψε τους λεγόμενους μικροοργανισμούς.⁸

Τον 19^ο αιώνα, ο Louis Jean Pasteur, όντας καθηγητής στο Πανεπιστήμιο της Lille, μελέτησε και ερμήνευσε τον ρόλο των ζυμών και την διαδικασία της ζύμωσης, ανακαλύπτοντας την παστερίωση. Διαπίστωσε, δηλαδή, μέσω μιας έρευνας που έκανε, ότι ενώ η επιθυμητή παραγωγή της αλκοόλης προκαλούταν από την ανάπτυξη μικροοργανισμών, ανεπιθύμητα προϊόντα της ζύμωσης οφείλονταν στη δράση άλλων μικροοργανισμών, όπως τα βακτήρια. Έτσι, πρότεινε σαν λύση αυτού του προβλήματος την θέρμανση της μύρας σε υψηλές θερμοκρασίες, προκειμένου να απομονωθούν και να θανατωθούν οι βλαβεροί αυτοί μικροοργανισμοί και να δοθεί στο τελικό προϊόν μεγαλύτερη διάρκεια ζωής.^{9,10}

Τον ίδιο αιώνα, μια νέα ανακάλυψη συνέβαλε σημαντικά στην παραγωγή μύρας. Ο Carl Von Linde ανακάλυψε την τεχνητή ψύξη που βοήθησε στην παραγωγή μύρας, παρά τις όποιες καιρικές συνθήκες και θερμοκρασίες επικρατούσαν.⁹

Στο τέλος του 19^{ου} αιώνα, ο Δανός επιστήμονας Emile Christian Hansen άρχισε να ασχολείται σε ερευνητικό επίπεδο με τις ζύμες που μετατρέπουν τους υδατάνθρακες σε αλκοόλ.¹¹ Συγκεκριμένα, ήταν ο πρώτος ο οποίος απομόνωσε επιτυχώς ένα καθαρό κύτταρο ζύμης, και αφού το ανέμειξε με ένα ζαχαρούχο διάλυμα, παρήγαγε περισσότερη ζύμη από ότι σε μια τράπεζα ζύμης. Η ζύμη αυτή ονομάστηκε από το εργαστήριο *Saccharomyces carlsbergensis* και είναι η ζύμη από την οποία προέρχονται όλες οι ζύμες που χρησιμοποιούνται στις μύρες lager.¹²

1.2.1 Η μύρα στην Ελλάδα

Το διάστημα 1840 – 1850, επί βασιλείας Όθωνος, ιδρύθηκαν τα πρώτα χειροκίνητα ζυθοποιεία στην Ελλάδα, κυρίως από Γερμανούς, με σκοπό να καλύψουν τις ανάγκες των Γερμανών αξιωματούχων και στρατιωτών, που υπηρετούσαν εκείνη την εποχή στην Ελλάδα, με ιδρυτές τους: Melcher, Fischer, Waweck και Seel.^{13,14} Ο Johann Fuchs, που είχε σπουδάσει ζυθοποιός στο Μόναχο, δούλεψε στο ζυθοποιείο του Melcher, που είχε έδρα στο σημερινό Νέο Ηράκλειο Αττικής, το οποίο και αγόρασε μετά τον θάνατο του Melcher, ιδρύοντας έτσι την ζυθοποιία Φιξ.^{13,14} Μετά τον θάνατό του, τον διαδέχτηκε ο Karl Johann Fuchs, του οποίου το εργοστάσιο ήταν το πρώτο που εμπορεύτηκε από την Ευρώπη μηχανήματα παραγωγής τεχνητού ψύχους (παγοποιείο).¹⁴ Ο γιος του, Anton Karl Fuchs, εγκαταλείπει επιχειρηματικά την οικογένεια και ανοίγει το δικό του εργοστάσιο, την «Άλφα».¹⁴

Το 1965 εισέρχεται στην Ελλάδα, η ολλανδική εταιρεία παραγωγής μύρας, Amstel ενώ πολύ αργότερα ακολουθούν κι άλλες ελληνικές εταιρείες (Ολυμπιακή Ζυθοποιία, Αθηναϊκή Ζυθοποιία, Πατραϊκή Ζυθοποιία, Ζυθοποιία Μακεδονίας Θράκης, Ζυθοποιία Σαντορίνης κ.ά.).¹⁴

1.3 ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΜΠΥΡΑΣ

Σύμφωνα με τον νόμο της καθαρότητας, η μύρα έπρεπε να έχει ως πρώτες ύλες το νερό, το κριθάρι, τον λυκίσκο και τις ζύμες.⁴ Πρόσφατα όμως η ελληνική νομοθεσία προσαρμόστηκε στην ευρωπαϊκή, κι έτσι σήμερα ως πρώτες ύλες μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες πηγές σακχάρων και αμύλου, όπως ζάχαρη, σιρόπι γλυκόζης ή/και μαλτόζης, ρύζι, βύνη σίτου κ.ά.

1.3.1 Νερό

Το νερό είναι το σημαντικότερο συστατικό της μύρας και αποτελεί το 90%.¹⁵ Επηρεάζει τόσο την ποιότητα όσο και τον χαρακτήρα της μύρας, αφού συμμετέχει σε πολλές επιμέρους διεργασίες. Επηρεάζεται από τα γεωλογικά χαρακτηριστικά της κάθε περιοχής με αποτέλεσμα να διαμορφώνει το τελικό προϊόν.¹⁶

1.3.1.1 Πηγές νερού για την παραγωγή μύρας

Το νερό προέρχεται από τρεις διαφορετικές πηγές: νερό εδάφους, επιφανείας και δικτύου:

A) Το νερό εδάφους

Αντλείται από ιδιωτικά πηγάδια ή από γεωτρήσεις κατευθείαν στο ζυθοποιείο. Περιέχει πληθώρα αλάτων όπως ανθρακικά, νιτρικά, θειικά και χλωριούχα καθώς επίσης και διάφορα κατιόντα όπως μαγνησίου, νατρίου, ασβεστίου, ανιόντα χλωρίου και ίχνη από σίδηρο και μαγγάνιο. Συγκριτικά με το νερό επιφανείας, η σύσταση του είναι σταθερότερη και είναι λιγότερο επιρρεπές στις επιμολύνσεις.⁵

B) Το νερό επιφανείας

Πηγή του επιφανειακού νερού είναι τα ποτάμια και οι λίμνες με αποτέλεσμα η ποσότητά του να εξαρτάται από τις κλιματολογικές συνθήκες και η ποιότητά του να εξαρτάται από τα συστατικά της ατμόσφαιρας. Λόγω της όξινης βροχής, μπορούν να βρεθούν σε αυτό ρύποι διαλυμένοι από τις βιομηχανίες. Επιπλέον, μπορεί να περιέχονται σε αυτό ορυκτά σωματίδια, ιόντα μετάλλων, φυσικές οργανικές ενώσεις προερχόμενες από την αποσύνθεση οργανικών ουσιών και οργανικές ενώσεις προερχόμενες από τη βιομηχανία (π.χ. φυτοφάρμακα).⁵

Γ) Το νερό δικτύου

Προέρχεται από πηγάδια ή πηγές επιφανειακών υδάτων που τροφοδοτούν τοπικές περιοχές. Κατά κύριο λόγο το νερό του δικτύου αποτελείται από νερό βροχής. Τα επιφανειακά στρώματα της γης απορροφούν το νερό της βροχής και τα κατώτερα στρώματα μαζί με τους πορώδεις λίθους το φιλτράρουν, με αποτέλεσμα να περιέχονται άλατα. Για την ασφαλή κατανάλωσή του το νερό του δικτύου υπόκειται σε επεξεργασία συνήθως με διήθηση, με προσθήκη χλωρίου ή ενώσεων του, με υπεριώδη ακτινοβολία ή με όζον. Μετά την επεξεργασία, το νερό δικτύου περιέχει μικρές συγκεντρώσεις από άλατα και ίχνη οργανικής ύλης.⁵

1.3.1.2 Κατηγορίες νερού

Στη ζυθοποιία το νερό κατηγοριοποιείται ανάλογα με τη χρήση του στις εξής 4 κατηγορίες: νερό ζυθοποίησης, νερό των διεργασιών, νερό γενικής χρήσης και νερό υπηρεσίας. Το νερό ζυθοποίησης είναι το συστατικό που χρησιμοποιείται για την παραγωγή της μύρας και υπόκειται σε επεξεργασία ώστε να πληρεί τις προδιαγραφές για τον κάθε τύπο μύρας. Το νερό των διεργασιών είναι αυτό που χρησιμοποιείται στον καθαρισμό και την αποστείρωση του εξοπλισμού (π.χ. των επιφανειών που έρχονται σε επαφή με την μύρα καθώς και των δεξαμενών και σωληνώσεων) και επιπλέον για την παστερίωση και ψύξη της μύρας. Το νερό αυτό θα πρέπει να είναι πόσιμο και αποσκληρυσμένο. Το νερό γενικής χρήσης είναι για το

γενικό πλύσιμο του ζυθοποιείου. Τέλος, το νερό υπηρεσίας χρησιμοποιείται ως ατμός από τους λέβητες και πρέπει να είναι μαλακό ή πλήρως απιονισμένο.⁵

1.3.1.3 Ιδιότητες και συστατικά του νερού ζυθοποίησης

Τα μεταλλικά στοιχεία του νερού επηρεάζουν το pH, και η παρουσία τους εξαρτάται αρκετά από το γεωλογικό προφίλ της περιοχής. Η σκληρότητα του νερού χαρακτηρίζεται από την περιεκτικότητα του σε άλατα ασβεστίου και μαγνησίου. Ο συνδυασμός δισανθρακικών, ανθρακικών και θεικών αλάτων χαρακτηρίζουν την ολική σκληρότητα. Νερό υψηλής αλκαλικότητας χαρακτηρίζεται σαν σκληρό νερό, με το pH του να είναι 8,5 ή και υψηλότερο και χρησιμοποιείται για την παραγωγή σκουρόχρωμης μύρας ενώ νερό χαμηλής αλκαλικότητας είναι πιο όξινο ή αλλιώς μαλακό, με το pH του να είναι κάτω από 6,5 και χρησιμοποιείται για την παραγωγή ανοιχτόχρωμης μύρας. Η σύσταση σε μεταλλικά στοιχεία μπορεί να ρυθμιστεί. Χρειάζεται όμως προσοχή γιατί τέτοιες ενέργειες προκαλούν αλυσιδωτές αντιδράσεις (π.χ. η αφαίρεση αλκαλικών στοιχείων από το σκληρό νερό μπορεί να οδηγήσει στην υπερβολική αφαίρεση ασβεστίου, που όμως χρειάζεται κατά την πολτοποίηση, με αποτέλεσμα να πρέπει να ξαναπροσθεθεί ασβέστιο). Εκτός της αλκαλικότητας, άλλες ουσίες που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη στην ζυθοποίηση είναι το χλώριο και οι ενώσεις του διότι εντοπίζονται σε αρκετά αποθέματα νερού δικτύου. Δεν είναι βλαβερά αλλά αντιδρούν με τις φαινόλες της βύνης και του λυκίσκου και δημιουργούν χημικές ουσίες που απελευθερώνουν άσχημες μυρωδιές. Σημαντικό ρόλο έχει η καθαρότητα του νερού εφόσον το νερό που χρησιμοποιείται στην ζυθοποίηση πρέπει να είναι καθαρό από μολυσματικούς παράγοντες (π.χ. βακτήρια).^{18,19}

1.3.1.4 Επεξεργασία του νερού ζυθοποίησης

Ανάλογα με το πλήθος και το είδος των ουσιών που περιέχονται στο νερό γίνεται και η κατάλληλη επεξεργασία. Με ισχυρή ανάδευση και ιζηματογένεση καταβυθίζονται οι ανεπιθύμητες ουσίες του νερού και απομακρύνονται με διήθηση ή επίπλευση. Ποσότητα όζοντος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την οξειδωση ιόντων σιδήρου σε οξείδια σιδήρου. Ο βρασμός του νερού μετριάξει τη σκληρότητα (λόγω του δισανθρακικού ασβεστίου που μετατρέπεται σε ανθρακικό και καθιζάνει) και έτσι το νερό μετατρέπεται σε μαλακό. Με τη χρήση οξειδίου του ασβεστίου ή διοξειδίου του άνθρακα (σε περιοχές που δεν επιτρέπεται η χρήση του οξειδίου του ασβεστίου) χρησιμοποιείται η μέθοδος εξουδετέρωσης για τη μείωση της παροδικής οξύτητας. Με την προσθήκη γαλακτικού οξέος μέχρι το pH να φτάσει στο 7,0 εξουδετερώνεται η αλκαλικότητα. Η αφαίρεση του χλωρίου και των ενώσεών της μπορεί να

επιτευχθεί με την προσθήκη ταμπλετών πυροσουλφικού καλίου ή με κάποιες μεθόδους φιλτραρίσματος (π.χ. η εξάτμιση του χλωρίου με το να αφηθεί το νερό σε ανοιχτά δοχεία).^{20,21}

1.3.2 Κριθάρι

Το κριθάρι είναι ένας δημητριακός καρπός του αγγειόσπερμου, μονοκοτυλήδονου φυτού του είδους Κριθή η κοινή (*Hordeum vulgare*) της οικογένειας των Ποειδών (Poaceae) ή Αγρωστωδών (Gramineae), ο οποίος χρησιμοποιείται και καλλιεργείται από τα πολύ παλιά χρόνια.²² Στην ζυθοποίηση αποτελεί μία από τις πρώτες ύλες, η οποία δίνει τα σάκχαρα μετά από υδρόλυση. Όμως, όταν δεν ακολουθείται ο νόμος της καθαρότητας μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα δημητριακά, εκτός του κριθαριού, όπως το ρύζι, η σίκαλη, ο αραβόσιτος, η βρώμη κ.ά. Επίσης, είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν και άλλες πηγές σακχάρων, όπως είναι το μέλι, το σιρόπι μαλτόζης, η σακχαρόζη κ.ά.^{4,5} Το κριθάρι διακρίνεται σε τρεις βασικές κατηγορίες, ανάλογα με τον αριθμό των σειρών στον μίσχο: δίστιχα, τετράστιχα και εξάστιχα. Στην ζυθοποίηση προτιμώνται τα δίστιχα καλοκαιρινά κριθάρια, γιατί έχουν καλύτερες τεχνολογικές επιδόσεις για τα στάδια της παραγωγής μύρας.³ Έχουν καλύτερη αναλογία πρωτεϊνών – αμύλου και συγκεκριμένα περιέχουν μικρή ποσότητα πρωτεϊνών σε σχέση με το άμυλο που εμπεριέχεται. Τέλος, τα δίστιχα κριθάρια πλεονεκτούν στην χαμηλή συγκέντρωση λιπιδίων και στην εύκολη ελεγχόμενη βλάστησή του.⁵

1.3.2.1 Περιγραφή του κόκκου και μορφολογικά χαρακτηριστικά

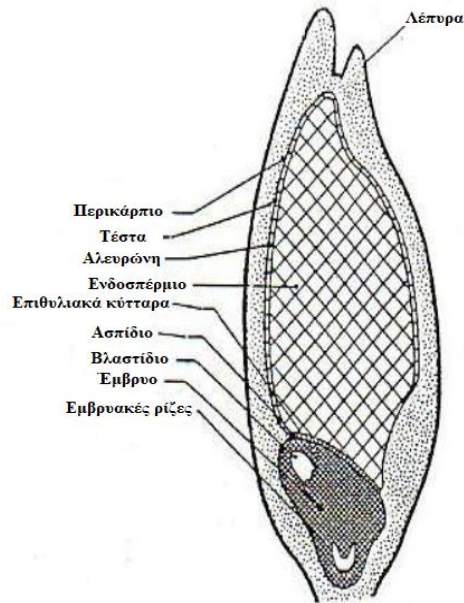
Το κριθάρι δεν παρουσιάζει μεγάλη παραλλακτικότητα στην μορφή του.²³ Τα άνθη του είναι τοποθετημένα σε ταξιανθίες. Τα άνθη κατά ομάδες ονομάζονται σταχύδια.⁵ Η ταξιανθία αποτελείται από πολλά σταχύδια, τα οποία είναι τοποθετημένα στους κόμβους ενός αρθρωτού άξονα. Κάθε σταχύδιο διαθέτει δύο εσωτερικά και δύο εξωτερικά λέπυρα. Ο αριθμός των κόκκων ανά στάχυ ποικίλει, για τις δίστιχες ποικιλίες από 15-30 κόκκους και για τις εξάστιχες από 26-60. Ο καρπός του κριθαριού ονομάζεται καρύοψη. Ο κόκκος περιλαμβάνει την καρύοψη, τον χιτώνα, την λεπίδα και το ραχίδιο. Ο καρπός και ο σπόρος αποτελούν τον κόκκο.⁵ Η καρύοψη του κριθαριού αποτελείται από το περικάρπιο, το περίβλημα του σπόρου, το ενδοσπέρμιο και το έμβρυο. Το χρώμα του καρπού μπορεί να είναι λευκό, κυανό, πορφυρό, ή μαύρο, με το λευκό και το κυανό να επικρατεί.^{5,23}

1.3.2.2 Ποιοτικά χαρακτηριστικά του κριθαριού

Το κριθάρι θα πρέπει να προκύπτει από αποδεκτή ποικιλία, να είναι απαλλαγμένο από επιμολύνσεις, μούχλα, έντομα, ξένα σώματα, επεξεργασμένους κόκκους και δυσάρεστες οσμές και να μην περιέχει περισσότερο από 5% αποφλοιωμένους ή σπασμένους κόκκους. Να έχει ωριμάσει πλήρως και να διαθέτει μεγάλη βλαστική ικανότητα σε προβλέψιμο χρονικό διάστημα. Ο κόκκος πρέπει να είναι γεμάτος και μεγάλος με ομοιόμορφο σχήμα, χωρίς βαθιά στίγματα γήρανσης και με χαμηλή περιεκτικότητα αζώτου, πρωτεΐνη σε ξηρό βάρος 10,5 – 13% και μέγιστη υγρασία 13,5%. Ακόμη, είναι απαραίτητο να μην έχει επηρεαστεί από υψηλή θερμοκρασία ή παγετό, να μην υπάρχουν ουσίες που επηρεάζουν την υγρασία και να μην έχει υποστεί ξήρανση με τεχνητά μέσα.⁵

1.3.2.3 Χημική σύσταση του κριθαριού

Ο καρπός – σπόρος του κριθαριού εμπεριέχει πολλά συστατικά, τα οποία βοηθούν στην σύνθεση του ζυθογλεύκους και συγκεκριμένα μέταλλα, βιταμίνες, κόκκους αμύλου και σακχαρόζης, νουκλεοτίδια, λίπη και πολυφαινόλες. Κάποια από αυτά χρησιμεύουν στην γεύση, ενώ άλλα, όπως το άμυλο και τα παράγωγά του συνεισφέρουν στην παραγωγή αιθανόλης. Ακόμα, πολλά συστατικά έχουν αρνητική επίδραση στο τελικό προϊόν, όπως οι β-γλυκάνες, οι οποίες αν δεν διασπαστούν δημιουργούν μεγάλο ιξώδες στο ζυθογλεύκος που θα παραχθεί και προβλήματα στην ομαλή ροή του. Το ενδοσπέρμιο του σπόρου του κριθαριού αποτελείται από ένα πρωτεϊνικό δίκτυο στο οποίο βρίσκονται κόκκοι αμύλου. Το άμυλο αποτελείται από την αμυλόζη, σε ποσοστό 20-25%, με τα μόρια της γλυκόζης να ενώνονται σε ευθεία γραμμή και από την αμυλοπηκτίνη, σε ποσοστό 75-80%, που είναι διακλαδισμένο μόριο αμύλου. Στον σπόρο του κριθαριού περιέχονται επίσης και πρωτεΐνες, όπως οι αλβουμίνες, οι σφαιρίνες, η ορδεΐνη και η γλουτενίνη, οι οποίες είναι δομικές πρωτεΐνες και διασπώνται κατά την διάρκεια της βυνοποίησης. Η αναλογία πρωτεϊνών – αμύλου επιδρά στην μορφολογία του ενδοσπερμίου.⁵ Όταν το επίπεδο του αμύλου είναι μεγαλύτερο σε σχέση με αυτό των πρωτεϊνών τότε πρόκειται για αλευρώδες ενδοσπέρμιο, ενώ αντίθετα, πρόκειται για υαλώδες ενδοσπέρμιο. Μεγάλο ποσοστό σε πρωτεΐνες μπορεί να προκαλέσει θόλωμα στην μύρα, ενώ μικρές συγκεντρώσεις επηρεάζουν αρνητικά την ποιότητα του αφρού της. Τέλος, οι κυριότερες βιταμίνες που περιέχονται στο κριθάρι είναι το ασκορβικό οξύ (C), η θειαμίνη (B1) και η ριβοφλαβίνη (B2).²⁴



Εικόνα 1. Κατά μήκος τομή κόκκου κριθαριού.⁵

1.3.2.4 Μακροσκοπική εξέταση και έλεγχος του κριθαριού (ή εξωτερικά γνωρίσματα κριθαριού)

Η ποιότητα του κριθαριού παίζει καθοριστικό ρόλο στην ποιότητα του τελικού προϊόντος. Γι' αυτό η δειγματοληψία είναι απαραίτητο να γίνεται με ιδιαίτερη προσοχή.

Πίνακας 1.1 Εξωτερική όψη και χρώμα κριθαριού

Χρώμα	Ένδειξη
Ανοιχτόχρωμο, λευκό	Αναγκαστική ωρίμανση, υαλώδεις ενδοσπέρμιο, μικρή ενεργότητα ενζύμων
Ανοιχτό κίτρινο, γυαλιστερό	Πιθανή χαμηλή περιεκτικότητα υγρασίας, καλή ωρίμανση
Πρασινωπό	Οι κόκκοι δεν έχουν ωριμάσει ακόμα
Γκρίζο, όχι γυαλιστερό	Ανάπτυξη μυκήτων

1.3.2.5 Ξένες ύλες

Οτιδήποτε δεν είναι ακέραιοι υγιείς κόκκοι κριθαριού, χαρακτηρίζονται ως ξένες ύλες και ειδικότερα πέτρες, άλλα σιτηρά, όπως βρώμη, σκόνη στην επιφάνεια των κόκκων, λέπυρα, θρυμματισμένοι ή τραυματισμένοι κόκκοι κριθαριού και σπόροι ζιζανίων. Οι ξένες ύλες είναι απαραίτητο να βρίσκονται σε μικρό ποσοστό. Διαφορετικά, μειώνουν την ποσότητα του βυνοποιήσιμου κριθαριού και μεγαλώνει το κόστος της πρώτης ύλης. Επίσης, οι σπασμένοι κόκκοι απορροφούν πολλή υγρασία με αποτέλεσμα την ανάπτυξη μικροοργανισμών και την οσμή μούχλας στο βυνογλεύκος. Τέλος, οι τραυματισμένοι κόκκοι συνήθως δεν βλαστάνουν.⁵

1.3.2.6 Σχήμα και μέγεθος

Για να θεωρηθεί ένας κόκκος αξιόλογος για βυνοποίηση, πρέπει να είναι καλοθρεμμένος – γεμάτος, να έχει στενό επιμήκη αύλακα στην κοιλία του και χαμηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη. Αντίθετα, ο πλατύς και βαθύς αύλακας αποτελεί ελάττωμα.⁵

1.3.2.7 Οσμή

Ικανοποιητική οσμή είναι η φρέσκια και αχυρώδης, η οποία εμφανίζεται όταν κλείνεται αεροστεγώς το κριθάρι σε κουτί και ζεσταθεί ελαφρά λίγο πριν την εξέταση. Εάν η οσμή θυμίζει μούχλα είναι αποτέλεσμα υγρασίας και μυκήτων. Τέτοιου είδους κριθάρια έχουν μειωμένη βυνοποιητική αξία. Σε περίπτωση όμως που η βλαστική τους ικανότητα δεν έχει ελαττωθεί, βελτιώνονται με άμεση ξήρανση και προσεκτική αποθήκευση. Αυτά τα κριθάρια είναι καλό να εξετάζονται για ήδη βλαστημένους κόκκους.⁵

1.3.2.8 Υφή (λεπτότης) λεπύρων

Τα λέπυρα επηρεάζουν τόσο αρνητικά όσο και θετικά την διαδικασία παραγωγής ζύθου. Για να είναι πολύ καλό ένα κριθάρι για βυνοποίηση και κυρίως για την παραγωγή ανοιχτόχρωμων μπυρών, πρέπει να έχει λεπτές ρυτίδες στην πίσω – νωτιαία πλευρά του κόκκου και λεπτά λέπυρα. Αντίθετα, αν οι ρυτίδες είναι χοντρές και έντονες σημαίνει ότι τα λέπυρα είναι χοντρά και ανεπτυγμένα. Αυτό φαίνεται όταν ο κόκκος πιαστεί με το χέρι. Δηλαδή, κόκκος με λεπτά λέπυρα και λίγη υγρασία δίνει την αίσθηση στο χέρι του πιο σκληρού, λείου, ζεστού και ολισθηρού.⁵

1.3.2.9 Ομοιογένεια ποικιλίας

Αποτελεί το κριτήριο για μια ζυθοποίηση χωρίς προβλήματα. Για να θεωρηθεί μια ποικιλία καλή, πρέπει το κριθάρι να πληρεί κάποια χαρακτηριστικά. Ενδεικτικά, να διαθέτει

εκχυλισματική απόδοση για την βύνη που θα παραχθεί και να είναι ανθεκτικό στις ασθένειες. Να περιέχει πρωτεΐνη και να σχηματίζει κόκκους. Επιπλέον, να παρουσιάζει προσρόφηση και ευαισθησία στο νερό και να μπορεί να απορροφά και να αξιοποιεί τα συστατικά του εδάφους. Να έχει βλαστική ικανότητα – ενεργότητα και να είναι ικανό να σχηματίζει ένζυμα και να τα διαλυτοποιεί καθώς επίσης να παρουσιάζει απόδοση στην συγκομιδή.⁵

1.3.3 Λυκίσκος

Ο λυκίσκος επιστημονικά ονομάζεται *Humulus lupulus* και είναι ένα πολυετές, αναρριχώμενο δίοικο φυτό της οικογένειας κανναβοειδών²⁵ και πολύ ευαίσθητο.³ Υπάρχουν δηλαδή φυτά μόνο με αρσενικά άνθη και φυτά μόνο με θηλυκά άνθη.²⁶ Τα αρσενικά φυτά αναπτύσσουν τα άνθη τους σε ταξιανθίες βότρυ ενώ τα θηλυκά σχηματίζουν κιτρινοπράσινους κώνους.²⁷ Στην βάση κάθε μικρού φύλλου υπάρχουν μικροί σάκοι. Οι σάκοι αυτοί είναι αδένες λουπουλίνης. Σε αυτούς τους αδένες υπάρχουν τα πικρικά οξέα, οι ρητίνες και τα αιθέρια έλαια που συντελούν στον πικρικό χαρακτήρα, στην γεύση και στα αρώματα του ζύθου, αντίστοιχα.⁵ Στην ζυθοποιία και ειδικότερα για τον αρωματισμό της μύρας, χρησιμοποιούνται μόνο τα θηλυκά άνθη του λυκίσκου.²⁵ Θεωρείται ο «πράσινος χρυσός» της ζυθοποίησης⁵ και «πρώτος ξάδελφος» με την τσουκνίδα και την κάνναβη. Συμβάλλει στην εξισορρόπηση της γλυκύτητας που δίνει η βύνη^{3,4} λόγω των σακχάρων, προσφέροντας την πικρή γεύση και το άρωμα στην μύρα.⁵ Στην Ελλάδα καλλιεργείται κυρίως στην Ήπειρο και είναι γνωστό με το όνομα αγριόκλημα.²⁷

Στην παραγωγή της μύρας ο λυκίσκος παρέχει αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Επιπλέον προσδίδει πικρή γεύση λόγω των πικρικών ουσιών που έχει (α & β-οξέα, ανάλογα και με την ποικιλία), σπιρτάδα στον αρωματικό χαρακτήρα, ανθινό άρωμα και σταθερότητα γεύσης. Τέλος δρα ως φυσικό διαυγαστικό.⁵

1.3.3.1 Ποικιλίες λυκίσκου

Ο λυκίσκος έχει πολλές ποικιλίες, οι οποίες χωρίζονται σε κατηγορίες, ανάλογα με το άρωμα και την πικρική του δύναμη. Υπάρχουν οι αρωματικές ποικιλίες (aroma)²⁶, οι οποίες χαρακτηρίζονται από υψηλή περιεκτικότητα σε αρωματικές ουσίες, έχουν λιγότερα α-οξέα²⁸ και χρησιμοποιούνται στο τέλος ή μετά το βρασμό του ζυθογλεύκου και ονομάζονται Late ή Dry αντίστοιχα.²⁹ Οι πικρές ποικιλίες (alfa²⁶ ή bitter²⁹), οι οποίες χαρακτηρίζονται από υψηλή περιεκτικότητα σε α-οξέα και λιγότερο από άρωμα²⁸ χρησιμοποιούνται κυρίως κατά την

διάρκεια του βρασμού του ζυθογλεύκου και ονομάζονται Copper. Οι δύο αυτές κατηγορίες (αρωματικές και πικρές) μπορούν να συνδυαστούν, με την πικρή να προστίθεται στην αρχή του βρασμού και την αρωματική στο τέλος. Υπάρχουν και ορισμένες ποικιλίες που συνδυάζουν τις δύο προηγούμενες κατηγορίες²⁹ και ονομάζονται διπλού σκοπού ή διπλής χρήσης.^{30,31}

1.3.3.2 Τύποι λυκίσκου

Ο λυκίσκος, για την παραγωγή της μπίρας, διατίθεται σε 3 μορφές. Τα άνθη λυκίσκου – κώνοι (cones), τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν φρέσκα ή αποξηραμένα. Τα φρέσκα επιλέγονται σπάνια, γιατί είναι ευάλωτα σε πιθανή οξείδωση και περιέχουν μόνο το 20% των χρήσιμων συστατικών για την ζυθοποίηση. Επιπλέον, τα σφαιρίδια λυκίσκου (σε συμπιεσμένη μορφή) (pellets) που είναι επεξεργασμένα άνθη του φυτού ώστε να επιτρέπεται η εύκολη μετακίνηση και αποθήκευσή τους.³⁰ Η επεξεργασία αυτή, πραγματοποιείται για να μην προσβληθεί το φυτό από αέρα και οξειδωθεί. Επίσης, αποφεύγονται απώλειες πολύτιμων ελαίων και ρητινών.³¹ Πραγματοποιείται ξήρανση θερμοκρασίας μέχρι 60°C, με την χρήση ζεστού αέρα, διάρκειας 12 περίπου ωρών, με τελικό στόχο το ποσοστό της υγρασίας των άνθεων να μειωθεί από 80% σε 8-10%^{5,30} και ακολουθεί ψύξη στους -30°C και θρυμματισμός. Από αυτήν την διαδικασία προκύπτει μια σκόνη, η οποία ομογενοποιείται και έπειτα παίρνει την μορφή σφαιριδίων (pellet).³⁰ Η αποθήκευση σε αυτή την μορφή δίνει την ικανότητα στο φυτό να διατηρεί την φρεσκάδα του για καιρό.³¹ Τέλος, παράγεται το εκχύλισμα (plugs) για την παραλαβή του οποίου χρησιμοποιούνται ως διαλύτες το διοξείδιο του άνθρακα και η αιθανόλη. Από αυτές τις μορφές επιλέγονται συνήθως τα σφαιρίδια λυκίσκου (pellets) ή η αποξηραμένη μορφή των άνθεων. Ο λυκίσκος πρέπει να αποθηκεύεται σε δροσερό μέρος που να μην υπάρχει αέρας. Διαφορετικά, η μπίρα χάνει την πικράδα της και δεν διατηρούνται τα αρώματα και τα α-οξέα. Γι' αυτό είναι απαραίτητο η αποθήκευση να γίνεται σε σακούλες αλουμινίου υπό κενό και σε μια ιδανική θερμοκρασία 0-3°C.³⁰



Εικόνα 2. Μορφές λυκίσκου. Άνθη, pellets και εκχύλισμα, από τα αριστερά προς τα δεξιά.³⁰

1.3.3.3 Χημεία του λυκίσκου

Ο λυκίσκος περιέχει ρητίνες, έλαια, πρωτεΐνες, λίπη, τανίνες, λιγνίνη και κυτταρίνη. Ωστόσο, τα πιο σημαντικά και ενδιαφέροντα συστατικά είναι οι ρητίνες και τα έλαια:⁵

A) Ρητίνες

Οι ρητίνες βρίσκονται στα θηλυκά άνθη του λυκίσκου⁴ και είναι σημαντικές για το ίδιο το φυτό και συγκεκριμένα για την ανάπτυξη και την ζωή του. Μαζί με τα αιθέρια έλαια και ορισμένες πολυφαινόλες βρίσκονται στους λουπουλονικούς αδένες ώριμων λυκίσκων.³² Οι αδένες αυτοί παράγουν μια εμφανή λεπτή κίτρινη ουσία-σκόνη στο βάθος του κώνου του λυκίσκου, η οποία ονομάζεται λουπουλίνη.^{33,34} Το 57% της ουσίας αυτής καταλαμβάνουν τα α-οξέα, ενώ το 75% είναι τα α- και β-οξέα μαζί.²⁴ Οι ρητίνες, ανάλογα με την εκχυλισσιμότητά τους σε διαφορετικούς διαλύτες, διακρίνονται σε μαλακές και σκληρές ρητίνες. Οι μαλακές είναι περισσότερο σημαντικές καθώς αυτές συμβάλλουν στην πικρή γεύση της μύρας. Σε αυτές βρίσκονται τα οξέα του λυκίσκου, τα οποία χωρίζονται σε α-οξέα και β-οξέα (δεν είναι πικρές ενώσεις).³² Την πικράδα στην μύρα την δίνουν κατά κύριο ρόλο τα ισομερισμένα α-οξέα, αλλά και σε μικρότερο βαθμό τα οξειδωμένα β-οξέα. Συνεπώς, ο λυκίσκος είναι πλούσιος σε α-οξέα. Ο βρασμός για να αποδώσει την βέλτιστη πικράδα διαρκεί περίπου 90 λεπτά.⁵ Οι ρητίνες, εκτός από τον βρασμό, μπορούν να εξαχθούν από τον λυκίσκο και με την χρήση αιθανόλης ή διοξειδίου του άνθρακα.³²

B) Αιθέρια έλαια

Τα αιθέρια έλαια βρίσκονται, μαζί με τις ρητίνες και κάποιες πολυφαινόλες, στους λουπουλονικούς αδένες του λυκίσκου³² και υπάρχουν μόνο στα θηλυκά άνθη.⁴ Παράγονται στον λυκίσκο μετά από τις ρητίνες κατά το τέλος της ωρίμανσης.⁵ Από τον συνολικό όγκο του κώνου του λυκίσκου, το 0,5 με 3% καταλαμβάνουν τα αιθέρια έλαια,²⁹ τα οποία ευθύνονται για τα αρώματα του φυτού. Σχηματίζονται μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης των α- και β-οξέων.³⁰ Τα αιθέρια έλαια είναι πτητικές ουσίες και κατατάσσονται στην ομάδα των τερπενίων,²⁹ εξατμίζοντας έτσι ένα μέρος τους κατά τον βρασμό, όταν αυτός πραγματοποιείται σε ανοιχτό βραστήρα. Γι' αυτό, για να διατηρηθούν τα αρώματα του λυκίσκου, αυτός προστίθεται λίγο πριν το τέλος του βρασμού ή χρησιμοποιείται ξηρός λυκίσκος κατά την ζύμωση.³⁰ Υπάρχουν συνολικά 250 με 300 αιθέρια έλαια στον λυκίσκο. Από αυτά, τα 22 περίπου έχουν διαμορφώσει τον αρωματικό χαρακτήρα του, ενώ 3 είναι τα βασικότερα και αποτελούν το 80-90% των συνολικών ελαίων του λυκίσκου.³⁵ Αυτά είναι το μυρκένιο³⁶ (άρωμα φρέσκου λυκίσκου, χόρτου, ρητίνης³⁵), το καρυοφιλένιο³⁶ (πικάντικο άρωμα, άρωμα πιπεριού^{33,34}) και το χουμουλένιο³⁶ (ξυλώδες άρωμα^{33,34}).

1.3.4 Ζύμες

Οι ζύμες είναι ευκαρυωτικοί μονοκύτταροι οργανισμοί που ανήκουν στο Βασίλειο των Μυκήτων. Είναι οργανισμοί που απαρτίζουν το 1% όλων των ειδών των μυκήτων με τουλάχιστον 1500 είδη να έχουν αναγνωριστεί μέχρι το 2006. Ονομάζονται και σακχαρομύκητες λόγω της ικανότητάς τους να ζυμώνουν τους υδατάνθρακες (σάκχαρα) σε αιθυλική αλκοόλη και διοξείδιο του άνθρακα, μέσω του μεταβολικού μονοπατιού που ονομάζεται αλκοολική ζύμωση.^{37,38,39}

Αξιοπρόσεκτο είναι ότι οι ζύμες δεν αποτελούν μια ταξινομική βαθμίδα. Ο όρος «ζύμη» προέρχεται από τον *Saccharomyces* αλλά η ποικιλομορφία που παρουσιάζουν όλες οι ζύμες τους κατατάσσει σε δύο διαφορετικά φύλα: τους Ασκομύκητες και τους Βασιδιομύκητες. Οι βλαστιτικοί μύκητες ουσιαστικά κατατάσσονται στην Τάξη των *Saccharomycetales* που ανήκει στο φύλο των Ασκομυκήτων.^{40,41}

Αν και οι ζύμες είναι μονοκύτταροι οργανισμοί, κάποια είδη τους σχηματίζουν ψευδοϋφές που αποτελούν αλυσίδες επιμηκυμένων βλαστοκονιδίων, χαρακτηριστικό που θυμίζει πολυκύτταρες οργανώσεις και δείχνει την εξελικτική σχέση των ζυμών με τους πολυκύτταρους προγόνους τους.^{42,43}

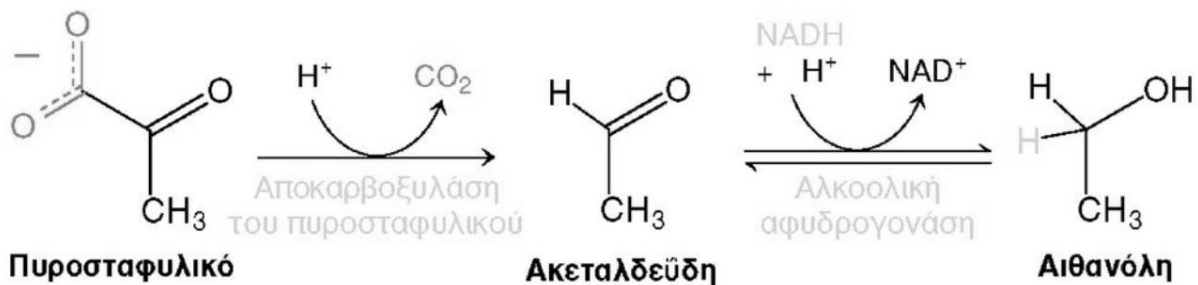
Το μέγεθος τους ποικίλει και είναι διαφορετικό από είδος σε είδος. Παραδείγματος χάριν, παρόλο που τυπικά η διάμετρός τους είναι 3-4 μm, έχει παρατηρηθεί ο *Blastomyces dermatidis* να έχει διάμετρο άνω των 20 μm σε πνεύμονες ασθενών.⁴⁴

Ο πιο γνωστός είναι ο *Saccharomyces cerevisiae* του οποίου η αλκοολική ζύμωση βρίσκει εφαρμογή στη παραγωγή άρτου και αλκοολούχων ποτών.⁴⁵ Επίσης, είναι ένας οργανισμός-μοντέλο σε έρευνες της κυτταρικής βιολογίας και είναι ένας από τους πιο μελετημένους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Εκτός από την βιομηχανία τροφίμων και ποτών, ζύμες έχουν χρησιμοποιηθεί και για την παραγωγή αιθανόλης ως βιοκαύσιμο. Δεν είναι όμως όλοι οι ζυμομύκητες ωφέλιμοι για τον άνθρωπο, με χαρακτηριστικό παράδειγμα τον *Candida albicans* που προκαλεί την γνωστή καντιντίαση.⁴³

1.3.4.1 Μεταβολισμός και αλκοολική ζύμωση

Το κύριο χαρακτηριστικό των ζυμών, για το οποίο είναι γνωστοί και πάνω στο οποίο βασίζεται η βιοτεχνολογική τους αξιοποίηση, είναι η ζύμωση σακχάρων μέσω μιας βιολογικής διεργασίας γνωστής ως αλκοολική ζύμωση. Με την αλκοολική ζύμωση διασπώνται τα σάκχαρα για την παραγωγή κυτταρικής ενέργειας, αιθανόλης και διοξειδίου του άνθρακα.

Οι ζύμες, όντας προαιρετικά αναερόβιοι οργανισμοί, μπορούν να αποικοδομούν την γλυκόζη είτε παρουσία είτε απουσία οξυγόνου. Όμως, απουσία οξυγόνου επιτελείται η αλκοολική ζύμωση και παράγεται η αιθανόλη. Συγκεκριμένα, στο τέλος της απικοδόμησης της γλυκόζης, μια πορεία που περιλαμβάνει εννέα αντιδράσεις και λέγεται γλυκόλυση, παράγονται 2 μόρια πυροσταφυλικού οξέος, 2 μόρια ATP και NADH. Στη συνέχεια το κάθε μόριο πυροσταφυλικού με την δράση της πυροσταφυλικής αποκαρβοξυλάσης μετατρέπεται σε ακεταλδεΐδη (και ταυτόχρονη απελευθέρωση διοξειδίου του άνθρακα) και η ακεταλδεΐδη με την δράση της αλκοολικής αφυδρογονάσης γίνεται αιθανόλη (**Εικόνα 3.**). Άρα τελικά από ένα μόριο γλυκόζης παράγονται δύο μόρια αιθανόλης.



Εικόνα 3. Μετατροπή πυροσταφυλικού σε ακεταλδεΐδη με τη δράση της πυροσταφυλικής αποκαρβοξυλάσης και τη μετατροπή της ακεταλδεΐδης σε αιθανόλη με τη δράση της αλκοολικής αφυδρογονάσης.⁴⁶

1.3.4.2 Κατηγοριοποίηση ζυμών για την παραγωγή ζύθου

A) Αφροζύμες ονομάζονται τα στελέχη των σακχαρομυκήτων που κατά το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης έχουν την τάση να επιπλέουν και να συγκεντρώνονται στο επάνω μέρος του δοχείου ζύμωσης. Ταξινομούνται ως *S. cerevisiae* και χρησιμοποιούνται για να παράγουν μύρες τύπου ale. Οι μύρες αυτές χαρακτηρίζονται από φρουτώδες άρωμα και γεμάτη γεύση. Η τυπική θερμοκρασία ζύμωσης για τις αφροζύμες είναι 18-22°C.

B) Βυθοζύμες ονομάζονται τα στελέχη των σακχαρομυκήτων που κατά το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης έχουν την τάση να καταβυθίζονται και να συγκεντρώνονται στο κάτω μέρος του δοχείου ζύμωσης. Ταξινομούνται ως *S. carlsbergensis* και χρησιμοποιούνται για να παράγουν μύρες τύπου lager. Οι μύρες αυτές είναι διαυγής με απαλό και κομψό χαρακτήρα. Έχουν την ικανότητα να διασπούν τον τρισακχαρίτη ραφινόζη σε γαλακτόζη και σακχαρόζη

εφόσον διαθέτουν το ένζυμο μελιβιάση (α-γαλακτοζιδάση), που διασπά τον α(1,4) γλυκοσιδικό δεσμό μεταξύ γαλακτόζης και γλυκόζης. Η τυπική θερμοκρασία ζύμωσης για τις βυθοζύμες είναι 7-15°C.

Ένα κοινό χαρακτηριστικό που έχουν είναι ότι εφαρμόζεται αυτόματη ψύξη του αντιδραστήρα όταν η ζύμωση φτάνει στη μέγιστη θερμοκρασία των 20-23°C για τις αφροζύμες και των 12-17°C για τις βυθοζύμες.

1.4 ΣΤΑΔΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΗΣ ΜΠΥΡΑΣ

Τα στάδια παραγωγής μπίρας χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, τα στάδια βυνοποίησης και τα στάδια ζυθοποίησης.

1.4.1 Στάδια βυνοποίησης

1.4.1.1 Παραλαβή, καθαρισμός, ταξινόμηση

Συλλέγεται το δίστιχο κριθάρι, το οποίο ζυγίζεται και καθαρίζεται από ξένες ύλες.³ Ελέγχονται οι προδιαγραφές καταλληλότητάς του και γίνονται χημικοτεχνικές αναλύσεις και μακροσκοπική εξέταση του κριθαριού. Το κριθάρι αποθηκεύεται, καθαρίζεται ξανά, ταξινομείται ανά μέγεθος με την βοήθεια παλλόμενων κοσκίνων και τέλος ζυγίζεται ακόμα μια φορά.⁵

1.4.1.2 Διαβροχή

Στο στάδιο αυτό το κριθάρι μεταφέρεται σε δεξαμενές διαβροχής (μεγάλες κυλινδρικές δεξαμενές), οι οποίες περιέχουν νερό³ και παραμένει έως ότου φτάσει σε μια αρχική υγρασία 30% όπου αρχίζει η βλάστησή του. Μετέπειτα, η υγρασία πρέπει να φτάσει περίπου 40-48% ώστε να γίνουν οι επιθυμητές μετατροπές των αποθησαυριστικών ουσιών του σπόρου και ταυτόχρονα να τροφοδοτείται με οξυγόνο ώστε να αποφευχθεί ο αναερόβιος μεταβολισμός του.⁵

1.4.1.3 Βλάστηση

Υπό κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας, υγρασίας και αερισμού, ο κόκκος αναπτύσσεται για να δημιουργήσει την πράσινη βύνη, η οποία έχει διπλάσιο μήκος από τον αρχικό σπόρο.³

Παράλληλα, ενεργοποιείται ο μεταβολισμός του σπόρου με αποτέλεσμα τον σχηματισμό α και β αμυλάσης (μετατρέπουν το άμυλο σε απλούστερα σάκχαρα), πρωτεασών και πρωτεϊνολυτικών (διασπούν τις πρωτεΐνες σε πεπτίδια και αμινοξέα),²⁹ κυτταρινασών (μαλακώνουν το κυτταρικό τοίχωμα), γλυκανασών, πεντοζανασών, φωσφατασών κ.α. με την ελάχιστη δυνατή απώλεια των αποθησαυριστικών ουσιών του σπόρου.⁵

1.4.1.4 Ξήρανση

Σκοπός της ξήρανσης ή αλλιώς φρύξης είναι να σταματήσει η ανάπτυξη του κριθαριού και να αδρανοποιηθούν τα ένζυμα χωρίς να καταστραφούν, με απομάκρυνση της υγρασίας. Με τη διαδικασία αυτή σταθεροποιούνται οι χημικοβιολογικές μεταβολές και σχηματίζονται αρωματικές και χρωστικές ουσίες που θα δώσουν γεύση, αρώματα και χρώμα στο τελικό προϊόν. Το αποξηραμένο κριθάρι που προκύπτει έχει μερικώς βλαστήσει και είναι εμπλουτισμένο με ένζυμα λέγεται βύνη.^{5,29} Είναι εύθρυπτη, εύγευστη, περιέχει υγρασία περίπου 4% και μπορεί να αποθηκευτεί χωρίς αλλοιώσεις. Οι θερμοκρασίες και η διάρκεια της ξήρανσης που θα εφαρμοστούν, εξαρτώνται από τον τύπο βύνης που θα παραχθεί.²⁹

1.4.2 Στάδια ζυθοποίησης

1.4.2.1 Άλεση

Η διαδικασία άλεσης της βύνης έχει στόχο την αύξηση της επιφάνειάς της και τη δράση των ενζύμων προκειμένου οι ουσίες που περιέχονται σε αυτή να αποικοδομηθούν και να εκχυλιστούν.^{5,47} Ο φλοιός διαχωρίζεται από τον σπόρο, ο οποίος σπάει σε μικρότερα κομμάτια και από τον οποίον παραλαμβάνεται το βυνάλευρο. Υπάρχουν δύο είδη άλεσης: η ξηρή και η υγρή άλεση. Η πρώτη είναι πιο εύκολη και χρησιμοποιείται πιο συχνά, με την βοήθεια ενός ειδικού μύλου.²⁵ Σε αυτή την περίπτωση η βύνη περιέχει πολύ μικρό έως αμελητέο ποσοστό υγρασίας. Ο εμπλουτισμός του γλεύκους όμως με β-γλυκάνες, λόγω της λεπτοαλεσμένης βύνης, προκαλεί δυσκολία στον διαχωρισμό και έπειτα στην διαύγασή του στα τελικά στάδια της παραγωγής της μπύρας. Η υγρή άλεση πραγματοποιείται με προσθήκη ζεστού νερού και όχι ατμού σε χαμηλή πίεση, προκειμένου να μην υπάρχει πιθανότητα καταστροφής των ενζύμων. Εφαρμόζεται σε μεγάλες ποσότητες βύνης. Η διεργασία αυτή όμως δυσκολεύει στην επίτευξη της ομοιόμορφης διαβροχής και καλής ανάμειξης, ενώ όταν απομακρύνεται το νερό της διαβροχής απομακρύνονται παράλληλα και μερικά ένζυμα. Τέλος, για την υγρή άλεση δεν

κατασκευάζονται πλέον καινούργια μηχανήματα, γι' αυτό χρησιμοποιούνται μόνο όπου υπάρχουν.⁵

1.4.2.2 Πολτοποίηση - Εκχύλιση

Η ανάμειξη της αλεσμένης βύνης με νερό, το οποίο θερμαίνεται σε συγκεκριμένες θερμοκρασίες και για καθορισμένο χρόνο, συντελεί στη διάλυση υδατοδιαλυτών ουσιών της, δηλαδή την ενζυματική διάσπαση του αμύλου και των πρωτεϊνών. Το άμυλο χαρακτηρίζεται ως πολυσακχαρίτης, που αποτελείται από αμυλόζη και αμυλοπηκτίνη. Λόγω της δράσης των ενζύμων α-αμυλάση και β-αμυλάση, το άμυλο διασπάται σε δεξτρίνες και μαλτόζη αντίστοιχα, ενώ λόγω των πρωτεασών και πρωτεϊνολυτικών οι πρωτεΐνες διασπώνται σε αμινοξέα και πεπτίδια.⁵ Το στάδιο δηλαδή της πολτοποίησης ή εκχύλισης επιτρέπει στο άμυλο να μετατραπεί σε ζυμώσιμα σάκχαρα (σακχαροποίηση).⁴

Ο βαθμός αποικοδόμησης του αμύλου και των πρωτεϊνών εξαρτάται κυρίως από τη θερμοκρασία νερού πολτοποίησης και το pH του βυνογλεύκου. Υψηλές θερμοκρασίες του νερού πολτοποίησης ευνοούν τη δράση της α-αμυλάσης και κατά συνέπεια την παραγωγή δεξτρινών, που δεν ζυμώνονται εύκολα από τις ζύμες. Αντίθετα, οι πιο χαμηλές θερμοκρασίες ευνοούν τη δράση της β-αμυλάσης και συνεπώς την παραγωγή μαλτόζης που ζυμώνεται πιο εύκολα. Βάσει της θερμοκρασίας του νερού της πολτοποίησης λοιπόν, μπορεί να καθοριστεί η ικανότητα του βυνογλεύκου προς ζύμωση και συνεπώς η περιεκτικότητα της παραγόμενης μύρας σε αλκοόλη.

Η θερμοκρασία του νερού πολτοποίησης επηρεάζει επίσης και την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών. Υψηλές θερμοκρασίες ευνοούν το σχηματισμό αζωτούχων ουσιών, πολύτιμων για τις οργανοληπτικές ιδιότητες της μύρας και τον σχηματισμό πλούσιου και σταθερού αφρού, ενώ πιο χαμηλές θερμοκρασίες οδηγούν στη δημιουργία αμινοξέων, που θα χρησιμεύσουν σαν υπόστρωμα για τις ζύμες. Έτσι λοιπόν κατά την πολτοποίηση, το βυνογλεύκος υποβάλλεται σε ένα πρόγραμμα θερμοκρασίας χρόνου, ανάλογα με την σύσταση που επιθυμούμε να αποκτήσει.

Το pH του βυνογλεύκου παίζει εξίσου σημαντικό ρόλο στη δράση των ενζύμων και με κατάλληλη ρύθμισή του είναι δυνατόν να αυξηθεί η ποσότητα του εκχυλίσματος. Μετά το τέλος της πολτοποίησης, το στερεό υπόλειμμα που δημιουργήθηκε, απομακρύνεται με τη βοήθεια φυσικών φίλτρων.

Σε αυτό το στάδιο η βύνη αναμιγνύεται με το νερό και θερμαίνεται σε συγκεκριμένες θερμοκρασίες και για καθορισμένο χρόνο ώστε να αυξηθεί η επιφάνεια της και να δράσουν τα

ένζυμα που θα μετατρέψουν το άμυλο σε ζυμώσιμα σάκχαρα. Με τη δράση των ενζύμων γίνεται η αποικοδόμηση των αδιάλυτων ουσιών της βύνης, κυρίως δηλαδή του αμύλου και των πρωτεϊνών και η μετατροπή τους σε διαλυτές (ζυμώσιμο και μη ζυμώσιμο εκχύλισμα). Τα προϊόντα της αποικοδόμησης αυτής (κυρίως το ζυμώσιμο και το μη ζυμώσιμο εκχύλισμα) θα χρησιμεύσουν: α) Για την ανάπτυξη των ζυμών και β) για να προσδώσουν ιδιαίτερα χαρακτηριστικά στη μύρα που θα παραχθεί.

Συγκεκριμένα όσον αφορά στην παραγωγή των σακχάρων, πρώτη δρα η β-αμυλάση (67° C) στα άκρα των μορίων του αμύλου και παράγει μαλτόζες και δεξτρίνες (σάκχαρα υψηλού μοριακού βάρους) και στη συνέχεια η α-αμυλάση (72°C) και οι γλυκοζιδάσες που διασπούν τα περισσότερα μόρια μεγάλου μοριακού βάρους παράγοντας κυρίως μαλτόζη, φρουκτόζη και γλυκόζη. Ταυτόχρονα δρουν και πρωτεάσες που διασπούν τις πρωτεΐνες, συνεισφέροντας στα αρωματικά στοιχεία του τελικού προϊόντος. Όταν πια αποικοδομηθεί όλη η ποσότητα αμύλου, η θερμοκρασία στη δεξαμενή πολτοποίησης ρυθμίζεται μεγαλύτερη των 78°C ώστε να καταστραφούν τα παραπάνω ένζυμα.

1.4.2.3 Διήθηση - Διαύγαση

Μετά το τέλος της πολτοποίησης, ο πολτός που έχει δημιουργηθεί αποτελείται από διαλυτές και αδιάλυτες ουσίες, το βυνογλεύκος και τα βυνοϋπολείμματα. Στα τελευταία περιλαμβάνονται το βλαστίδιο, τα λέπυρα και ουσίες οι οποίες δεν αποικοδομήθηκαν στο στάδιο της πολτοποίησης.⁵ Για να διαχωριστεί το βυνογλεύκος από τα βυνοϋπολείμματα χρησιμοποιείται είτε δοχείο με ψευδοπυθμένα (Lauter), στο οποίο υπάρχουν σήτες προκειμένου να διηθηθεί το υγρό μέρος (γλεύκος) και να κρατηθεί το στερεό (βυνοϋπόλειμμα),^{5,25} είτε με φίλτρα πλακών (φιλτρόπρεςσες).⁵ Η διαύγαση παίζει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή της μύρας διότι επηρεάζει την σταθεροποίησή της και την εικόνα της στο ποτήρι και θα πρέπει να έχει την σωστή ισορροπία για να μην χάνονται πολλά από τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της που την κάνουν να ξεχωρίζει.³

1.4.2.4 Βρασμός

Το βυνογλεύκος που λαμβάνεται από την διαύγαση υποβάλλεται σε βρασμό και παράλληλα γίνεται και η προσθήκη του λυκίσκου.⁵ Σε αυτό το στάδιο, ο λυκίσκος ελευθερώνει τα αιθέρια έλαιά του και τις ρητίνες, που δίνουν αντίστοιχα το άρωμα και την πικράδα στο τελικό προϊόν.⁴ Το βυνογλεύκος αποστειρώνεται κατά τον βρασμό και καταστρέφονται όλα τα ένζυμα. Σχηματίζονται και απομακρύνονται πρωτεΐνες και σύμπλοκα πρωτεϊνών-πολυφαινολικών ενώσεων με την μορφή κροκιδωμάτων, θερμού ιζήματος.⁵ Η συγκέντρωση του βυνογλεύκου

σε σάκχαρα αυξάνεται με τον βρασμό καθώς εξατμίζεται μεγάλο ποσοστό νερού.²⁹ Ο βρασμός του βυνογλεύκους πραγματοποιείται σε συστήματα βρασμού, τα οποία είναι: ανοιχτό δοχείο βρασμού με διπλό πυθμένα, δοχείο βρασμού με εσωτερικό ή εξωτερικό βραστήρα, δοχείο με συμπίεση και επαναχρησιμοποίηση των παραγόμενων υδρατμών και τέλος σύστημα βρασμού σε υψηλή θερμοκρασία.⁵

Με την ολοκλήρωση του βρασμού, είναι απαραίτητο να απομακρυνθεί το θερμό ιζήμα για να μη μεταβληθεί η δομή και να μην ελαττωθεί η θερμοκρασία του γλεύκου και αυξηθεί το ιξώδες, που επιδρά άμεσα στην διαδικασία διαχωρισμού. Οι τρόποι απομάκρυνσης του θερμού ιζήματος, είναι οι εξής: φυσική καθίζηση, φυγοκέντρωση με φυγόκεντρο Dekanter ή Whirlpool και φιλτράρισμα.⁵

1.4.2.5 Ψύξη

Έπειτα από την απομάκρυνση του θερμού ιζήματος, το ζυθογλεύκος ψύχεται στην ίδια δεξαμενή στην οποία έβρασε. Με την ψύξη, επιτυγχάνεται η ρύθμιση της θερμοκρασίας ζύμωσης και ο κορεσμός του γλεύκου για να αναπτυχθούν οι ζύμες καθώς η απομάκρυνση του ψυχρού ιζήματος.^{5,29} Η απομάκρυνση αυτή, μπορεί να πραγματοποιηθεί με φίλτρα ή με επίπλευση. Τα φίλτρα έχουν υψηλό κόστος, γι' αυτό προτιμάται η μέθοδος με επίπλευση. Στόχος σε αυτό το στάδιο είναι η ολική απομάκρυνση του θερμού ιζήματος και η μερική απομάκρυνση, σε ποσοστό 50 – 65%, του ψυχρού ιζήματος, με σκοπό την επίτευξη ταχύτερης ζύμωσης και ωρίμανσης, αλλά και την σταθεροποίηση της τελικής γεύσης της μπίρας.⁵

1.4.2.6 Ζύμωση

Όταν το γλεύκος ψυχθεί, μεταφέρεται στη δεξαμενή ζύμωσης, οπότε και προστίθεται η ζύμη.²⁵ Κύρια διεργασία κατά την ζύμωση είναι η ζύμη να αναπτυχθεί και να μετατρέψει το ζυμώσιμο εκχύλισμα (σάκχαρα) σε αιθυλική αλκοόλη και διοξείδιο του άνθρακα.^{5,47} Ταυτόχρονα όμως σχηματίζονται και άλλα προϊόντα, δευτερεύοντα, τα οποία επιδρούν τόσο θετικά όσο και αρνητικά στην γεύση και το άρωμα της μπίρας. Τα δευτερεύοντα αυτά προϊόντα είναι κυρίως εστέρες, θειούχες ενώσεις, αλδεΐδες, ανώτερες αλκοόλες και διακετύλιο.⁵ Η διάρκεια της ζύμωσης εξαρτάται κατά κύριο λόγο από την θερμοκρασία ζύμωσης, την ποιότητα της ζύμης και την πυκνότητα της μπίρας και κυμαίνεται συνήθως από 5 έως 7 ημέρες, αλλά μπορεί να διαρκέσει και περισσότερο.²⁵

1.4.2.7 Ωρίμανση

Μετά την ολοκλήρωση της ζύμωσης, η μύρα παραμένει για τουλάχιστον 2 εβδομάδες στην δεξαμενή σε χαμηλή θερμοκρασία, η οποία συνήθως κυμαίνεται από -2 έως 0°C, ενώ μπορεί να πραγματοποιηθεί και στους +2 και +3°C. Ωστόσο, όσο χαμηλότερη είναι η θερμοκρασία αυτή τόσο καλύτερα για την ποιότητα του τελικού προϊόντος και την σταθεροποίησή του.²⁵ Η μύρα μετά την ζύμωση, η οποία ονομάζεται πράσινη ή μη ώριμη μύρα, είναι θολή και περιέχει διάφορες ουσίες. Αυτό είναι αποδεκτό μόνο στην περίπτωση της επιθυμητής παραγωγής αφιλτράριστης και μη παστεριωμένης μύρας. Διαφορετικά, είναι αναγκαίο να φιλτραριστεί.⁵ Σκοπός της ωρίμανσης ή αλλιώς δεύτερης ζύμωσης, είναι η πλήρης ζύμωση των εναπομεινάντων σακχάρων από την πρώτη ζύμωση, η ανάπτυξη επιθυμητών ουσιών που συνεισφέρουν στο άρωμα και η αποικοδόμηση μη επιθυμητών ουσιών. Επίσης, επιτυγχάνεται παραγωγή φυσικού διοξειδίου του άνθρακα και αύξηση της γευστικής αρμονίας της μύρας.^{5,29}

1.4.2.8 Σταθεροποίηση

Η μύρα εξακολουθεί να είναι θολή και να έχει κύτταρα ζύμης και σύμπλοκα πρωτεϊνών – τανινών. Για να είναι όμως μια μύρα υψηλής ποιότητας, πρέπει να αποκτήσει διαύγεια και βιολογική σταθερότητα, δηλαδή να απομακρυνθούν τα βακτήρια, οι ζύμες και άλλοι μικροοργανισμοί που πιθανόν υπάρχουν, καθώς και οι πρωτεΐνες – τανίνες, για να μην επηρεαστεί η κολλοειδής σταθερότητα. Αυτό επιτυγχάνεται με φιλτράρισμα της ώριμης μύρας με διάφορα είδη φίλτρων.⁵ Έτσι, η μύρα αυξάνει την σταθερότητά της και την διάρκεια ζωής της. Αν δεν πραγματοποιηθεί αυτή η απομάκρυνση, οι πρωτεΐνες, μετά από ορισμένο χρονικό διάστημα, θα δημιουργήσουν θόλωμα.²⁵ Τέλος, για την αποφυγή βιολογικών ή μη βιολογικών θολωμάτων απαιτείται παστερίωση ή διήθηση μέσω μεμβρανών αντίστοιχα.⁵

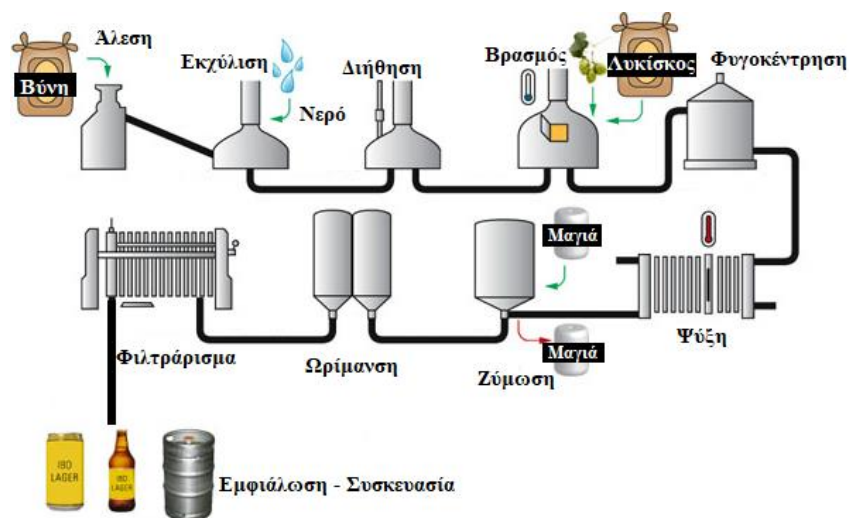
1.4.2.9 Προσθήκη διοξειδίου του άνθρακα – Παστερίωση – Εμφιάλωση – Συσκευασία

Η παστερίωση είναι μια θερμική επεξεργασία που υφίσταται η μύρα και εξασφαλίζει την βιολογική της σταθερότητα.²⁹ Λαμβάνει χώρα στους 30°C για 20 – 30 λεπτά και χρησιμοποιούνται παστεριωτήρες πλακών. Ωστόσο, είναι δυνατό να πραγματοποιείται μετά την εμφιάλωση. Τότε όμως εμφανίζει μερικά μειονεκτήματα, όπως είναι το υψηλό κόστος λειτουργίας, ο συνολικά μεγάλος χρόνος και η μεγάλη κατανάλωση νερού και θερμότητας. Η παστερίωση, εκτός από τον χρόνο και την θερμοκρασία, εξαρτάται και από την συγκέντρωση των μικροοργανισμών. Γι' αυτό είναι σημαντικό, όλος ο εξοπλισμός ο οποίος έρχεται σε επαφή με την μύρα να καθαρίζεται επιμελώς και να προστατεύεται.⁵ Υπάρχουν και μύρες οι οποίες δεν έχουν υποστεί παστερίωση. Αυτές θεωρούνται ποιοτικά καλύτερες από τις παστεριωμένες,

επειδή η παστερίωση υποβαθμίζει σε κάποιο βαθμό το προϊόν. Έχουν όμως μικρότερη διάρκεια ζωής.²⁵

Στην συνέχεια, ακολουθεί προσθήκη διοξειδίου του άνθρακα (ενανθράκωση) υπό πίεση.⁵ Εχθρός της μύρας είναι το οξυγόνο και γι' αυτό η εμφιάλωση πραγματοποιείται παρουσία διοξειδίου του άνθρακα (ανθρακικού). Έτσι, πριν το γέμισμα της φιάλης, αφαιρείται ο αέρας που υπάρχει και αντικαθίσταται από διοξείδιο του άνθρακα, βελτιώνοντας έτσι την τελική ποιότητα της μύρας.^{4,5}

Το τελικό στάδιο στην παραγωγή της μύρας είναι η εμφιάλωση και η συσκευασία. Η μύρα εμφιαλώνεται σε γυάλινα μπουκάλια, κουτάκια αλουμινίου ή βαρέλια.³ Στην συσκευασία περιλαμβάνεται, πέρα από το γέμισμα των φιαλών, το σφράγισμα αυτών, ο έλεγχος για την σωστή πλήρωση ή πιθανά ελαττώματα στα μέσα συσκευασίας, η τοποθέτηση ετικετών και πωμάτων και η τοποθέτηση σε πλαστικά ή χάρτινα δοχεία.⁵ Η τελική αποθήκευση της μύρας, σαν ποτό χαμηλό σε αλκοόλη και ευαίσθητο, απαιτεί δροσερό περιβάλλον μακριά από τον ήλιο και τις υψηλές θερμοκρασίες.³



Εικόνα 4. Στάδια παραγωγής μύρας.²⁵

1.5 ΣΑΚΧΑΡΑ

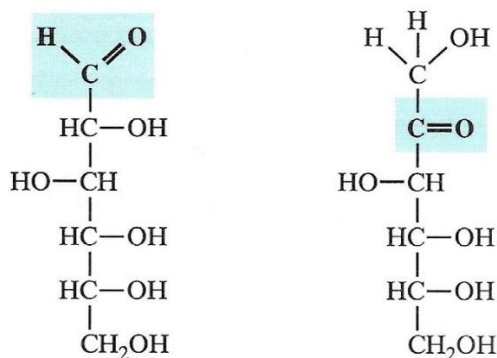
Τα σάκχαρα ή υδατάνθρακες είναι οργανικά μόρια που αποτελούνται από άτομα άνθρακα (C), υδρογόνου (H) και οξυγόνου (O) συνήθως σε αναλογία υδρογόνου-οξυγόνου 2:1. Έτσι προκύπτει ο εμπειρικός τύπος $C_n(H_2O)_n$, τον οποίο όμως δεν ακολουθούν όλα τα σάκχαρα (π.χ. τα δεοξυ-σάκχαρα όπως η δεοξυριβόζη $C_5H_{10}O_4$).

1.5.1 Ταξινόμηση των σακχάρων

Οι υδατάνθρακες χωρίζονται στις εξής κατηγορίες: μονοσακχαρίτες, ολιγοσακχαρίτες και πολυσακχαρίτες.

1.5.1.1 Μονοσακχαρίτες

Οι μονοσακχαρίτες είναι υδατάνθρακες που δεν μπορούν να υδρολυθούν σε άλλα μικρότερα μόρια όπως η φρουκτόζη και η γλυκόζη. Από χημική άποψη, είναι ενώσεις που περιέχουν πολλές υδροξυλομάδες και μία καρβονυλομάδα. Ανάλογα με το αν η καρβονυλομάδα είναι αλδεϋδομάδα ή κετονομάδα διακρίνονται σε αλδόζες και κετόζες, αντίστοιχα. Τα προθέματα αλδο- και κετο- προσδιορίζουν τη φύση της καρβονυλικής ομάδας, ενώ η κατάληξη -όζη υποδηλώνει τον υδατάνθρακα. Σε έναν μονοσακχαρίτη ο αριθμός των ατόμων υποδηλώνεται με τη χρήση των προθεμάτων τρι-, τετρ-, πεντ-, εξ-, και ούτω καθεξής (π.χ. η φρουκτόζη είναι μια κετοεξόζη, δηλαδή ένα σάκχαρο με έξι άτομα άνθρακα και μια κετονομάδα, ενώ η γλυκόζη είναι μια αλδοεξόζη, δηλαδή ένα σάκχαρο με έξι άτομα άνθρακα και μια αλδεϋδομάδα).



Εικόνα 5. Η εικόνα της γλυκόζης (αλδοεξόζης) αριστερά και η εικόνα της φρουκτόζης (κετόζης) δεξιά.⁴⁸

A) Είδη δομών

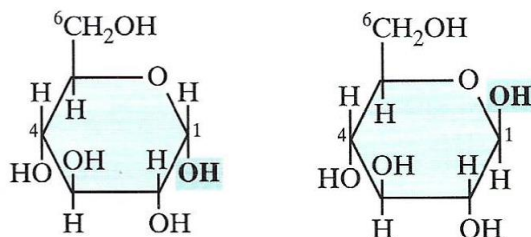
Οι δομές στους μονοσακχαρίτες και γενικότερα στους υδατάνθρακες διακρίνονται στις δομές κατά Fischer και κατά Haworth.

Στη δομή κατά Fischer η αλδεϋδομάδα (CHO) ή η κετονομάδα (C=O) γράφονται προς τα πάνω. Οι άνθρακες προβάλλονται κάθετα και παραλείπονται της γραφής εκτός αυτών που συμμετέχουν στην υδροξυμεθυλομάδα (CH₂OH). Τα υδροξύλια (-OH) και τα υδρογόνα (-H) προβάλλονται και γράφονται οριζόντια με τις θέσεις τους να είναι καθορισμένες διότι αν αλλάξουν δημιουργείται άλλος μονοσακχαρίτης.

Οι μονοσακχαρίτες ανάλογα με τη θέση του πιο απομακρυσμένου υδροξυλίου του ασύμμετρου άνθρακα της αλδεϋδομάδας ή της κετονομάδας χαρακτηρίζονται ως D εάν το υδροξύλιο είναι δεξιά ή L εάν το υδροξύλιο είναι αριστερά.

Στη δομή κατά Haworth, σχεδιάζεται είτε ένας πενταγωνικός δακτύλιος με ένα άτομο οξυγόνου και με τέσσερα άτομα άνθρακα, ο οποίος ονομάζεται φουρανόζη, είτε ένας εξαγωνικός δακτύλιος με ένα άτομο οξυγόνου και πέντε άτομα άνθρακα, ο οποίος ονομάζεται πυρανόζη. Το οξυγόνο σε μόρια αποτελούμενα από πέντε άτομα άνθρακα βρίσκεται πάντα στο επάνω μέρος, ενώ σε μόρια αποτελούμενα από έξι άτομα άνθρακα βρίσκεται πάντα στο επάνω δεξιά μέρος. Όταν η υδροξυμεθυλομάδα (CH₂OH) γράφεται στο πάνω μέρος του δακτυλίου πρόκειται για D-μονοσακχαρίτη, ενώ όταν γράφεται στο κάτω μέρος πρόκειται για L-μονοσακχαρίτη. Όσον αφορά τα υδροξύλια, αυτά τα οποία στην προβολή κατά Fischer γράφονται δεξιά, στον δακτύλιο γράφονται κάτω, ενώ αυτά που στην προβολή κατά Fischer γράφονται αριστερά, στον δακτύλιο γράφονται πάνω. Καθώς σχηματίζεται ο δακτύλιος, δημιουργείται ένα καινούργιο υδροξύλιο, από την αντίδραση της αλδεϋδομάδας ή της κετονομάδας με ένα υδροξύλιο, που ονομάζεται ημιακεταλικό. Το υδροξύλιο αυτό όταν βρίσκεται προς τα κάτω στον δακτύλιο ονομάζεται α-ανωμερές, ενώ όταν βρίσκεται προς τα πάνω στον δακτύλιο ονομάζεται β-ανωμερές. Τα δύο κυκλικά μόρια των δακτυλίων αυτών είναι στερεοϊσομερή. Με την αντίδραση σχηματισμού ημιακετάλης και τη μετατροπή της ανοιχτής αλυσίδας του μονοσακχαρίτη σε πυρανόζη ή φουρανόζη, σχηματίζεται ένα νέο στερεογονικό κέντρο στη θέση όπου υπήρχε το καρβονύλιο και συνεπώς προκύπτουν δύο νέα διαστερομερή που αποκαλούνται ανωμερή, ενώ ο ημιακεταλικός άνθρακας αναφέρεται ως ανωμερικό κέντρο. Ειδικότερα η γλυκόζη κυκλοποιείται αντιστρεπτά σε υδατικό διάλυμα σχηματίζοντας μίγμα ανωμερών με αναλογία 36:64. Το ανωμερές που σχηματίζεται σε μικρότερη αναλογία και στο οποίο η ομάδα -OH του 1^{ου} ατόμου C βρίσκεται σε θέση trans ως

προς τον υποκαταστάτη $-\text{CH}_2\text{OH}$ του $5^{\text{ου}}$ ατόμου C (κατεύθυνση προς τα κάτω στην προβολή Haworth), ονομάζεται α ανωμερές (α -D-γλυκοκυραζόνη). Το ανωμερές που σχηματίζεται σε μεγαλύτερη αναλογία και στο οποίο η ομάδα $-\text{OH}$ του $1^{\text{ου}}$ ατόμου C βρίσκεται σε θέση *cis* ως προς τον υποκαταστάτη $-\text{CH}_2\text{OH}$ του $5^{\text{ου}}$ ατόμου C (κατεύθυνση προς τα επάνω στην προβολή Haworth), ονομάζεται β ανωμερές (β -D-γλυκοκυραζόνη).



Εικόνα 6. Η εικόνα της α -d-γλυκόζης αριστερά και η εικόνα της β -d-γλυκόζης δεξιά.⁴⁸

B) Ιδιότητες μονοσακχαριτών

Γενικά έχουν χρώμα λευκό, είναι στερεοί με γλυκιά γεύση και κατά κύριο λόγο διαλύονται εύκολα στο νερό. Οι χημικές τους ιδιότητες οφείλονται στις πολλές υδροξυλομάδες που διαθέτουν.

Εμφανίζουν:

- Αναγωγικό χαρακτήρα, που εκδηλώνεται από αντίδραση ακόμη και με ήπια οξειδωτικά μέσα όπως είναι τα αντιδραστήρια Fehling (διάλυμα CuSO_4 σε NaOH) και Tollens (διάλυμα AgNO_3 σε NH_3). Οι δύο αυτές αντιδράσεις βοηθούν στην ανίχνευση και τον προσδιορισμό των σακχάρων.
- Σχηματισμό γλυκοζιτικού δεσμού, που δημιουργείται από τη συμπύκνωση δύο υδροξυλίων διαφορετικών μορίων με απόσπαση ενός μορίου νερού.

Οι σχηματιζόμενες ενώσεις λέγονται γλυκοζίτες και σε αυτές ανήκουν οι ολιγοσακχαρίτες και οι πολυσακχαρίτες.

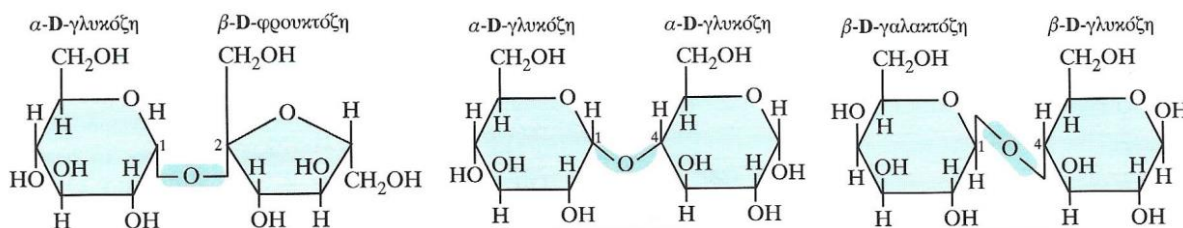
1.5.1.2 Ολιγοσακχαρίτες

Ανάλογα με τον αριθμό των μονοσακχαριτών (2 έως 10 μορίων) που περιέχουν στο μόριό τους, οι ολιγοσακχαρίτες ονομάζονται δι-, τρι-, τετρα-, πεντασακχαρίτες, κ.ο.κ. Οι ολιγοσακχαρίτες μπορούν να υδρολυθούν και να αποδώσουν τους μονοσακχαρίτες από τους οποίους

αποτελούνται. Διασπώνται με τη βοήθεια οξέων ή ενζύμων που ονομάζονται γλυκοζιδάσες. Οι διάφοροι τύποι ολιγοσακχαριτών δημιουργούνται από διάφορους γλυκοζιτικούς δεσμούς σε α- ή β- διαμόρφωση οπότε λαμβάνουν αντίστοιχα την ονομασία α-γλυκοζιτικός και β-γλυκοζιτικός δεσμός, αντίστοιχα. Ανάλογα με το εάν μένει ή όχι ελεύθερο το ημιακεταλικό υδροξύλιο (-OH) διακρίνονται σε ανάγοντες και μη ανάγοντες ολιγοσακχαρίτες.⁵ Οι κυριότεροι ολιγοσακχαρίτες είναι οι δισακχαρίτες και από αυτούς οι σημαντικότεροι είναι οι εξής:

- Σακχαρόζη, ή καλαμοσάκχαρο, ή σουκρόζη, ή ζάχαρη. Ο πιο διαδεδομένος δισακχαρίτης που προέρχεται από την ένωση ενός μορίου φρουκτόζης και ενός μορίου γλυκόζης.
- Μαλτόζη. Προέρχεται από την ένωση δύο μορίων γλυκόζης και σχηματίζεται κατά την υδρόλυση του αμύλου ως ενδιάμεσο προϊόν.
- Λακτόζη ή γαλακτοσάκχαρο. Προέρχεται από την ένωση ενός μορίου γλυκόζης και ενός μορίου γαλακτόζης.

Χαρακτηριστικό της μαλτόζης είναι ότι διαθέτει ελεύθερο ημιακεταλικό υδροξύλιο -OH, οπότε ο δισακχαρίτης λαμβάνει τη διαμόρφωση α ή β ανωμερούς (α-μαλτόζη ή β-μαλτόζη). Όταν το ένα ανωμερές διαλυθεί στο νερό μετατρέπεται στο άλλο ανωμερές διαμέσου της ανοιχτής μορφής. Το φαινόμενο ονομάζεται πολυστροφισμός. Έτσι μπορεί να μετατραπεί σε ανοιχτή μορφή και να εμφανίσει την αλδεϋδομάδα (CH=O). Η αλδεϋδομάδα CH=O οξειδώνεται από τα αντιδραστήρια Tollens και Fehling. Επομένως η μαλτόζη είναι ανάγον σάκχαρο σε αντίθεση με τη σουκρόζη που δεν διαθέτει ημιακεταλικό υδροξύλιο -OH, αφού τα δύο ημιακεταλικά υδροξύλια -OH της γλυκόζης και της φρουκτόζης σχηματίζουν τον γλυκοζιτικό δεσμό. Συνεπώς η σουκρόζη δεν εμφανίζει πολυστροφισμό και ούτε οξειδώνεται από τα αντιδραστήρια Tollens και Fehling, δηλαδή δεν είναι ανάγον σάκχαρο.⁴⁹



Εικόνα 7. Δομές Σακχαρόζης, Μαλτόζης και Λακτόζης, από τα αριστερά προς τα δεξιά⁴⁸

1.5.1.3 Πολυσακχαρίτες ή γλυκάνες

Ως πολυσακχαρίτες (ή γλυκάνες) ορίζονται τα υψηλού μοριακού βάρους πολυμερή, τα οποία προέρχονται από την συμπύκνωση μεγάλου αριθμού απλών σακχάρων συνδεδεμένα μέσω γλυκοζιτικών δεσμών. Με την υδρόλυσή τους οι πολυσακχαρίτες σχηματίζουν κατ' αρχάς ολιγοσακχαρίτες και στη συνέχεια μονοσακχαρίτες. Επειδή δεν υπάρχουν ελεύθερα ανωμερικά υδροξύλια, εκτός από αυτό του άκρου της πολυμερικής αλυσίδας, οι πολυσακχαρίτες δεν είναι αναγωγικά σάκχαρα, δεν έχουν γλυκιά γεύση, ούτε εμφανίζουν πολυμορφισμό, σχηματίζουν κολλοειδή διαλύματα και είναι εξαιρετικά υδρόφιλες ενώσεις. Οι πολυσακχαρίτες διακρίνονται, ανάλογα με τη σύστασή τους σε ομοπολυσακχαρίτες (άμυλο, κυτταρίνη, γλυκογόνο) το μόριο των οποίων αποτελείται από ένα είδος απλού σακχάρου, και σε ετεροπολυσακχαρίτες (ημικυτταρίνες, κόμμεα) το μόριο των οποίων αποτελείται από δύο ή περισσότερα συστατικά.⁴⁹ Οι πιο σημαντικοί πολυσακχαρίτες, οι οποίοι αποτελούνται από επαναλαμβανόμενες μονάδες γλυκόζης, είναι:

- Το άμυλο, που αποτελεί την κύρια εφεδρική ουσία των φυτών και εναποτίθεται σε μεγάλες ποσότητες στα δημητριακά και στις πατάτες. Εμφανίζεται με δύο μορφές, την αμυλόζη, που αποτελεί το 20%-30% του αμύλου και σχηματίζεται από 250-300 μονάδες γλυκόζης γραμμικά διατεταγμένες, και την αμυλοπηκτίνη, που αποτελεί το υπόλοιπο ποσοστό του αμύλου και εμφανίζει διακλαδώσεις ανά 25 περίπου μονάδες γλυκόζης. Η δομή του μορίου μοιάζει με εκείνη του γλυκογόνου. Το σημαντικότερο πεπτικό ένζυμο του αμύλου είναι η α-αμυλάση, που βρίσκεται στο σάλιο και στο λεπτό έντερο.
- Το γλυκογόνο, που αποτελεί την κύρια αποταμιευτική μορφή της γλυκόζης των ζωικών κυττάρων.
- Η κυτταρίνη, που αποτελείται από 8.000 - 12.000 επαναλαμβανόμενες μονάδες γλυκόζης και μοριακό βάρος περίπου 1-2.000.000. Συναντάται στα φυτά και αποτελεί δομικό συστατικό τους. Τα ένζυμα που διασπούν την κυτταρίνη ονομάζονται κυτταρινάσες, είναι διαδεδομένα στους μικροοργανισμούς που αποτελούν την μικροχλωρίδα του στομάχου των μηρυκαστικών και αποτελούν τον λόγο που τα μηρυκαστικά πέμπουν την κυτταρίνη.

1.5.2 Ο ρόλος των σακχάρων

Τα σάκχαρα, σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς, κατά κύριο λόγο, χρησιμεύουν για την παραγωγή ενέργειας. Ο σημαντικότερος υδατάνθρακας είναι η γλυκόζη. Παραδείγματος χάριν στον άνθρωπο είναι η μοναδική πηγή ενέργειας του εγκεφάλου και του κεντρικού νευρικού συστήματος. Μετά την καύση της παράγεται διοξείδιο του άνθρακα και νερό ενώ απελευθερώνονται 4 Kcal / 1 g γλυκόζης. Στα κύτταρα η αντίδραση αυτή εκδηλώνεται κατά την κυτταρική αναπνοή με βραδύ ρυθμό, ώστε η απελευθέρωση της ενέργειας να είναι ελεγχόμενη.

Οι υδατάνθρακες επιτελούν ποικίλους ρόλους στον οργανισμό. Εκτός από πηγή ενέργειας, η γλυκόζη αλλά και άλλα σάκχαρα, όπως και ενδιάμεσα προϊόντα του μεταβολισμού τους, αποτελούν την πρώτη ύλη για τη βιοσύνθεση διάφορων βιομορίων μεγάλης βιολογικής σημασίας, όπως νουκλεϊνικά οξέα, γλυκοπρωτεΐνες, γλυκολιπίδια, συνένζυμα κ.ά. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι τα σάκχαρα δεοξυριβόζη και ριβόζη που αποτελούν δομικά συστατικά του DNA και RNA αντίστοιχα.

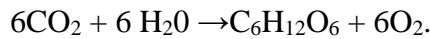
1.5.3 Ανάγοντα σάκχαρα – ζυμώσιμα

Ανάγοντα σάκχαρα είναι εκείνα τα οποία μπορούν να οξειδωθούν. Όταν ο ανωμερής άνθρακας είναι συνδεδεμένος με υδροξυλομάδα ή όταν στο ελεύθερο ανωμερικό άκρο της κυκλικής δομής του σακχάρου υπάρχει απευθείας συνδεδεμένο υδροξύλιο τότε το σάκχαρο είναι αναγωγικό. Αναγωγικά σάκχαρα είναι όλοι οι μονοσακχαρίτες και ορισμένοι ολιγοσακχαρίτες. Οι πιο γνωστοί αναγωγικοί μονοσακχαρίτες είναι η γλυκόζη και η φρουκτόζη. Οι αναγωγικοί ολιγοσακχαρίτες, όπως η λακτόζη και η μαλτόζη έχουν μόνο ένα αναγωγικό άκρο, καθώς συγκρατούνται μεταξύ τους με γλυκοζιτικούς δεσμούς, οι οποίοι αποτελούνται από έναν ανωμερή άνθρακα. Ο ελεύθερος ανωμερής άνθρακας μπορεί να μετατραπεί σε μορφή ανοιχτής αλυσίδας με ομάδα αλδεΐδης.

1.5.3.1 Γλυκόζη

Η γλυκόζη είναι ο σημαντικότερος μονοσακχαρίτης, καθώς χρησιμοποιείται ως πηγή ενέργειας από όλους σχεδόν τους οργανισμούς, από τα απλά βακτήρια μέχρι και τον ανθρώπινο οργανισμό, μέσω της αναπνοής, αερόβιας ή αναερόβιας ή μέσω της ζύμωσης. Είναι μια αλδοεξόζη, δηλαδή ένα σάκχαρο αποτελούμενο από έξι άτομα άνθρακα και μια αλδεΐδομάδα και δεν μπορεί να υδρολυθεί σε μικρότερα μόρια. Αποτελεί μέρος των δισακχαριτών, όπως η

σακχαρόζη που αποτελείται από ένα μόριο φρουκτόζης και ένα μόριο γλυκόζης, των ολιγοσακχαριτών, των πολυσακχαριτών, όπως το άμυλο, το οποίο αποτελείται από πολλές μονάδες γλυκόζης, καθώς και των γλυκοζιτών. Η γλυκόζη είναι από τα κυριότερα προϊόντα της φωτοσύνθεσης. Το ηλιακό φως προσφέρει την ενέργεια που απαιτείται προκειμένου να μετατραπεί το διοξείδιο του άνθρακα σε γλυκόζη, σύμφωνα με την αντίδραση:



Υπάρχουν αρκετές διαφορετικές μοριακές δομές της γλυκόζης, όμως στη φύση υπάρχει ένα ζεύγος ισομερών της. Η D-γλυκόζη ή δεξτρόζη, ονομασία η οποία έχει προέλθει από τον όρο "δεξιόστροφη γλυκόζη" και η L-γλυκόζη (αριστερόστροφη γλυκόζη), η οποία απαντάται σπάνια στη φύση.

Όσο αφορά την μύρα, η γλυκόζη είναι το βασικότερο σάκχαρο που χρειάζεται η μαγιά για να μπορέσει να παράξει αλκοόλη και διοξείδιο του άνθρακα. Επιπλέον, η γλυκόζη αποτελεί τον δομικό λίθο του αμύλου. Το άμυλο που υπάρχει στη βύνη αποτελείται από 80% αμυλοπηκτίνη και 20% αμυλόζη. Η αμυλόζη και η αμυλοπηκτίνη είναι δύο πολυμερή της α-γλυκόζης. Τέλος, το ζυθογλεύκος περιέχει περίπου 7% γλυκόζη και 20% μαλτοτριόζη, η οποία αποτελείται από τρία μόρια γλυκόζης.

1.5.3.2 Φρουκτόζη

Η φρουκτόζη είναι το δεύτερο πιο σημαντικό σάκχαρο μετά την γλυκόζη. Η φρουκτόζη βρίσκεται σε μεγάλη αναλογία στο μέλι και σχεδόν σε όλα τα ώριμα φρούτα, γι' αυτό συχνά χαρακτηρίζεται ως οπωροσάκχαρο. Παράγεται από την ζάχαρη μετά από διαδικασία υδρόλυσης. Μπορεί να παραχθεί και από το άμυλο από το οποίο η γλυκόζη, η οποία δημιουργείται μετά την υδρόλυση του αμύλου, μετατρέπεται σε φρουκτόζη, συνήθως ενζυμικά, με αποτέλεσμα να προκύπτουν τα αμυλοσιρόπια υψηλής συγκέντρωσης φρουκτόζης.

Για τον ανθρώπινο οργανισμό, βασική ιδιότητα της φρουκτόζης είναι η απορρόφησή της από τον οργανισμό, η οποία πραγματοποιείται κυρίως στο συκώτι και γίνεται αργά και ομοιόμορφα. Γι' αυτό, μια ποσότητα παραμένει περισσότερο σε διαθεσιμότητα και επειδή όταν απορροφηθεί μεταβολίζεται αμέσως με παραγωγή γλυκογόνου υπάρχει μια σύντομη παραγωγή ενέργειας στον οργανισμό.

Βιομηχανικά και τεχνολογικά έχει μεγαλύτερη γλυκύτητα σε σχέση με την ζάχαρη και παρουσιάζει μια περισσότερο δροσιστική και καθαρή γεύση στα αναψυκτικά προκειμένου να έχουν μια καλύτερη γεύση, συνεργατικά με άλλα σάκχαρα.

1.5.3.3 Μαλτόζη

Η μαλτόζη είναι ένας ολιγοσακχαρίτης και αποτελείται από δυο μόρια γλυκόζης ενωμένα με έναν α(1→4) γλυκοζιτικό δεσμό. Εάν προστεθεί στην μαλτόζη ένας επιπλέον δακτύλιος γλυκόζης δημιουργείται η μαλτοτριόζη, ενώ με την προσθήκη ακόμη περισσότερων μορίων γλυκόζης δημιουργούνται ολιγοσακχαρίτες οι οποίοι είναι γνωστοί ως δεξτρίνες και χρησιμοποιούνται στα τρόφιμα ως πρόσθετα.

Στον ανθρώπινο οργανισμό κατά τη διάρκεια του τελικού σταδίου της πέψης των αμυλούχων τροφών, η μαλτόζη διασπάται σε δύο μόρια γλυκόζης από το ένζυμο μαλτάση.

Η μαλτόζη περιέχεται σε μεγάλη ποσότητα στους βλαστημένους καρπούς δημητριακών, στους οποίους το άμυλο που υπήρχε αρχικά έχει αρχίσει να διασπάται από τις αμυλάσες σε μικρότερες αλυσίδες γλυκόζης. Επιπλέον, αποτελεί ένα από τα προϊόντα της διάσπασης του αμύλου. Κατά την πολτοποίηση, όπου τα φυσικά ένζυμα που βρίσκονται στη βύνη, και συγκεκριμένα το ένζυμο β-αμυλάση, διασπούν το άμυλο που υπάρχει για να δημιουργήσουν μεγάλες ποσότητες μαλτόζης, περίπου το 45% της συνολικής περιεκτικότητας των σακχάρων του γλεύκους. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, η μαλτόζη που υπάρχει στο γλεύκος μεταφέρεται στα κύτταρα του ζυμομύκητα και διασπάται στα συστατικά της πριν από τον επόμενο μεταβολισμό σε κυτταρικά συστατικά, αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα.

1.5.4 Αζύμωτο σάκχαρο

Η μύρα περιέχει αζύμωτο σάκχαρο που οφείλεται στη σκόπιμη παύση της ζύμωσης ή σε ατελή ζύμωση λόγω κακής κατάστασης τη ζύμης. Αυτό αποτελείται από δεξτρίνες, μαλτοτριόζη, μαλτόζη και ίχνη γλυκόζης και φρουκτόζης. Ωστόσο υπό φυσιολογικές συνθήκες ζυμώνεται πλήρως. Η συγκέντρωση του στις τυπικές μύρες του εμπορίου εκφρασμένη ως γλυκόζη, κυμαίνεται μεταξύ 0,89 – 5,98% w/v. Ο προσδιορισμός του αζύμωτου σακχάρου μπορεί να γίνει με διάφορες χημικές μεθόδους καθώς επίσης και με ενόργανες μεθόδους ανάλυσης όπως η HPLC.

1.5.5 Μέθοδοι προσδιορισμού σακχάρων

1.5.5.1 Μέθοδος Rebelein

Η μέθοδος Rebelein βασίζεται στην αντίδραση του αλκαλικού διαλύματος θειικού χαλκού, καθώς τα σάκχαρα οξειδώνονται, προκαλούν αναγωγή του χαλκού από Cu^{2+} σε Cu^+ , όπου παραμένει σε περίσσεια μετά την αντίδραση, το υπόλοιπο ποσό του Cu^{2+} αντιδρά με ιόντα ιωδίου και ακολουθεί ογκομέτρηση με θειοθειικό νάτριο.⁵⁰

1.5.5.2 Μέθοδος Luff

Η μέθοδος Luff βασίζεται, όπως και η μέθοδος Rebelein, στην αντίδραση των αναγόντων σακχάρων με το αλκαλικό διάλυμα θειικού χαλκού και έχει ως εξής: Γνωστή ποσότητα διαλύματος σακχάρων αντιδρά με γνωστή ποσότητα αλκαλικού διαλύματος χαλκού. Η περίσσεια των ιόντων Cu^{2+} που δεν αντέδρασαν με τα σάκχαρα προσδιορίζονται ιωδιομετρικά. Μετατρέπονται σε ιόντα Cu^+ με προσθήκη ιωδιούχου καλίου το οποίο σε όξινο περιβάλλον δίνει I_2 σύμφωνα με την αντίδραση : $2\text{I}^- + 2\text{Cu}^{++} \rightarrow \text{I}_2 + 2\text{Cu}^+$. Το σχηματιζόμενο I_2 προσδιορίζεται με τιτλοδότηση από το διάλυμα θειοθειικού νατρίου σύμφωνα με την αντίδραση: $\text{I}_2 + 2\text{S}_2\text{O}_3^{2-} \rightarrow 2\text{I}^- + \text{S}_4\text{O}_6^{2-}$. Το άμυλο με το I_2 δίνει ένα σύμπλοκο κυανού χρώματος το οποίο όταν αποχρωματιστεί καθορίζεται το τέλος της αντίδρασης. Ο δείκτης προστίθεται όταν το μεγαλύτερο ποσοστό του I_2 έχει αναχθεί για να είναι πιο σαφής η αλλαγή του χρώματος.^{51,52}

1.5.5.3 Μέθοδος Lane – Eynon

Στη μέθοδο Lane Eynon, διάλυμα σακχάρων προστίθεται σε μείγμα διαλυμάτων Fehling A και B (1:1) που βράζουν. Αρχικά αποσπάται οξυγόνο και παράγεται οξείδιο του χαλκού. Αυτό μεταπίπτει αμέσως στο κεραμοκόκκινο Cu_2O . Η συνολική αντίδραση οξειδοαναγωγής είναι: $\text{RCHO} + \text{Cu}(\text{OH})_2 + \text{NaOH} \rightarrow \text{RCOONa} + \text{Cu}_2\text{O} + 3\text{H}_2\text{O}$. Το τελικό σημείο της ογκομέτρησης αναγνωρίζεται παρουσία δείκτη μπλε του μεθυλενίου που αποχρωματίζεται με την πρώτη περίσσεια ανάγοντος σακχάρου, αφήνοντας να φανεί το κεραμοκόκκινο χρώμα του σχηματισθέντος Cu_2O . Η οξείδωση των σακχάρων δεν ακολουθεί απλή στοιχειομετρική εξίσωση, αλλά επέρχεται με διάσπαση του μορίου των σακχάρων.^{52,53}

1.5.5.4 Μέθοδος Kolthoff

Η μέθοδος Kolthoff είναι ένας ιωδιομετρικός προσδιορισμός αλδοζών, καθώς διάλυμα σακχάρων κατεργάζεται με περίσσεια διαλύματος ιωδίου σε αλκαλικό περιβάλλον και στη

συνέχεια οξινίζεται με υδροχλώριο ή θειικό οξύ. Η περίσσεια του I^2 ογκομετρείται με θειοθειικό νάτριο. Η αντίδραση οξειδωσης των αλδοζών είναι:

$RCHO + I_2 + 3NaOH \rightarrow RCOONa + 2NaI + 2H_2O$. Οι αλδόζες οξειδώνονται προς τα αντίστοιχα αλδονικά οξέα, ενώ οι κετόζες παραμένουν σχεδόν αναλλοίωτες. Έτσι είναι δυνατός ο προσδιορισμός των αλδοζών παρουσία κετοζών. Τα μη ανάγοντα σάκχαρα, όπως η σακχαρόζη, προσδιορίζονται από την διαφορά που παρουσιάζει στην αναγωγική ικανότητα το σακχαρούχο διάλυμα πριν και μετά την υδρόλυση των σακχάρων.⁵⁴

1.5.5.5 Μέθοδος Fehling

Η μέθοδος Fehling βασίζεται στην ιδιότητα των αναγόντων σακχάρων να οξειδώνονται καθώς ανάγουν το φελίγγειο υγρό, που αποτελείται από πενταένυδρο θειικό χαλκό και τετραένυδρο τρυγικό καλιονάτριο σε ίση αναλογία. Κατά την αντίδραση προκαλείται θέρμανση, οι αλδεϋδομάδες των σακχάρων οξειδώνονται σε οξύ και σχηματίζεται οξειδίο του χαλκού που καταβυθίζεται ως κόκκινο ίζημα και υποδεικνύει την παρουσία αναγωγικών σακχάρων. Έτσι η μέθοδος χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των μονοσακχαριτών, συγκεκριμένα των αλδοζών και των κετοζών. Εάν δεν υπάρχουν αναγωγικά σάκχαρα στο δείγμα, το διάλυμα θα παραμείνει ένα μπλε χρώμα.⁵⁵

1.5.5.6 Μέθοδος Munson και Walker

Η μέθοδος Munson και Walker είναι αναγωγική μέθοδος. Επειδή χρησιμοποιείται διάλυμα Fehling, στηρίζεται στην οξείδωση των σακχάρων με ταυτόχρονη αναγωγή του χαλκού σε δισθενή ιόντα χαλκού Cu^{2+} . Αποτέλεσμα αυτού είναι το ίζημα του οξειδίου του χαλκού Cu_2O , το οποίο αρχικά πλένεται καλά με νερό, στην συνέχεια με αλκοόλη και τέλος με αιθέρα. Μετά το πλύσιμο ακολουθεί ξήρανση και ζύγιση του ιζήματος αυτού. Ο τελικός προσδιορισμός του σακχάρου υπολογίζεται από τον πίνακα των Munson και Walker με βάση το συγκεκριμένο βάρος σε χιλιοστόγραμμα (mg).⁵⁶

1.5.5.7 Μέθοδος Bertrand

Η μέθοδος του Bertrand βασίζεται στην αναγωγική δράση της ζάχαρης σε αλκαλικό διάλυμα τρυγικού συμπλόκου με ιόν χαλκού. Το οξειδίο του μονοσθενούς χαλκού που σχηματίζεται, διαλύεται σε θερμό όξινο διάλυμα θειικού σιδηροαμμωνίου. Το θειικό σιδηροαμμώνιο ανάγεται σε $FeSO_4$ και τιτλοδοτείται έναντι υπερμαγγανικού καλίου. Η ισοδυναμία Cu με την ποσότητα του αναγωγικού σακχάρου υπολογίζεται από πίνακα.⁵⁷

1.5.5.8 Μέθοδος Knight και Allen

Η μέθοδος Knight και Allen προσδιορίζει τα ανάγοντα σάκχαρα λευκής ή υπέρλευκης ζάχαρης, εκφρασμένα σε ιμπερτοσάκχαρο. Το αντιδραστήριο που χρησιμοποιείται περιέχει δισθενή χαλκό και προστίθεται σε περίσσεια στο προς ανάλυση διάλυμα, με αποτέλεσμα την αναγωγή του χαλκού. Όση από την ποσότητα δεν ανάγεται, πραγματοποιείται επανογκομέτρηση με διάλυμα EDTA. Για την εμφάνιση των αποτελεσμάτων χαράσσεται μια καμπύλη με γνωστές ποσότητες ιμπερτοσακχάρου και με βάση την ποσότητα του EDTA που καταναλώθηκε βρίσκεται η ποσότητα των αναγόντων σακχάρων του άγνωστου διαλύματος.⁵²

1.5.5.9 Μέθοδος του Ινστιτούτου του Βερολίνου

Η μέθοδος του Ινστιτούτου του Βερολίνου προσδιορίζει την περιεκτικότητα σε ανάγοντα σάκχαρα, εκφρασμένα σε ιμπερτοσάκχαρο στην ημίλευκη ζάχαρη. Σύμφωνα με αυτή την μέθοδο, γίνεται αναγωγή διαλύματος δισθενούς χαλκού με διάλυμα αναγόντων σακχάρων, σχηματίζοντας οξείδιο του χαλκού. Σε αυτό προστίθεται διάλυμα ιωδίου σε περίσσεια, η οποία προσδιορίζεται με ογκομέτρηση με διάλυμα θειοθειικού νατρίου. Με βάση αυτή την κατανάλωση προσδιορίζεται η περιεκτικότητα σε ανάγοντα σάκχαρα.⁵²

1.5.5.10 Μέθοδος Benedict

Η μέθοδος Benedict είναι ποιοτική, διότι βασίζεται στην αλλαγή του χρώματος από πορτοκαλί έως κεραμοκόκκινο, όταν τα ανάγοντα σάκχαρα αναμειχθούν με το αντιδραστήριο Benedict και θερμανθούν. Αυτή η αντίδραση προκαλείται επειδή τα ιόντα του δισθενούς χαλκού στο αντιδραστήριο Benedict ανάγονται σε ιόντα μονοσθενούς χαλκού που προκαλούν και την αλλαγή χρώματος. Το κόκκινο οξείδιο του μονοσθενούς χαλκού σχηματίζει ίζημα που όσο αυξάνεται η συγκέντρωση των αναγόντων σακχάρων τόσο περισσότερο ίζημα σχηματίζεται και τόσο το χρώμα γίνεται πιο καφεκόκκινο - κεραμοκόκκινο. Το αντιδραστήριο Benedict αποτελείται από ιόντα κιτρικού νατρίου συμπλοκοποιημένα με ιόντα δισθενή χαλκού.⁵⁸

1.5.5.11 Μέθοδος Tollens

Η μέθοδος Tollens είναι ποιοτική διότι βασίζεται στη δημιουργία ενός "ασημένιου κάτοπτρου", όταν τα ανάγοντα σάκχαρα αναμειχθούν με το αντιδραστήριο Tollens. Αυτή η αντίδραση προκαλείται επειδή το σύμπλοκο διαμίνης αργύρου (I) οξειδώνει την αλδεϋδη, που υπάρχει στα αντίστοιχα αναγωγικά σάκχαρα, σε οξύ και στη διαδικασία αυτή ανάγεται σε στοιχειακό άργυρο και υδατική αμμωνία. Ο στοιχειακός άργυρος καθιζάνει στην εσωτερική επιφάνεια του δοχείου αντίδρασης, δημιουργώντας αυτό το "ασημένιο κάτοπτρο".⁵⁹

1.5.5.12 Μέθοδος Barfoed

Η μέθοδος Barfoed είναι χρωματομετρική και χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των μονοσακχαριτών. Βασίζεται στην αναγωγή του οξικού χαλκού(II) σε οξείδιο του χαλκού(I), το οποίο σχηματίζει ένα κεραμοκόκκινο ίζημα, καθώς οι αλδεϋδομάδες των σακχάρων οξειδώνονται σε οξύ. Εάν εμφανιστεί κεραμοκόκκινο ίζημα στο δοχείο αντίδρασης υπάρχει μονοσακχαρίτης.⁶⁰

1.5.5.13 Μέθοδος Molisch

Η μέθοδος Molisch είναι χρωματομετρική και χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των υδατανθράκων. Οι υδατάνθρακες με επίδραση υδροχλωρικού ή θεικού οξέος αναμιγνύονται με το αντιδραστήριο Molisch, που αποτελείται από α-ναφθόλη και αλκοόλη, και σχηματίζονται δακτύλιοι με χαρακτηριστικό ιώδες χρώμα.⁶¹

1.5.5.14 Μέθοδος Υγρής χρωματογραφίας υψηλής πιέσεως (HPLC)

Η μέθοδος HPLC εφαρμόζεται για τον ποσοτικό προσδιορισμό αναγόντων σακχάρων σε συγκεντρώσεις έως 20g/L, ή παραπάνω έπειτα από κατάλληλη αραιώση. Με τον ίδιο τρόπο μπορεί να προσδιοριστεί και η σακχαρόζη (από 1 έως 40g/L). Τα σάκχαρα διαχωρίζονται με χρήση στήλης αλκυλαμίνης και με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης.⁶²

1.5.5.15 Μέθοδος χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC)

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) μπορεί να προσδιορίσει ποσοτικά μονοσακχαρίτες και ολιγοσακχαρίτες. Ανήκει στην γενικότερη κατηγορία της υγρής χρωματογραφίας. Το προς ανάλυση δείγμα σακχάρων φέρεται σε πλάκα TLC από Kieselgel G διαποτισμένο με βορικό οξύ. Παράλληλα με αυτό το δείγμα, τοποθετούνται οι κηλίδες των γνωστών διαλυμάτων σακχάρων. Για να αναπτυχθεί το χρωματογράφημα, χρειάζεται ένα από τα παρακάτω μίγματα διαλυτών: α) ακετόνης / n-βουτανόλης / νερού σε αναλογία 5:4:1, β) οξικού αιθυλεστέρα / ισοπροπανόλης / νερού σε αναλογία 6:2:1 γ) n-προπανόλης / νερού / οξικού αιθυλεστέρα / αμμωνίας σε αναλογία 24:12:4:1 ή δ) n-προπανόλης / ακετόνης / 0,1 M γαλακτικού οξέος (9g/L) σε αναλογία 50:40:10. Η εμφάνιση του χρωματογραφήματος γίνεται σε 40 λεπτά περίπου και συνήθως με μίγμα διαλύματος διφαινυλαμίνης (40% v/v σε αιθανόλη) / διαλύματος ανιλίνης (40% v/v σε αιθανόλη) / ορθοφωσφορικού οξέος σε αναλογία 10:10:2. Μετά τον ψεκασμό ακολουθεί θέρμανση, επαναψεκασμός και αναθέρμανση. Τέλος, η ανίχνευση των σακχάρων γίνεται με βάση το Rf αυτών. Ως Rf ορίζεται ο λόγος της απόστασης που διάνυσε κάθε σάκχαρο προς την απόσταση που διάνυσε ο διαλύτης έκλουσης.⁶³

1.5.5.16 Μέθοδος Nelson – Somogyi

Η μέθοδος Nelson – Somogyi είναι φασματοφωτομετρική και βασίζεται στην απορρόφηση στα 520nm ενός έγχρωμου αρσενομολυβδαινικού συμπλόκου που σχηματίζεται έπειτα από την οξειδωση των σακχάρων με αναγωγή χαλκού.⁶⁴

1.5.5.17 Μέθοδος 3,5 δινιτροσαλικυκού οξέος (DNS)

Η μέθοδος DNS είναι φασματοφωτομετρική και βασίζεται στην απορρόφηση στα 540nm του 3-αμινο-5νιτροσαλικυκού οξέος που είναι αποτέλεσμα της αντίδρασης του 3,5 δινιτροσαλικυκού οξέος με τα ανάγοντα σάκχαρα.⁶⁵

1.5.5.18 Μέθοδος ενζυμικού προσδιορισμού

Η μέθοδος ενζυμικού προσδιορισμού είναι μια αναλυτική μέθοδος, η οποία βασίζεται στην ικανότητα των ενζύμων να καταλύουν συγκεκριμένες αντιδράσεις. Δεν απαιτείται ιδιαίτερη προετοιμασία δειγμάτων. Τα υγρά δείγματα προσδιορίζονται απευθείας, ενώ στα στερεά απαιτείται πρώτα η διάλυσή τους σε νερό. Υπάρχουν πολλά κιτ ενζυμικής ανάλυσης στο εμπόριο που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε αυτή την μέθοδο για συγκεκριμένους υδατάνθρακες. Οι δύο μέθοδοι που χρησιμοποιούνται πιο συχνά για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης υδατανθράκων είναι: α) αφήνοντας την αντίδραση να ολοκληρωθεί και μετρώντας τη συγκέντρωση του προϊόντος, η οποία είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος και β) η μέτρηση του αρχικού ρυθμού της αντίδρασης που καταλύεται από το ένζυμο επειδή ο ρυθμός είναι ανάλογος με τη συγκέντρωση του υποστρώματος. Το βασικό πρόβλημα όμως με την ενζυμική μέθοδο είναι ότι πολλοί ολιγοσακχαρίτες μετατρέπονται σε μονοσακχαρίτες από μια γλυκοσιδάση και είναι δύσκολο να προσδιοριστεί με ακρίβεια ποιοι ολιγοσακχαρίτες υπάρχουν. Επομένως, η μέθοδος αυτή είναι χρήσιμη μόνο όταν κάποιος γνωρίζει τον τύπο των υδατανθράκων που υπάρχουν, αλλά όχι τις σχετικές συγκεντρώσεις τους. Για παράδειγμα, η συγκέντρωση μαλτόζης και σακχαρόζης, δισακχαρίτες αποτελούμενοι από μόρια γλυκόζης και φρουκτόζης, μπορεί να προσδιοριστεί αφού έχει βρεθεί πρώτα η συγκέντρωση των μονοσακχαριτών γλυκόζης και φρουκτόζης. Οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα, συνήθως χρησιμοποιούν το συνένζυμο $\text{NADP}^+ / \text{NADPH}$, το οποίο μπορεί να μετρηθεί εύκολα από την αύξηση ή μείωση της απορρόφησής του στο UV, καθώς και το ένζυμο εξοκινάση, ενώ είναι απαραίτητη και η παρουσία του ATP.^{66,67}

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 ΜΕΘΟΔΟΣ LUFF^{51,52}

2.1.1 Αντιδραστήρια

1. Αλκαλικό διάλυμα θειικού χαλκού CuSO_4 2,5 % w/v (0.1 N) (Διάλυμα 1)
2. Διάλυμα ιωδιούχου καλίου KI 30 % w/v (Διάλυμα 2)
3. Διάλυμα θειικού οξέος H_2SO_4 25 % w/v (Διάλυμα 3)
4. Διάλυμα Αμύλου (Διάλυμα 4)
5. Διάλυμα θειοθειικού νατρίου $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ N/10 (0,1 N) (Διάλυμα 5)

2.1.2 Εξοπλισμός

1. Μία συσκευή βρασμού με κάθετο ψυκτήρα
2. Πεχάμετρο
3. Μαγνητικός αναδευτήρας με θερμοαντική πλάκα
4. Σφαιρικές φιάλες βρασμού με εσμύρισμα των 250 mL
5. Μια κωνική φιάλη 250 mL
6. Σιφώνια πλήρωσεως των 5, 10 και 25 mL
7. Μία προχοΐδα των 50 mL
8. Ποτήρια ζέσεως των 250 mL
9. Ογκομετρικές φιάλες των 250 και 1000 mL
10. Ογκομετρικός κύλινδρος 300 mL
11. Σκουρόχρωμες φιάλες
12. Γυάλινη ράβδος ανάδευσης
13. Πουάρ
14. Χωνιά υάλου
15. Διηθητικό χαρτί

2.1.3 Παρασκευή αντιδραστηρίων

1. Αλκαλικό διάλυμα θειικού χαλκού CuSO_4 2,5 % w/v (0.1 N) (Διάλυμα 1)

α) Λαμβάνονται 100mL απιονισμένου νερού σε ένα ποτήρι ζέσεως το οποίο τοποθετείται σε μαγνητικό αναδευτήρα με θερμαντική πλάκα, έως ότου επέλθει βρασμός. Στη συνέχεια, ζυγίζονται 25,002g στερεού πενταένυδρου θειικού χαλκού $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ και προστίθενται στο απιονισμένο νερό. Το διάλυμα αναδεύεται μέχρι να γίνει ομοιογενές και μετά ψύχεται μέχρι να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου.

β) Ζυγίζονται 50,000g στερεού ένυδρου κιτρικού οξέος $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ και διαλύονται σε 50mL νερό.

γ) Λαμβάνονται 300mL απιονισμένου νερού σε ένα ποτήρι ζέσεως το οποίο τοποθετείται σε μαγνητικό αναδευτήρα με θερμαντική πλάκα, έως ότου ζεσταθεί. Στη συνέχεια, ζυγίζονται 143,802g στερεού άνυδρου ανθρακικού νατρίου Na_2CO_3 και προστίθενται στο απιονισμένο νερό. Το διάλυμα αναδεύεται μέχρι να γίνει ομοιογενές και μετά ψύχεται μέχρι να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου.

δ) Με προσεκτική ανάδευση, λόγω αφρισμού, το διάλυμα του κιτρικού οξέος β) προστίθεται στο διάλυμα του ανθρακικού νατρίου γ) και τοποθετούνται σε ογκομετρική φιάλη των 1000mL. Ύστερα προστίθεται σε αυτά το διάλυμα του θειικού χαλκού α) και συμπληρώνεται μέχρις όγκου 1000mL με απιονισμένο νερό. Το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία μία νύχτα και μετά διηθείται και αποθηκεύεται σε σκουρόχρωμη φιάλη. Το pH του τελικού διαλύματος πρέπει να είναι περίπου 9,4.

2. Διάλυμα ιωδιούχου καλίου KI 30 % w/v (Διάλυμα 2)

Ζυγίζονται 75,002g στερεού ιωδιούχου καλίου KI και διαλύονται σε απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια, μεταφέρονται ποσοτικά σε μια ογκομετρική φιάλη των 250mL και συμπληρώνεται μέχρις όγκου 250mL με απιονισμένο νερό. Το διάλυμα αποθηκεύεται σε σκουρόχρωμη φιάλη.

3. Διάλυμα θειικού οξέος H_2SO_4 25 % w/v (Διάλυμα 3)

Σε απαγωγό, λαμβάνονται με ογκομετρικό κύλινδρο 260mL διαλύματος πυκνού θειικού οξέος H_2SO_4 και προστίθενται σιγά σιγά και πλαγίως σε ογκομετρική φιάλη 1000mL που περιέχει ποσότητα απιονισμένου νερού. Τέλος, συμπληρώνεται μέχρις όγκου 1000mL με απιονισμένο νερό και ανακινείται καλά.

4. Διάλυμα Αμύλου (Διάλυμα 4)

Ζυγίζονται 1,252g στερεού ευδιάλυτου στο νερό άμυλο και διαλύονται σε απιονισμένο νερό. Το διάλυμα βράζει με ταυτόχρονη ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα με θερμαντική πλάκα για 10min. Κατόπιν προστίθενται 40,000g χλωριούχου νατρίου NaCl και αφού ψυχθεί, τοποθετείται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 250ml. Τέλος, συμπληρώνεται μέχρις όγκου 1000mL με απιονισμένο νερό.

5. Διάλυμα θειοθειικού νατρίου $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ N/10 (0,1 N) (Διάλυμα 5)

Ζυγίζονται 6,202g στερεού πενταένυδρου θειοθειικού νατρίου $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (99,5% καθαρότητα), τα οποία διαλύονται σε αποσταγμένο νερό και μεταφέρονται ποσοτικά σε μια ογκομετρική φιάλη των 250mL, η οποία στην συνέχεια συμπληρώνεται με αποσταγμένο νερό μέχρις όγκου 250mL.

2.1.4 Προετοιμασία δειγμάτων

1. Γλυκόζη 2,036 g/L (Δείγμα 1)

Ζυγίζονται 0,509g καθαρής γλυκόζης και διαλύονται σε απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια, μεταφέρονται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 250mL και συμπληρώνεται με αποσταγμένο νερό μέχρις όγκου 250mL.

2. Φρουκτόζη 2,016 g/L (Δείγμα 2)

Ζυγίζονται 0,501g καθαρής φρουκτόζης και διαλύονται σε απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια, μεταφέρονται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 250mL και συμπληρώνεται με αποσταγμένο νερό μέχρις όγκου 250mL.

3. Ένυδρη μαλτόζη 2,004 g/L (Δείγμα 3)

Ζυγίζονται 0,501g ένυδρης μαλτόζης και διαλύονται σε απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια, μεταφέρονται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 250mL και συμπληρώνεται με αποσταγμένο νερό μέχρις όγκου 250mL.

4. Άνυδρη μαλτόζη 2,004 g/L (Δείγμα 4)

Επαρκή ποσότητα ένυδρης μαλτόζης ξηραίνεται σε φούρνο στους 103°C για 3 ώρες και στη συνέχεια τοποθετείται σε ξηραντήρα για να απομακρυνθεί τυχόν υγρασία. Έπειτα ζυγίζονται

0,501g καθαρής πλέον μαλτόζης και διαλύονται σε απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια, μεταφέρονται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 250mL και συμπληρώνεται με αποσταγμένο νερό μέχρι όγκου 250mL.

5. Ιμβερτοποιημένη άνυδρη σακχαρόζη 5 mg/mL (Δείγμα 5)

Επαρκής ποσότητα σακχαρόζης ξηραίνεται σε φούρνο στους 103°C για 3 ώρες και στη συνέχεια τοποθετείται σε ξηραντήρα για να απομακρυνθεί τυχόν υγρασία. Έπειτα ζυγίζονται 9,500g καθαρής πλέον σακχαρόζης και διαλύονται σε 95mL απιονισμένο νερό και 5mL πυκνού υδροχλωρίου HCl. Το διάλυμα παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου στους 20–25°C για 3 ημέρες και μετά μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 1000mL. Τέλος, συμπληρώνεται μέχρι όγκου 1000mL με απιονισμένο νερό. Το διάλυμα αυτό έχει συγκέντρωση 1% και πολύ σταθερό για μια περίοδο αρκετών μηνών καθώς είναι πολύ όξινο. Για την εξουδετέρωση του $\text{pH} = 7,7$, λαμβάνονται 50mL του διαλύματος αυτού και προστίθενται σε αυτό 5,9mL καυστικό νάτριο NaOH 0,5N και στη συνέχεια, μεταφέρονται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 100ml και συμπληρώνεται με αποσταγμένο νερό μέχρι όγκου 100mL. Έτσι προκύπτει ότι 1mL διαλύματος περιέχει 5mg ιμβερτοσακχάρου.

6. Ιμβερτοποιημένη άνυδρη μαλτόζη 5 mg/mL (Δείγμα 6)

Επαρκής ποσότητα μαλτόζης ξηραίνεται σε φούρνο στους 103°C για 3 ώρες και στη συνέχεια τοποθετείται σε ξηραντήρα για να απομακρυνθεί τυχόν υγρασία. Έπειτα ζυγίζονται 9,501g καθαρής πλέον σακχαρόζης και διαλύονται σε 95mL απιονισμένο νερό και 5mL πυκνού υδροχλωρίου HCl. Το διάλυμα παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου στους 20–25°C για 3 ημέρες και μετά μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 1000mL. Τέλος, συμπληρώνεται μέχρι όγκου 1000mL με απιονισμένο νερό. Το διάλυμα αυτό έχει συγκέντρωση 1% και πολύ σταθερό για μια περίοδο αρκετών μηνών καθώς είναι πολύ όξινο. Για την εξουδετέρωση του $\text{pH} = 7,7$, λαμβάνονται 50mL του διαλύματος αυτού και προστίθενται σε αυτό 6,2mL καυστικό νάτριο NaOH 0,5N και στη συνέχεια, μεταφέρονται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 100ml και συμπληρώνεται με αποσταγμένο νερό μέχρι όγκου 100mL. Έτσι προκύπτει ότι 1mL διαλύματος περιέχει 5mg ιμβερτοσακχάρου.

2.1.5 Πειραματική πορεία

2.1.5.1 Προσδιορισμός δειγμάτων

Βήμα 1^ο για τα δείγματα 1, 2, 3 και 4: Σε σφαιρική φιάλη των 250mL προστίθενται α) 25mL διαλύματος 1, β) 25mL δείγματος και γ) 4 – 5 πέτρες βρασμού.

Βήμα 1^ο για τα δείγματα 5 και 6: Σε σφαιρική φιάλη των 250mL προστίθενται α) 25mL διαλύματος 1, β) 10mL δείγματος, γ) 15mL απιονισμένο νερό και δ) 4 – 5 πέτρες βρασμού.

Βήμα 2^ο: Ενεργοποίηση της συσκευής βρασμού με κάθετο ψυκτήρα. Άνοιγμα νερού και ρύθμιση της θερμοκρασίας στο μέγιστο.

Βήμα 3^ο: Τοποθέτηση των σφαιρικών φιαλών στη συσκευή βρασμού και διατήρηση του βρασμού για 10 λεπτά.

Βήμα 4^ο: Διακοπή του βρασμού και ψύξη της σφαιρικής έως ότου το δείγμα έρθει σε θερμοκρασία δωματίου.

Βήμα 5^ο: Τοποθέτηση στην προχοΐδα το διάλυμα 5.

Βήμα 6^ο: Προστίθενται στη φιάλη με την ακόλουθη σειρά 1) 10mL διαλύματος 2, 2) 25mL διαλύματος 3 με προσοχή στον αφρισμό και 3) 5mL διαλύματος 4.

Βήμα 7^ο: Ογκομέτρηση του συνολικού δείγματος με το διάλυμα 5 που βρίσκεται στην προχοΐδα, ανακινώντας συνεχώς την σφαιρική φιάλη έως την αλλαγή του χρώματος σε γαλακτερό λευκό.

Βήμα 8^ο: Καταγράφεται έστω n mL η κατανάλωση του διαλύματος 5.

Βήμα 9^ο: Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται άλλες δυο φορές, σημειώνονται οι αντίστοιχες καταναλώσεις και υπολογίζεται ο μέσος όρος των τριών αυτών καταναλώσεων.

2.1.5.2 Προσδιορισμός του τυφλού

Σε κωνική φιάλη των 250mL προστίθενται α) 25mL διαλύματος 1, β) 25mL απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια ακολουθούνται τα παραπάνω βήματα 5, 6, 7 από « **2.1.5.1 Προσδιορισμός δειγμάτων** » και τέλος καταγράφεται έστω n' mL η κατανάλωση του διαλύματος 5.

2.1.6 Υπολογισμός αναγόντων σακχάρων

Υπολογίζεται η διαφορά ($n' - n$) και μεταφέρεται στον **Πίνακα 2.1**. Η τιμή « k » που αποδίδεται από τον πίνακα αντιπροσωπεύει την ποσότητα των αναγόντων σακχάρων σε mg που περιέχονται στον όγκο του δείγματος που χρησιμοποιήθηκε. Τέλος, γίνεται μετατροπή των αποτελεσμάτων στις αρχικές συγκεντρώσεις σακχάρων των εκάστοτε προτύπων.

Πίνακας 2.1 Πίνακας μετατροπής των καταναλωθέντων mL $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 N ($n' - n$) σε ανάγοντα σάκχαρα (mg). Η 1η στήλη (1,2,3...22,22) είναι το ακέραιο μέρος της διαφοράς ($n' - n$), ενώ η 1η γραμμή (0,0...0,9) δείχνει το δεκαδικό μέρος της διαφοράς αυτής. Το σημείο όπου τέμνονται οι δύο αριθμοί εκφράζει 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

Παράδειγμα χρήσης του πίνακα: Έστω $n' = 24,25\text{mL}$ και $n = 11,65\text{mL}$.

Τότε $n' - n = 24,25 - 11,65 = 12,6$. Άρα $k = 31,92\text{mg}$

2.2 ΜΕΘΟΔΟΣ LANE - EYNON^{52,53}

2.2.1 Αντιδραστήρια

1. Τροποποίηση του διαλύματος Fehling από το Soxhlet (Διάλυμα 1)
2. Πρότυπο διάλυμα ιμβερτοποιημένης ζάχαρης (Διάλυμα 2)
3. Διάλυμα μπλε του μεθυλενίου, 0,5% w/v (Διάλυμα 3)

2.2.2 Εξοπλισμός

1. Σιφόνια μετρήσεως των 25 mL
2. Σιφόνια πληρώσεως των 5 και 50 mL
3. Κωνικές φιάλες 300 και 500 mL
4. Ποτήρια ζέσεως των 100 και 150 mL
5. Ογκομετρικός κύλινδρος 100 mL
6. Ογκομετρικές φιάλες των 100 και 500 mL
7. Συσκευή διήθησης υπό κενό αέρος
8. Προχοΐδα των 50 mL
9. Πουάρ
10. Μαγνητικός αναδευτήρας με θερμαντική πλάκα
11. Πεχάμετρο
12. Γυάλινη ράβδος ανάμειξης

2.2.3 Παρασκευή αντιδραστηρίων

1. Τροποποίηση του διαλύματος Fehling από το Soxhlet (Διάλυμα 1)

Παρασκευάζεται αμέσως πριν χρησιμοποιηθεί με ανάμειξη από ίσους όγκους διαλύματος θεικού χαλκού (Διάλυμα Α) και αλκαλικού τρυγικού διαλύματος (Διάλυμα Β).

Διάλυμα Α: Ζυγίζονται 34,639g στερεού πενταένυδρου θεικού χαλκού $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ και διαλύονται σε απιονισμένο νερό. Στην συνέχεια μεταφέρονται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 500 mL, όπου συμπληρώνεται μέχρις όγκου 500mL με απιονισμένο νερό. Το διάλυμα αυτό διηθείται μέσω διηθητικής συσκευής υπό κενό αέρος.

Διάλυμα Β: Ζυγίζονται 173g τετραένυδρου τρυγικού καλίου νατρίου ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) και 50,007g καυστικού νατρίου NaOH και διαλύονται σε απιονισμένο νερό. Στην συνέχεια μεταφέρονται ποσοτικά σε μια ογκομετρική φιάλη των 500mL, όπου συμπληρώνεται μέχρις όγκου 500mL με απιονισμένο νερό και παραμένει σε ηρεμία για 2 ημέρες. Το διάλυμα αυτό διηθείται μέσω διηθητικής συσκευής υπό κενό αέρος.

2. Πρότυπο διάλυμα ιμβερτοποιημένης σακχαρόζης (Διάλυμα 2)

Επαρκής ποσότητα σακχαρόζης ξηραίνεται σε φούρνο στους 103°C για 3 ώρες και στη συνέχεια τοποθετείται σε ξηραντήρα για να απομακρυνθεί τυχόν υγρασία. Έπειτα ζυγίζονται 9,500g καθαρής πλέον σακχαρόζης και διαλύονται σε 95mL απιονισμένο νερό και 5mL πυκνού υδροχλωρίου HCl . Το διάλυμα παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου στους $20\text{--}25^\circ\text{C}$ για 3 ημέρες και μετά μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 1000mL. Τέλος, συμπληρώνεται μέχρις όγκου 1000mL με απιονισμένο νερό. Το διάλυμα αυτό έχει συγκέντρωση 1% και είναι πολύ σταθερό για μια περίοδο αρκετών μηνών καθώς είναι πολύ όξινο. Για την εξουδετέρωση του $\text{pH} = 7,7$, λαμβάνονται 50mL του διαλύματος αυτού και προστίθενται σε αυτό 5,9mL καυστικό νάτριο NaOH 0,5N και στη συνέχεια, μεταφέρονται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 100mL και συμπληρώνεται με αποσταγμένο νερό μέχρις όγκου 100mL. Έτσι προκύπτει ότι 1mL διαλύματος περιέχει 5mg ιμβερτοσακχάρου.

3. Διάλυμα μπλε του μεθυλενίου (Διάλυμα 3)

Ζυγίζονται 0,503g μπλε του μεθυλενίου και διαλύονται σε αιθυλική αλκοόλη. Στην συνέχεια, μεταφέρονται ποσοτικά σε μια ογκομετρική φιάλη των 100mL και συμπληρώνεται μέχρις όγκου 100mL με αιθυλική αλκοόλη.

2.2.4 Προετοιμασία δειγμάτων

1. Γλυκόζη 2,036 g/L (Δείγμα 1)

Ζυγίζονται 0,509g καθαρής γλυκόζης και διαλύονται σε απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια, μεταφέρονται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 250mL και συμπληρώνεται με αποσταγμένο νερό μέχρις όγκου 250mL.

2. Φρουκτόζη 2,016 g/L (Δείγμα 2)

Ζυγίζονται 0,501g καθαρής φρουκτόζης και διαλύονται σε απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια, μεταφέρονται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 250mL και συμπληρώνεται με αποσταγμένο νερό μέχρις όγκου 250mL.

3. Ιμβερτοποιημένη άνυδρη μαλτόζη 5 mg/mL (Δείγμα 4)

Επαρκής ποσότητα μαλτόζης ξηραίνεται σε φούρνο στους 103° C για 3 ώρες και στη συνέχεια τοποθετείται σε ξηραντήρα για να απομακρυνθεί τυχόν υγρασία. Έπειτα ζυγίζονται 9,501g καθαρής πλέον σακχαρόζης και διαλύονται σε 95mL απιονισμένο νερό και 5mL πυκνού υδροχλωρίου HCl. Το διάλυμα παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου στους 20–25°C για 3 ημέρες και μετά μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 1000mL. Τέλος, συμπληρώνεται μέχρις όγκου 1000mL με απιονισμένο νερό. Το διάλυμα αυτό έχει συγκέντρωση 1% και είναι πολύ σταθερό για μια περίοδο αρκετών μηνών καθώς είναι πολύ όξινο. Για την εξουδετέρωση του $\text{pH} = 7,7$, λαμβάνονται 50mL του διαλύματος αυτού και προστίθενται σε αυτό 6,2mL καυστικό νάτριο NaOH 0,5N και στη συνέχεια, μεταφέρονται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 100mL και συμπληρώνεται με αποσταγμένο νερό μέχρις όγκου 100mL. Έτσι προκύπτει ότι 1mL διαλύματος περιέχει 5mg ιμβερτοσακχάρου.

2.2.5 Πειραματική πορεία

2.2.5.1 Τιτλοδότηση του διαλύματος Soxhlet

Βήμα 1^ο: Στην προχοΐδα των 50mL τοποθετείται μέχρις όγκου το διάλυμα 2.

Βήμα 2^ο : Σε μια κωνική φιάλη των 300mL τοποθετούνται 25mL διαλύματος 1 και 24mL διαλύματος 2 και αναδεύεται καλά.

Βήμα 3^ο: Η κωνική αυτή φιάλη τοποθετείται πάνω στο μαγνητικό αναδευτήρα με θερμαντική πλάκα, θερμαίνοντας μέχρι βρασμού.

Βήμα 4^ο: Το μείγμα βράζει για 2 λεπτά.

Βήμα 5^ο: Στα 2 λεπτά μειώνεται επαρκώς η φλόγα, για να αποφευχθεί η υπερχειλίση και χωρίς να αφαιρεθεί η κωνική, προστίθενται σε αυτήν 2 με 5 σταγόνες Διαλύματος 3.

Βήμα 6^ο: Η τιτλοδότηση ολοκληρώνεται σε συνολικό χρόνο βρασμού 3 περίπου λεπτών με μικρές προσθήκες του διαλύματος 2, μέχρι την αλλαγή χρώματος από έντονο μπλε σε πορτοκαλί.

Βήμα 7^ο: Καταγράφεται έστω n mL η κατανάλωση του διαλύματος 2.

Βήμα 8^ο: Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται άλλες δυο φορές, σημειώνονται οι αντίστοιχες καταναλώσεις και υπολογίζεται ο μέσος όρος των τριών αυτών καταναλώσεων. Ο μέσος όρος των καταναλώσεων πρέπει να είναι περίπου 24,8mL (0,5% διαλύματος ιμβερτοποιημένου σακχάρου, ισοδύναμο με 124mg ιμβερτοσακχάρου). Μικρές αποκλίσεις μπορεί να υπάρξουν από διακυμάνσεις σε μεμονωμένη διαδικασία ή σύνθεση αντιδραστηρίων.

2.2.5.2 Προσδιορισμός δειγμάτων

Για όλα τα δείγματα ακολουθείται η ίδια ακριβώς διαδικασία όπως περιγράφεται παρακάτω. Περιγράφεται ως παράδειγμα η διαδικασία της μεθόδου για την γλυκόζη (Δείγμα 1).

Βήμα 1^ο: Σε μια προχοΐδα των 50mL τοποθετείται μέχρις όγκου το δείγμα 1.

Βήμα 2^ο: Σε μια κωνική φιάλη των 300mL τοποθετούνται με σιφόνιο 25mL διαλύματος 1 και 15mL δείγματος 1 και αναδεύεται καλά.

Βήμα 3^ο: Η κωνική αυτή φιάλη τοποθετείται πάνω στο μαγνητικό αναδευτήρα με θερμαντική πλάκα, θερμαίνοντας μέχρι βρασμού.

Βήμα 4^ο: Το μείγμα βράζει για περίπου 15 δευτερόλεπτα και προστίθεται ταχύτερα το δείγμα 1 με συνεχή ανάδευση, βράζοντας λίγα δευτερόλεπτα μετά από κάθε προσθήκη έως ότου παραμείνει μόνο ένα ελαφρώς αισθητό μπλε χρώμα.

Βήμα 5^ο: Προστίθεται 2 με 5 σταγόνες διαλύματος 3 και συνεχίζεται με αργό ρυθμό η προσθήκη του δείγματος 1 και η συνεχής ανάδευση μέχρι αλλαγής χρώματος από σκούρο έντονο μπλε σε πορτοκαλί.

Βήμα 6^ο: Καταγράφεται έστω n mL η κατανάλωση του δείγματος 1.

Βήμα 7^ο: Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται για το δείγμα 1 άλλες δυο φορές, σημειώνονται οι αντίστοιχες καταναλώσεις και υπολογίζεται ο μέσος όρος των τριών αυτών καταναλώσεων.

2.3 ΜΕΘΟΔΟΣ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΕΩΣ (HPLC)

2.3.1 Εξοπλισμός

1. Ποτήρια ζέσεως των 250 mL
2. Ογκομετρικές φιάλες των 50 mL
3. Γυάλινη ράβδος ανάδευσης
4. Πουάρ

2.3.2 Προετοιμασία δειγμάτων

1. Γλυκόζη 1 gr/L (Δείγμα 1)

Ζυγίζονται 0,05gr καθαρής γλυκόζης και διαλύονται σε απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια, μεταφέρονται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 50ml και συμπληρώνεται με αποσταγμένο νερό μέχρις όγκου 50mL.

2. Γλυκόζη 2 gr/L (Δείγμα 2)

Ζυγίζονται 0,101gr καθαρής γλυκόζης και διαλύονται σε απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια, μεταφέρονται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 50ml και συμπληρώνεται με αποσταγμένο νερό μέχρις όγκου 50mL.

3. Γλυκόζη 5 gr/L (Δείγμα 3)

Ζυγίζονται 0,25gr καθαρής γλυκόζης και διαλύονται σε απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια, μεταφέρονται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 50ml και συμπληρώνεται με αποσταγμένο νερό μέχρις όγκου 50mL.

4. Φρουκτόζη 1 gr/L (Δείγμα 4)

Ζυγίζονται 0,051gr καθαρής φρουκτόζης και διαλύονται σε απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια, μεταφέρονται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 50ml και συμπληρώνεται με αποσταγμένο νερό μέχρις όγκου 50mL.

5. Φρουκτόζη 2 gr/L (Δείγμα 5)

Ζυγίζονται 0,101gr καθαρής φρουκτόζης και διαλύονται σε απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια, μεταφέρονται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 50ml και συμπληρώνεται με αποσταγμένο νερό μέχρις όγκου 50mL.

6. Φρουκτόζη 5 gr/L (Δείγμα 6)

Ζυγίζονται 0,251gr καθαρής φρουκτόζης και διαλύονται σε απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια, μεταφέρονται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 50ml και συμπληρώνεται με αποσταγμένο νερό μέχρις όγκου 50mL.

7. Άνυδρη μαλτόζη 1 gr/L (Δείγμα 7)

Επαρκή ποσότητα μαλτόζης για τα δείγματα 7,8 και 9 ξηραίνεται σε φούρνο στους 105°C για 3h και στη συνέχεια τοποθετείται σε ξηραντήρα για να απομακρυνθεί τυχόν υγρασία. Έπειτα ζυγίζονται 0,052gr καθαρής πλέον μαλτόζης και διαλύονται σε απιονισμένο νερό. Τέλος, μεταφέρονται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 50ml και συμπληρώνεται με αποσταγμένο νερό μέχρις όγκου 50mL.

8. Άνυδρη μαλτόζη 2 gr/L (Δείγμα 8)

Ζυγίζονται 0,100gr καθαρής μαλτόζης και διαλύονται σε απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια, μεταφέρονται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 50ml και συμπληρώνεται με αποσταγμένο νερό μέχρις όγκου 50mL.

9. Άνυδρη μαλτόζη 5 gr/L (Δείγμα 9)

Ζυγίζονται 0,251gr καθαρής μαλτόζης και διαλύονται σε απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια, μεταφέρονται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 50ml και συμπληρώνεται με αποσταγμένο νερό μέχρι όγκου 50mL.

10. Άνυδρη σακχαρόζη 1 gr/L (Δείγμα 10)

Επαρκή ποσότητα σακχαρόζης για τα δείγματα 10, 11 και 12 ξηραίνεται σε φούρνο στους 105°C για 3h και στη συνέχεια τοποθετείται σε ξηραντήρα για να απομακρυνθεί τυχόν υγρασία. Έπειτα ζυγίζονται 0,052gr καθαρής πλέον σακχαρόζης και διαλύονται σε απιονισμένο νερό. Τέλος μεταφέρονται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 50ml και συμπληρώνεται με αποσταγμένο νερό μέχρι όγκου 50mL.

11. Άνυδρη σακχαρόζη 2 gr/L (Δείγμα 11)

Ζυγίζονται 0,102gr καθαρής σακχαρόζης και διαλύονται σε απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια, μεταφέρονται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 50ml και συμπληρώνεται με αποσταγμένο νερό μέχρι όγκου 50mL.

12. Άνυδρη σακχαρόζη 5 gr/L (Δείγμα 12)

Ζυγίζονται 0,250gr καθαρής σακχαρόζης και διαλύονται σε απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια, μεταφέρονται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 50ml και συμπληρώνεται με αποσταγμένο νερό μέχρι όγκου 50mL.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΘΟΔΟΥ LUFF

Για τον προσδιορισμό των σακχάρων σε όλα τα δείγματα της μεθόδου Luff, πραγματοποιήθηκαν τρεις μετρήσεις σε κάθε δείγμα και τα αποτελέσματα με τη στατιστική τους ανάλυση φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 3.1 Αποτελέσματα μεθόδου Luff και στατιστική ανάλυση.

Σάκχαρο	1η κατανάλωση (mL)	2η κατανάλωση (mL)	3η κατανάλωση (mL)	Τυπική Απόκλιση	Μέσος όρος καταναλώσεων (mL)
Γλυκόζη	5,7	5,9	5,9	0,1	5,8
Φρουκτόζη	6,2	6,5	5,8	0,4	6,2
Ένυδρη μαλτόζη	13,4	12,9	12,8	0,3	13,0
Άνυδρη μαλτόζη	12,8	12,7	12,9	0,1	12,8
Ιμβερτοποιημένη άνυδρη σακχαρόζη	6,0	6,1	6,2	0,1	6,1
Ιμβερτοποιημένη άνυδρη μαλτόζη	13,2	13,1	13,3	0,1	13,2

Σύμφωνα με το «2.1.6 Υπολογισμός αναγόντων σακχάρων» γίνονται οι υπολογισμοί όπως φαίνονται παρακάτω:

- 1) Για το τυφλό χρησιμοποιήθηκαν 25,1mL απιονισμένου νερού.
- 2) Για τη γλυκόζη χρησιμοποιήθηκαν 25mL δείγματος γλυκόζης και καταναλώθηκαν για το τυφλό $n' = 25,1\text{mL}$ διαλύματος $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ και για το δείγμα $n = 5,8\text{mL}$ διαλύματος $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, άρα: $n' - n = 25,1 - 5,8 = 19,3\text{mL}$ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

Από τον Πίνακα 2.1, τα 19,3mL $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ αντιστοιχούν σε 50,90mg αναγόντων σακχάρων. Διαιρώντας με τον συντελεστή που αντιστοιχεί στα 25mL του δείγματος, προκύπτει ότι η περιεκτικότητα σε ανάγοντα σάκχαρα είναι $50,90\text{mg} / 25\text{mL} = 2,036\text{g}$ γλυκόζης / L διαλύματος.

- 3) Για τη φρουκτόζη χρησιμοποιήθηκαν 25mL δείγματος φρουκτόζης και καταναλώθηκαν για το τυφλό $n' = 25,1\text{mL}$ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ και για το δείγμα $n = 6,2\text{mL}$ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, άρα: $n' - n = 25,1 - 6,2 = 18,9\text{mL}$ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

Από τον Πίνακα 2.1, τα 18,9mL $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ αντιστοιχούν σε 49,71mg αναγόντων σακχάρων. Διαιρώντας με τον συντελεστή που αντιστοιχεί στα 25mL του δείγματος, προκύπτει ότι η περιεκτικότητα σε ανάγοντα σάκχαρα είναι $49,71\text{mg} / 25\text{mL} = 1,998\text{g φρουκτόζης} / \text{L}$ διαλύματος.

- 4) Για την ένυδρη μαλτόζη χρησιμοποιήθηκαν 25mL δείγματος ένυδρης μαλτόζης και καταναλώθηκαν για το τυφλό $n' = 25,1\text{mL Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ και για το δείγμα $n = 13,0\text{mL Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, άρα: $n' - n = 25,1 - 13,0 = 12,1\text{mL Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

Από τον Πίνακα 2.1, τα 12,1mL $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ αντιστοιχούν σε 30,57mg αναγόντων σακχάρων. Διαιρώντας με τον συντελεστή που αντιστοιχεί στα 25mL του δείγματος, προκύπτει ότι η περιεκτικότητα σε ανάγοντα σάκχαρα είναι $30,57\text{mg} / 25\text{mL} = 1,222\text{g ένυδρης μαλτόζης} / \text{L}$ διαλύματος.

- 5) Για την άνυδρη μαλτόζη χρησιμοποιήθηκαν 25mL δείγματος άνυδρης μαλτόζης και καταναλώθηκαν για το τυφλό $n' = 25,1\text{mL Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ και για το δείγμα $n = 12,8\text{mL Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, άρα: $n' - n = 25,1 - 12,8 = 12,3\text{mL Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

Από τον Πίνακα 2.1, τα 12,3mL $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ αντιστοιχούν σε 31,11mg αναγόντων σακχάρων. Διαιρώντας με τον συντελεστή που αντιστοιχεί στα 25mL του δείγματος, προκύπτει ότι η περιεκτικότητα σε ανάγοντα σάκχαρα είναι $31,11\text{mg} / 25\text{mL} = 1,244\text{g άνυδρης μαλτόζης} / \text{L}$ διαλύματος.

- 6) Για την ιμβερτοποιημένη άνυδρη σακχαρόζη χρησιμοποιήθηκαν 25mL δείγματος ιμβερτοποιημένης άνυδρης σακχαρόζης και καταναλώθηκαν για το τυφλό $n' = 25,1\text{mL Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ και για το δείγμα $n = 6,1\text{mL Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, άρα: $n' - n = 25,1 - 6,1 = 19,0\text{mL Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

Από τον Πίνακα 2.1, τα 19,0mL $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ αντιστοιχούν σε 50,00mg αναγόντων σακχάρων. Διαιρώντας με τον συντελεστή που αντιστοιχεί στα 25mL του δείγματος, προκύπτει ότι η περιεκτικότητα σε ανάγοντα σάκχαρα είναι $50,00\text{mg} / 25\text{mL} = 2,000\text{g ιμβερτοποιημένης άνυδρης σακχαρόζης} / \text{L}$ διαλύματος.

- 7) Για την ιμβερτοποιημένη άνυδρη μαλτόζη χρησιμοποιήθηκαν 25mL δείγματος ιμβερτοποιημένης άνυδρης μαλτόζης και καταναλώθηκαν για το τυφλό $n' = 25,1\text{mL Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ και για το δείγμα $n = 13,2\text{mL Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, άρα: $n' - n = 25,1 - 13,2 = 11,9\text{mL Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

Από τον Πίνακα 2.1, τα 11,9mL $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ αντιστοιχούν σε 30,03mg αναγόντων σακχάρων. Διαιρώντας με τον συντελεστή που αντιστοιχεί στα 25mL του δείγματος, προκύπτει ότι η περιεκτικότητα σε ανάγοντα σάκχαρα είναι $30,03\text{mg} / 25\text{mL} = 1,201\text{g ιμβερτοποιημένης άνυδρης μαλτόζης} / \text{L}$ διαλύματος.

Πίνακας 3.2 Κατανάλωση διαλύματος θειοθειικού νατρίου $Na_2S_2O_3$ που αντιστοιχεί στα δείγματα, κατανάλωση διαλύματος θειοθειικού νατρίου $Na_2S_2O_3$ που αντιστοιχεί στο τυφλό, διαφορά των δύο αυτών τιμών και αντιστοιχεία σε mg αναγόντων σακχάρων.

Δείγματα Σακχάρων	n (mL)	n' (mL)	n - n' (mL)	Αντιστοιχία σε mg αναγόντων σακχάρων
Γλυκόζη	5,8	25,1	19,3	50,90
Φρουκτόζη	6,2		18,9	49,71
Ένυδρη μαλτόζη	13,0		12,1	30,57
Άνυδρη μαλτόζη	12,8		12,3	31,11
Ιμβερτοποιημένη άνυδρη σακχαρόζη	6,1		19,0	50,00
Ιμβερτοποιημένη άνυδρη μαλτόζη	13,2		11,9	30,03

Πίνακας 3.3 Πραγματική συγκέντρωση σακχάρων και αποτελέσματα προσδιορισμού σακχάρων με την μέθοδο Luff.

Δείγματα Σακχάρων	Πραγματική συγκέντρωση σακχάρων (g σακχάρου / L διαλύματος)	Αποτελέσματα σακχάρων με την μέθοδο Luff (g σακχάρου / L διαλύματος)
Γλυκόζη	2,036	2,036
Φρουκτόζη	2,016	1,998
Ένυδρη μαλτόζη	2,004	1,222
Άνυδρη μαλτόζη	2,004	1,244
Ιμβερτοποιημένη άνυδρη σακχαρόζη	2,000	2,000
Ιμβερτοποιημένη άνυδρη μαλτόζη	2,000	1,201

3.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΘΟΔΟΥ LANE – EYNON

Για τον προσδιορισμό των σακχάρων σε όλα τα δείγματα της μεθόδου Lane – Eynon, πραγματοποιήθηκαν τρεις μετρήσεις σε κάθε δείγμα και τα αποτελέσματα με τη στατιστική τους ανάλυση φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 3.4 Αποτελέσματα μεθόδου Lane - Eynon και στατιστική ανάλυση.

Σάκχαρα	1η κατανάλωση (mL)	2η κατανάλωση (mL)	3η κατανάλωση (mL)	Τυπική Απόκλιση	Μέσος όρος κατανalώσεων (mL)
Γλυκόζη	71,8	65,8	68,8	3,0	68,8
Φρουκτόζη	66,8	66,9	66,7	0,1	66,8
Ιμβερτοποιημένη άνυδρη σακχαρόζη	26,0	25,2	25,2	0,5	25,5
Ιμβερτοποιημένη άνυδρη μαλτόζη	47,0	47,2	47,2	0,1	47,1

Εφαρμόζοντας την μέθοδο Lane – Eynon, όπως αυτή περιγράφηκε στο «**2.2.5 Πειραματική πορεία**», ελήφθησαν τα παρακάτω αποτελέσματα:

- 1) Για την τιτλοδότηση του διαλύματος Soxhlet χρησιμοποιήθηκαν 25mL διαλύματος και καταναλώθηκαν 25,5mL πρότυπου διαλύματος ιμβερτοποιημένης σακχαρόζης, από τα οποία προκύπτει ότι: $0,0255L * 5g/L = 0,113g$ αναγόντων σακχάρων που αντιστοιχούν στα 25mL διαλύματος Soxhlet.
- 2) Για το δείγμα γλυκόζης χρησιμοποιήθηκαν 25mL διαλύματος Soxhlet και καταναλώθηκαν 68,8mL δείγματος γλυκόζης, από τα οποία προκύπτει ότι: $0,0688L * 2,036g/L = 0,138g$ ανάγοντος σακχάρου που αντιστοιχούν στα 25mL διαλύματος Soxhlet.
- 3) Για το δείγμα φρουκτόζης χρησιμοποιήθηκαν 25mL διαλύματος Soxhlet και καταναλώθηκαν 66,8mL δείγματος φρουκτόζης, από τα οποία προκύπτει ότι: $0,078L * 2,016g/L = 0,135g$ ανάγοντος σακχάρου που αντιστοιχούν στα 25mL διαλύματος Soxhlet.
- 4) Για το δείγμα ιμβερτοποιημένης άνυδρης μαλτόζης χρησιμοποιήθηκαν 25mL διαλύματος Soxhlet και καταναλώθηκαν 47,1mL δείγματος ιμβερτοποιημένης άνυδρης μαλτόζης, από τα οποία προκύπτει ότι: $0,0471L * 5g/L = 0,236g$ ανάγοντος σακχάρου που αντιστοιχούν στα 25mL διαλύματος Soxhlet.

Πίνακας 3.5 Καταναλώσεις δειγμάτων εκφρασμένες σε g αναγόντων σακχάρων που αντιστοιχούν στα 25mL διαλύματος Soxhlet, της μεθόδου Lane – Eynon.

Δείγματα Σακχάρων	g αναγόντων σακχάρων που αντιστοιχούν σε 25mL διαλύματος Soxhlet
Γλυκόζη	0,138
Φρουκτόζη	0,135
Ιμβερτοποιημένη άνυδρη σακχαρόζη	0,113
Ιμβερτοποιημένη άνυδρη μαλτόζη	0,236

3.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΘΟΔΟΥ HPLC

Δεν υπάρχουν αποτελέσματα, λόγω αδυναμίας λειτουργίας του μηχανήματος της HPLC, ενώ πραγματοποιήθηκε η παρασκευή δειγμάτων.

3.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

- Η Luff παρατηρείται ότι λειτούργησε κανονικά για τη γλυκόζη, τη φρουκτόζη και την ιμβερτοποιημένη σακχαρόζη, ενώ δεν λειτούργησε για τη μαλτόζη. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.3 για τη γλυκόζη, τη φρουκτόζη και την ιμβερτοποιημένη άνυδρη σακχαρόζη τα αποτελέσματα της μεθόδου είναι ίδια ή έχουν μικρές αποκλίσεις σε σχέση με τις πραγματικές τιμές. Αντίθετα, για την άνυδρη, ένυδρη και ιμβερτοποιημένη άνυδρη μαλτόζη τα αποτελέσματα της μεθόδου είναι διαφορετικά και παρατηρούνται μεγάλες αποκλίσεις σε σχέση με τις πραγματικές τιμές.
- Η Lane – Eynon δεν λειτούργησε για τη μαλτόζη, διότι όπως φαίνεται στον πίνακα 3.5 τα γραμμάριά της που αντιστοιχούν σε καθορισμένη ποσότητα του διαλύματος Soxhlet θα έπρεπε να είναι ίδια με της γλυκόζης, εφόσον η μαλτόζη έχει υδρολυθεί και τα δύο μόρια της γλυκόζης της δεν είναι ενωμένα. Ωστόσο υπάρχει μεγάλη απόκλιση. Στην περίπτωση της σακχαρόζης τα γραμμάριά της που αντιστοιχούν σε καθορισμένη ποσότητα του διαλύματος Soxhlet είναι σχετικά ίδια με της γλυκόζης και της φρουκτόζης, ωστόσο υπάρχει και σε αυτά απόκλιση.
- Τόσο η Luff όσο και η Lane – Eynon δεν έχουν λειτουργήσει για τη μέτρηση της μαλτόζης και αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι δεν έχει γίνει καλή υδρόλυση των ιμβερτοσακχάρων, με αποτέλεσμα να μη μπορούν να χρησιμοποιηθούν για αναλύσεις

στη μύρα, διότι αποτελείται από δεξτρίνες, μαλτοτριόζη, μαλτόζη και ίχνη γλυκόζης και φρουκτόζης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ξένη και Ελληνική βιβλιογραφία

AOAC Official Methods of Analysis., (1995). Sugars and sugar products. Chapter 44. ⁵³

Badger, P. C. (2002). Ethanol from cellulose: a general review. *Trends in new crops and new uses*, 14, 17-21. ⁵⁷

Barfoed, C. (1873). Ueber die Nachweisung des Traubenzuckers neben Dextrin und verwandten Körpern. *Zeitschrift für analytische Chemie*, 12(1), 27-32. ⁶⁰

Berg, J., M., Tymoczko, J., L., Gatto, G., J., Stryer., L., (1975). *Biochemistry*. W. H. Freeman and Company ⁶⁷

Bernt, E. (1974). D-fructose. *Methods of enzymatic analysis*. ⁶⁶

Briggs, D. E., Brookes, P. A., Stevens, R. B. C. A., & Boulton, C. A. (2004). *Brewing: science and practice* (Vol. 108). Woodhead Publishing. ³⁰

[Carl von Linde – developer of refrigerators & gas separation technology](#)". *World of Chemicals*. 27 May 2013. Retrieved 29 November 2016 ¹¹

COMPENDIUM OF INTERNATIONAL METHODS OF ANALYSIS-OIV, Dosage of sugars in wine by HPLC, Method OIV-MA-AS311-03 Type II method1 (Resolution Oeno 526/2016) ⁶²

COMPENDIUM OF INTERNATIONAL METHODS OF ANALYSIS-OIV, Method OIV-MA-AS311-01A Type IV method Reducing substances (Resolution Oeno377/2009) ⁵¹

Fehling, H. (1858). Die quantitative Bestimmung von Zucker. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 106(1), 75-79. ⁵⁵

Fonseca, A., & Inácio, J. (2006). Phylloplane yeasts. *In Biodiversity and ecophysiology of yeasts* (pp. 263-301). Springer, Berlin, Heidelberg. ⁴³

Foulger, J. H. (1931). The use of the Molisch (d-naphthol) reactions in the study of sugars in biological fluids. *Journal of Biological Chemistry*, 92, 345-353. ⁶¹

Griffiths, A. R., (1998). *Water quality in the food and drink industries*. Chandos Publishing (Oxford) Ltd, Oxford, 1998, pp.8-13. ¹⁸

- Hardwick, W. A., (1995). Handbook of Brewing, Marcel Dekker, New York. ¹⁹
- 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. ³⁷
- 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. ³³
- Kolthoff, I. M., & Menzel, H. (1929). *Volumetric analysis* (Vol. 1). CUP Archive. ⁵⁴
- Kurtzman, C. P. (1994). Molecular taxonomy of the yeasts. *Yeast*, *10*(13), 1727-1740. ⁴⁰
- 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. ³⁸
- Kurtzman, C. P., & Piškur, J. (2006). Taxonomy and phylogenetic diversity among the yeasts. In *Comparative Genomics* (pp. 29-46). Springer, Berlin, Heidelberg. ³⁹
- 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. ⁴⁵
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, *31*(3), 426-428. ⁶⁵
- Moll, M., (1979). Water in malting and brewing. *Brewing science*, *1*, Academic Press, London, 1979, pp. 539-577. ¹⁵
- Munson, L. S., & Walker, P. H. (1906). THE UNIFICATION OF REDUCING SUGAR METHODS. *Journal of the American Chemical Society*, *28*(6), 663-686. ⁵⁶
- Nickerson, D. O. R. O. T. H. Y. (1946). Color measurement. *US Dept. Agr., Misc. Publ*, *580*, 1062. ⁶³
- Olesen, K., Felding, T., Gjermansen, C., & Hansen, J. (2002). The dynamics of the *Saccharomyces carlsbergensis* brewing yeast transcriptome during a production-scale lager beer fermentation. *FEMS yeast research*, *2*(4), 563-573. ¹²
- Oshima, K., & Tollens, B. (1901). Ueber das Nori aus Japan. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, *34*(2), 1422-1424. ⁵⁹

Özer Uyar, G. E. (2009). Cloning and characterization of trehalose-6-phosphate synthase gene from *rhizopus oryzae*. ⁴¹

Rebelein, H. (1971). Correction de l'acidité des moûts et des vins. *Bulletin de l'OIV*, 480(44), 136-141. ⁵⁰

Simoni, R. D., Hill, R. L., & Vaughan, M. (2002). Benedict's solution, a reagent for measuring reducing sugars: the clinical chemistry of Stanley R. Benedict. *Journal of Biological Chemistry*, 277(16), e5-e6. ⁵⁸

Somogyi, M. (1952). Notes on sugar determination. *Journal of biological chemistry*, 195, 19-23. ⁶⁴

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. ³⁴

Stoskopf, N. C., (1985). *Cereal grain crops*. Reston Publishing Company inc. ²³

Taylor, D. G., (1989). The treatment of water at the brewery, *Ferment*, 2:76-79. ²⁰

Taylor, T. G., (1988). The impact of water quality on beer quality. *The Brewer* 74:532-536. ¹⁶

Verlag, H. C., (2001). Water in Brewing. *Manual of Good Practice, Vol. 8*. Nuernberg. ²¹

Verzele, M. (1986). 100 years of hop chemistry and its relevance to brewing. *Journal of the Institute of Brewing*, 92(1), 32-48. ³⁵

Walker, K., Skelton, H., & Smith, K. (2002). Cutaneous lesions showing giant yeast forms of *Blastomyces dermatitidis*. *Journal of cutaneous pathology*, 29(10), 616-618. ⁴⁴

Yong, E. (2012). Yeast suggests speedy start for multicellular life. *Nature News*. ⁴²

Διαμαντίδης Γ., (2007). Η ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΩΝ. *Εισαγωγή στη βιοχημεία*. University studio press, σελ. 99-114. ⁴⁸

Νεραντζής Η., Ταταρίδης Π., Κεχαγιά Δ., (2014). *Τεχνολογίες Βύνης και Ζύθου*. Βιβλιοθήκη του ζύθου. ⁵

Σπηλιόπουλος Ι., Βάκρος Ι., Ξαπλαντέρη Μ., (2015). Υδατάνθρακες. *Χημεία. Στοιχεία γενικής, οργανικής και βιολογικής χημείας*. Ελληνικά ακαδημαϊκά ηλεκτρονικά συγγράμματα και βοηθήματα, σελ.313-328 ⁴⁹

- Διαδικτυακές πηγές

http://archive.eclass.uth.gr/eclass/modules/document/file.php/SEYB132/6_%CE%93%CE%B%CF%85%CE%BA%CF%8C%CE%BB%CF%85%CF%83%CE%B7_%CE%B3%CE%B%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 ⁴⁶

http://www.beer.gr/articles/ingredients-hops/?fbclid=IwAR1fFnNnLav5B3TjGJHlarNLfNYExOQXwcoyWGYKL7kXAlvDAQYDT45_EaI ³¹

<http://www.euro-glass.com.gr/Article/i-istoria-tis-emfialomenis-mpuras-WCN-00337> ¹⁰

<https://agrosimvoulos.gr/kalliergeia-likiskou-kalliergitikes-texnikes/> ²⁷

https://apolloniannutrition.gr/hops_likiskos/ ²⁸

<https://beerandbrewing.com/dictionary/uHRqqHXWGJ/> ³²

<https://delphipages.live/el/%CE%B4%CE%B9%CE%AC%CF%86%CE%BF%CF%81%CE%B1/emile-christian-hansen> ¹¹

<https://docplayer.gr/5999464-O-ellinikos-aytofyis-lykiskos-kai-i-dynatotita-kalliergeias-toy-lykiskoy-stin-ellada.html> ²⁶

<https://enallaktikidrasi.com/2018/11/likiskos-therapeutikes-idiotites-tropoi-xrasis/> ⁶

<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EL/TXT/HTML/?uri=CELEX:31979L0796&from=ES>
⁵²

https://mlp-blo-g-spot.blogspot.com/2013/06/blog-post_11.html ¹⁴

https://web.archive.org/web/20090425092509/http://www.minagric.gr/Greek/agro_pol/Maps/krithari1.htm ²²

<https://winewalker.gr/index.php/blog/322-2019-01-14-07-31-44> ²

<https://www.beercatalog.gr/> ²⁹

<https://www.beeroskopio.com/2017/04/hops-oils.html> ³⁶

<https://www.ellinikienosizithopoion.gr/> ⁴

<https://www.greekqualityproducts.gr/index.php/proionta/pota/mpires/item/1139-alithies-kai-mithi-gia-thn-proti-elliniki-mpira> ¹³

<https://www.houseofwine.gr/how/> ³

<https://www.itrofi.gr/fytika/votana/article/1935/o-lykiskos-den-einai-mono-zythovotano> ⁷

<https://www.maxmag.gr/afieromata/loyi-paster/> ⁹

<https://www.newsbeast.gr/world/arthro/669941/i-istoria-tis-buras> ¹

<https://www.pineiosbrewery.gr/paragogiki-diadikasia/> ⁴⁷

<https://www.protagon.gr/themata/aftos-einai-o-prwtos-mikroviologos-ston-kosmo-44341259303> ⁸

<https://zythopedia.eu/zythopedia> ²⁴

<https://zythos.webnode.gr/> ²⁵