



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΧΗΜΕΙΑ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**«Μελέτη της δυνατότητας μείωσης της
βιοδιαθεσιμότητας μετάλλων μέσω της σύμπλεξης με
οργανικούς υποκαταστάτες φυτικών προϊόντων: η
περίπτωση του χαλκού σε μπίρες που
παρασκευάζονται σε ελληνικές μικροζυθοποιίες»**

**ΕΛΕΝΗ ΜΠΕΜΠΗ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΑΘΗΝΑ
ΙΟΥΝΙΟΣ 2015**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

«Μελέτη της δυνατότητας μείωσης της βιοδιαθεσιμότητας μετάλλων μέσω της σύμπλεξης με οργανικούς υποκαταστάτες φυτικών προϊόντων: η περίπτωση του χαλκού σε μπίρες που παρασκευάζονται σε ελληνικές μικροζυθοποιείες»

ΕΛΕΝΗ ΜΠΕΜΠΗ

A.M.: 91306

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

ΕΜΜΑΝΝΟΥΗΛ ΔΑΣΕΝΑΚΗΣ, Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΕΜΜΑΝΝΟΥΗΛ ΔΑΣΕΝΑΚΗΣ

Καθηγητής Τμήματος Χημείας, ΕΚΠΑ

ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΚΑΛΟΓΕΡΟΠΟΥΛΟΣ

Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής,
Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ ΠΡΟΕΣΤΟΣ

Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Χημείας, ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 09/07/2015

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μπύρα είναι ένα δημοφιλές ποτό εδώ και πολλά χρόνια, που εκτός από τις στιγμές απόλαυσης που προσφέρει, παρουσιάζει σημαντικές ευεργετικές ιδιότητες για την ανθρώπινη υγεία, οι οποίες αποδίδονται στην παρουσία βιοδραστικών οργανικών ενώσεων όπως οι φαινολικές ενώσεις, τα προϊόντα αντιδράσεων Maillard και άλλες ουσίες οι οποίες συμβάλλουν στην αναζωογονητική, καρδιοπροστατευτική, αντιοξειδωτική κ.α., δράση των ζύθων.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ειδίκευσης είναι η μελέτη της μείωσης της βιοδιαθεσιμότητας των τοξικών μετάλλων στον οργανισμό μέσω της επίδρασης της κατανάλωσης μπύρας. Στο πλαίσιο αυτό πραγματοποιήθηκε φυσικοχημικός χαρακτηρισμός της οργανικής ύλης που εμπεριέχεται σε μπύρες από ελληνικές ζυθοποιίες και προσδιορίστηκαν η δυνατότητα σύμπλεξης ιόντων χαλκού καθώς και η αντιοξειδωτική δράση των ζύθων.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων έδειξαν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, σε άμεση συσχέτιση με το φαινολικό περιεχόμενο των ζύθων, η οποία σε συνδυασμό με τη συμπλεκτική ικανότητα ιόντων χαλκού της περιεχόμενης οργανικής ύλης που διαπιστώθηκε, αναδεικνύουν τη μπύρα ως ένα εξαιρετικό αντιοξειδωτικό ρόφημα, του οποίου η καθημερινή κατανάλωση, σε φυσιολογικά επίπεδα, μπορεί να μειώσει τη βιοδιαθεσιμότητα των ελεύθερων τοξικών μετάλλων στον ανθρώπινο οργανισμό και συνεπώς τον κίνδυνο εμφάνισης παθολογικών καταστάσεων.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Ελληνικές μπύρες, χαλκός, συμπλεκτική ικανότητα χαλκού, οργανικοί υποκαταστάτες, φαινολικές ενώσεις, αντιοξειδωτική δράση

ABSTRACT

Beer has been a popular drink for many years, which apart from moments of taste demonstrates a significant positive impact on the human organism, offering protection from various diseases. It has beneficial properties on the human health, since it contains significant quantities of bioactive organic compounds such as polyphenols, Maillard reaction products and other substances that contribute to its refreshing, cardioprotective, antioxidant, etc., action.

The purpose of this thesis is to study whether complex formation, caused by beer consumption affects the bioaccessibility of metals in the human body. Under this perspective, a physicochemical characterization of organic matter contained in beers, produced from Greek microbreweries, was carried out. Additionally, the complexing capacity of copper ions together with the antioxidant activity of Greek beers were determined.

The results demonstrated a sufficient antioxidant activity, in direct correlation with the phenolic content of the beverages. Furthermore, a significant release of copper organic ligands was observed. Taking those findings under consideration, beer represents an excellent antioxidant beverage, the daily consumption of which up to normal levels may reduce the bioaccessibility of toxic metals and subsequently the risk of some pathological conditions.

KEYWORDS: Greek beers, copper, complexing capacity of copper, organic ligands, phenolic compounds, antioxidant activity

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας, η οποία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας Περιβάλλοντος του Τμήματος Χημείας του Ε.Κ.Π.Α. και στο Εργαστήριο Χημείας - Βιοχημείας και Φυσικοχημείας Τροφίμων του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου Αθηνών, θα ήθελα να ευχαριστήσω όσους συνέβαλαν στη διεκπεραίωσή της.

Ευχαριστώ τον Καθηγητή κ. Εμμανουήλ Δασενάκη, ο οποίος μου προσέφερε το ενδιαφέρον θέμα και μου έδωσε τη δυνατότητα να εκπονήσω τη διπλωματική μου εργασία στο συγκεκριμένο επιστημονικό τομέα. Τον Καθηγητή κ. Μιχαήλ Σκούλλο για τη δυνατότητα που μου έδωσε να παρακολουθήσω το Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα σπουδών Χημείας με ειδίκευση Χημεία και Τεχνολογία Περιβάλλοντος. Ευχαριστώ επίσης θερμά τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Χαραλαμπό Προεστό για τη συμμετοχή του στην τριμελή εξεταστική επιτροπή.

Έπειτα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Νικόλαο Καλογερόπουλο, Αναπληρωτή Καθηγητή του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, που με μεγάλη προθυμία, μου χάρισε τις γνώσεις και το χρόνο του, προκειμένου να ολοκληρωθεί αυτή η διπλωματική εργασία. Ευχαριστώ επίσης θερμά την Επίκουρη Καθηγήτρια του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου κ. Ανδριάννα Καλιώρα για τη συνεργασία μας στη διπλωματική εργασία και για το χρόνο που διέθεσε.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Βασίλη Ρούση, Καθηγητή του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων στο τμήμα Φαρμακευτικής και την κ. Ιωάννου Ευσταθία, Λέκτορα του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων για την προσφορά του περιστροφικού συμπυκνωτήρα.

Τα λόγια και οι ευχαριστίες όμως δεν είναι αρκετά για να αποδώσουν αυτά που αξίζει να αποδοθούν στους Δρ. Καραβόλτσο Σωτήριο και την Δρ. Σακελλάρη Αικατερίνη οι οποίοι με τα πλούσια πνευματικά τους προσόντα, το ήθος τους και τη φιλική τους στάση συνέβαλαν ώστε να ολοκληρωθεί επιτυχώς η ακαδημαϊκή μου αυτή προσπάθεια.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω το σύντροφό μου Γιώργο Βρότσο για την άμετρη συμπαράσταση και κατανόηση που έδειξε καθόλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών μου.

Βέβαια, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στους γονείς μου Νίκο και Εύα, των οποίων η πίστη στις δυνατότητες μου αποτέλεσε αρωγό σε όλους τους στόχους και τα όνειρά μου και στην αδερφή μου Σόφη η οποία είναι ανεκτίμητο στήριγμα για εμένα.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ABSTRACT	6
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	8
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ	14
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	15
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	16
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	17
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΜΠΥΡΑ	19
2.1 Γενικά για τη μπύρα.....	19
2.2 Η ιστορία της μπύρας.....	19
2.3 Οι βασικές πρώτες ύλες στην παραγωγή της μπύρας	21
2.3.1 Κριθάρι.....	21
2.3.2 Λυκίσκος	22
2.3.3 Μαγιά	22
2.3.4 Νερό.....	22
2.4 Διαδικασία Παραγωγής Μπύρας	23
2.5 Είδη μπύρας.....	26
2.6 Ελληνικές Ζυθοποιίες	30
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΟΡΓΑΝΙΚΗ ΥΛΗ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΕΣ ΜΠΥΡΕΣ	33
3.1 Χημική σύσταση μπύρας	33
3.2 Αλκοόλες.....	33
3.3 Διοξειδίο του άνθρακα	34
3.4 Άλλα αέρια στη μπύρα.....	35
3.4.1 Οξυγόνο	35
3.4.2 Άζωτο.....	35
3.5 Πρωτεΐνες, πεπτιδία και αμινοξέα	35

3.6 Λιπίδια.....	35
3.7 Αμίνες.....	36
3.8 Υδατάνθρακες	36
3.9 Φαινολικές ενώσεις.....	37
3.10 Ρητίνες	38
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΜΠΥΡΑ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑ.....	40
4.1 Κατανάλωση μπύρας και παθολογικές καταστάσεις	40
4.1.1 Καρδιαγγειακά νοσήματα.....	40
4.1.2 Έλκος.....	41
4.1.3 Νεφρά και ουροποιητικό σύστημα	41
4.1.4 Νόσος Αλτσχάιμερ.....	42
4.1.5 Καρκίνος.....	42
4.1.6 Άλλες επιπτώσεις της μπύρας στην υγεία.....	43
4.2 Αντιοξειδωτική δράση μπύρας.....	43
4.2.1 Ελεύθερες ρίζες – Οξειδωτικό στρες.....	43
4.2.2 Αντιοξειδωτική δράση και μπύρα.....	46
4.2.2.1 Φαινολικά συστατικά.....	46
4.2.2.2 Ενώσεις Maillard.....	48
4.2.2.3 Πρόσθετα στις μπύρες που έχουν αντιοξειδωτικές ικανότητες	48
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΜΕΤΑΛΛΑ.....	50
5.1 Ορισμός και ιδιότητες των μετάλλων	50
5.2 Ταξινόμηση μετάλλων με βάση το μέγεθος των ενώσεών τους.....	50
5.3 Ταξινόμηση μετάλλων με βάση τη χημική τους συγγένεια με διάφορους υποκαταστάτες	51
5.4 Χαλκός	52
5.4.1 Βιολογική σημασία χαλκού	54
5.5 Τοξικότητα μετάλλων.....	55

5.5.1 Ορισμός και γενικά χαρακτηριστικά	55
5.5.2 Μηχανισμοί τοξικής δράσης μετάλλων και επίδρασή τους στον οργανισμό ...	56
5.5.3 Τοξικότητα του χαλκού	58
5.5.4 Μηχανισμός τοξικής δράσης του χαλκού-Τοξικοκινητική.....	59
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ΣΥΜΠΛΕΚΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΜΕΤΑΛΛΩΝ	61
6.1 Ορισμός συμπλεκτικής ικανότητας μετάλλων	61
6.2 Βολταμμετρικές μέθοδοι	62
6.2.1 Εισαγωγή – Ορολογία	62
6.2.2 Βολταμμετρικές τεχνικές	63
6.2.3 Πολαρογραφία.....	65
6.3 Προσδιορισμός της ικανότητας σύμπλεξης ιόντων χαλκού σε ελληνικές μπίρες	70
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	73
7.1 Συλλογή δειγμάτων	73
7.2 Προετοιμασία δειγμάτων μπίρας	73
7.3 Λυοφιλίωση δειγμάτων	73
7.4 Μελέτη σύμπλεξης ιόντων χαλκού.....	73
7.4.1 Προετοιμασία δειγμάτων.....	73
7.4.2 Προσδιορισμός συμπλεκτικής ικανότητας και σταθεράς σχηματισμού ιόντων Cu	74
7.5 Προσδιορισμός ολικού χαλκού	77
7.6 Προσδιορισμός ολικού οργανικού άνθρακα (TOC)	78
7.7 Προσδιορισμός ολικών σακχάρων στις μπίρες.....	78
7.8 Προσδιορισμός του συνολικού φαινολικού περιεχομένου με τη μέθοδο Folin- Ciocalteu	79
7.8.1 Ταξινόμηση και προσδιορισμός φαινολικού περιεχομένου.....	80
7.8.2 Συνολικό περιεχόμενο σε φλαβονειδή	81
7.9 Αντιοξειδωτικές δοκιμές	82

7.9.1 Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας βασιζόμενη στη δέσμευση της 1,1-διφαινύλο-2-πικρυλο-υδράζυλο ελεύθερης ρίζας (DPPH•).....	82
7.9.2 Προσδιορισμός αναγωγικής ικανότητας μέσω αναγωγής του Fe ⁺³ σε Fe ⁺² (FRAP).....	83
7.9.3 Μελέτη της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας των δειγμάτων μπύρας στις λιποπρωτεΐνες ορού αίματος	84
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	85
8.1 Συμπλεκτική ικανότητα ιόντων χαλκού και σταθερά σχηματισμού συμπλόκων ..	85
8.2 Προσδιορισμός ολικού χαλκού στις μπύρες.....	87
8.3 Προσδιορισμός οργανικού άνθρακα στις μπύρες.....	89
8.4 Προσδιορισμός ολικών σακχάρων στις μπύρες	91
8.5 Συνολικό φαινολικό περιεχόμενο (μέθοδος Folin- Ciocalteu)	93
8.6 Αντιοξειδωτική δράση.....	95
8.7 Συνολικό περιεχόμενο σε φλαβονειδή	99
8.8 Ταξινόμηση και προσδιορισμός φαινολικού περιεχομένου	101
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	104
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ - ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ - ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ.....	113
ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....	115

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

- Σχήμα 6.1 : Σχέση μεταξύ φαρανταϊκού (i_f) και χωρικού ρεύματος (i_c) σε ένα πολαρογράφημα συνεχούς ρεύματος, i_d το ρεύμα διαχύσεως.....67
- Σχήμα 6.2 : Διάγραμμα διαφορικής παλμικής πολαρογραφίας, προσθήκης γνωστής ποσότητας μετάλλου (C_{Me}) για αδρανή φυσικά συστήματα. Η καμπύλη (α) αντιστοιχεί σε μηδενική συγκέντρωση υποκαταστατών ($CL=0$), η καμπύλη (β) σε μη μεδινική συγκέντρωση υποκαταστατών ($CL\neq 0$) και το τμήμα (γ) στην προέκταση του παράλληλου με την ευθεία (α) τμήματος της καμπύλης (β) το σημείο τομής του τμήματος (γ) με τον άξονα χ αντιστοιχεί στην τιμή της προσδιοριζόμενης συμπλεκτικής ικανότητας (CC).....71
- Σχήμα 6.3 : Βολταμμογράφημα οξεισμένου δείγματος ελληνικής μπύρας έπειτα από προσθήκη πρότυπου διαλύματος ιόντων χαλκού ώστε η συγκέντρωση του δείγματος σε χαλκό να αντιστοιχεί σε $50 \mu\text{g L}^{-1}$72
- Σχήμα 6.4 : Βολταμμογραφήματα που αντιστοιχούν σε διαδοχικές προσθήκες πρότυπου διαλύματος ιόντων χαλκού για το δείγμα ελληνικής μπύρας στο φυσικό pH.....72
- Σχήμα 7.1 : Καμπύλες τιτλοδότησης δείγματος ελληνικής μπύρας για pH =2 και pH=8.....76
- Σχήμα 7.2 : Διάγραμμα Ruzic δείγματος ελληνικής μπύρας. Ευθεία καμπύλη του λόγου $M/(M_T-M)$ (του ελεύθερου ιοντικού χαλκού προς το συμπλεγμένο) ως προς M (τον ελεύθερο ιοντικό χαλκό).....77
- Σχήμα 8.1 : Συμπλεκτική ικανότητα ιόντων χαλκού (L_T) των δειγμάτων.....88
- Σχήμα 8.2 : Λογάριθμος της σταθεράς σχηματισμού $\log K$ των δειγμάτων.....88
- Σχήμα 8.3 : Συγκέντρωση ολικού οργανικού άνθρακα στις μπύρες.....92
- Σχήμα 8.4 : Κινητική μελέτη της παραγωγής συζυγών διενίων κατά τη διάρκεια της οξειδωσης λιποπρωτεϊνών ανθρώπινου ορού από Cu^{+2} , χωρίς (Control) και με την παρουσία δείγματος μπύρας.....99

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 2.1 : Κατανάλωση μπύρας παγκοσμίως.....	19
Εικόνα 2.2 : Κριθάρι.....	21
Εικόνα 2.3 : Λυκίσκος.....	22
Εικόνα 2.4 : Διαδικασία παραγωγής μπύρας.....	26
Εικόνα 3.1 : Ισομερίωση α-οξέων, όπου R= -CH ₂ CH(CH ₃) ₂ για την humulone- isohumulone, R= - CH(CH ₃) ₂ για την cohumulone-isocohumulone και R= - CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃ για adhumulone -isoadhumulone.....	39
Εικόνα 3.2 : Υδρογόνωση iso-α-οξέων.....	39
Εικόνα 5.1 : Χαλκός.....	53
Εικόνα 7.1 Ηλεκτροχημικός αναλυτής ECO-CHEMIE συνδεδεμένος με κυψελίδα μέτρησης τριών ηλεκτροδίων της Metrohm (VA 663).....	75
Εικόνα 7.2 : Κυψελίδα μέτρησης του ηλεκτροχημικού αναλυτή μαζί με τα ηλεκτρόδια.....	75
Εικόνα 9.1: Ανάλυση ομαδοποίησης (cluster analysis).....	107
Εικόνα 9.2 : Ανάλυση ομαδοποίησης (cluster analysis) των παραμέτρων που προσδιορίστηκαν.....	108

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 3.1: Αλκοόλες που περιέχονται στην μπύρα.....	33
Πίνακας 3.2 : Περιεκτικότητα σακχάρων στην μπύρα.....	37
Πίνακας 5.1: Βασικά χαρακτηριστικά χαλκού.....	54
Πίνακας 8.1: Συγκεντρώσεις συμπλεκτικής ικανότητας ιόντων Cu(L _T) και τιμές σταθερών σχηματισμού συμπόκων Cu (logK).....	85
Πίνακας 8.2 : Συγκεντρώσεις ολικού χαλκού.....	88
Πίνακας 8.3 : Συγκεντρώσεις TOC (g L ⁻¹).....	89
Πίνακας 8.4 : Συγκέντρωση ολικών σακχάρων στις μπύρες.....	92
Πίνακας 8.5 : Συνολικό φαινολικό περιεχόμενο των ελληνικών ζύθων, εκφρασμένο σε mg ισοδύναμων γαλλικού οξέος (GAE) ανά λίτρο.....	94
Πίνακας 8.6 Ικανότητα των ζύθων να δεσμεύουν την ελεύθερη ρίζα DPPH·, (εκφρασμένη σε mg ισοδύναμων Trolox (TE) ανά λίτρο) και αναγωγική δύναμη αυτών (εκφρασμένη σε mg ισοδύναμων ασκορβικού οξέος AAE ανά λίτρο).....	96
Πίνακας 8.7 Χρόνος αντίστασης του ορού αίματος στην οξειδωση.....	98
Πίνακας 8.8 Συνολικό περιεχόμενο σε φλαβονοειδή.....	100
Πίνακας 8.9 Ταξινόμηση και προσδιορισμός φαινολικού περιεχομένου.....	102
Πίνακας 9.1 Συσχετίσεις.....	105
Πίνακας 9.2 Κανονικοποιημένες τιμές δειγμάτων	109

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η μπύρα είναι ένα δημοφιλές ποτό εδώ και πολλά χρόνια. Είναι ένα φυσικό ρόφημα χωρίς λίπος που περιέχει οργανικά οξέα, βιταμίνες, πρωτεΐνες, λυκίσκο και νερό. Συγκριτικά με άλλα αλκοολούχα ποτά, η μπύρα έχει υψηλότερη διατροφική αξία και αυτό οφείλεται στην παρουσία βασικών θρεπτικών ουσιών, όπως κάλιο, μαγνήσιο, ασβέστιο, φώσφορο και μια μικρή ποσότητα του νατρίου ^[1]. Είναι επίσης μια πηγή της βιταμίνης Β (Β1, Β2 και Β12), η οποία προέρχεται από τη βύνη και τη μαγιά ^[2].

Η κατανάλωση της μπύρας επιφυλάσσει αρκετά οφέλη για την ανθρώπινη υγεία, χάρη στις άφθονες βιοδραστικές οργανικές ουσίες που η μπύρα περιέχει. Υδατάνθρακες, πολυσακχαρίτες, μελανοϊδή, λιπίδια, πολυφαινόλες, είναι μερικές από τις χημικές ουσίες που καθιστούν τη μπύρα ένα εξαιρετικό αντιοξειδωτικό ποτό, του οποίου η καθημερινή κατανάλωση, σε φυσιολογικά επίπεδα, μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων, προβλημάτων στα νεφρά καθώς και της νόσου Alzheimer.

Η παραγωγή της μπύρας περιλαμβάνει 2 βασικά στάδια: (α) την άλεση της βύνης και (β) τη ζυθοποίηση, τα οποία το καθένα από τα οποία αποτελείται από άλλα επί μέρους στάδια. Η άλεση της βύνης περιλαμβάνει την πολτοποίηση-δίθηση και το βρασμό του λυκίσκου και η ζυθοποίηση αποτελείται από τη ζύμωση, την ωρίμανση, το φιλτράρισμα και τέλος την τυποποίηση του τελικού προϊόντος.

Υπάρχουν πολλοί διαφορετικοί τύποι μπύρας οι οποίοι μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σύμφωνα με (i) τη διαδικασία της ζύμωσης, (ii) το χρώμα, (iii) την περιεκτικότητα σε αλκοόλ, (iv) τα πρόσθετα και (v) την προέλευση ^[3].

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της συμπλεκτικής ικανότητας ιόντων χαλκού σε μπύρες από ελληνικές μικροζυθοποιίες. Μελετήθηκαν τριανταένα (31) δείγματα ζύθων. Προσδιορίστηκε η συμπλεκτική ικανότητα των ιόντων Cu (L_T), η σταθερά σχηματισμού των συμπλόκων του μετάλλου (logk_{app}) με τη μέθοδο της Διαφορικής Παλμικής Ανοδικής Αναδιαλυτικής

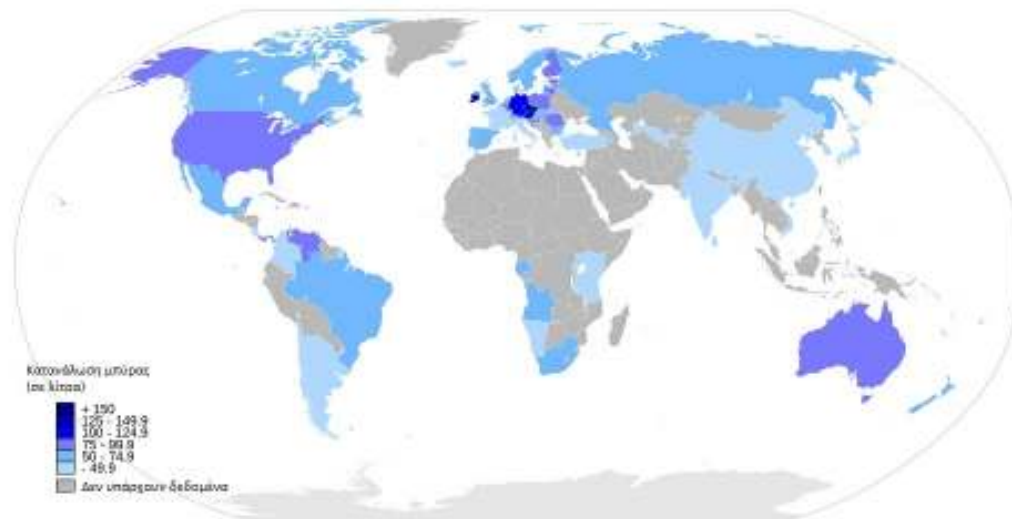
Βολταμμετρίας (Differential Pulse Anodic Stripping Voltammetry, DPASV), ο ολικός περιεχόμενος χαλκός με Φασματομέτρο Μάζας Επαγωγικά Συζευγμένου Πλάσματος και ο ολικός οργανικός άνθρακας (Total Organic Carbon, TOC) με τη μέθοδο της καταλυτικής οξείδωσης σε υψηλή θερμοκρασία. Η ολική περιεκτικότητα των δειγμάτων σε σάκχαρα προσδιορίστηκε με φασματοφωμετρία UV/Vis. Διεξήχθησαν αντιοξειδωτικές δοκιμές με την αναλυτική βιοχημική δοκιμή Elisa. Τέλος, εξετάστηκε η πιθανή συσχέτιση των πολυφαινολών και της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη συμπλοκοποίηση του χαλκού.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΜΠΥΡΑ

2.1 Γενικά για τη μπύρα

Η μπύρα είναι το δημοφιλέστερο αλκοολούχο ποτό στον κόσμο με μέσο όρο κατανάλωσης 17.3 λίτρα το χρόνο ανά άτομο. Τη δεύτερη θέση κατέχει το κρασί (3 λίτρα το χρόνο ανά άτομο) και την τρίτη θέση τα υπόλοιπα αλκοολούχα ποτά (2.2 λίτρα το χρόνο ανά άτομο) ^[4]. Στην Ευρώπη η κατανάλωση της μπύρας είναι 39 λίτρα το χρόνο ανά άτομο και πιο συγκεκριμένα στην Ελλάδα το 2014 η κατανάλωση μπύρας ανά άτομο ήταν περίπου 35.5 λίτρα ^[5].



Εικόνα 2.1 Κατανάλωση μπύρας παγκοσμίως

(Πηγή:http://en.wikipedia.org/wiki/List_of_countries_by_beer_consumption_per_capita)

2.2 Η ιστορία της μπύρας

Η ιστορία της μπύρας ξεκινά ήδη από τα πρώτα χρόνια καταγεγραμμένου πολιτισμού στη γη και φαίνεται να είναι το πρώτο αλκοολούχο ποτό που παρασκευάστηκε. Από το 10000 π.Χ. νομάδες κυνηγοί και κτηνοτρόφοι ανακάλυψαν ότι βρεμένο/υγρό σιτάρι, αν παραμείνει για μεγάλο χρονικό διάστημα, παράγει ποτό με ιδιαίτερες ιδιότητες και ευχάριστη γεύση ^[7].

Η κοιτίδα της μπύρας εντοπίζεται στο σημερινό Ιράκ, ανάμεσα στους ποταμούς Τίγρη και Εφράτη ^[7]. πολλές ανασκαφές βεβαιώνουν πως ο πρώτος πολιτισμένος λαός, οι Σουμέριοι, πριν από 6000 χρόνια παρήγαγαν μπύρα και μετέδωσαν μάλιστα με τη σφηνοειδή γραφή τους συνταγές για την παρασκευή διαφόρων ειδών μπύρας ^[8]. Περίπου 2000 π.Χ., μετά την εξαφάνιση των Σουμερίων, ανέλαβαν οι Βαβυλώνιοι, εξαιρετικοί γνώστες και καταναλωτές μπύρας. Στο μεγαλειώδες έργο της παγκόσμιας λογοτεχνίας, το Έπος του Γκιλγκαμές, γίνεται εκτενής αναφορά στη σημασία της μπύρας. Ήδη 3600 χρόνια πριν ίσχυαν αυστηροί νόμοι περί παραγωγής και πώλησης μπύρας. Όποιος πωλούσε χαμηλής ποιότητας μπύρα σε ακριβή τιμή, πνιγόταν μέσα στο ίδιο το προϊόν του ^[9]. Στους αρχαίους Αιγύπτιους η μπύρα καταναλωνόταν από όλα τα στρώματα του πληθυσμού, ανεξαρτήτως της κοινωνικής τους θέσης. Για την υψηλή τέχνη ζυθοποιίας των Αιγυπτίων μαρτυρούν οι τοιχογραφίες στον τάφο του Κέναμων. Η ζυθοποίηση γινόταν με την παρακάτω συνταγή: Μεγάλα καρβέλια ψωμιού τεμαχίζονταν και τρίβονταν μέσα από κόσκινα σε δοχεία με νερό. Στη συνέχεια τα δοχεία αυτά εκτίθονταν για μερικές μέρες στον ήλιο. Μόλις ολοκληρώνονταν η ζύμωση, το μίγμα φιλτραριζόταν και προέκυπτε η μπύρα.

Ενώ Αιγύπτιοι και Βαβυλώνιοι ήταν λάτρεις της μπύρας, οι Έλληνες, οι Ιουδαίοι και οι Ρωμαίοι είχαν σε πρώτη εκτίμηση το κρασί. Οι Έλληνες θεωρούσαν τη μπύρα ποτό των φτωχών. Ο Ιπποκράτης, ιατρός της αρχαιότητας, χρησιμοποιούσε τη μπύρα για την καταπολέμηση του πυρετού και ως διουρητικό. Ο Αριστοτέλης αναφέρει ότι η μέθη από κρασί μπορεί να φέρει πονοκέφαλο, ενώ η κατανάλωση μπύρας σε βυθίζει σε ελαφρύ ύπνο ^[10].

Οι Ιουδαίοι γνώριζαν την Αιγυπτιακή μπύρα και ζυθοποιούσαν και οι ίδιοι. Και σ' αυτούς όπως και στους Έλληνες, το κρασί ήταν το ποτό της γιορτής και της σπονδής. Η μπύρα ήταν απλά το ποτό της καθημερινότητας. Οι Ρωμαίοι δεν είχαν σχεδόν καμία σχέση με τη μπύρα, την οποία θεωρούσαν "βαρβαρικό ποτό".

Κατά το μεσαίωνα οι μοναχοί ανέδειξαν την τέχνη της ζυθοποίησης, χρησιμοποιώντας διάφορα αρωματικά φυτά για να δίνουν χαρακτηριστικό

άρωμα στη μπίρα. Είναι άγνωστο το ποιός εισήγαγε το λυκίσκο στην παραγωγή της μπίρας.

Το 1516, ο βαυαρός άρχοντας Γουλιέλμος καθόρισε επακριβώς τα 4 συστατικά της μπίρας: νερό, κριθάρι, λυκίσκος και μαγιά, που αποτελούν το γνωστό Γερμανικό κώδικα καθαρότητας της μπίρας, ο οποίος ισχύει μέχρι τις μέρες μας ^[11].

2.3 Οι βασικές πρώτες ύλες στην παραγωγή της μπίρας

Η βασικότερη πρώτη ύλη στην παραγωγή μπίρας είναι το κριθάρι. Απαιτούνται επίσης ο λυκίσκος, ο οποίος είναι υπεύθυνος για το χαρακτηριστικό άρωμα και την πικράδα, η μαγιά για να γίνει η αλκοολική ζύμωση και τέλος το νερό.

2.3.1 Κριθάρι

Είναι το βασικό δημητριακό που χρησιμοποιείται στην παραγωγή της μπίρας. Στις καλλιέργειες συναντάμε 3 βασικούς τύπους κριθαριού. Διακρίνονται από τον αριθμό των σπόρων που βρίσκονται στην κορυφή του κάθε στελέχους. Έτσι συναντάμε σπόρους κριθαριού που αναπτύσσουν 2, 4 και 6 γραμμές κατά μήκος του κεντρικού στελέχους.

Τα ζυθοποιία της Ευρώπης προτιμούν τα δίστιχα κριθάρια, γιατί βυνοποιούνται πιο εύκολα και έχουν υψηλότερο συντελεστή αμύλου/ φλοιού από τις άλλες δυο κατηγορίες, ενώ αντίθετα στις ΗΠΑ διαλέγουν κριθάρι με 6 σειρές για λόγους κόστους. Είναι πιο οικονομικό στην ανάπτυξη και έχει μεγαλύτερη συγκέντρωση ενζύμων, που απαιτούνται για τη μετατροπή του αμύλου σε κόκκους ζάχαρης ^[12].



Εικόνα 2.2 Κριθάρι

2.3.2 Λυκίσκος

Ο λυκίσκος είναι καρπός που προέρχεται από το φυτό Λυκίσκος το ζυθοβότανο. Η χρησιμοποίηση του λυκίσκου στη μπίρα είναι γνωστή από αρχαιοτάτων χρόνων. Η αρχαιότερη καταγραφή χρήσης λυκίσκου στη μπίρα ανάγεται στον 11ο αιώνα. Ο λυκίσκος είναι αυτός που δίνει το χαρακτηριστικό άρωμα στη μπίρα. Για τη ζυθοποίηση χρησιμοποιείται αποκλειστικά το λουλούδι του θηλυκού φυτού επειδή αυτό περιέχει ρητίνες, οι οποίες κατά το βρασμό αποδίδουν τις αρωματικές και γευστικές ουσίες της μπίρας. Επίσης ο λυκίσκος περιέχει ταννίνες και οργανικά οξέα που δρουν ταυτόχρονα ως συντηρητικά.



Εικόνα 2.3: Λυκίσκος

2.3.3 Μαγιά

Ως μαγιά της μπίρας χρησιμοποιούνται διάφορα είδη ζυμομυκήτων, τα οποία πραγματοποιούν τη διαδικασία της αλκοολικής ζύμωσης, το μεταβολισμό δηλαδή των σακχάρων και την παραγωγή της αλκοόλης και του διοξειδίου του άνθρακα. Έκτος από την αλκοολική ζύμωση, η μαγιά επηρεάζει και τη γεύση της μπίρας ^[13]. Η επιλογή της ζύμης σχετίζεται κάθε φορά με το είδος της μπίρας που θα παραχθεί. Για παράδειγμα για την παραγωγή της μπίρας Ale χρησιμοποιείται ο σακχαρομύκητας *Cerevisiae*. Η ζύμη που προέρχεται από αυτόν είναι ανθεκτική και επιζεί στην ατμόσφαιρα. Ένας άλλος σακχαρομύκητας (*Carlsbergnesis*) χρησιμοποιείται μόνο στις Lager μπίρες ^[14].

2.3.4 Νερό

Το 90% ενός ποτηριού μπίρας είναι νερό. Η γεύση και η υφή της μπίρας διαμορφώνονται κατά ένα ποσοστό από την ποιότητα του νερού και πιο

συγκεκριμένα από τα ιχνοστοιχεία που περιέχει. Το νερό που θα χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή της μπίρας δεν θα πρέπει να περιέχει αλλοιωμένα ή επικίνδυνα συστατικά και συνήθως το νερό που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί υφίσταται επεξεργασία με ενεργό άνθρακα.

Στο νερό υπάρχουν συγκεντρώσεις ασβεστίου και μαγνησίου τα οποία είναι υπεύθυνα για τη σκληρότητά του καθώς και για τη γεύση του.

Το ασβέστιο και το μαγνήσιο διαδραματίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στη βιοχημεία της ζυθοποίησης. Το ασβέστιο, για παράδειγμα, βοηθά στη ρύθμιση της αλκαλικότητας της βύνης και έτσι διατηρούνται οι ιδανικές συνθήκες για τους ζυμομύκητες (βιολογικοί καταλύτες). Άλλα ορυκτά στοιχεία που υπάρχουν στο νερό θα διαμορφώσουν επίσης τη διαδικασία: ίχνη ψευδαργύρου και χαλκού είναι επιθυμητά επειδή είναι απαραίτητα για τους ζυμομύκητες, όμως η παρουσία τους σε μεγάλες ποσότητες προκαλεί θολότητα στη μπίρα. Ομοίως, ίχνη θειικών δίνουν στη μπίρα καθαρή φρεσκάδα, όμως μεγάλη ποσότητα θειικών καθιστά τη μπίρα πικρή^[15].

2.4 Διαδικασία Παραγωγής Μπίρας

Η διαδικασία παραγωγής μπίρας αποτελείται από 7 στάδια τα οποία περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω (Εικόνα 2.4):

- **Άλεση της βύνης**

Η βασική πρώτη ύλη για την παραγωγή μπίρας είναι η βύνη κριθαριού. Η παραγωγή της βύνης πραγματοποιείται με τη διαδικασία βυνοποίησης του κριθαριού, η οποία έχει στόχο την ενεργοποίηση ενζύμων που μπορούν να αποικοδομήσουν το άμυλο που περιέχεται στο κριθάρι, σε πιο απλά σάκχαρα, τα οποία παράγουν αλκοόλη κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης.

Αρχικά η βύνη αλέθεται, έτσι ώστε αφενός να αυξηθεί η επιφάνειά της και να γίνεται ευκολότερη η εκχύλιση του αμύλου και των υπόλοιπων συστατικών της και αφετέρου να διαχωριστεί ο φλοιός από το ενδοσπέρμιο.

- **Πολτοποίηση-Διήθηση**

Η αλεσμένη βύνη μεταφέρεται στο δοχείο πολτοποίησης-διήθησης όπου αναμειγνύεται με νερό συγκεκριμένης χημικής σύνθεσης και θερμοκρασίας.

Στη συνέχεια ακολουθεί η θέρμανση και η ανάδευση του μίγματος-πολτού σε συγκεκριμένο θερμοκρασιακό προφίλ το οποίο καθορίζει σε μεγάλο βαθμό τα ιδιαίτερα γευστικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της παραγόμενης μπύρας.

Ακολουθεί το φιλτράρισμα του πολτού για την απομάκρυνση των στερεών υπολειμμάτων της βύνης. Το εκχύλισμα που περιέχει τις διαλυτές ουσίες της βύνης, ζυμώσιμες και μη ζυμώσιμες, ονομάζεται ζυθογλεύκος. Με τη διήθηση αυξάνουμε τη διαύγεια του ζυθογλεύκου, χαρακτηριστικό ιδιαίτερα σημαντικό για την ποιότητα της μπύρας.

- **Βρασμός- Προσθήκη Λυκίσκου**

Ο βρασμός του ζυθογλεύκου διασφαλίζει την αποστείρωσή του και έτσι αποτρέπεται η μεταφορά επιμολύνσεων από τη βύνη. Κατά τη διάρκεια του βρασμού προστίθεται και ο λυκίσκος, ο οποίος συνεισφέρει στο άρωμα και στην πικρή γεύση της μπύρας.

Αφού ολοκληρωθεί ο βρασμός, το αποστειρωμένο ζυθογλεύκος φυγοκεντρείται σε ένα δοχείο με ειδικό γεωμετρικό σχήμα (Whirlpool). Σκοπός αυτής της φυγοκέντρωσης είναι η διαύγαση καθώς και η απομάκρυνση όλων των στερεών υπολειμμάτων που δημιουργήθηκαν με το βρασμό και την προσθήκη του λυκίσκου από το ζυθόλευκος.

Το βρασμό ακολουθεί η ταχεία ψύξη από τους 104°C στους 12-16 °C, με τη χρήση ενός πλακοειδούς εναλλάκτη και το ζυθόλευκος μεταφέρεται στις δεξαμενές ζύμωσης.

- **Ζύμωση**

Στη δεξαμενή ζύμωσης προστίθεται η ζύμη (μαγιά), στο ψυγμένο ζυθογλεύκος, προκειμένου να αρχίσει η αλκοολική ζύμωση. Σε αυτήν τη φάση τα σάκχαρα που εκχυλίστηκαν από τη βύνη μεταβολίζονται από τους ζυμομύκητες σε αλκοόλη και διοξείδιο του άνθρακα.

Η αλκοολική ζύμωση στα σύγχρονα ζυθοποιεία λαμβάνει χώρα σε ανοξείδωτα κυλινδρικών δοχεία που λόγω του ειδικού τους σχήματος, επιτρέπουν την

απομάκρυνση των ζυμών από τον πυθμένα τους, γεγονός που δίνει τη δυνατότητα να πραγματοποιείται και η ωρίμανση της μπίρας σε αυτά.

- **Ωρίμανση**

Αφού ολοκληρωθεί η αλκοολική ζύμωση και τα σάκχαρα έχουν πλήρως μεταβολιστεί, οι ζυμομύκητες καταβυθίζονται στον πυθμένα της δεξαμενής.

Σε αυτή τη φάση η θερμοκρασία της μπίρας μειώνεται και προσεγγίζει τους 0°C, προκειμένου η καταβύθιση των ζυμών να επιταχυνθεί συμπαρασύροντας μαζί και πρωτεΐνες, οι οποίες σε αυτές τις θερμοκρασίες συσσωματώνονται.

Επίσης στη θερμοκρασία αυτή ορισμένες φαινολικές ενώσεις παραμένουν αδιάλυτες, καθιστώντας τη μπίρα πιο μαλακή και φρουτώδη.

- **Φιλτράρισμα**

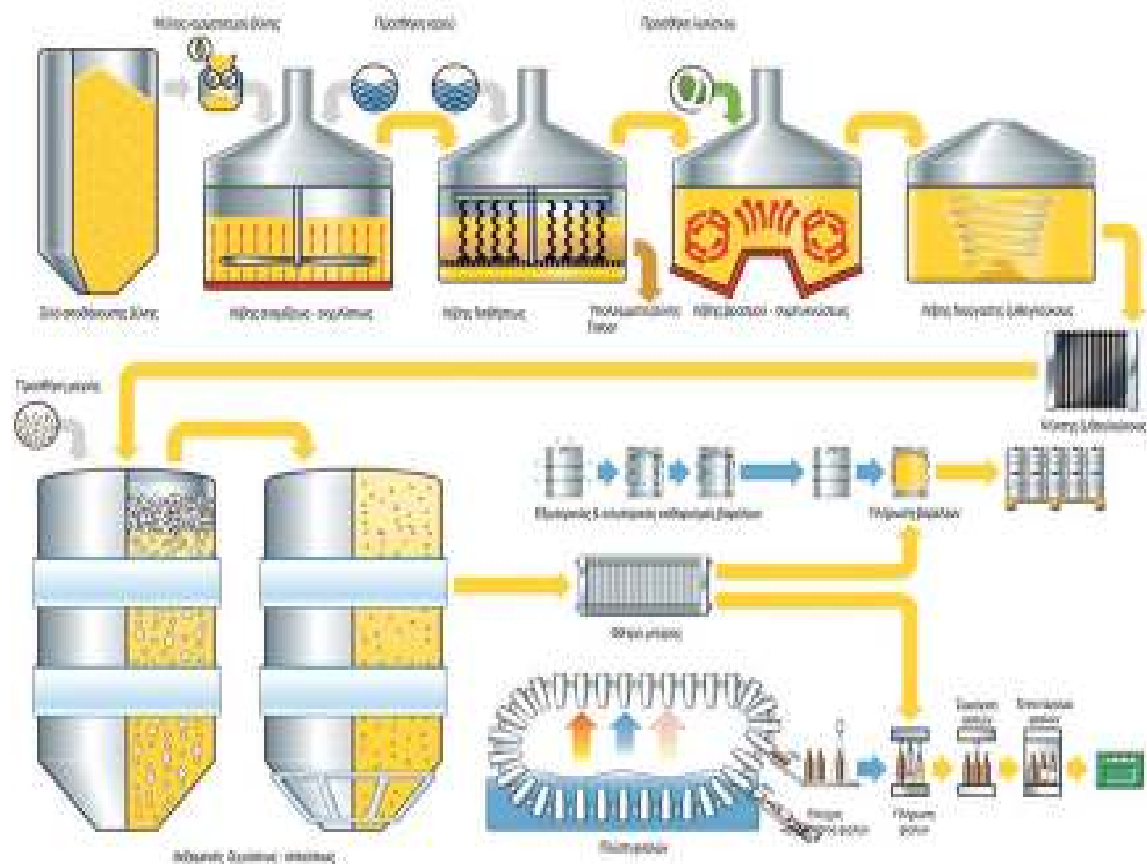
Με το φιλτράρισμα επιτυγχάνουμε αφενός τη σταθεροποίηση της γεύσης της μπίρας και αφετέρου τη διαύγεια και τη λαμπρότητά της. Σημειώνεται ότι δεν φιλτράρονται όλοι οι τύποι της μπίρας, καθώς ορισμένοι εξ αυτών ωριμάζουν στις φιάλες αφιλτράριστοι.

Το φιλτράρισμα επιτρέπει την απομάκρυνση των στερεών και των ζυμών από τη μπίρα. Ανάλογα με το πορώδες του φίλτρου, είναι δυνατή η απομάκρυνση όλων των μικροοργανισμών που πιθανώς μπορούν να αλλοιώσουν τη γεύση της μπίρας (αποστειρωτικό φιλτράρισμα).

- **Τυποποίηση**

Η τυποποίηση είναι το τελευταίο στάδιο της παραγωγής της μπίρας και είναι η διαδικασία μεταφοράς της από τις δεξαμενές φύλαξης σε φιάλες ή βαρέλια, προκειμένου το τελικό προϊόν να διατεθεί στην αγορά.

Η συγκεκριμένη διαδικασία πρέπει να γίνεται με προσοχή διότι η μπίρα δεν πρέπει να έρθει σε επαφή με το οξυγόνο και ταυτόχρονα πρέπει να γίνεται σε συνθήκες αποστείρωσης, καθώς η παρουσία μικροοργανισμών μπορεί να επιμολύνει τη μπίρα και να οδηγήσει στην οργανοληπτική υποβάθμιση του τελικού προϊόντος ^[16].



Εικόνα 2.4 : Διαδικασία παραγωγής μπίρας

(Πηγή : http://www.mamos.gr/assets/img/big/stadia_paragogikis_diadikasias_950.jpg)

2.5 Είδη μπίρας

Ο διαχωρισμός των ειδών της μπίρας γίνεται συνήθως με βάση τον τρόπο ζύμωσης. Υπάρχουν 3 είδη ζυμώσεων και πάνω σε αυτό το στοιχείο θα στηριχθεί η κατηγοριοποίηση των ειδών της μπίρας σε αυθόρμητη ζύμωση (spontaneous fermentation), ζύμωση με αφοζύμες (top fermentation) και ζύμωση με βυθοζύμες (bottom fermentation). Το κάθε είδος έχει διάφορα υποείδη τα οποία θα αναλυθούν παρακάτω.

Αυθόρμητη ζύμωση

The Lambic Family

Το είδος αυτής της μπύρας αποτελεί την παλαιότερη μέθοδο που χρησιμοποιείται από τους ζυθοποιούς και καθιερώθηκε από παραγωγούς στην κοιλάδα Sienne του Βελγίου. Το είδος αυτής της μπύρα παράγεται με φυσική ζύμωση, δηλαδή ζυμώνεται σε ανοιχτά δοχεία με τη βοήθεια των ζυμομυκήτων του περιβάλλοντος και χωρίς προσθήκη μαγιάς και έτσι παραμένουν στη μπύρα αζύμωτα σάκχαρα και πτητικά συστατικά (εστέρες). Ως εκ τούτου οι μπύρες αυτής της κατηγορίας είναι φρουτώδεις, γεμάτες φαινολικά και με μεγάλη πολυπλοκότητα. Υποκατηγορίες αυτής της οικογένειας είναι:

- Lambic

Παράγεται από αβυνοποίητο σιτάρι. Οι αβυνοποίητοι κόκκοι παράγουν ένα άσπρο-κρεμώδες πολτό.

- Faro

Περιέχει μια lambic και ζάχαρη ή καραμέλα και μερικές φορές μπαχαρικά.

- Gueze

Παράγεται από την ανάμιξη δυο lambics (μιας που έχει ωριμάσει για τουλάχιστον 3 χρόνια και μιας «νεότερης»). Με αυτό τον τρόπο γίνεται μια δεύτερη ζύμωση, η οποία παράγει περισσότερο CO₂ και αλκοόλη. Το αποτέλεσμα της ανάμιξης αυτής είναι μια μπύρα σχετικά ξινή.

- Fruit Lambic

Παράγεται από μπύρα lambic ή gueze με προσθήκη φρούτων ως επιπλέον συστατικού. Τα φρούτα μπορεί να είναι κεράσια, βατόμουρα, ροδάκινα, μπανάνες, μήλα και μαύρες σταφίδες. Η γεύση των ζύθων αυτών έχει μεγάλη ποικιλία.

Ζύμωση με αφροζύμες

Ale

Το είδος αυτό αναφέρεται στη μπίρα που παράγεται με χρήση του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*. Στα ελληνικά αποκαλείται και «αφροζύμωτη μπίρα» ή «μπύρα αφροζύμης», διότι η συγκεκριμένη μαγιά κατά τη διάρκεια της ζύμωσης ανέρχεται στην επιφάνεια του μούστου. Αυτό το είδος μπίρας, υφίσταται ζύμωση σε σχετικά υψηλές θερμοκρασίες 15-23 °C ενώ η μεταζύμωση διαρκεί συνήθως μικρό χρονικό διάστημα ^[17]. Υποκατηγορίες των αφροζύμων ζύθων είναι οι:

- Pale

Το χρώμα της είναι ξανθό-κόκκινο. Χαρακτηρίζεται από ελαφριά γεύση καρυδιού που παρέχει η βύνη.

- Trappist

Πρόκειται για τις λεγόμενες μοναστηριακές μπίρες, οι οποίες είναι υψηλής ζύμωσης και η ωρίμανσή τους διαρκεί πάνω από 3 χρόνια. Παράγονται περίπου 20 μπίρες με αυτή την ονομασία, στο σύνολό τους με αφροζύμες και με υψηλό αλκοολικό βαθμό. Η γεύση τους είναι φρουτώδης και κάποιες έχουν γευστική συγγένεια με το ρούμι λόγω προσθήκης καλαμοσακχάρου κατά τη διάρκεια της ζύμωσης.

- Belgian golden ale

Είναι δυνατή, αχυρόχρωμη βέλγικη μπίρα με υψηλό αλκοολικό βαθμό και πικρή γεύση λόγω λυκίσκου.

- Berliner Weisse

Είναι από τις πιο δροσιστικές μπίρες της κατηγορίας, έχει χαμηλό αλκοολικό βαθμό, αφρώδη χαρακτήρα, χαρακτηριστικό χλωμό χρώμα και όχι διακριτή πικράδα.

- Stout

Είναι μπύρες με πολύ σκούρο χρώμα, σχεδόν μαύρο, με γεύση ψημένου ή καβουρδισμένου. Υπάρχουν 5 είδη stout: Dry, Oyster, Sweet, Oatmeal, Imperial.

Ζύμωση με Βυθοζύμες

Lager

Οι μπύρες αυτής της κατηγορίας είναι οι ευρύτερα διαδεδομένες και καταναλώνονται περισσότερο. Παρασκευάζονται με χρήση του ζυμομύκητα *Saccharomyces carlsbergensis*. Η μαγιά τους κατά τη ζύμωση υφίσταται καθίζηση στο βυθό του μούστου για αυτό και αποκαλούνται στα ελληνικά μπύρες βυθοζύμης. Οι μπύρες Lager υφίστανται ζύμωση σε χαμηλότερες θερμοκρασίες, συνήθως 6-12 °C ενώ η διαδικασία της μεταζύμωσης διαρκεί μερικούς μήνες. Για το λόγο αυτό, η τελικά παραγόμενη μπύρα φυλάσσεται σε αποθήκες, γεγονός που οδήγησε και στον όρο -lager που στα γερμανικά σημαίνει -αποθήκη ^[17].

- Bock

Έχει υψηλό αλκοολικό βαθμό, είναι σκουρόχρωμη και χαρακτηρίζεται από μια γλυκάδα βύνης.

- Pilsner

Είναι ανοιχτόχρωμες μπύρες, με γεμάτη γεύση βύνης και έχουν πικράδα από το λυκίσκο.

- Amber

Έχει χαρακτηριστική γεύση καραμέλας και λυκίσκου.

- Rauchbier (smoked beer)

Είναι μπύρες όπου η βύνη έχει ξεραθεί πάνω σε καπνισμένο ξύλο. Έχουν σκούρο χρώμα, άρωμα καπνού και γεύση με μέτρια πικράδα.

- Darkbeer

Έχουν χρώμα καστανό και καστανοκόκκινο με γεύση καραμέλας ή σοκολάτας.

- Schwarzbier (black beer)

Έχουν χρώμα μαύρο και χαρακτηριστική γεύση πικρής σοκολάτας.

2.6 Ελληνικές Ζυθοποιίες

1. ΦΙΞ – Η 1η Ελληνική Ζυθοποιία

Το πρώτο εργοστάσιο μπίρας στη χώρα μας δημιουργήθηκε το 1864 στο Κολωνάκι από τον Ιωάννη Φιξ. Το 1961 ξεκινά να λειτουργεί το νέο υπερσύγχρονο εργοστάσιο στη Λεωφόρο Συγγρού. Όμως το 1982 το εργοστάσιο κλείνει λόγω μεγάλου ανταγωνισμού. Έπειτα το 2010 τρεις Έλληνες επιχειρηματίες εξαγοράζουν την εταιρεία Ολυμπιακή Ζυθοποιία μαζί με το σήμα της παλαιότερης ελληνικής μπίρας. Το 2010 δημιουργείται το ζυθοποιείο στην Εύβοια και η μπίρα FIX είναι ξανά διαθέσιμη στην ελληνική αγορά ^[18].

2. Αθηναϊκή Ζυθοποιία Α.Ε.

Ιδρύθηκε το 1963 και αποτελεί μέλος του Ομίλου Heineken. Το 1965 ξεκίνησε η λειτουργία του πρώτου εργοστασίου στην Αθήνα. Το δεύτερο εργοστάσιο άνοιξε το 1974 στη Θεσσαλονίκη. Το 1976 η Amstel γίνεται η πιο δημοφιλής μπίρα στην ελληνική αγορά. Το 1981 η Αθηναϊκή Ζυθοποιία ξεκίνησε την παραγωγή της μπίρας Heineken. Το 1985 άνοιξε τρίτο εργοστάσιο στην Πάτρα. Σήμερα, παράγει και συσκευάζει στην Ελλάδα μερικές από τις πιο διάσημες μπίρες: Amstel, Amstel Pils, Amstel Bock, Heineken, ΑΛΦΑ, Fischer, Buckler, ΒΙΟΣ 5. Επίσης εισάγει τις Amstel Light, McFarland, Erdinger, SOL, Murphy's, Duvel, Chimay, Kirin, Moretti, Desperados, Krusovice και άλλες ^[19].

3. Μύθος Ζυθοποιία

Η δεύτερη μεγαλύτερη ζυθοποιία στην Ελλάδα και μέλος του Ομίλου Carlsberg. Ιδρύθηκε το 1968 ως Henninger Hellas S.A. Το 1976 ξεκινάει η

παραγωγή της Kaiser. Το 1992 η εταιρεία γυρίζει σελίδα καθώς ο Όμιλος Μπουτάρη εξαγοράζει την πλειοψηφία των μετοχών της Henninger Hellas S.A και το 1997 λανσάρει τη μπύρα Mythos, η οποία αποκτά άμεσα φανατικούς οπαδούς. Το 2012 λανσάρει την Kaiser Blonde. Το 2014 λανσάρει τη Mythos Radler και το ανθρακούχο ποτό Somersby με βάση το μήλο ^[20].

4. Ελληνική Ζυθοποιία Αταλάντης

Η ΕΖΑ, δημιουργήθηκε το 1989 ως ομώνυμη θυγατρική του γερμανικού ομίλου Löwenbräu του οποίου η μπύρα κυκλοφόρησε στην Ελλάδα το 1980, υπό καθεστώς παραχώρησης σήματος. Το 1989 απέκτησε το εργοστάσιο στην Αταλάντη και μετονομάστηκε σε Ελληνική Ζυθοποιία Αταλάντης Α.Ε. (ΕΖΑ). Το 1996 λάνσαρε στην αγορά την ελληνική μπύρα Pils Hellas και το 2010 κυκλοφόρησε η Berlin Premium Lager ^[21].

5. Ζυθοποιία Μακεδονίας Θράκης

Εδρεύει στη βιομηχανική περιοχή Κομοτηνής. Θεωρείται μια από τις πιο ανερχόμενες και υποσχόμενες εταιρίες στην Ελλάδα. Παράγει τις Βεργίνα Lager, Βεργίνα Weiss, Βεργίνα Red ^[22].

6. Septem - Πρότυπη μικροζυθοποιία

Ιδρύθηκε τον Ιούνιο 2009, στο Ωρολόγιο της Εύβοιας. Διαθέτει στην αγορά, φρέσκια, εμφιαλωμένα, απαστερίωτη μπύρα. Οι Septem Monday's Pilsner και Septem Friday's Pale Ale βραβεύθηκαν με χρυσό μετάλλιο στην κατηγορία Design & Packaging στο International Beer Challenge 2010 στο Λονδίνο ^[16].

7. Κερκυραϊκή Ζυθοποιία

Η Κερκυραϊκή Μικροζυθοποιία ιδρύθηκε το 2006 και εδρεύει στον Αρίλλα, ένα μικρό χωριό της βόρειας Κέρκυρας. Παράγει τις Royal Ionian που είναι ξανθιά, Real Ale Bitter, μια καστανόχρωμη μπύρα, και Ionian Epos ^[23].

8. Μικρό-Ζυθοποιία Σαντορίνης

Εδρεύει στον οικισμό της Μέσα Γωνίας της Σαντορίνης και παράγει τις απαστερίωτες μπύρες: Yellow Donkey, Red Donkey και Crazy Donkey ^[24].

9. Volkan Beers

Ξεκίνησε τη λειτουργία της το χειμώνα του 2011. Παράγει τις Volkan Blonde και Volkan Black. Η μπύρα VOLKAN, η πρώτη ελληνική μπύρα από τη Σαντορίνη, αποτέλεσε προϊόν έμπνευσης και δημιουργίας από τα καλύτερα τοπικά προϊόντα των ελληνικών νησιών αφού για την παραγωγή της χρησιμοποιούνται βασάλτης από το ηφαίστειο του 1600 π.Χ., νερό Σαντορίνης, Κίτρο Νάξου και μέλι Σαντορίνης ^[25].

10. Μπύρα Χίου

Η παραγωγή της φρέσκιας μπύρας Χίου ξεκίνησε το 2012. Η εμφιάλωσή της γίνεται πάντα αφιλτράριστη και απαστερίωτη για να διατηρεί όλη τη γεύση και τα χαρακτηριστικά μιας πραγματικής μπύρας ^[26].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΟΡΓΑΝΙΚΗ ΥΛΗ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΕΣ ΜΠΥΡΕΣ

3.1 Χημική σύσταση μπίρας

Η μπίρα είναι το τελικό προϊόν της διαδικασίας της ζυθοποίησης. Είναι ένα πολύπλοκο μίγμα που αποτελείται από περισσότερες από 450 ενώσεις και περιέχει μακρομόρια όπως είναι οι πρωτεΐνες, τα νουκλεϊκά οξέα, οι πολυσακχαρίτες και τα λιπίδια. Όλα τα παραπάνω μαζί συνθέτουν το χαρακτήρα της μπίρας ^[27].

Η ανάλυση της σύστασης της μπίρας είναι σημαντική για την αξιολόγηση:

- i. των οργανοληπτικών της χαρακτηριστικών
- ii. της ποιότητάς της
- iii. της θρεπτικής της αξίας και
- iv. της ασφάλειάς της

Μεγάλος αριθμός πτητικών ενώσεων έχει προσδιοριστεί στις μπίρες και τα διαφορετικά συστατικά μπορούν να επηρεάσουν το άρωμα, τη γεύση και την ποιότητα αφρού του προϊόντος σε διαφορετικό βαθμό ^[28].

3.2 Αλκοόλες

Η μπίρα περιέχει μια σειρά από αλκοόλες που επηρεάζουν τη γεύση της (Πίνακας 3.1).

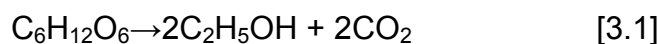
Πίνακας 3.1 : Αλκοόλες που περιέχονται στη μπίρα

Αλκοόλη	Περιεκτικότητα (mg L ⁻¹)	Γεύση
Μεθανόλη	0.5-0.3	Αλκοολική
Αιθανόλη	20000-80000	Αλκοολική, ισχυρή
1-Προπανόλη	3-16	Αλκοολική
2-Προπανόλη	3-6	Αλκοολική
2-Μεθυλοβουτανόλη	8-30	Αλκοολική, μπανάνα
3-Μεθυλοβουτανόλη	30-70	Αλκοολική, μπανάνα

Αλκοόλη	Περιεκτικότητα (mg L ⁻¹)	Γεύση
2-Φαινυλαιθανόλη	8-35	Τριαντάφυλλο, πικρή
1-Οκτεν-30-όλη	0.03	Φρεσκοκομμένο χορτάρι
2-Δεκανόλη	0.005	Καρύδα, γλυκάνισος
Γλυκερόλη	1200-2000	Υπόγλυκη, παχύρρευστο
Τυροσόλη	3-40	Πικρή

(Πηγή: Hughes P.S., Baxter E.D., 2001) ^[29]

Η πιο σημαντική αλκοόλη που περιέχεται στη μπίρα είναι η αιθανόλη η οποία παράγεται σύμφωνα με την αντίδραση [3.1]:



Η πλειοψηφία των ζύθων έχει περιεκτικότητα σε αλκοόλ από 3.5% έως 5.5% κατ' όγκο ^[29].

Η παρουσία αιθανόλης στη μπίρα επηρεάζει την ποιότητά της με αρκετούς τρόπους. Συμβάλλει άμεσα στη γεύση, με ένα αναγνωρίσιμο θερμό χαρακτηριστικό το οποίο απουσιάζει από τις μη αλκοολούχες μπίρες ή αυτές που έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε αλκοόλ. Επηρεάζει επίσης τη συμβολή άλλων πτητικών ουσιών στο άρωμα της μπίρας επηρεάζοντας το τμήμα μεταξύ της μπίρας και της επιφάνειάς της.

Επίσης η αιθανόλη μειώνει την επιφανειακή τάση και με αυτόν τον τρόπο προάγει το σχηματισμό φυσαλίδων όμως ανταγωνίζεται με άλλες επιφανειακά ενεργές ουσίες για τη θέση τους στη μεσεπιφάνεια μπίρας - αφρού, οδηγώντας σε μείωση του τελευταίου ^[30].

3.3 Διοξείδιο του άνθρακα

Το διοξείδιο του άνθρακα παράγεται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης σύμφωνα με την αντίδραση [3.1].

Το CO₂ παρέχει τον αφρισμό στη μπίρα και όπως η αιθανόλη, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ποιότητα της μπίρας. Εκτός από την επίδρασή του στη γεύση, το CO₂ προσδιορίζει την έκταση του σχηματισμού του αφρού κατά τη διάρκεια της διανομής της μπίρας σε ποτήρι και επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό

τη διανομή πτητικών ενώσεων στο άνω μέρος της μπίρας και ως εκ τούτου το άρωμά της ^[31].

3.4 Άλλα αέρια στη μπίρα

3.4.1 Οξυγόνο

Το οξυγόνο έχει αρνητικές επιπτώσεις στη μπίρα λόγω της οξειδωσης διάφορων συστατικών, οδηγώντας στο σχηματισμό θολερότητας και σε μια “μπαγιατική” γεύση. Για αυτό το λόγο οι ζυθοποιοί προσπαθούν να αποφύγουν με κάθε τρόπο την είσοδο του οξυγόνου στην μπίρα ^[32].

3.4.2 Άζωτο

Το άζωτο προστίθεται στη μπίρα για τη σταθεροποίηση του αφρού. Ο αφρός που παράγεται σε μπίρες που περιέχουν N₂ έχει την τάση να σχηματίζει πολλές μικρές φυσαλίδες. Αυτού του είδους οι αφροί είναι πολύ σταθεροί και έχουν μια απαλή υφή στο στόμα ^[31].

3.5 Πρωτεΐνες, πεπτιδία και αμινοξέα

Τα αμφιπαθικά πολυπεπτιδία που υπάρχουν στη μπίρα σταθεροποιούν τις φυσαλίδες στον αφρό ^[33]. Οι υδρόφοβες περιοχές τους τα οδηγούν σε επιφάνειες οι οποίες δημιουργούνται κατά τον αφρισμό και είναι υπεύθυνες για την αλληλεπίδρασή τους με άλλα υδρόφοβα μόρια, κυρίως τα iso-α-οξέα. Η σχηματιζόμενη μήτρα ανθίσταται στη δύναμη της επιφανειακής τάσης η οποία επιδιώκει να περιορίσει την αυξημένη επιφάνεια που δημιουργείται κατά τον αφρισμό. Μερικές πρωτεΐνες που βρίσκονται στη μπίρα αντιδρούν με πολυφαινόλες με αποτέλεσμα να προκύπτει θολερότητα ^[34].

Όσον αφορά τα αμινοξέα, η παρουσία τους δεν επιφέρει θετικές επιπτώσεις. Ειδικά αν υπάρχουν σε περίσσεια ενισχύουν τη μόλυνση του προϊόντος δρώντας ως πηγές αζώτου για μικροοργανισμούς. Ωστόσο είναι σημαντικό το ζυθογλεύκος να περιέχει μια σωστή αναλογία αμινοξέων ώστε να μπορούν να αναπτυχθούν οι ζυμομύκητες και να γίνει η ζύμωση.

3.6 Λιπίδια

Το κριθάρι περιέχει περίπου 3% w/w λιπίδια, κυρίως σε μορφή τριγλυκεριδίων, το μεγαλύτερο μέρος των οποίων συγκεντρώνεται στους

ζωντανούς ιστούς ^[35]. Αυτά δεν παραλαμβάνονται εύκολα από υδατικό διάλυμα, αλλά περιορισμένη δραστηριότητα της λιπάσης κατά τη διάρκεια της ζυθοποίησης και της πολτοποίησης του μούστου μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή λιπαρών οξέων, κυρίως ακόρεστων C₁₈, όπως το λινελαϊκό και το λινολενικό οξύ. Τα περισσότερα από αυτά χρησιμοποιούνται από τους ζυμομύκητες για την ανάπτυξή τους ^[36], καθιστώντας τη μπίρα ένα τρόφιμο χωρίς λιπαρά.

Τα χαμηλά επίπεδα λιπιδίων στη μπίρα είναι επίσης σημαντικά για την ποιότητά της, αφού μπορεί να έχουν επιβλαβείς επιπτώσεις τόσο στον αφρό όσο και στη γεύση της.

3.7 Αμίνες

Πολλές διαφορετικές αμίνες έχουν ταυτοποιηθεί στις μπίρες, αλλά η αμμωνία αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος των πτητικών ουσιών της μπίρας. Οι πτητικές αμίνες δεν σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, αλλά προέρχονται από τη βύνη και το λυκίσκο που χρησιμοποιούνται, ενώ οι συνθήκες που επικρατούν κατά τη διάρκεια της πολτοποίησης και της ζυθοποίησης επηρεάζουν τη συγκέντρωσή τους στη μπίρα ^[37]. Μεγάλες διακυμάνσεις στις συγκεντρώσεις των πτητικών αμινών έχουν βρεθεί σε διαφορετικές μπίρες, οι οποίες οφείλονται στις διαφορές των πρώτων υλών και των διεργασιών ζυθοποίησης. Στις αμερικανικές μπίρες, η αιθυλαμίνη φαίνεται να είναι η κύρια πτητική αμίνη ^[38] ενώ η διμεθυλαμίνη φαίνεται να είναι η πιο κοινή στις Ευρωπαϊκές μπίρες ^[39].

3.8 Υδατάνθρακες

Ενώ τα περισσότερα σάκχαρα που υπάρχουν στο ζυθόγλυκος ζυμώνονται προς αιθανόλη, μερικοί υδατάνθρακες παραμένουν στη μπίρα. Επίσης μερικές φορές μπορεί να προστεθούν επιπλέον σάκχαρα στη μπίρα ώστε το τελικό προϊόν να αποκτήσει περισσότερο γλυκιά γεύση. Οι υδατάνθρακες που παραμένουν στη μπίρα από το ζυθόγλυκος είναι οι μη ζυμώσιμες δεξτρίνες και μερικοί πολυσακχαρίτες. Οι δεξτρίνες είναι υπολείμματα της αποικοδόμησης του αμύλου, ενώ οι πολυσακχαρίτες προέρχονται από τα κυτταρικά τοιχώματα του κριθαριού ^[40].

Η περιεκτικότητα της μπίρας σε υδατάνθρακες είναι περίπου 3-4%. Τα πιο συνηθισμένα σάκχαρα που υπάρχουν στη μπίρα δίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 3.2 : Περιεκτικότητα σακχάρων στη μπίρα

Σάκχαρα	Περιεκτικότητα (g L ⁻¹)
Φρουκτόζη	0-0.19
Γλυκόζη	0.04-1.1
Σακχαρόζη	0-3.3
Μαλτόζη	0.7-3.0
Μαλτοτριόζη	0.4-3.4

(Πηγή: Hughes P.S., Baxter E.D., 2001) ^[29]

3.9 Φαινολικές ενώσεις

Οι φαινολικές ενώσεις ανήκουν στα φυσικά αντιοξειδωτικά της μπίρας και αποτελούν μια πολύ μεγάλη τάξη ενώσεων. Η δομή των φαινολικών ενώσεων ποικίλει και έτσι μπορούμε να συναντήσουμε απλές φαινολικές ενώσεις όπως φαινολικά οξέα με έναν ανθρακικό σκελετό 6 ατόμων άνθρακα, μέχρι σύνθετες φαινολικές ενώσεις αποτελούμενες από πολυμερισμένα μόρια όπως οι ταννίνες. Οι φαινολικές ενώσεις είναι παράγωγα του βενζολίου με ένα ή περισσότερα υδροξύλια στο φαινολικό δακτύλιο και ανάλογα με τη δομή του ανθρακικού σκελετού κατατάσσονται στα φαινολικά οξέα, στα φλαβονοειδή, στα στυλβένια και τις λιγνάσες ^[41].

Οι πολυφαινόλες είναι δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών, που χρησιμοποιούνται στο αμυντικό τους σύστημα ενάντια στους απειλητικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες. Η κύρια χημική διαδικασία στην οποία εμπλέκονται οι πολυφαινόλες είναι η σάρωση των δραστικών μορφών οξυγόνου, ενώ οι φαινολικές ενώσεις των φυτών μπορούν επίσης να δράσουν ως φυσικά αντιοξειδωτικά οδηγώντας στη δημιουργία χηλικών ενώσεων. Αναφέρονται επίσης ως κύρια συστατικά των εκκριμάτων ρίζας ως απόκριση στην ανεπάρκεια σιδήρου. Τα πιο άφθονα φαινολικά οξέα στη μπίρα είναι το φερουλικό οξύ, το συριγγικό οξύ και το γαλλικό οξύ.

3.10 Ρητίνες

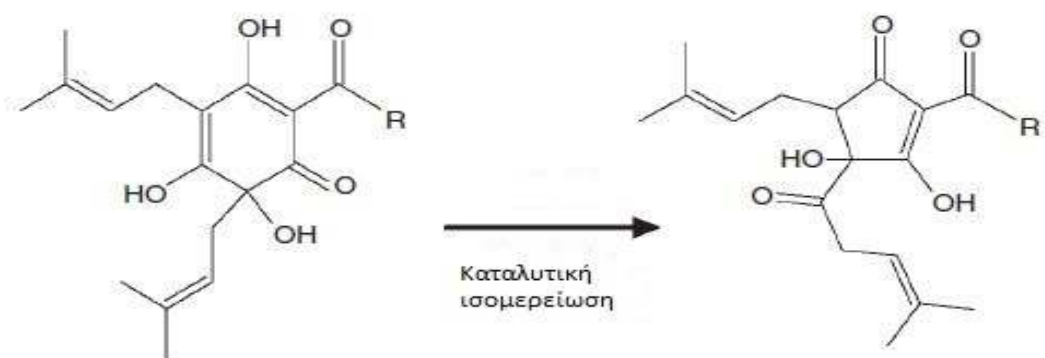
Ο λυκίσκος ευθύνεται για την πικρή γεύση της μπύρας, λόγω των ρητινών που περιέχει.

Οι πιο σημαντικές ρητίνες που υπάρχουν στη μπύρα είναι τα α-οξέα των οποίων η περιεκτικότητα στη μπύρα εξαρτάται από την ποικιλία του λυκίσκου καθώς και από το περιβάλλον όπου αναπτύχθηκε. Υπάρχουν 3 διαφορετικά είδη α-οξέων στο λυκίσκο, τα οποία κατά τη διάρκεια της ζύμωσης ισομερειώνονται σε πιο διαλυτές και πιο πικρές ενώσεις (εικόνα 3.1).

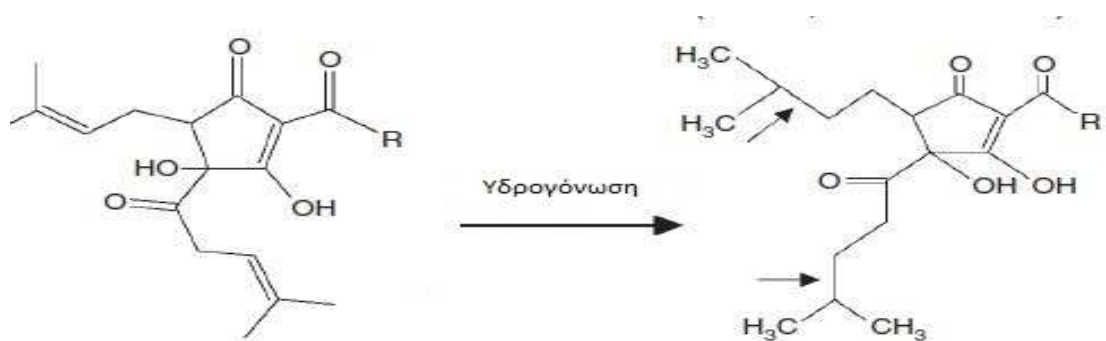
Κάποιες φορές τα iso-α-οξέα μειώνονται χρησιμοποιώντας αέριο υδρογόνο και καταλύτη παλλαδίου (εικόνα 3.2). Αυτό γίνεται για να αποφευχθεί ο σχηματισμός της ένωσης 3-μέθυλο-2-βουτενο-1-θειόλη η οποία σχηματίζεται όταν τα iso-α-οξέα εκτεθούν στο φως και η οποία προσδίδει στη μπύρα μια πολύ άσχημη μυρωδιά.

Έκτος βέβαια από την ικανότητά τους να προσδίδουν πικρή γεύση στη μπύρα, τα iso-α-οξέα έχουν και άλλες ενδιαφέρουσες ικανότητες ^[42]:

- έχουν τασιενεργές ιδιότητες και κατά συνέπεια με την παρουσία τους σταθεροποιείται ο αφρός της μπύρας και
- αναστέλλουν την ανάπτυξη των Gram(+) βακτηρίων προστατεύοντας έτσι τη μπύρα από μικροοργανισμούς



Εικόνα 3.1 : Ισομερίωση α-οξέων, όπου R= -CH₂CH(CH₃)₂ για την humulone-
isohumulone, R= -CH(CH₃)₂ για την cohumulone-isocohumulone και R= -
CH(CH₃)CH₂CH₃ για adhumulone-isoadhumulone



Εικόνα 3.2 : Υδρογόνωση iso-α-οξέων

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΜΠΥΡΑ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑ

Η εγκληματικότητα, τα τροχαία ατυχήματα, η διατάραξη της δημόσιας τάξης καθώς και βλάβες στην υγεία μπορεί να είναι αποτέλεσμα της χρόνιας χρήσης αλκοόλ. Η αιθανόλη, που αποτελεί συστατικό της μπύρας, είναι ένα από τα συνηθέστερα, παγκοσμίως χρησιμοποιούμενα ψυχαγωγικά μέσα. Με την κατανάλωση της μπύρας, η αιθανόλη απορροφάται από το γαστρεντερικό σωλήνα με διάχυση και γρήγορα διανέμεται στο αίμα πριν από την είσοδό της στους ιστούς. Η αιθανόλη μεταβολίζεται σε ακεταλδεΐδη κυρίως στο στομάχι και το ήπαρ. Η ακεταλδεΐδη είναι ιδιαίτερα τοξική και δεσμεύει κυτταρικά συστατικά δημιουργώντας επιβλαβή σύμπλοκα ακεταλδεΐδης ^[43].

Υπάρχουν ενδείξεις ότι η κατανάλωση αλκοόλ με μέτρο έχει θετικότερα αποτελέσματα στην υγεία από ό, τι η αποχή από αυτό. Η μέτρια κατανάλωση μπύρας έχει αποδειχθεί ότι είναι, τουλάχιστον, τόσο καλή για την υγεία όσο η κατανάλωση κρασιού, μειώνοντας τους κινδύνους εμφάνισης της στεφανιαίας νόσου, του εμφράγματος, του διαβήτη και της θνησιμότητας γενικότερα ^[44,45]. Τα θετικά αυτά αποτελέσματα της κατανάλωσης μπύρας μπορούν επίσης να αποδοθούν σε μια ολόκληρη σειρά από άλλες ουσίες που βρίσκονται στα δημητριακά και στο λυκίσκο όπως αντιοξειδωτικές ουσίες π.χ. πολυφαινόλες και φλαβονοειδή. Ιδιαίτερα αξιοσημείωτη είναι η μηδενική περιεκτικότητα σε λιπαρά και χοληστερόλη. Επιπλέον, η μπύρα περιέχει βασικές βιταμίνες και ανόργανα συστατικά συμβάλλοντας έτσι σε μια υγιεινή και ισορροπημένη διατροφή ^[46].

4.1 Κατανάλωση μπύρας και παθολογικές καταστάσεις

4.1.1 Καρδιαγγειακά νοσήματα

Τα καρδιαγγειακά νοσήματα αποτελούν μία από τις κυριότερες αιτίες θανάτου παγκοσμίως (μαζί με τις κακοήθειες και τα ατυχήματα) και οφείλονται κυρίως στην αθηρωμάτωση των στεφανιαίων αρτηριών. Οι παράγοντες κινδύνου είναι ο σακχαρώδης διαβήτης, η αρτηριακή υπέρταση, η υπερλιπιδαιμία, το κάπνισμα, η παχυσαρκία και η έλλειψη φυσικής δραστηριότητας. Αν και η

υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ είναι αναμφίβολα και ποικιλότροπα επιζήμια για την υγεία, συνεχή επιδημιολογικά δεδομένα αναφέρουν ότι η μέτρια κατανάλωση αλκοόλ συνδέεται αντιστρόφως με την εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων ^[47].

Ο μηχανισμός με τον οποίο το αλκοόλ μειώνει τον κίνδυνο της αθηροσκλήρωσης είναι πολύπλοκος. Το αλκοόλ μειώνει την LDL χοληστερίνη στο πλάσμα του αίματος και διεγείρει την αύξηση του επιπέδου της HDL χοληστερόλης και της απολιποπρωτεΐνης A-I και A-II. Μειώνει επίσης τον κίνδυνο πήξης του αίματος με ελάττωση του επιπέδου του ινωδογόνου στο πλάσμα, καθώς και τις τάσεις συσσωμάτωσης των αιμοπεταλίων ^[48].

Συστατικά εκτός του αλκοόλ μπορούν να συμβάλλουν στην αντιμετώπιση της στεφανιαίας νόσου ^[49], συμπεριλαμβανομένων και των πολυφαινόλων ^[50]. Επίσης η επίδραση που έχει η μέτρια κατανάλωση του αλκοόλ στη μείωση του άγχους διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μείωση των καρδιαγγειακών νοσημάτων ^[51]. Τέλος, η μπύρα μπορεί να είναι ιδιαίτερα πολύτιμη σε σύγκριση με άλλα αλκοολούχα ποτά εξαιτίας κάποιων «πικρικών παραγόντων» (bittering agents), οι οποίοι προέρχονται από το λυκίσκο και υποστηρίζεται ότι έχουν ηρεμιστικές και υπνωτικές επιπτώσεις ^[52].

4.1.2 Έλκος

Έχει αποδειχθεί μια αντίστροφη σχέση μεταξύ της μέτριας κατανάλωσης αλκοόλ και του ελικοβακτηριδίου του πυλωρού (*Helicobacter pylori*), γεγονός που υποδηλώνει ότι η κατανάλωση αλκοόλ μπορεί να διευκολύνει την εξάλειψη της χρόνιας αυτής λοίμωξης ^[53].

4.1.3 Νεφρά και ουροποιητικό σύστημα

Το αλκοόλ αφυδατώνει ολόκληρο το σώμα (εκτός από τον εγκέφαλο, ο οποίος διογκώνεται) μέσω διουρητικής επίδρασης στα νεφρά ^[54]. Γι' αυτό το λόγο πρέπει να καταναλώνεται μεγάλη ποσότητα νερού μετά την κατανάλωση αλκοόλ.

Η μπύρα είναι πιο διουρητική από το νερό, με το περιεχόμενό της σε οργανικά οξέα, προϊόντα ζύμωσης και σε πολυφαινόλες να διαδραματίζει σημαντικό

ρόλο στη διουρητικότητα ^[55]. Ως εκ τούτου, η κατανάλωση κάποιων ζύθων μπορεί να επιφέρει πρόβλημα στους πάσχοντες από ουρική αρθρίτιδα λόγω του περιεχομένου τους σε πουρίνες ^[56].

Από την άλλη πλευρά, η μπύρα είναι ανώτερη από το νερό στην έκπλυση των νεφρών προστατεύοντάς τα έτσι από την παρουσία λίθων. Έχει αναφερθεί ότι κάθε φιάλη μπύρας που καταναλώνεται ανά ημέρα μειώνει τον κίνδυνο της εμφάνισης πέτρας στα νεφρά κατά 40% ^[57].

4.1.4 Νόσος Αλτσχάιμερ

Η νόσος του Αλτσχάιμερ είναι η πιο κοινή αιτία θανάτου άνοιας των ηλικιωμένων και η τέταρτη σε σειρά αιτία θανάτου στις ανεπτυγμένες χώρες ^[58]. Τα αίτια της νόσου του Alzheimer είναι άγνωστα, αλλά είναι σαφές ότι οι περιβαλλοντικοί παράγοντες σε συνδυασμό με μια γενετική προδιάθεση είναι πιθανόν να παίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση αυτής της διαταραχής.

Η κατανάλωση της μπύρας, σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, έχει συσχετισθεί με την πρόληψη της νόσου του Αλτσχάιμερ λόγω της παρουσίας πυριτίου (Si) στη μπύρα. Η πρόσληψη πυριτίου (Si) έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει τη βιοδιαθεσιμότητα του αργιλίου στον ανθρώπινο οργανισμό. Το αργίλιο που αποτελεί νευροτοξίνη, θεωρείται ένας πιθανός παράγοντας που συμβάλει στην ανάπτυξη της νόσου αυτής. Το πυρίτιο (Si) είναι σε θέση να μειώσει την πρόσληψη Al από το πεπτικό σύστημα και ως εκ τούτου να επιβραδύνει τη συσσώρευσή του στον εγκέφαλο.

Επομένως, η μπύρα, λόγω της περιεκτικότητάς της σε πυρίτιο πιθανώς παρέχει πρόληψη έναντι της νόσου του Alzheimer, άρα η κατανάλωσή της με μέτρο θα μπορούσε να συμπεριληφθεί στις διατροφικές συνήθειες του πληθυσμού ^[59].

4.1.5 Καρκίνος

Έρευνες δείχνουν ότι η μόνο η μεγάλη κατανάλωση αλκοόλ μπορεί να αποτελέσει πιθανή αιτία καρκίνου. Μια έρευνα της Επιτροπής Υγείας και Διατροφής της Εθνικής Ακαδημίας των Επιστημών προειδοποιεί για την υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ και όχι για την αποφυγή του. Η βιβλιογραφία

είναι αντιφατική ως προς τη σχέση μεταξύ της κατανάλωσης αλκοόλ και του καρκίνου, με πολλές έρευνες να υποστηρίζουν ότι η κατανάλωση αλκοόλ μπορεί να μειώσει πραγματικά τις πιθανότητες εμφάνισης ορισμένων μορφών καρκίνου. Ορισμένες ουσίες που βρίσκονται στη μπύρα θα μπορούσαν να θεωρηθούν ως εν δυνάμει αντικαρκινικά. Οι πολυφαινολικές ενώσεις οι οποίες βρίσκονται στο λυκίσκο και κατά συνέπεια στη μπύρα προσδίδουν χημειοπροληπτικές ιδιότητες αναστέλλοντας το κυτόχρωμα P450 ^[60]. Οι ενώσεις αυτές είναι η ξανθοχουμόλη, η 8-φαινυλαργινίνη και η ισοξανθοχουμόλη. Έχει βρεθεί ότι τα πρενυλιωμένα φλαβονοειδή αναστέλλουν τον *in vitro* πολλαπλασιασμό ενός φάσματος καρκινικών κυττάρων ^[61]. Εκχυλίσματα λυκίσκου σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις αναστέλλουν αποτελεσματικά καρκινικά κύτταρα του μαστού ^[62]. Η 8-φαινυλαργινίνη αναστέλλει τα ένζυμα τα οποία εμπλέκονται στην ανάπτυξη του καρκίνου του προστάτη και επίσης εμποδίζει την ανάπτυξη νέων αιμοφόρων αγγείων τα οποία απαιτούνται για την ανάπτυξη του όγκου ^[63]. Η ξανθοχουμόλη και η ισοξανθοχουμόλη αναστέλλουν τη μεταλαξιογόνο επίδραση των ετεροκυκλικών αμινών ^[64].

4.1.6 Άλλες επιπτώσεις της μπύρας στην υγεία

Υπάρχουν στοιχεία που αποδεικνύουν ότι μέτρια κατανάλωση αλκοόλ σχετίζεται με καλύτερη εγκεφαλική λειτουργία σε μεγάλη ηλικία ^[65]. Κατανάλωση μπύρας με μέτρο μειώνει τις πιθανότητες ενάντια στην ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς κηλίδας ^[66]. Επίσης, λέγεται ότι η μπύρα σχετίζεται με την υψηλή αρτηριακή πίεση ^[67]. Η κατανάλωση μπύρας σχετίζεται με τη μείωση του κινδύνου νεφρολιθίασης. Οι μπύρες, επίσης, περιέχουν σημαντικά επίπεδα ζάχαρης και χαμηλό pH ως εκ τούτου έχουν επιβλαβείς επιπτώσεις στα δόντια ^[68].

4.2 Αντιοξειδωτική δράση μπύρας

4.2.1 Ελεύθερες ρίζες – Οξειδωτικό στρες

Ως οξειδωτικό στρες χαρακτηρίζεται η ανισορροπία μεταξύ της παραγωγής ελευθέρων ριζών και δραστικών μεταβολιτών, που ονομάζονται οξειδωτικοί παράγοντες ή δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) και της αδρανοποίησης/απομάκρυνσής τους από προστατευτικούς

μηχανισμούς, που ονομάζονται αντιοξειδωτικοί. Η ανισορροπία αυτή οδηγεί στην καταστροφή σημαντικών βιομορίων και κυττάρων μεταβάλλοντας έτσι την ομοιόσταση του οργανισμού με αποτέλεσμα την ανάπτυξη ασθενειών. Οι ROS παράγονται κατά τον φυσικό κυτταρικό μεταβολισμό και διαδραματίζουν ζωτικό ρόλο στη διέγερση σηματοδοτικών οδών σε φυτικά και ζωικά κύτταρα, ως απάντηση σε αλλαγές στις ενδο- και εξω- κυτταρικές συνθήκες [69].

Οι περισσότερες από τις ROS παράγονται στα κύτταρα μέσω της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας, όπου τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται στον τελικό τους αποδέκτη, το μοριακό οξυγόνο, μέσω αναπνευστικών συγκροτημάτων που βρίσκονται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Κατά τη διάρκεια ενδογενών μεταβολικών αντιδράσεων, τα αερόβια κύτταρα παράγουν ROS (O_2^- , H_2O_2 , OH^\bullet) ως φυσιολογικά προϊόντα της βιολογικής αναγωγής του μοριακού οξυγόνου, σε ποσοστό 1- 5% του ολικού οξυγόνου. Σε συνθήκες υποξίας από τη μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα μπορούν επίσης να παραχθούν οξειδία του αζώτου (NO), τα οποία προκαλούν την παραγωγή δραστικών ενώσεων αζώτου (Reactive Nitrogen Species, RNS) [70].

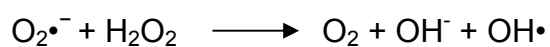
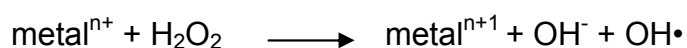
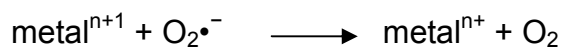
Όπως αναφέρθηκε, οι ελεύθερες ρίζες ROS και RNS προκαλούν οξειδωση, δηλαδή αύξηση του θετικού φορτίου ενός στοιχείου ως αποτέλεσμα αποβολής ηλεκτρονίων σε μόρια γειτονικών κυττάρων, με συνέπεια να προκαλούνται σοβαρές βλάβες ή ακόμα και θάνατος αυτών των κυττάρων. Το οξειδωτικό στρες προκαλεί οξειδωτικές αλλαγές στα βιολογικά μακρομόρια, όπως υδατάνθρακες, λιπίδια, πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα (DNA/RNA) και διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη γήρανση και στις εκφυλιστικές ασθένειες. Με σκοπό να αντιμετωπίσει την περίσσεια των ελευθέρων ριζών που παράγονται λόγω του οξειδωτικού στρες, το ανθρώπινο σώμα έχει δημιουργήσει έναν εξειδικευμένο μηχανισμό για τη διατήρηση της οξειδοαναγωγικής του ομοιόστασης. Αυτός ο ενδογενής μηχανισμός περιλαμβάνει δέσμευση ή σταθεροποίηση των ROS, παρεμπόδιση του σχηματισμού τους, δημιουργία χηλικών συμπλόκων καθώς και ενζυμική και μη ενζυμική αντιοξειδωτική άμυνα μέσω συστατικών που παράγονται στο σώμα (υπεροξειδική δισμουτάση, καταλάση, ουρικό οξύ, πρωτεΐνες του πλάσματος).

Πηγή προέλευσης των τοξικών και δραστικών ελευθέρων ριζών στον οργανισμό δεν αποτελεί μόνο το μιτοχονδριακό σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων του αερόβιου μεταβολισμού, αλλά και ένα σύνολο άλλων ενδογενών και εξωγενών παραγόντων. Η ενζυμική δράση οξειδασών, οι φλεγμονές, ο μεταβολισμός του κυτοχρώματος P450, τα υπεροξειδισώματα, η αυτοοξειδωση ορισμένων υποστρωμάτων αποτελούν τους ενδογενείς παράγοντες, ενώ η υπεριώδης ακτινοβολία, οι ακτίνες X, οι ακτίνες γ, η υψηλή θερμιδική δίαιτα, η ρύπανση της ατμόσφαιρας και το κάπνισμα τους εξωγενείς [71].

Μεταλλικά ιόντα όπως τα ιόντα Fe (II), Cu, Cr (III), Cr (V) και Cr (IV), Co (II), Ni(II) και V(IV), παράγουν ενδοκυτταρικά δραστικές ελεύθερες ρίζες αν και η δραστικότητά τους διαφέρει. Οι αντιδράσεις τύπου Fenton είναι ένας από τους επικρατέστερους μηχανισμούς που πραγματοποιούνται. Ένα μεταλλικό ιόν αντιδρά με το H₂O₂ προς παραγωγή της ιδιαίτερα τοξικής ρίζας υδροξυλίου:

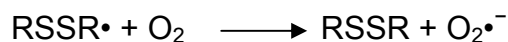


Ένας άλλος κοινός μηχανισμός παραγωγής ROS είναι οι αντιδράσεις Haber-Weiss, κατά τις οποίες το O₂^{•-} συμμετέχει στην παραγωγή ριζών OH• και στην αναγωγή του Fe(III) οδηγώντας στις αντιδράσεις Fenton.



Οι αντιδράσεις Haber-Weiss περιλαμβάνουν μεταλλικά ιόντα όπως τα ιόντα Cr (III), Cr (IV), Cr (V) και Cr (VI), V (IV), Co (I) και Co (II). Ο μηχανισμός Haber-Weiss είναι πιθανό να επικρατεί έναντι του μηχανισμού Fenton στους ζωντανούς οργανισμούς, λόγω της παραγωγής ROS από τη λειτουργία των μακροφάγων κατά τη διεργασία της φαγοκύτωσης. Εκτός από τις αντιδράσεις Fenton και Haber-Weiss, ορισμένα μεταλλικά ιόντα μπορούν να παράγουν κυτταρικές ελεύθερες ρίζες, μέσω ενός άμεσου μηχανισμού με κυτταρικά μόρια. Η αντίδραση του Cr (VI) με την κυστεΐνη ή την πενικιλλαμίνη παράγει

σουλφυδριλικές ρίζες, οι οποίες εν συνεχεία αντιδρούν με άλλα μόρια προς παραγωγή $O_2^{\bullet-}$:



Η διερεύνηση της αντιοξειδωτικής δράσης που επιδεικνύουν διάφορες ενώσεις αλλά και της δυνατότητας δέσμευσης των ελεύθερων μετάλλων από τις οργανικές ουσίες που περιέχουν οι μπίρες, αποτελούν αντικείμενο πολλών μελετών, που στοχεύουν στην ακριβή κατανόηση των μηχανισμών με τους οποίους δρουν οι ουσίες αυτές ^[72].

4.2.2 Αντιοξειδωτική δράση και μπίρα

Τα αντιοξειδωτικά της μπίρας προέρχονται κυρίως από δύο φυσικά συστατικά που χρησιμοποιούνται στη ζυθοποιία: το κριθάρι και τον λυκίσκο. Η αντιοξειδωτική δράση της μπίρας ωστόσο πιθανώς να εξαρτάται από το αντιοξειδωτικό περιεχόμενο των συστατικών και τις μεταβολές τους κατά τη διάρκεια της ζυθοποίησης, τη θερμοκρασία και το pH κατά την πολτοποίηση και κατά το βρασμό και την ποικιλία των λυκίσκων που προστίθενται κατά το βρασμό του ζυθόγλευκος και της ζύμωσης. Οι κυριότερες αντιοξειδωτικές ενώσεις που περιέχονται στη μπίρα είναι οι φαινολικές ενώσεις και ουσίες που σχηματίζονται κατά την αντίδραση Maillard. Επιπλέον κάποια πρόσθετα, όπως για παράδειγμα η βιταμίνη C, που χρησιμοποιούνται στη μπίρα μπορεί επίσης να συνεισφέρουν στην αντιοξειδωτική της ικανότητα.

4.2.2.1 Φαινολικά συστατικά

Οι πολυφαινόλες αποτελούν μια ομάδα ουσιών που περιέχονται σε φυτικές τροφές, με περισσότερες από 8000 γνωστές ενώσεις. Είναι προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών και ταξινομούνται, ανάλογα με τη χημική τους δομή σε διαφορετικές ομάδες, όπως φλαβονοειδή, στιλβένια, υδροξυβενζοϊκά οξέα, υδροξυκινναμικά οξέα, προανθοκυανιδίνες και τανίνες.

Οι περισσότερες από τις πολυφαινόλες που βρίσκονται στη μπίρα προέρχονται από το κριθάρι. Η περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες ποικίλει από

3 έως 6% και εξαρτάται από την ποικιλία, την προέλευση και τη φρεσκάδα του λυκίσκου, τη διαδικασία συγκομιδής και τον τρόπο συσκευασίας του λυκίσκου.

Οι φαινολικές ενώσεις που προέρχονται από το κριθάρι περιλαμβάνουν τα φαινολικά οξέα που προέρχονται από την τυροσίνη και την τυραμίνη, τους εστέρες τους, τις ανθοκυανίνες, προανθοκυανίνες, τις λιγνάνες και ουσίες που σχετίζονται με τη λιγνίνη ^[73]. Οι φαινολικές ενώσεις βρίσκονται κυρίως στα εξωτερικά στρώματα του κόκκου ^[74]. Το φερουλικό οξύ είναι το κυρίαρχο ελεύθερο φαινολικό οξύ στους σπόρους κριθαριού. Οι προανθοκυανιδίνες που προέρχονται από το κριθάρι εμπλέκονται στη θολερότητα της μπίρας ^[76]. Αυτές οι ενώσεις βρίσκονται στο κέλυφος του κόκκου και αποτελούν μίγμα προδελφινιδίνων και προκυανιδίνων ^[75]. Εκτός από τις φαινολικές ενώσεις που υπάρχουν στις πρώτες ύλες, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η τελική περιεκτικότητα της μπίρας σε φαινολικές ενώσεις μπορεί επίσης να επηρεαστεί από την επεξεργασία.

Τα πιο άφθονα φαινολικά οξέα στη μπίρα είναι το γαλλικό οξύ, το φερουλικό οξύ και συριγγικό οξύ. Μερικές από αυτές τις ενώσεις εντοπίζονται στη μπίρα κυρίως σε ελεύθερη μορφή, ενώ άλλες είναι κυρίως σε συζευγμένη μορφή ^[76]. Η μπίρα περιέχει επίσης φαινολικές ενώσεις από την ομάδα των φλαβονοειδών όπως είναι η κατεχίνη, η επικατεχίνη και η κερκετίνη, οι οποίες προέρχονται από τα εξωτερικά στρώματα της βύνης και του λυκίσκου ^[77].

Αξίζει να σημειωθεί ότι *in vitro* μελέτες έχουν δείξει ότι οι πολυφαινόλες έχουν σημαντικές αντιοξειδωτικές ικανότητες, καλύτερες και από εκείνες άλλων γνωστών φυσικών αντιοξειδωτικών όπως η βιταμίνη C και η βιταμίνη E ^[78].

Διαφορετικές δοκιμασίες έχουν δείξει ότι τα φλαβονοειδή που υπάρχουν στη μπίρα, όπως η κατεχίνη, η επικατεχίνη και η κερκετίνη, εμφανίζουν επίσης σημαντική αντιοξειδωτική ικανότητα ^[79].

4.2.2.2 Ενώσεις Maillard

Η αντίδραση Maillard είναι μία από τις πιο κοινές διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα στα προϊόντα τροφίμων. Όσο αναφορά τη μπύρα, οι ενώσεις Maillard αρχικά παράγονται κατά τη διαδικασία της πολτοποίησης και στη συνέχεια κατά την εξαγωγή και τις διαδικασίες βρασμού. Οι ενώσεις αυτές και οι ιδιαίτερα οι μελανοειδείς επηρεάζουν το χρώμα, το άρωμα και τη γεύση χαρακτηρίζοντας κάποιους ιδιαίτερους τύπους μπύρας και φυσικά επηρεάζουν επιπλέον την αντιοξειδωτική ικανότητα της μπύρας^[80]. Οι μαύρες μπύρες χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε αυτές τις ενώσεις από ό,τι οι lager ή οι μπύρες χωρίς αλκοόλ^[81].

4.2.2.3 Πρόσθετα στις μπύρες που έχουν αντιοξειδωτικές ικανότητες

Το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) είναι ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό στις μπύρες, το οποίο προστατεύει το χρώμα και τις αλλοιώσεις του αρώματος και της γεύσης, παρατείνοντας τη διάρκεια ζωής τους στα εμφιαλωμένα μπουκάλια. Συνήθως προστίθενται στη μπύρα περίπου 30 έως 50 mg ασκορβικού οξέος^[82]. Το ασκορβικό οξύ είναι μια υδρόφιλη ένωση η οποία δεσμεύει τις υπεροξυλικές ρίζες και μειώνει την κυττοτοξικότητα που οφείλεται σε οξειδωτικούς παράγοντες. Μπορεί επίσης να εμποδίσει ή να μειώσει τη λιπιδική υπεροξειδωση που προκαλείται από H_2O_2 και το σχηματισμό OH-δεοξυγουανοσίνης, τα οποία λαμβάνουν χώρα ως αποτέλεσμα της οξειδωσης του DNA^[83].

Το θειώδες είναι ακόμη ένα συντηρητικό που χρησιμοποιείται σε τρόφιμα για την πρόληψη της δραστηριότητας του ενζύμου που προκαλεί την αμαύρωση και επίσης αναστέλλει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών κατά την αποθήκευση. Οι ενώσεις του θείου όπως η κυστεΐνη, η γλουταθειόνη και οι δισουλφιδικές γέφυρες σε πεπτίδια και πρωτεΐνες, οι οποίες βρίσκονται στις πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται κατά τη διαδικασία παρασκευής της μπύρας, μπορεί να οξειδωθούν σε θειώδη άλατα. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) είναι γνωστό ότι απενεργοποιούνται από τις θειώδες για το σχηματισμό δισουλφιδίων. Η οξειδωση των θειολών από ROS χρησιμεύει ως ένα αντιοξειδωτικό αμυντικό σύστημα^[84]. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια έχει

γίνει κατανοητό ότι το θειώδες μπορεί να προκαλέσει ανεπιθύμητες αντιδράσεις σε ευαίσθητα ασθματικά άτομα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΜΕΤΑΛΛΑ

5.1 Ορισμός και ιδιότητες των μετάλλων

Τα χημικά στοιχεία διακρίνονται σε μέταλλα (περίπου 70 τον αριθμό) και σε αμέταλλα (περίπου 30). Αυτή η διάκριση βασίζεται στη διαφοροποίηση των στοιχείων ως προς τις χημικές και φυσικές τους ιδιότητες. Έτσι μέταλλο λέγεται κάθε υλικό, που λαμβάνεται από τα διάφορα μεταλλεύματα με τη χρήση διαφόρων μεταλλουργικών μεθόδων, σχηματίζει μεταλλικό δεσμό και κατά κανόνα εμφανίζει τις παρακάτω ιδιότητες ^[85]:

- Βρίσκεται σε στερεά κατάσταση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, εκτός από τον υδράργυρο που είναι υγρός
- Έχει χαρακτηριστική μεταλλική λάμψη
- Παρουσιάζει αργυρό χρωματισμό, εκτός από το χαλκό (ερυθρός) και χρυσό (κίτρινος)
- Έχει σχετικά υψηλή πυκνότητα
- Έχει σχετικά υψηλό σημείο τήξεως
- Εμφανίζει υψηλή θερμική αγωγιμότητα και υψηλή ηλεκτρική αγωγιμότητα
- Διαθέτει πλαστικότητα, δηλαδή είναι δυνατόν να μορφοποιηθεί εν ψυχρώ. Τα μέταλλα είναι ελατά και όλκιμα.
- Έχει κρυσταλλική δομή

Η ταξινόμηση των μετάλλων μπορεί να γίνει λαμβάνοντας υπόψη διάφορους παράγοντες όπως το μέγεθος των μορφών τους και τη χημική συγγενειά τους με διάφορους υποκαταστάτες ^[86].

5.2 Ταξινόμηση μετάλλων με βάση το μέγεθος των ενώσεών τους

Μέταλλα σε αιωρούμενη, σωματιδιακή φάση

Στην κατηγορία αυτή ανήκουν μέταλλα με μέγεθος ενώσεων μεγαλύτερο από 0,45 μm. Η σωματιδιακή ύλη μπορεί να περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις μετάλλων κυρίως χαλκού και σιδήρου. Τα μέταλλα αυτά σχηματίζουν διάφορα

σύμπλοκα και ένυδρα υδροξείδια με τα σωματίδια ή προσροφώνται στην επιφάνειά τους.

Μέταλλα σε διαλυτή φάση

- Κolloειδή μέταλλα: στα κolloειδή ανήκουν οι μορφές των μετάλλων με μέγεθος από nm έως 0.2- 1 μm. Πρόκειται για μια σημαντική κατηγορία, αφού τα κolloειδή συμμετέχουν στο βιογεωχημικό κύκλο των μετάλλων και του άνθρακα. Λόγω της μεγάλης τους επιφάνειας τα κolloειδή παρουσιάζουν αυξημένη προσροφητική ικανότητα και με αυτόν τον τρόπο ρυθμίζουν την κατανομή των στοιχείων μεταξύ διαλυτής και σωματιδιακής φάσης. Τα κolloειδή αποτελούνται κυρίως από μεγάλα οργανικά μόρια και συγκριτικά με τα αιωρούμενα σωματίδια διαθέτουν πολύ περισσότερες θέσεις σύμπλεξης ανά μονάδα μάζας.
- «Αληθώς» διαλυτά μέταλλα: Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι μορφές των μετάλλων με μέγεθος μικρότερο από nm. Ο διαχωρισμός τους από τα κolloειδή γίνεται με διάφορες μεθόδους. Κυρίως χρησιμοποιείται η τεχνική της υπερδιήθησης και της διαπήδησης, ενώ σπανιότερα χρησιμοποιείται η χρωματογραφία^[87].

5.3 Ταξινόμηση μετάλλων με βάση τη χημική τους συγγένεια με διάφορους υποκαταστάτες

Μεταλλικά ιόντα τύπου A («σκληρά» ιόντα)

Τα μέταλλα αυτού του τύπου σχηματίζουν πιο σταθερά σύμπλοκα με υποκαταστάτες που περιέχουν τα «σκληρά» άτομα-δότες N, O και P σε σχέση με εκείνους που περιέχουν τα «μαλακά» άτομα P, S και O. Εμφανίζονται ως υψηλά θετικά φορτισμένα ιόντα και έχουν μικρές ακτίνες. Η χημική τους συγγένεια με άτομα δότες διαφόρων υποκαταστατών ακολουθεί τη σειρά: F>O>P,N-Cl>Br>I>S.

Μεταλλικά ιόντα τύπου B («μαλακά» ιόντα)

Τα «μαλακά» ιόντα συνήθως έχουν ένα μεγάλο αριθμό ηλεκτρονίων στην εξωτερική τους στοιβάδα και κατά συνέπεια, σχηματίζουν κυρίως

ομοιοπολικούς δεσμούς. Η χημική τους συγγένεια με άτομα δότες διαφόρων υποκαταστατών εμφανίζει αντίστροφη σειρά συγκριτικά με τα «σκληρά» ιόντα: $F < O < P < N < Cl < Br < I < S$. Τα ιόντα αυτού του τύπου, με εξαίρεση ορισμένα όπως ο ψευδάργυρος, έχουν σημαντικούς βιολογικούς ρόλους και έτσι οι οργανισμοί διαθέτουν μηχανισμούς ώστε να τα διατηρούν σε ασφαλή επίπεδα.

Μεταλλικά ιόντα ενδιάμεσου τύπου

Τα μέταλλα αυτής της κατηγορίας εμφανίζουν συμπεριφορά ενδιάμεση των τύπων Α και Β. Πολλά από αυτά είναι απαραίτητα στους οργανισμούς σε μικροποσότητες, αφού λαμβάνουν μέρος σε διάφορες βιοχημικές διεργασίες. Σε υψηλές όμως συγκεντρώσεις μπορεί να εμφανίσουν τοξικότητα ^[88].

5.4 Χαλκός

Το χημικό στοιχείο Χαλκός (Cuprum) (εικόνα 5.1) είναι μέταλλο με ατομικό αριθμό 29 και ατομικό βάρος 63,546. Έχει θερμοκρασία τήξης 1084,6 °C και θερμοκρασία βρασμού 2567 °C. Το σύμβολό του είναι Cu. Έχει κοκκινωπό χρώμα και είναι όλκιμος και ελατός ^[89]. Λόγω της ιδιότητάς του όταν είναι τηγμένος να απορροφά ατμοσφαιρικό αέρα, τον οποίο αποβάλλει ψυχόμενος, δεν μπορούν να κατασκευασθούν χυτά αντικείμενα από χαλκό. Δεν εμφανίζει σχιστότητα, ενώ έχει ανώμαλη θραύση. Είναι τελείως αδιαφανής, ακόμη και σε λεπτά ελάσματα. Δεν εμφανίζει μαγνητικές ιδιότητες. Σε επαφή με άλλα μέταλλα εμφανίζει διαφορά δυναμικού (φαινόμενο Galvani). Ανήκει στην ομάδα της 1^{ης} κύριας σειράς των στοιχείων ^[90].

Σύμφωνα με τους αρχαιολόγους ο χαλκός είναι το πρώτο από τα μέταλλα που χρησιμοποίησε ο άνθρωπος για την κατασκευή σκευών, εργαλείων και όπλων. Εκτιμάται ότι ο χαλκός έγινε γνωστός περίπου το 9.000 π.Χ., πιθανόν επειδή απαντάται ως αυτοφυής και δεν απαιτεί μεταλλουργική διαδικασία για την παρασκευή του σε καθαρή μορφή. Η χρήση καθαρού χαλκού ήταν γνωστή στη Μικρά Ασία από το 6.500 π.Χ. ενώ από τα μέσα της 4^{ης} χιλιετίας άρχισε να αναπτύσσεται η μεταλλουργία που προκάλεσε και την αστικοποίηση της Μεσοποταμίας. Περί το 3.000 π.Χ. η χρήση χαλκού ήταν πλήρως διαδεδομένη στην Εγγύς Ανατολή. Η χρήση του ορείχαλκου ήταν

ευρύτερα διαδεδομένη στη 2^η χιλιετία μέχρι την 1^η όπου ακολούθησε η ευρύτερη χρήση του σιδήρου ^[91].

Ανευρίσκεται αυτοφυής στη φύση, ωστόσο σήμερα τα κοιτάσματα αυτοφυούς χαλκού είναι είτε περιορισμένα είτε μη οικονομικά εκμεταλλεύσιμα, όπως το αποκαλούμενο “Disseminated Copper Ore” στην Μοντάνα και άλλες Πολιτείες των ΗΠΑ.

Κυριότερα ορυκτά του χαλκού είναι ο Χαλκοπυρίτης (Cu_2S), ο χαλκοσίνης, ο βορνίτης, ο κυπρίτης, ο μαλαχίτης, και ο αζουρίτης (τα δύο τελευταία είναι ημιπολύτιμοι λίθοι). Στα κράματα του ανήκει ο ορείχαλκος και ο μπρούτζος, που χρησιμοποιούνται σε ποικίλες κατασκευές, όπως εργαλεία, όπλα, αμαλγάματα, διακοσμητικά σκεύη, όργανα μέτρησης και μουσικά όργανα. Ο χαλκός εμφανίζει δύο αριθμούς οξειδωσης (+1 και +2). Δεν είναι ιδιαίτερα δραστικό μέταλλο γι’ αυτό και δεν αντιδρά εύκολα με άλλα στοιχεία ούτε χρησιμοποιείται ευρέως ως αναγωγικό. Στον ατμοσφαιρικό αέρα καλύπτεται αρχικά από το οξείδιό του, το οποίο με το διοξείδιο του άνθρακα μετατρέπεται σε ανθρακικό χαλκό, προσδίδοντας πρασινωπό χρώμα (πατίνα). Αντιδρά με οξυγόνο, θείο και αλογόνα προς τις αντίστοιχες ενώσεις. Δεν προσβάλλεται από αραιά οξέα ούτε από πυκνό θειικό οξύ, αλλά από το νιτρικό οξύ (HNO_3) ^[92].



Εικόνα 5.1 : Χαλκός

(Πηγή : <http://www.hellenica.de/Physik/Chalkos.html>)

5.4.1 Βιολογική σημασία χαλκού

Ο χαλκός είναι απαραίτητο ιχνοστοιχείο, τόσο στα ζώα όσο και στα φυτά. Ανευρίσκεται σε ποικιλία ενζύμων, όπως η υπεροξειδάση του κυτοχρώματος C και η υπεροξυ-δισμουτάση. Ορισμένα μαλάκια και αρθρόποδα έχουν ως μεταφορική ουσία των αναπνευστικών αερίων την αιμοκυανίνη (αντί της αιμοσφαιρίνης), η οποία περιέχει χαλκό. Στα ανώτερα ζώα έχει διαπιστωθεί ότι η παρουσία χαλκού διευκολύνει την απορρόφηση σιδήρου από τον οργανισμό. Η υπερβολική απόθεση χαλκού στους ιστούς προκαλεί τη νόσο του Wilson, ενώ χρόνια έλλειψη χαλκού προκαλεί δυσλειτουργία στη σύνθεση ντοπαμίνης με συνέπεια την εμφάνιση κατάθλιψης, στη σύνθεση μελανίνης από τα δερματικά κύτταρα καθώς και δυσλειτουργίες στο μεταβολισμό των λιπών και των τριγλυκεριδίων ^[93]. Ο χαλκός μεταπίπτει στον ανθρώπινο ή ζωικό οργανισμό μεταξύ των μορφών του μονοσθενούς χαλκού (Cu^{+1}) και στην πλειοψηφία του δισθενούς χαλκού (Cu^{+2}). Ο χαλκός έχει τη δυνατότητα να παίρνει και να δίνει εύκολα ηλεκτρόνια και αυτό εξηγεί και το σημαντικό ρόλο του στις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις και τη δέσμευση των ελευθέρων ριζών. Ανευρίσκεται στο κρέας, στα καρύδια, τα οστρακόδερμα, τα λαχανικά και στους σπόρους (άλευρα ολικής άλεσης) ^[94].

Παγκοσμίως παράγονται περίπου 15,6 εκατ. τόνοι το χρόνο. Οι κυριότερες χώρες παραγωγού είναι η Χιλή, το Περού, οι ΗΠΑ, η Κίνα, η Αυστραλία, η Ρωσία και ο Καναδάς ^[95].

Τα βασικά χαρακτηριστικά του χαλκού παρατίθενται στον Πίνακα 5.1 που ακολουθεί.

Πίνακας 5.1 Βασικά χαρακτηριστικά χαλκού

Χημικό σύμβολο	Cu
Ατομικός αριθμός	29
Χημική ομάδα	Στοιχείο μετάπτωσης
Πυκνότητα	8.96 g cm ⁻³
Χρώμα	Κοκκινωπό

Σημείο τήξης	1084.62 °C
Σημείο βρασμού	2562 °C
Θερμότητα εξάτμισης	300.4 kJ mol ⁻¹
Θερμότητα τήξης	13.26 kJ mol ⁻¹
Μοριακή θερμοχωρητικότητα	24.440 J mol ⁻¹ K ⁻¹
Ηλεκτρική αγωγιμότητα	16.78 nΩ m
Θερμική αγωγιμότητα	401 W m ⁻¹ K ⁻¹

(Πηγή : <http://en.wikipedia.org/wiki/Copper>)

5.5 Τοξικότητα μετάλλων

5.5.1 Ορισμός και γενικά χαρακτηριστικά

Τοξικότητα είναι η ικανότητα μιας ουσίας –εν προκειμένω των μετάλλων- να επηρεάζει τις ζωτικές λειτουργίες ενός βιολογικού συστήματος ή ενός ζωντανού οργανισμού. Με βάση το ρόλο τους στους ζωντανούς οργανισμούς τα διάφορα στοιχεία ταξινομούνται στα:

- Στοιχεία βιοχημικώς χρήσιμα (H, B, C, N, O, F, Na, Mg, Si, P, S, CL, K, Ca, V, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Br, I)
- Στοιχεία με πιθανή βιοχημική σημασία (Al, Ti, As, Sn, Pb, Cd)
- Στοιχεία πιθανώς μη βιοχημικώς χρήσιμα (He, Li, Be, Ne, Ar, Sc, Cr, Ga, Ge, Se, Kr, Rb, Sr, Y, Ir, Pt, Au, Hg, Tl, Bi, Po, At, R, Fr, Ac, Th, Pa, U)

Αρκετά μέταλλα θεωρούνται απαραίτητα στους ζώντες οργανισμούς λόγω του οξειδοαναγωγικού ρόλου που διαδραματίζουν σε πολλές ενζυμικές πρωτεΐνες ή/και της συμμετοχής τους ως δομικών συστατικών ή ρυθμιστών της όσμωσης ηλεκτρολυτών. Άλλα είναι απαραίτητα σε μεγάλες ποσότητες, όπως π.χ. το νάτριο και το ασβέστιο, ενώ άλλα σε μικρότερες ποσότητες π.χ. σίδηρος, χαλκός και ψευδάργυρος, διότι σε αυξημένες συγκεντρώσεις ασκούν τοξική επίδραση στους οργανισμούς. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν και τα πολύ τοξικά μέταλλα, όπως ο υδράργυρος, ο μόλυβδος, το κάδμιο, το

χρώμιο κ.α. που είναι επιβλαβή για τον άνθρωπο και σχεδόν για όλους τους οργανισμούς, ακόμη και όταν βρίσκονται σε ίχνη της τάξης του εκατομμυριοστού του γραμμαρίου ^[96].

5.5.2 Μηχανισμοί τοξικής δράσης μετάλλων και επίδρασή τους στον οργανισμό

Η τοξική δράση των μετάλλων στους οργανισμούς οφείλεται στην:

- Απενεργοποίηση των απαραίτητων βιολογικών λειτουργικών ομάδων των βιομορίων
- Αντικατάσταση των απαραίτητων ιχνοστοιχείων στα βιομόρια από άλλα
- Τροποποίηση της ενεργού διαμόρφωσης των βιομορίων

Βιοχημικά, ο κυριότερος μηχανισμός της τοξικής δράσης τους οφείλεται στην ισχυρή συγγένεια των μεταλλοκατιόντων με το θείο. Έτσι, οι σουλφυδρυλικές ομάδες (-SH), οι οποίες συχνά εμφανίζονται στα ένζυμα, που ελέγχουν την ταχύτητα των κρίσιμων μεταβολικών αντιδράσεων στο ανθρώπινο σώμα, ενώνονται εύκολα με τα κατιόντα των βαρέων μετάλλων που προσλήφθηκαν με την τροφή ή με τα μόρια που περιέχουν μέταλλα. Συνακόλουθα, ο δεσμός μετάλλου-θείου που προκύπτει επηρεάζει το ένζυμο και τη λειτουργία του, με αποτέλεσμα ο ανθρώπινος οργανισμός να προσβάλλεται μερικές φορές θανατηφόρα. Ακόμη, υπάρχουν ενδείξεις ότι ορισμένα μέταλλα, ικανά να συμμετέχουν σε οξειδοαναγωγικούς κύκλους (πχ. Cu , Fe) στο εσωτερικό των κυττάρων, είναι δυνατό να προκαλέσουν τοξική επίδραση, όχι μόνο μέσω τυχαίας σύνδεσής τους, αλλά επιπλέον μέσω της παραγωγής ελευθέρων ριζών ενεργού οξυγόνου και υπεροξειδικών ριζών φτάνοντας μέχρι και στην παρεμβολή του μετάλλου σε διαδικασίες μεταγραφής του DNA και την πρόκληση γενετικών ανωμαλιών ^[97]. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την τοξικότητα των ιχνοστοιχείων στους οργανισμούς είναι:

- Η χημική μορφή του μετάλλου
- Η παρουσία άλλων μετάλλων
- Οι παράγοντες που επηρεάζουν τη φυσιολογία των οργανισμών και πιθανώς τη μορφή του μετάλλου (θερμοκρασία, pH, διαλυμένο οξυγόνο, φως, αλατότητα)

- Το είδος του οργανισμού
- Η φυσιολογική κατάσταση και φάση εξέλιξης του οργανισμού (στάδιο ανάπτυξης, ηλικία, μέγεθος)
- Η φυσική κατάσταση του οργανισμού

Όσον αφορά στην τοξική τους επίδραση, ορισμένα μέταλλα προκαλούν ισχυρή τοξική επίδραση στον οργανισμό, μέσω πρόσληψης επιμολυσμένης τροφής και ιδιαίτερα νερού, ακόμη και μέσω της εισπνοής.

Άμεσα συμπτώματα είναι η τάση για εμετό, διάρροια, καρδιακή ανωμαλία, δερματικές παθήσεις, ενώ πολλά είναι θανατηφόρα σε μεγαλύτερες δόσεις. Συγκεκριμένα, εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος και δρουν με ποικίλους τρόπους, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Δύνανται να αντικαταστήσουν το ασβέστιο στον ερειστικό ιστό ή στις νευρωνικές συνάψεις, λόγω του παρόμοιου μεγέθους και φορτίου τους και έτσι είναι πιθανή η επιβράδυνση της παιδικής ανάπτυξης, καθώς και η εμφάνιση μαθησιακών δυσκολιών. Προκαλούν νεφροτοξικότητα και υπέρταση, ενώ με την εισπνοή συσσωρεύονται στους πνεύμονες. Ο μεθυλιωμένος υδράργυρος εισέρχεται μέσω της διατροφής στον ανθρώπινο οργανισμό, κυρίως μέσω της κατανάλωσης λιπαρών ψαριών και προκαλεί χρόνια ή οξεία δηλητηρίαση ή και θάνατο. Επειδή ο υδράργυρος είναι λιποδιαλυτός, τείνει να συσσωρευτεί στον εγκέφαλο με συνέπεια τη νεφρίτιδα, την κατάρρευση του κυκλοφορικού, νευρικές βλάβες και τερατογενέσεις. Οι ενώσεις του καδμίου θεωρούνται υπεύθυνες για αναπνευστικές δυσλειτουργίες και καρκινογενέσεις, ενώ μέταλλα όπως το κοβάλτιο και ο ψευδάργυρος σε υψηλότερα επίπεδα γίνονται τοξικά. Επιπλέον, το αργίλιο είναι υπεύθυνο για νευροτοξικές βλάβες και ίσως σε κάποιο βαθμό για τη νόσο Alzheimer, όταν συσσωρεύεται στον εγκέφαλο, ενώ το εξασθενές χρώμιο προκαλεί συμπτώματα χρόνιας δηλητηρίασης που είναι συνήθως αντιστρεπτά και περιλαμβάνουν αναπνευστικές και δερματικές βλάβες καθώς και καρκινογένεση έπειτα από χρόνια έκθεση σε υψηλές συγκεντρώσεις. Αποθηκεύεται κυρίως στα νεφρά και τη σπλήνα, με ίχνη ποσοτήτων του να ανιχνεύονται και στην καρδιά, τους πνεύμονες, το πάγκρεας και τον εγκέφαλο ^[98].

5.5.3 Τοξικότητα του χαλκού

Ο χαλκός και τα ιόντα του είναι σημαντικά για τα βιολογικά συστήματα, καθώς είναι απαραίτητα ως θρεπτικά συστατικά. Το εύρος συγκέντρωσης όμως εντός του οποίου η επίδρασή του στις μεταβολικές διεργασίες των οργανισμών είναι η βέλτιστη, είναι ιδιαίτερα στενό. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις είναι απαραίτητος για τους έμβιους οργανισμούς και κυρίως για τη βλάστηση και δρα ως συστατικό διαφόρων ενζύμων και ως καταλύτης οξειδοαναγωγής σε μια ποικιλία μεταβολικών οδών. Σε υψηλές συγκεντρώσεις εν τούτοις ο χαλκός αναστέλλει την ανάπτυξη και παρεμβαίνει σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες όπως η φωτοσύνθεση, η αναπνοή, η δραστηριότητα των ενζύμων, η σύνθεση των χρωστικών και των πρωτεϊνών και ο διαχωρισμός των κυττάρων. Η ευρεία εφαρμογή του χαλκού και των αλάτων του στη βιομηχανία και τη γεωργία, καθώς και η υψηλή τοξικότητά του σε υψηλότερο εύρος συγκεντρώσεων τον καθιστούν δυνητικά τοξικό ιχνοστοιχείο ^[99].

Η ωφέλιμη πρόσληψη του χαλκού εκτιμήθηκε στα 0.7 mg ανά ημέρα για τους άνδρες και 0.8 mg ανά ημέρα για τις γυναίκες όπως αυτή θεσπίστηκε από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας το 1996, με συνιστώμενα διαιτητικά επιτρεπτά όρια τα 0.9 mg ανά ημέρα για τους ενήλικες γενικά ^[100].

Ο χαλκός είναι μέταλλο ιδιαίτερου ενδιαφέροντος καθώς οι συγκεντρώσεις των ιόντων του μέσα στο εύρος, το οποίο είναι κοινό για τα φυσικά ύδατα, μπορεί να είναι τοξικές για το φυτοπλαγκτόν και τους οργανισμούς (π.χ. σε περιπτώσεις νερών ανάβλυσης). Πολλοί φυσικοί οργανικοί υποκαταστάτες στο έδαφος, το νερό και τα ιζήματα μπορούν να συμπλέξουν το χαλκό και να επηρεάσουν τη δραστηριότητά του, την παραμονή και την κινητικότητά του στο έδαφος και το νερό. Τα ιόντα του χαλκού που συνδέονται με το χουμικό υλικό συγκαταλέγονται μεταξύ των σημαντικότερων μορφών στα γλυκά και τα εκβολικά ύδατα. Στο θαλασσινό νερό ο ανταγωνισμός για αντιδράσεις με άλλα μέταλλα και υποκαταστάτες μειώνουν τη συμπλεκτική αντίδραση του χαλκού με το χουμικό υλικό. Ποσοστό μεγαλύτερο από το 99,9% του χαλκού είναι συμπλοκοποιημένο με υποκαταστάτες στις υγρές κατακρημνίσεις ^[101].

Μεταξύ των διαφόρων δισθενών μετάλλων ή μετάλλων μεταπτώσεως ο χαλκός σχηματίζει ιδιαίτερα σταθερά οργανικά σύμπλοκα. Οι αντιδράσεις συμπλοκοποίησης επηρεάζουν τη βιοδιαθεσιμότητα των ιόντων χαλκού, καθώς και τις αντιδράσεις προσρόφησής του σε σωματιδιακό υλικό. Η βιοδιαθεσιμότητα του χαλκού είναι πιθανό να ελέγχεται επίσης από την κινητική διαχωρισμού των μεταλλικών συμπλόκων. Οι συμπλεγμένες μορφές του χαλκού με υδροξύλιο ($\text{Cu}(\text{OH})^+$ και $\text{Cu}(\text{OH})_{2(\text{aq})}$) και ανόργανους υποκαταστάτες (CuHCO_3^+ , CuCO_3 , $\text{Cu}(\text{CO}_3)_2^{2-}$ και $\text{CuCl}_n^{-(n-2)}$) εμφανίζουν τοξικότητα. Τα μεταλλικά σύμπλοκα με λιπόφιλους οργανικούς υποκαταστάτες είναι ικανά να διαπεράσουν τις κυτταρικές μεμβράνες, με αποτέλεσμα την τοξική δράση τους. Ο διαχωρισμός του χαλκού μεταξύ διαλυτών και σωματιδιακών μορφών προκύπτει από τον ανταγωνισμό μεταξύ διαλυμένων υποκαταστατών και των θέσεων σύμπλεξης στα σωματίδια ^[102].

5.5.4 Μηχανισμός τοξικής δράσης του χαλκού-Τοξικοκινητική

Ο χαλκός και οι ενώσεις του εισέρχονται στον οργανισμό κυρίως μέσω του γαστρεντερικού σωλήνα και ειδικότερα του δωδεκαδακτύλου με μηχανισμό ενεργού μεταφοράς, σε μικρότερο βαθμό μέσω στομάχου και σπανιότερα μέσω του αναπνευστικού βλεννογόνου και του δέρματος σε ποσότητες που ακόμη δεν έχουν διευκρινισθεί ^[103].

Ο βαθμός απορρόφησης του χαλκού στο γαστρεντερικό σύστημα εξαρτάται κατά ένα μεγάλο μέρος από τη χημική κατάσταση καθώς και από την παρουσία άλλων ενώσεων ή στοιχείων όπως ο ψευδάργυρος, ο σίδηρος κτλ. Συγκεκριμένα, το 30-50% του προσλαμβανόμενου χαλκού που απορροφάται είναι συνήθως στη δισθενή του μορφή (Cu^{2+}) και λιγότερο στη μονοσθενή του (Cu^+). Στον ορό του αίματος ο χαλκός όταν απορροφηθεί από το έντερο, μεταφέρεται συνδεδεμένος με την αλβουμίνη και στη συνέχεια όταν ο χαλκός απελευθερώνεται από το ήπαρ μεταφέρεται στους ιστούς με την σερουλοπλασμίνη σε ποσοστό 95% ^[104]. Η σερουλοπλασμίνη είναι α2 σφαιρίνη μεγάλου μοριακού βάρους που δεσμεύεται στενά και μεταφέρει 6-8 άτομα δισθενούς χαλκού. Συντίθεται και ρυθμίζεται η συγκέντρωσή της από το ήπαρ χωρίς να αποκλείονται και άλλοι ιστοί στο σώμα που να μπορούν να τη συνθέσουν ^[105].

Οι Freedman et al. (1989) υποστηρίζουν ότι σύμφωνα με ένα μοντέλο κυτταρικού μεταβολισμού του χαλκού στο ήπαρ, το συγκεκριμένο μέταλλο συμπλοκοποιείται πρώτα με την ανηγμένη γλουταθειονίνη (GSH- reduced glutathione) αμέσως αφότου μπει στο κύτταρο και ύστερα μεταφέρεται για να συμπλοκοποιηθεί με τη μεταλλοθειονίνη. Αυτό συμβαίνει γιατί εφόσον εισέλθει ο χαλκός στο κύτταρο απαιτούνται αρκετές ώρες για να φτάσει σε ικανοποιητικά επίπεδα η συγκέντρωση της μεταλλοθειονίνης ώστε να ανασταλεί η τοξικότητά του. Η μεταλλοθειονίνη είναι μια δεσμευτική πρωτεΐνη χαμηλού μοριακού βάρους, πλούσια σε κυστεΐνη, η οποία αποθηκεύει προσωρινά τον κυτταροπλασματικό χαλκό. Ο μηχανισμός μέσω του οποίου η μεταλλοθειονίνη συσσωρεύει και μεταφέρει το χαλκό σε άλλες πρωτεΐνες και ένζυμα, όπως η σερουλοπλασμίνη και η υπεροξειδική δισμουτάση, δεν έχει ακόμη διευκρινισθεί πλήρως ^[106].

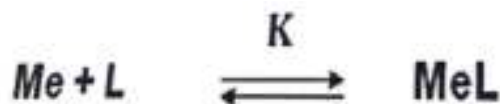
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΣΥΜΠΛΕΚΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΜΕΤΑΛΛΩΝ

6.1 Ορισμός συμπλεκτικής ικανότητας μετάλλων

Η συμπλεκτική ικανότητα μετάλλου ενός δείγματος είναι η ικανότητά του να συμπλέκει ορισμένη ποσότητα ενός μετάλλου. Η συμπλεκτική ικανότητα ως προς ένα μέταλλο ουσιαστικά αποτελεί μέτρο της ποσότητας των υποκαταστατών του στο δείγμα. Η συμπλεκτική ικανότητα ενός δείγματος ως προς τα μεταλλικά ιόντα, ορίζεται ως τα προστιθέμενα moles του μετάλλου που έχουν συμπλεχθεί ανά λίτρο δείγματος.

Ο προσδιορισμός της συμπλεκτικής ικανότητας μπορεί να επηρεαστεί από το βαθμό ευκινήσιας του συστήματος. Έτσι, ευκίνητο θεωρείται ένα σύστημα όταν ο χρόνος επίτευξης της θερμοδυναμικής ισορροπίας της διάστασης των συμπλόκων του μετάλλου (MeL) είναι ικανοποιητικά μεγαλύτερος από το χρόνο απόκρισης της χρησιμοποιούμενης αναλυτικής τεχνικής. Στην περίπτωση που τα μεταλλικά σύμπλοκα δεν δίστανται κατά μέτρηση, τότε το σύστημα χαρακτηρίζεται ως αδρανές. Για να επιτευχθεί πλήρης ευκινήσια χρειάζονται μεγάλοι χρόνοι ανάλυσης.



Τα μεταλλικά σύμπλοκα είναι είτε ανόργανα είτε οργανικά και μπορούν να διαχωριστούν περαιτέρω σε ευκίνητα (αδρανή), ανάλογα με τις σταθερές αστάθειας/ σχηματισμού τους. Τα σύμπλοκα μπορούν να αλλάξουν σημαντικά τη φυσική, χημική και βιολογική συμπεριφορά των μετάλλων, ενώ μειώνουν την τοξικότητά τους στους οργανισμούς^[107].

6.2 Βολταμμετρικές μέθοδοι

6.2.1 Εισαγωγή – Ορολογία

Σύμφωνα με τον Henze (2001), «πολαρογραφία» και γενικότερα «βολταμμετρία» ονομάζονται οι αναλυτικές μέθοδοι που βασίζονται στις μετρήσεις ρεύματος-δυναμικού σε ηλεκτροχημικές κυψελίδες. Το αναλυτικό σήμα είναι το ρεύμα (συνήθως φαρανταϊκό ρεύμα), το οποίο ρέει μέσα στην κυψελίδα κατά τη διάρκεια της αντίδρασης του αναλύτη στο μικρής επιφάνειας ηλεκτρόδιο εργασίας. Ο αναλύτης μπορεί να είναι κατιόν, ανιόν ή μόριο ^[108].

Η μέθοδος αυτή δημιουργήθηκε από τον Jaroslav Heyrovsky, ο οποίος εισήγαγε το σταγονικό ηλεκτρόδιο υδραργύρου ως το ηλεκτρόδιο εργασίας. Το ηλεκτρόδιο αυτό αποτελείται από γυάλινο τριχοειδές παχέως τοιχώματος, από το οποίο ο υδράργυρος στάζει μέσα στο διάλυμα του δείγματος υπό την πίεση μιας στήλης υδραργύρου. Οι όροι «πολαρογραφία» και «βολταμμετρία» χρησιμοποιούνται συχνά με την αντίστροφη έννοια ή δίχως ακρίβεια. Σύμφωνα με τους κανόνες της IUPAC, ο όρος «πολαρογραφία» χρησιμοποιείται όταν η καμπύλη ρεύματος-δυναμικού καταγράφεται με τη χρήση υγρού ηλεκτροδίου εργασίας, του οποίου η επιφάνεια μπορεί να ανανεώνεται περιοδικά ή συνεχώς (π.χ. με τη μορφή σταγόνων). Αυτό περιλαμβάνει το κλασικό σταγονικό ηλεκτρόδιο υδραργύρου (Dropping Mercury Electrode - DME) και το στατικό σταγονικό ηλεκτρόδιο υδραργύρου (Static Mercury Drop Electrode - SMDE), που αναπτύχθηκε στη συνέχεια. Ο όρος «βολταμμετρία» χαρακτηρίζει το σύνολο των μεθόδων στις οποίες οι μετρήσεις ρεύματος-δυναμικού πραγματοποιούνται σε στατικά και σταθερά ηλεκτρόδια εργασίας (ανεξαρτήτως του υλικού τους). Αυτά περιλαμβάνουν το σταγονικό ηλεκτρόδιο υδραργύρου, το ηλεκτρόδιο λεπτού φιλμ υδραργύρου, τα υαλώδη ηλεκτρόδια άνθρακα και τα ηλεκτρόδια πάστας άνθρακα. Τα ηλεκτρόδια εργασίας ευγενών μετάλλων (π.χ. χρυσού ή λευκόχρυσου) χρησιμοποιούνται λιγότερο συχνά. Στην πολαρογραφία ως ηλεκτρόδιο εργασίας χρησιμοποιείται αποκλειστικά το σταγονικό ηλεκτρόδιο υδραργύρου (HDME) ^[109].

6.2.2 Βολταμμετρικές τεχνικές

Οι βολταμμετρικές τεχνικές συνιστούν μια ομάδα ηλεκτροχημικών τεχνικών αναλύσεως, στις οποίες η αναλυτική πληροφορία προκύπτει από διαγράμματα i - E , όπου i είναι το ρεύμα που διαρρέει το ηλεκτρολυτικό στοιχείο και E το δυναμικό του ηλεκτροδίου εργασίας. Οι επιμέρους βολταμμετρικές τεχνικές διαφέρουν μεταξύ τους κυρίως ως προς τον τρόπο με τον οποίο μεταβάλλεται το δυναμικό με το χρόνο και ως προς τον τύπο του χρησιμοποιούμενου ηλεκτροδίου εργασίας. Γενικά, οι μετρήσεις στις βολταμμετρικές τεχνικές γίνονται σε συνθήκες που ευνοούν την πόλωση του ηλεκτροδίου εργασίας σε ευρείες περιοχές δυναμικού του έτσι ώστε, όταν διέρχεται ηλεκτρικό ρεύμα, η τιμή του να μπορεί να συσχετισθεί άμεσα με τη συγκέντρωση των ηλεκτρενεργών χημικών σωματιδίων, τα οποία συμμετέχοντας σε μια ηλεκτροδιακή ημιαντίδραση δρουν ως αποπολωτές.

Συνθήκες που ευνοούν την πόλωση του ηλεκτροδίου εργασίας και ως εκ τούτου χρησιμοποιούνται μόνες ή σε συνδυασμό στις επιμέρους βολταμμετρικές τεχνικές είναι:

- Ηλεκτρόδιο εργασίας με μικρή επιφάνεια. Η χρησιμοποίηση ηλεκτροδίου εργασίας με πολύ μικρή επιφάνεια (μικροηλεκτρόδιο) σε σχέση με την επιφάνεια του άλλου ηλεκτροδίου του ηλεκτρολυτικού στοιχείου (αντιηλεκτρόδιο ή βοηθητικού ηλεκτροδίου) εξασφαλίζει α) ταχύτατη πόλωση συγκεντρώσεως στην περιοχή του διαλύματος που το περιβάλλει, β) τιμές ρεύματος οι οποίες εξαρτώνται αποκλειστικά από τις φαρανταϊκές διαδικασίες που πραγματοποιούνται σε αυτό και όχι στο αντιηλεκτρόδιο ή βοηθητικό ηλεκτρόδιο (καθίσταται το 'καθοριστικό' του ρεύματος ηλεκτρόδιο) και γ) πολύ μικρά ρεύματα (μερικές δεκάδες μA ή μικρότερα), γεγονός που επιτρέπει να θεωρηθούν οι μετρήσεις ως μη καταστροφικές του δείγματος, αφού μόνο ένα πολύ μικρό κλάσμα της ηλεκτρενεργού ουσίας του ηλεκτρολυτικού διαλύματος υφίσταται οξειδωση ή αναγωγή κατά τη διάρκεια κάθε μέτρησης.

- Ακίνησια διαλύματος. Το διάλυμα στην ηλεκτρολυτική κυψελίδα διατηρείται ακίνητο (δεν αναδεύεται), γεγονός που σε συνδυασμό με τη μικρή επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας επιταχύνει την πόλωση συγκεντρώσεως.
- Υλικό ηλεκτροδίου εργασίας. Ως υλικό των ηλεκτροδίων εργασίας χρησιμοποιούνται κατά το δυνατόν χημικώς αδρανή υλικά όπως ευγενή μέταλλα, υδράργυρος και διάφορες αγωγιμες μορφές άνθρακα (υαλώδης άνθρακας ή γραφίτης), γεγονός που επεκτείνει την περιοχή πολώσεως σε αρκετά οξειδωτικά δυναμικά, ακόμη και σε όξινα διαλύματα, δεδομένου ότι η αποπόλωση υδραργυρικών ηλεκτροδίων με αναγωγή του ύδατος ή των υδρογονοκατιόντων προϋποθέτει μεγάλο καθοδικό υπερδυναμικό (πόλωση ενεργοποίησεως).

Το ηλεκτρολυτικό στοιχείο στο οποίο ισχύουν μία ή περισσότερες από τις παραπάνω συνθήκες και χρησιμοποιείται σε μια βολταμετρική τεχνική ανάλυσεως θα ονομάζεται στο εξής βολταμετρικό στοιχείο ή βολταμετρική κυψελίδα (voltametric cell).

Σχεδόν στο σύνολό τους οι βολταμετρικές τεχνικές χαρακτηρίζονται από χαμηλά όρια ανιχνεύσεως (τυπικά $10^{-8} - 10^{-10}$ M, ανάλογα με τη συγκεκριμένη τεχνική) και ικανοποιητική εκλεκτικότητα. Διακρίνονται από τις άλλες ηλεκτροχημικές τεχνικές ως προς το ότι πολλές από αυτές επιτρέπουν την ποιοτική ταυτοποίηση, όπως τον ταυτόχρονο προσδιορισμό περισσότερων του ενός ηλεκτρενεργών συστατικών. Εκτός από τις καθαρά αναλυτικές εφαρμογές οι βολταμετρικές τεχνικές χρησιμοποιούνται ευρύτατα σε ηλεκτροχημικές και γενικότερα φυσικοχημικές μελέτες, όπως π.χ. στη διευκρίνιση μηχανισμών ηλεκτροδιακών αντιδράσεων, σε μελέτες χημικών ισορροπιών (προσδιορισμός συντάξεως και σταθερών σχηματισμού συμπλόκων), σε κινητικές μελέτες και καταλύσεις αντιδράσεων και στην παρακολούθηση βραχύβιων ηλεκτρενεργών σωματιδίων.

Η συνηθέστερη βολταμετρική τεχνική ανάλυσεως είναι η πολαρογραφία, η οποία ορίζεται ως «βολταμετρία σταγονικού ηλεκτροδίου υδραργύρου», αφού το τελευταίο χρησιμοποιείται αποκλειστικά και μόνο στην πολαρογραφία ως ηλεκτρόδιο εργασίας^[110].

6.2.3 Πολαρογραφία

Η πολαρογραφία επινοήθηκε από τον Heyrovsky το 1922, ο οποίος για το επίτευγμά του αυτό τιμήθηκε με το βραβείο Νόμπελ. Έκτοτε αναπτύχθηκε και χρησιμοποιήθηκε ευρέως στη χημική ανάλυση. Με την πολαρογραφία είναι δυνατή η ταυτοποίηση και ο προσδιορισμός ανόργανων και οργανικών ουσιών, που μπορούν να αναχθούν ή να οξειδωθούν ηλεκτροχημικά.

Κατά την πολαρογραφική ανάλυση διάλυμα του δείγματος φέρεται σε ειδικό ηλεκτρολυτικό δοχείο (κυψελίδα) και υφίσταται ηλεκτρόλυση μεταξύ δύο ηλεκτροδίων, ενός μικροηλεκτροδίου (του σταγονικού ηλεκτροδίου υδραργύρου- HMDE), που πολώνεται εύκολα και δρα ως κάθοδος (εξ' ου και η ονομασία της τεχνικής) κι ενός ευμεγέθους μη πολώσιμου ηλεκτροδίου καλομέλανος (ΚΗΚ) (αντιθέτως μπορεί να χρησιμοποιηθεί μεγάλη επιφάνεια υδραργύρου), που αποτελεί την άνοδο. Το HMDE αποτελεί το ηλεκτρόδιο εργασίας του ηλεκτρολυτικού στοιχείου και για μεγαλύτερη ακρίβεια χρησιμοποιείται και ένα βοηθητικό ηλεκτρόδιο, συνήθως λευκοχρύσου, από το οποίο διέρχεται το ρεύμα κατά αποκλειστικότητα, ενώ το ρεύμα που διέρχεται από το ηλεκτρόδιο αναφοράς του ΚΗΚ είναι αμελητέο. Η ηλεκτρόλυση γίνεται παρουσία περίσσειας φέροντος ηλεκτρολύτη, σε απόλυτα ήρεμο διάλυμα (χωρίς ανάδευση), ώστε η μεταφορά των ηλεκτρενεργών ουσιών από την κύρια μάζα του διαλύματος στην επιφάνεια του HMDE να γίνεται πρακτικά μόνο με διάχυση. Μεταξύ των δύο ηλεκτροδίων εφαρμόζεται συνεχώς μεταβαλλόμενη τάση E , κατά κανόνα ισοταχώς (συνήθως προς τις αρνητικότερες τιμές από +0.1 έως -1.9 V ως προς το ΚΗΚ) καταγράφεται η ένταση του ρεύματος i (καθοδικό ρεύμα).

Στην αρχή της ηλεκτρόλυσης παρατηρείται ένα πολύ ασθενές ρεύμα, το βασικό ρεύμα, που οφείλεται σε ίχνη ηλεκτρενεργών προσμίξεων του φέροντος ηλεκτρολύτη και σε χωρητική φόρτιση του HMDE. Όταν η τάση E γίνει ίση με το δυναμικό αποσυνθέσεως της ηλεκτρενεργού ουσίας A του διαλύματος, παρατηρείται γρήγορη αύξηση της εντάσεως του ρεύματος που συνεχίζεται μέχρι μια οριακή τιμή i_1 (ρεύμα κόρου ή ύψος κύματος), η οποία αντιστοιχεί στην αναγωγή ή οξείδωση όλων των μορίων ή ιόντων της ουσίας A , που βρίσκονται πολύ κοντά στο ηλεκτρόδιο εργασίας HMDE (είναι

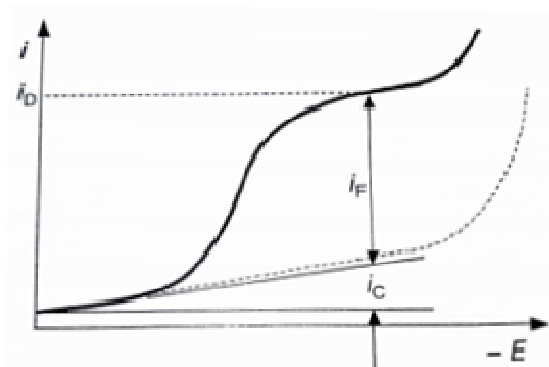
αδύνατον να αυξηθεί περισσότερο ο ρυθμός προσελεύσεως νέων μορίων ή ιόντων της ουσίας A στο HMDE αποκλειστικά και μόνο με διάχυση). Επειδή στην προκειμένη περίπτωση το ρεύμα κόρου οφείλεται πρακτικά στη διάχυση, η διαφορά $i - i_f$ ονομάζεται ρεύμα διαχύσεως i_d . Η απότομη μεταβολή της εντάσεως i του ρεύματος καλείται πολαρογραφικό κύμα ή βαθμίδα, ενώ η καμπύλη εντάσεως-τάσεως αποτελεί το πολαρογράφημα, το οποίο λαμβάνεται αυτόματα από τον πολαρογράφο. Στην περίπτωση του μείγματος ηλεκτρενεργών ουσιών με σαφή διαφορά στο δυναμικό αποσυνθέσεως, λαμβάνονται διαδοχικά πολαρογραφικά κύματα ^[111].

Οι μεταβολές αυτές της έντασης του ρεύματος εξαρτώνται από την τιμή της εφαρμοζόμενης τάσεως και από τη φύση και τη συγκέντρωση των ηλεκτρενεργών ουσιών, για αυτό και είναι δυνατή η ταυτοποίηση και ο προσδιορισμός των ουσιών αυτών από το διάγραμμα i_d - E ως εξής: το δυναμικό που αντιστοιχεί στο σημείο της καμπύλης «έντασης-τάσης» στο οποίο $i = i_d/2$ καλείται δυναμικό μισού κύματος ή δυναμικό ημικύματος $E_{1/2}$, αποτελεί χαρακτηριστική σταθερά για κάθε ηλεκτρενεργό ουσία υπό καθορισμένες συνθήκες και χρησιμοποιείται για την ταυτοποίησή της. Το ρεύμα διαχύσεως i_d είναι συνήθως ανάλογο της συγκεντρώσεως C ($i_d = k \cdot C$, k =σταθερά αναλογίας) της ηλεκτρενεργού ουσίας στο διάλυμα και χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό της.

Στην απλούστερη περίπτωση η αρχή της μέτρησης της πολαρογραφίας βασίζεται στην καταγραφή του ρεύματος που ρέει μέσω του DME ως ηλεκτροδίου εργασίας κατά τη διάρκεια μια γραμμικής (άμεσης) αλλαγής της τάσης (κλασική άμεση πολαρογραφία ρεύματος). Το ηλεκτρόδιο καταμέτρησης είναι συνήθως ηλεκτρόδιο καλομέλανος ή χλωριούχου αργύρου, το οποίο αποτελεί και το ηλεκτρόδιο αναφοράς ^[112].

Το ρεύμα που ρέει διαμέσου του ηλεκτροδίου εργασίας αποτελείται από δύο συνιστώσες (σχήμα 6.1): το φαρανταϊκό ρεύμα i_f , το οποίο βασίζεται στην αναγωγή ή οξειδωση του αναλύτη και το χωρητικό ρεύμα i_c , το οποίο προκαλείται μέσω της φόρτισης και αποφόρτισης της ηλεκτροχημικής διπλής στοιβάδας στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας. Στους περισσότερους πολαρογραφικούς προσδιορισμούς το i_f παρέχει το σήμα μέτρησης (χρήσιμο

σήμα) και το i_c την ανεπιθύμητη παρεμβολή. Στην πράξη το i_c μπορεί να φθάσει μέχρι και την τιμή 10^{-7} A, εμπίπτοντας στο εύρος του ρεύματος i_d που προκύπτει για το διάλυμα ενός αναλυτή συγκέντρωσης 10^{-5} mol L⁻¹. Στην περίπτωση που $i_c=i_f$, τότε το χρήσιμο σήμα δεν μπορεί να διαχωριστεί από την ανεπιθύμητη παρεμβολή, δηλαδή το όριο ανίχνευσης για άμεσους πολαρογραφικούς προσδιορισμούς περιορίζεται από τη σχέση ανάμεσα στο χρήσιμο σήμα και στην παρεμβολή (επίσης γνωστή ως «αναλογία σήματος-θορύβου»).



Σχήμα 6.1 Σχέση μεταξύ φαρανταϊκού (i_f) και χωρητικού ρεύματος (i_c) σε ένα πολαρογράφημα συνεχούς ρεύματος, i_d το ρεύμα διάχυσεως^[109]

Το ρεύμα διάχυσης i_d είναι η μέγιστη τιμή του i_f , η οποία λαμβάνεται όταν όλα τα μόρια του αναλύτη που έχουν μεταφερθεί στην επιφάνεια της σταγόνας υδραργύρου μέσω διάχυσης έχουν τροποποιηθεί π.χ. αναχθεί ή οξειδωθεί (αντίδραση μεταφοράς φορτίου). Η σχέση μεταξύ του ρεύματος διάχυσης και της συγκέντρωσης του αναλύτη περιγράφεται από την εξίσωση Ilkovic:

$$I_d = 0.607 nD^{1/2}m^{2/3}t^{1/6}C_a$$

Όπου n ο αριθμός των ηλεκτρονίων που ανταλλάσσονται στην αντίδραση μεταφοράς φορτίου, D ο συντελεστής διάχυσης του αναλύτη, m ο ρυθμός ροής του υδραργύρου, t_d ο χρόνος ροής της σταγόνας υδραργύρου και C_a η συγκέντρωση του αναλύτη. Ο πολαρογραφικός προσδιορισμός με μεγαλύτερη ευαισθησία είναι δυνατός μόνο εάν η αναλογία i_f/i_c μπορεί να

βελτιωθεί με άλλες τεχνικές μέτρησης (π.χ. αυξάνοντας το i_f ή μειώνοντας το i_c). Για τη μερική εξάλειψη του χωρητικού ρεύματος δημιουργήθηκαν η πολαρογραφία συνεχούς ρεύματος (Direct Current - DC) και οι παλμικές μέθοδοι. Για την αύξηση του φαρανταϊκού ρεύματος δημιουργήθηκε η αναδιαλυτική βολταμμετρία, στην οποία ο αναλύτης συσσωρεύεται ηλεκτρολυτικά σε ένα σταθερό ηλεκτρόδιο εργασίας, πριν το βολταμμετρικό προσδιορισμό. Επίσης, η απόδοση των πολαρογραφικών και βολταμμετρικών μεθόδων έχει βελτιωθεί με τη χρήση του στατικού σταγονικού ηλεκτροδίου υδραργύρου (SMDE) και με την καταγραφή των πολαρογραφημάτων στα ψηφιακά όργανα μέσω γραμμικής σάρωσης^[113].

Όργανα πολαρογραφίας

Η διάταξη που απαιτείται για τις βολταμμετρικές μετρήσεις αποτελείται από τρία κύρια μέρη:

- Σύστημα μέτρησης (measuring stand)
- Σύστημα διασύνδεσης (interface) με μικροεπεξεργαστή
- Ηλεκτρονικό υπολογιστή

Όσον αφορά το σύστημα της μέτρησης αυτό περιλαμβάνει:

- Ποτενσιοστάτη (ηλεκτρονική μονάδα με την οποία μπορεί να ελεγχθεί και να ρυθμιστεί επακριβώς η τιμή του ηλεκτροδίου αναφοράς τόσο για την προεπιλεγμένη διαμόρφωση του δυναμικού (τετραγωνικού κύματος, κανονική πολαρογραφία και πολαρογραφία διαφορικών παλμών) όσο και για πολαρογραφία εναλλασσόμενου ρεύματος)
- Ενισχυτή μέτρησης ρεύματος για τη μέτρηση-καταγραφή της έντασης του ρεύματος
- Αναλογικό ψηφιακό μετατροπέα
- Ψηφιακό αναλογικό μετατροπέα
- Ρυθμιστές βαλβίδων αερίων
- Κυψελίδα μέτρησης τριών ηλεκτροδίων με αναδευτήρα

Εκτός από τα ηλεκτρόδια εργασίας και αναφοράς, η κυψελίδα μέτρησης περιλαμβάνει επίσης βοηθητικό ηλεκτρόδιο, η προσθήκη του οποίου προκαλεί

μείωση στη ροή του ρεύματος μεταξύ του ηλεκτροδίου αναφοράς και του ηλεκτροδίου εργασίας. Ως εκ τούτου η ροή ρεύματος λαμβάνει χώρα ανάμεσα στο ηλεκτρόδιο εργασίας και στο βοηθητικό, έτσι ώστε το ηλεκτρόδιο αναφοράς να λειτουργεί αποκλειστικά ως σημείο αναφοράς για τον καθορισμό του δυναμικού στο ηλεκτρόδιο εργασίας. Ως ηλεκτρόδιο αναφοράς συνήθως χρησιμοποιούνται τα ηλεκτρόδια Ag/AgCl, εκτός από το ηλεκτρόδιο καλομέλανος που χρησιμοποιείται παλαιότερα.

Όσον αφορά το απαιτούμενο σύστημα διασυνδέσεως (interface), εκεί πραγματοποιείται η επιλογή των πειραματικών συνθηκών (είδος μέτρησης, εύρος δυναμικού, χρόνοι απαέρωσης και ανάδευσης, γνωστή προσθήκη), οι οποίες από εκεί μεταφέρονται στο λειτουργικό σύστημα ελέγχου και υπολογισμών, όπου παράγονται τα αποτελέσματα.

Οι σημαντικότεροι τύποι ηλεκτροδίων εργασίας είναι τα ηλεκτρόδια υδραργύρου ελεγχόμενα μέσω βαλβίδας, τα οποία αποτελούνται από λεπτά τριχοειδή με εσωτερική διάμετρο περίπου 50 μm συνδεδεμένα με δεξαμενή υδραργύρου. Η ροή του Hg ελέγχεται μέσω βαλβίδας, η οποία ανοίγει για μικρό χρονικό διάστημα (20-200 ms) και κλείνει ξανά γρήγορα προκειμένου να σχηματιστεί μια μεμονωμένη σταγόνα Hg με σταθερή επιφάνεια 0.1-0.6 mm^2 ή κατόπιν επανάληψης μια σειρά σταγόνων Hg. Το σταγονικό ηλεκτρόδιο Hg με σταθερό μέγεθος σταγόνας Hg πλεονεκτεί έναντι εκείνου του οποίου η επιφάνεια αυξάνεται όσο η σταγόνα πέφτει, καθώς το ρεύμα καταγράφεται κατά τη μέτρηση πάντοτε σε σταθερή επιφάνεια ηλεκτροδίου, ώστε να επιτυγχάνεται μεγαλύτερη ευαισθησία ^[114].

Εφαρμογές πολαρογραφίας

Η πολαρογραφία χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό μεγάλου αριθμού ανόργανων και οργανικών ουσιών, μοριακών ή ιονικών, οι οποίες ανάγονται ή οξειδώνονται στο σταγονικό ηλεκτρόδιο Hg σε δυναμικά μεταξύ +0.3 V και -2.8 V ως προς το ηλεκτρόδιο καλομέλανα. Η περιοχή των προσδιοριζόμενων συγκεντρώσεων μπορεί να εκτείνεται μέχρι και 10^{-8} M για τη διαφορική παλμική πολαρογραφία ή 10^{-10} M για την αναδιαλυτική βολταμμετρία.

Κυριότερες εφαρμογές της πολαρογραφίας στην ποσοτική ανάλυση είναι οι εξής ^[115]:

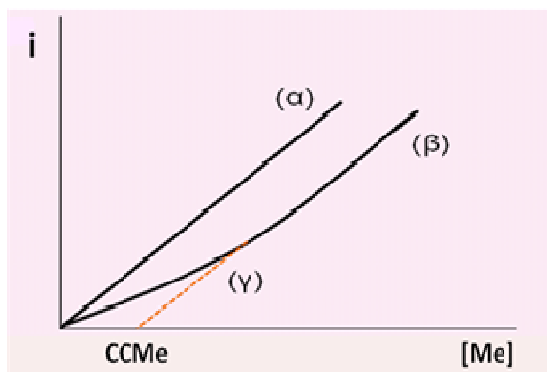
1. Προσδιορισμός μεταλλοϊόντων, μέσω κατάλληλης επιλογής φέροντος ηλεκτρολύτη, pH και συμπλεκτικών μέσων. Μπορεί επίσης να πραγματοποιηθεί και ανάλυση μίγματος μεταλλοϊόντων όταν τα δυναμικά ημικούματος διαφέρουν επαρκώς μεταξύ τους ώστε να εμφανίζεται διακριτό κύμα για κάθε ένα εξ αυτών και να δύναται να μετρηθεί το αντίστοιχο ρεύμα διάχυσης.
2. Προσδιορισμός ανόργανων ανιόντων
3. Προσδιορισμός ουδέτερων μορίων π.χ. διαλυμένου οξυγόνου σε υδατικά διαλύματα, οξειδίων αζώτου και θείου, H₂O₂ κλπ
4. Προσδιορισμός οργανικών ουσιών και χαρακτηριστικών ομάδων και παρακολούθηση της κινητικής πολλών οργανικών αντιδράσεων

6.3 Προσδιορισμός της ικανότητας σύμπλεξης ιόντων χαλκού σε ελληνικές μπύρες

Η συμπλεκτική ικανότητα μετάλλου (MeCC) αναφέρεται κυρίως στο χαλκό λόγω της μεγάλης του εκλεκτικότητας για τους οργανικούς υποκαταστάτες ^[116]. Η μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συμπλεκτικής ικανότητας ως προς τα ιόντα χαλκού, η οποία χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα εργασία είναι η Διαφορική Παλμική Ανοδική Αναδιαλυτική Βολταμμετρία (DPASV) με τη χρήση σταγονικού ηλεκτροδίου υδραργύρου. Η μέθοδος αυτή είναι πολύ ευαίσθητη και ακριβής και αποκλείει κάθε επηρεασμό των αποτελεσμάτων από κινητικούς παράγοντες ^[117].

Ο προσδιορισμός της συμπλεκτικής ικανότητας σε αδρανή συστήματα βασίζεται σε διαγράμματα (σχήμα 6.2) που αναπαριστούν τη μετρούμενη ένταση του ηλεκτρικού ρεύματος (*i*) συναρτήσει της συγκέντρωσης (προσθήκη γνωστής ποσότητας) του μετάλλου (C_{Me}) και τα οποία εξαρτώνται από την ισχύ της σύμπλεξης. Σε ευκίνητα συστήματα τα διαγράμματα αυτά εξαρτώνται επίσης από το συντελεστή διάχυσης των οργανικών υποκαταστατών. Βάσει των συγκεκριμένων διαγραμμάτων (σχήμα 6.2) η συμπλεκτική ικανότητα προσδιορίζεται (α) σε αδρανή συστήματα από την προέκταση του ευθύγραμμου τμήματος της καμπύλης β στον άξονα των τετμημένων (ευθεία

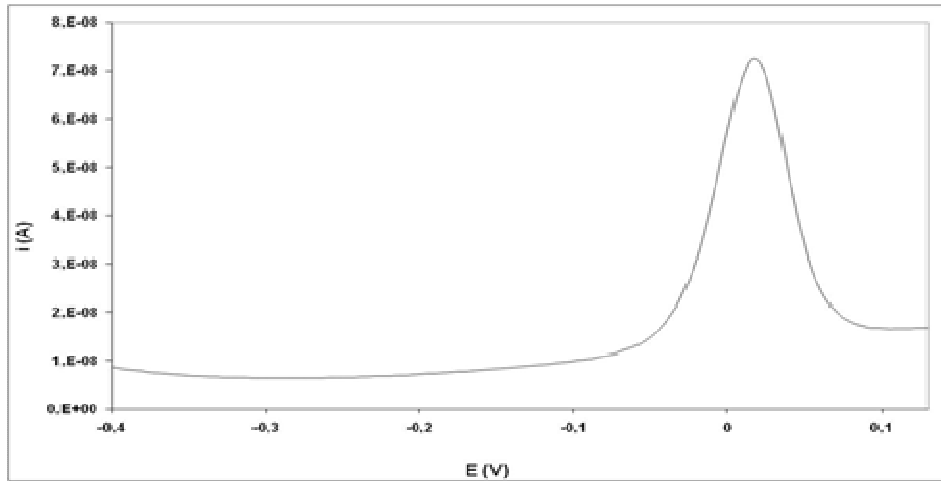
γ) και (β) σε ευκίνητα συστήματα από τον εντοπισμό του σημείου όπου καταγράφεται αλλαγή στην κλίση της καμπύλης (έχει επέλθει κορεσμός των υποκαταστατών). Το σημείο αυτό σε αρκετές περιπτώσεις είναι δύσκολο να εντοπιστεί με ακρίβεια και για αυτό θα πρέπει να αποφεύγεται ο προσδιορισμός της συμπλεκτικής ικανότητας σε ευκίνητα συστήματα ^[118].



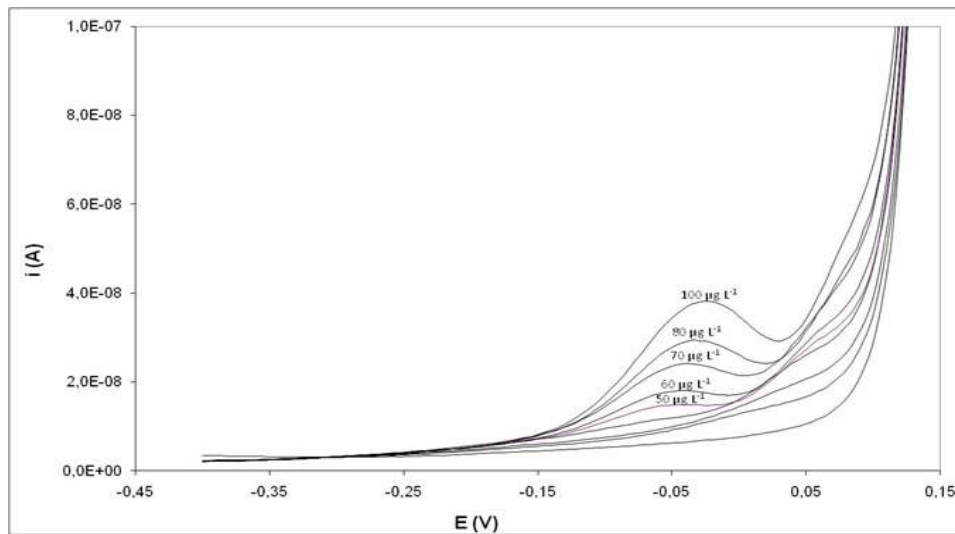
Σχήμα 6.2 Διάγραμμα διαφορικής παλμικής πολωρογραφίας, προσθήκης γνωστής ποσότητας μετάλλου (C_{Me}) για αδρανή φυσικά συστήματα. Η καμπύλη (α) αντιστοιχεί σε μηδενική συγκέντρωση υποκαταστατών ($C_L=0$), η καμπύλη (β) σε μη μηδενική συγκέντρωση υποκαταστατών ($C_L \neq 0$) και το τμήμα (γ) στην προέκταση του παράλληλου με την ευθεία (α) τμήματος της καμπύλης (β). το σημείο τομής του τμήματος (γ) με τον άξονα x αντιστοιχεί στην τιμή της προσδιοριζόμενης συμπλεκτικής ικανότητας (CC). (Πηγή: Davison 1978)

Στο σχήμα 6.3 δίνεται ένα παράδειγμα βολταμμογραφήματος το οποίο αντιστοιχεί σε οξυνισμένο (ενδεικτικού $pH=2$) δείγμα ελληνικής μπύρας (δείγμα 31 της παρούσας εργασίας) έπειτα από προσθήκη πρότυπου διαλύματος ιόντων χαλκού ώστε η συγκέντρωση του δείγματος σε χαλκό να αντιστοιχεί σε $50 \mu g L^{-1}$.

Στο σχήμα 6.4 δίνονται τα βολταμμογραφήματα που λαμβάνονται για το δείγμα που ελήφθη από τις ελληνικές μπύρες (δείγμα 31 της παρούσας εργασίας) στο φυσικό pH , έπειτα από προσθήκες πρότυπου διαλύματος ιόντων χαλκού ώστε η συγκέντρωση του δείγματος σε χαλκό να αντιστοιχεί σε 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 και $100 \mu g L^{-1}$.



Σχήμα 6.3 Βολταμμογράφημα οξυινισμένου δείγματος ελληνικής μπύρας (δείγμα 31 της παρούσας εργασίας) έπειτα από προσθήκη πρότυπου διαλύματος ιόντων χαλκού ώστε η συγκέντρωση του δείγματος σε χαλκό να αντιστοιχεί σε $50 \mu\text{g L}^{-1}$.



Σχήμα 6.4 Βολταμμογραφήματα που αντιστοιχούν σε διαδοχικές προσθήκες πρότυπου διαλύματος ιόντων χαλκού για το δείγμα ελληνικής μπύρας (δείγμα 31 της παρούσας εργασίας) στο φυσικό pH.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

7.1 Συλλογή δειγμάτων

Τα 31 δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία προέρχονται από ελληνικές μικροζυθοποιίες.

7.2 Προετοιμασία δειγμάτων μπίρας

Λαμβάνονται 320 mL δείγματος σε ογκομετρική φιάλη 1 L και τοποθετούνται για 30 λεπτά σε λουτρό υπερήχων ώστε να απομακρυνθούν τα ανθρακικά ιόντα. Για να ολοκληρωθεί η διαδικασία απομάκρυνσης των ανθρακικών ιόντων διοχετεύεται καθαρό αέριο N₂ στο δείγμα μέχρις ότου παύσει τελείως ο αφρισμός. Έπειτα, το δείγμα ελληνικής μπίρας τοποθετείται ανά 80 mL σε προζυγισμένα και καθαρά ουροδοχεία. Για την απομάκρυνση CO₂ τα δείγματα συμπυκνώθηκαν σε περιστροφικό συμπυκνωτήρα (rotary evaporator).

7.3 Λυοφιλίωση δειγμάτων

Τα δείγματα διατηρήθηκαν στην κατάψυξη στους -80 °C για 72 h και κατόπιν λυοφιλύθηκαν με συσκευή HetoLyolab 3000 (Heto-Hiltten, Allerod, Denmark). Μετά από διάστημα 4 ημερών, αφού είχε ολοκληρωθεί η διαδικασία της λυοφιλίωσης, τα ξηρά στερεά δείγματα με μορφή πούδρας που προέκυψαν, φυλάχθηκαν στην κατάψυξη στους -20 °C.

7.4 Μελέτη σύμπλεξης ιόντων χαλκού

7.4.1 Προετοιμασία δειγμάτων

Για την προετοιμασία του δείγματος για την πολαρογραφική ανάλυση λαμβάνονται 250 μL μπίρας (κατόπιν προετοιμασίας του όπως περιγράφεται στην παράγραφο 7.2) τα οποία αραιώνονται με 25 mL υπερκάθαρου, δις – απιονισμένου νερού αγωγιμότητας 18.2 MΩ cm (Millipore, Bedford, MA, USA).

7.4.2 Προσδιορισμός συμπλεκτικής ικανότητας και σταθεράς σχηματισμού ιόντων Cu

Η αναλυτική μέθοδος που εφαρμόστηκε για τον προσδιορισμό της συμπλεκτικής ικανότητας ιόντων χαλκού είναι η διαφορική παλμική ανοδική αναδιαλυτική βολταμετρία (DPASV, Differential Pulse Anodic Stripping Voltammetry) ^[117]. Ο προσδιορισμός της συμπλεκτικής ικανότητας πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη γνωστών ποσοτήτων πρότυπου διαλύματος ιόντων χαλκού σε δείγμα στο φυσικό pH (~8.0) και σε δείγμα οξυνισμένο (pH=2) που προηγουμένως είχε χωνευθεί. Η διαδικασία υγρής χώνευσης του δείγματος είναι η εξής: Σε δοχείο Teflon, ειδικά σχεδιασμένο για αεροστεγές κλείσιμο εισάγονται 2 mL H₂O (αγωγιμότητας 18.2 MΩ cm), 500 μL δείγματος μπύρας, 1 mL π. HCl και 1 mL π. HClO₄ (Merck, Darmstadt, Germany) και αφήνονται στη θερμαντική πλάκα στους 150 °C. Ακολουθεί εξάτμιση σχεδόν μέχρι ξηρού και έπειτα παραλαβή σε ογκομετρική φιάλη 50 mL με δις-απιονισμένο νερό). Μέσω της χώνευσης οξυνισμένου δείγματος διασπώνται πλήρως οι εν δυνάμει υποκαταστάτες των ιόντων χαλκού και με την τιτλοδότηση του συγκεκριμένου δείγματος επιτυγχάνεται ο προσδιορισμός της ευαισθησίας/απόκρισης του ηλεκτροχημικού αναλυτή στις διαδοχικές προσθήκες γνωστής ποσότητας ιόντων χαλκού.

Για τις μετρήσεις στον ηλεκτροχημικό αναλυτή τόσο σε φυσικό pH όσο και σε pH=2 κάθε φορά προστίθετο στην κυψελίδα μέτρησης ποσότητα δείγματος ίση με 25 mL και 3 σταγόνες ηλεκτρολύτη.

Οι ηλεκτροχημικές μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με τον ηλεκτροχημικό αναλυτή ECO-CHEMIE (The Netherlands) συνδεδεμένο με κυψελίδα μέτρησης τριών ηλεκτροδίων της Metrohm (VA 663) (Εικόνες 7.1 και 7.2).



Εικόνα 7.1 Ηλεκτροχημικός αναλυτής ECO-CHEMIE συνδεδεμένος με κυψελίδα μέτρησης τριών ηλεκτροδίων της Metrohm (VA 663)

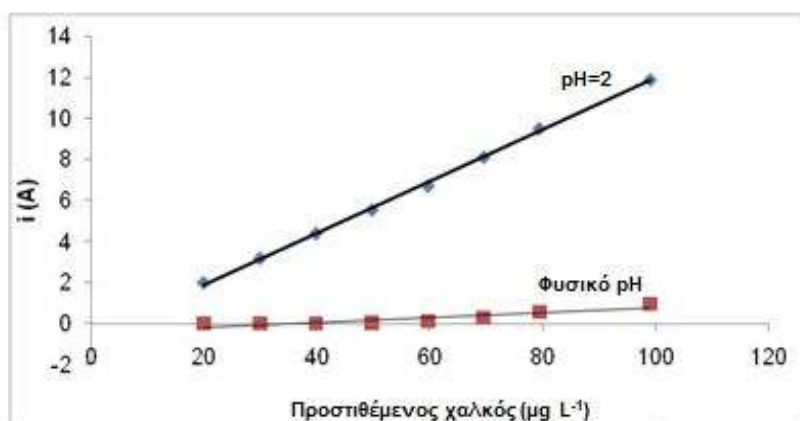


Εικόνα 7.2 Κυψελίδα μέτρησης του ηλεκτροχημικού αναλυτή μαζί με τα ηλεκτρόδια

Οι πειραματικές συνθήκες που εφαρμόστηκαν στον ηλεκτροχημικό αναλυτή είναι οι ακόλουθες ^[117]:

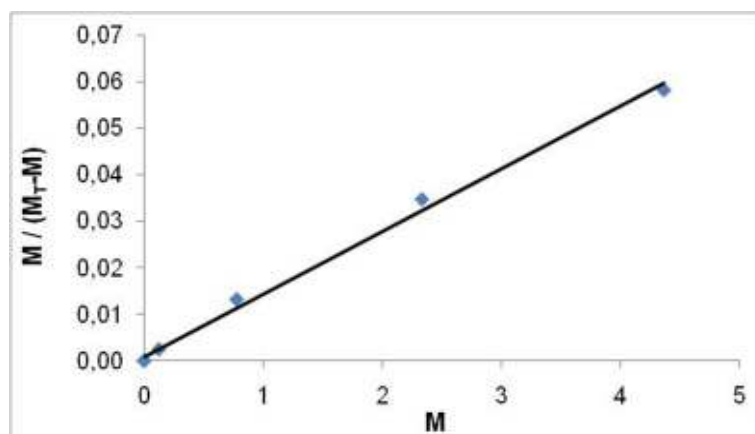
- Χρόνος απαέρωσης με άζωτο (N₂): 5 λεπτά (για τα πρώτα 25 mL δείγματος) και 10 δευτερόλεπτα για κάθε επόμενη προσθήκη προτύπου διαλύματος χαλκού.
- Πίεση μέσου απαέρωσης: 1.2 bar
- Χρόνος απόθεσης: 60s
- Χρόνος εξισορρόπησης πριν από τη μέτρηση: 15 s
- Δυναμικό απόθεσης: -0.6 V
- Χρόνος διαμόρφωσης: 0.04 s
- Διάστημα χρόνου: 0.31 s
- Πλάτος διαμόρφωσης: 25 mV
- Βήμα δυναμικού: 5 mV

για κάθε δείγμα που αναλύθηκε ελήφθησαν οι καμπύλες τιτλοδότησης της συγκέντρωσης του προστιθέμενου χαλκού ($\mu\text{g L}^{-1}$) (άξονας χ) συναρτήσεως της έντασης του ρεύματος ($i(\text{A})$) (άξονας ψ) για τα δείγματα σε φυσικό pH και pH=2 (Σχήμα 7.3).



Σχήμα 7.1: Καμπύλες τιτλοδότησης δείγματος ελληνικής μπύρας για pH=2 και pH=8.

Οι απόλυτες τιμές της συμπλεκτικής ικανότητας και της αντίστοιχης σταθεράς σχηματισμού των συμπλόκων χαλκού των δειγμάτων που αναλύονται και υπολογίζονται με εφαρμογή του διαγράμματος Ruzic ^[119]. Αναλυτικά αρχικά λαμβάνεται η ευθεία καμπύλη του λόγου $M / (M_T - M)$ (άξονας ψ) ως προς M (άξονας χ), όπου M είναι το ελεύθερο μεταλλικό ιόν και $M_T - M$ είναι το συμπλεγμένο μέταλλο (όπου M_T είναι η συνολική ποσότητα του μετάλλου) ^[119,120]. Η σταθερά σχηματισμού (K_{app}) προσδιορίζεται από την τεταγμένη επί την αρχή της ευθείας (τεταγμένη = $1/K_{app} CCCu$), ενώ από την κλίση της ευθείας (κλίση= $1/CCCu$) προσδιορίζεται η συμπλεκτική ικανότητα των ιόντων χαλκού.



Σχήμα 7.2 Διάγραμμα Ruzic δείγματος ελληνικής μπύρας. Ευθεία καμπύλη του λόγου $M/(M_T - M)$ (του ελεύθερου ιοντικού χαλκού προς το συμπλεγμένο) ως προς M (τον ελεύθερο ιοντικό χαλκό)

7.5 Προσδιορισμός ολικού χαλκού

Ο προσδιορισμός του ολικού χαλκού πραγματοποιήθηκε σε οξινισμένο δείγμα (η προετοιμασία του δείγματος περιγράφεται στην παράγραφο 7.4.2) ελληνικής μπύρας με Φασματόμετρο Μάζας Επαγωγικά Συζευγμένου Πλάσματος με κυψελίδα συγκρούσεων/αντίδρασης (ICP-MS, Thermo ICAP-Qc)

7.6 Προσδιορισμός ολικού οργανικού άνθρακα (TOC)

Για τον προσδιορισμό του ολικού οργανικού άνθρακα εφαρμόστηκε η μέθοδος της καταλυτικής οξειδωσης σε υψηλή θερμοκρασία (HTCO, High Temperature Catalytic Oxidation) και χρησιμοποιήθηκε ο αναλυτής διαλυτού οργανικού άνθρακα TOC-500A Shimadzu. Τα δείγματα οξυνίστηκαν με HCl 2 M σε pH<2 και στη συνέχεια διαβιβάστηκαν σε αυτά υπερκάθαρο οξυγόνο για περίπου 12 λεπτά ώστε να απομακρυνθεί πλήρως ο ανόργανος άνθρακας ως CO₂. Έπειτα, τα δείγματα διαβιβάζονται σε καταλύτη πληρωμένο με Pt-Al₂O₃ στους 680 °C. Με αυτή τη διαδικασία, ο οργανικός άνθρακας οξειδώνεται πλήρως, ενώ το διοξείδιο του άνθρακα που παράγεται μετράται σε ανιχνευτή IR^[121].

7.7 Προσδιορισμός ολικών σακχάρων στις μπίρες

Παρουσία φαινόλης οι υδατάνθρακες (απλά σάκχαρα, ολιγοσακχαρίτες, πολυσακχαρίτες και τα παράγωγά τους συμπεριλαμβανομένων των μεθυλαιθέρων με ελεύθερες αναγωγικές ομάδες) δίνουν σε όξινο περιβάλλον έντονο πορτοκαλοκίτρινο, σταθερό χρώμα, μετατρέπόμενοι σε φουρφουράλες^[122]. Η βασική αντίδραση που λαμβάνει χώρα περιλαμβάνει τη μετατροπή των σακχάρων (εξόζες) σε 5-υδροξυμέθυλο-2-φουραλδεΐδη (HMF) παρουσία ισχυρού οξέος και τον ακόλουθο σχηματισμό έγχρωμου χρωμογόνου μεταξύ φαινόλης και HMF^[123].

Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο UV διπλής δέσμης Cary-1E (Varian, Mulgrave, Australia).

Πειραματική διαδικασία

Σε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται προστίθενται 50 μL δείγματος και 5000 μL απεσταγμένου ύδατος. Έπειτα σε όλα τα δείγματα προστίθεται 1 mL διαλύματος φαινόλης 5% v/v και κατόπιν ανακίνησης σε αναδευτήρα vortex προστίθενται 5 mL πυκνού θειικού οξέος. Το διάλυμα ανακινείται κατά διαστήματα επί 30 min. Στη συνέχεια φωτομετρείται στα 485 nm ως προς το τυφλό διάλυμα αντιδραστηρίων σε κυψελίδα με μήκος οπτικής διαδρομής ίσο με 1 cm.

Τα χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια είναι τα εξής :

- Διάλυμα φαινόλης 5% v/v (Διαλύονται 50.0 g PhOH σε 1 L απεσταγμένου ύδατος και το διάλυμα ανακινείται καλά. Είναι σταθερό για μεγάλο χρονικό διάστημα).
- Πυκνό H₂SO₄ 95% p.a.

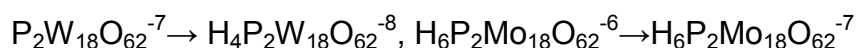
Για τον υπολογισμό της περιεκτικότητας των δειγμάτων σε ολικά σάκχαρα κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς με κατάλληλες αραιώσεις ενός πυκνού προτύπου διαλύματος γλυκόζης συγκέντρωσης 100 mg L⁻¹, το οποίο παρασκευάζεται με τη διάλυση σε νερό γλυκόζης που έχει απαλλαγεί από την υγρασία μέσω παραμονής σε ξηραντήρα κενού για 24h. Από το πυκνό διάλυμα παρασκευάζονται πρότυπα διαλύματα συγκέντρωσης 0.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0, 50.0, 1000.0 mg L⁻¹. Η καμπύλη αναφοράς χρησιμοποιείται στον υπολογισμό του περιεχομένου των δειγμάτων σε ολικά σάκχαρα.

Για κάθε δείγμα μπίρας που αναλύεται εκτελούνται ταυτόχρονα τα ακόλουθα τυφλά πειράματα που απαιτούνται για τη διόρθωση των αποτελεσμάτων ως προς τις παρεμποδίσεις λόγω αλληλεπίδρασης τόσο του θειικού οξέος με μη υδατανθρακικά συστατικά του δείγματος όσο και της φαινόλης με συστατικά της μπίρας. Όλα τα τυφλά έδωσαν τιμές κάτω από το μηδέν επομένως δεν έχουμε καμία επιβάρυνση από τα αντιδραστήρια και δεν χρειάζεται να αφαιρεθεί καμία τιμή τυφλού. Η συγκέντρωση των δειγμάτων σε ολικά σάκχαρα εκφράζεται σε g L⁻¹. Από την εξίσωση ευθείας που εξάγεται από την καμπύλη αναφοράς υπολογίζονται οι συγκεντρώσεις C των μετρηθέντων διαλυμάτων.

7.8 Προσδιορισμός του συνολικού φαινολικού περιεχομένου με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

Η μέθοδος βασίζεται σε οξειδοαναγωγική αντίδραση με την οποία προσδιορίζεται το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο χωρίς διάκριση μεταξύ μονομερών, διμερών και πολυμερών φαινολικών συστατικών. Το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu είναι διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφομολυβδαινικά και φωσφοβολφραμικά ετεροπολυμερή οξέα. Οξειδώνει τα φαινολικά ιόντα με ταυτόχρονη αναγωγή

των ετεροπολυμερών οξέων σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση, της οποίας δεν είναι γνωστή η στοιχειομετρία:



Το προϊόν είναι σύμπλοκο μολυβδαινίου-βολφραμίου (Mo-W) χαρακτηριστικής μπλε χρώσης που απορροφά στο ορατό (750 nm). Η αλκαλικότητα ρυθμίζεται με κορεσμένο διάλυμα Na_2CO_3 (20% w/v) που αφενός δε διαταράσσει την σταθερότητα του F-C και του προϊόντος της αντίδρασης, αφετέρου αποτελεί προϋπόθεση της παρουσίας των φαινολικών ιόντων.

Αναλυτική Πορεία

Σε ένα φιαλίδιο errendorf τοποθετούνται 790 μL απιονισμένου νερού και έπειτα 10 μL δείγματος αφυδατωμένης μπίρας, αναδιαλυμένου σε μεθανόλη, συγκέντρωσης 5 mg mL^{-1} ή καθαρής μεθανόλης για την παρασκευή του τυφλού δείγματος. Στη συνέχεια, προστίθενται 50 μL αντιδραστήριου F-C. Ακολουθεί ανάδευση, ενώ μετά το πέρας 1 min προστίθενται επίσης 150 μL κορεσμένου διαλύματος Na_2CO_3 (20% w/v). Το μίγμα ανακινείται εκ νέου και φυλάσσεται σε σκοτεινό μέρος, για 120 min, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το προϊόν της αντίδρασης φωτομετρείται στα 750 nm, με τη βοήθεια φασματοφωτομέτρου διπλής δέσμης, ως προς το λευκό δείγμα, ενώ κατασκευάζεται και πρότυπη καμπύλη αναφοράς με γαλλικό οξύ. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε mg ισοδυνάμων γαλλικού οξέος.

Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς

Παρασκευάζονται διαλύματα γαλλικού οξέος συγκεντρώσεων 25, 50, 100, 200, 400, 600, 800 mg L^{-1} . Ακολουθεί η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω. Οι μετρήσεις χρησιμοποιούνται για το σχεδιασμό διαγράμματος $\psi=f(x)$, όπου x η ποσότητα του γαλλικού οξέος (GA) σε mg L^{-1} και ψ η απορρόφηση στα 750 nm.

7.8.1 Ταξινόμηση και προσδιορισμός φαινολικού περιεχομένου

Ο προσδιορισμός των διαφορετικών κατηγοριών φαινολικών συστατικών έγινε σύμφωνα με τον Obied et al. [125].

Αναλυτική Πορεία

Σε φιαλίδιο erpendorf αναμιγνύονται 25 μL δείγματος μπύρας με 75 $\mu\text{L H}_2\text{O}$, με 100 μL διαλύματος υδροχλωρίου-αιθανόλης (1:1000) και 800 μL διαλύματος υδροχλωρίου-νερού (1:50). Μετά την ανάμιξη, μετρήθηκε η απορρόφηση στα 280, 360 και 520 nm για να προσδιοριστεί η συνολική περιεκτικότητα σε φαινόλες, παράγωγα υδροξυκινναμωμικού οξέος, φλαβονόλες και ανθοκυανίνες, αντίστοιχα. Δύο τυφλά δείγματα παρασκευάστηκαν το ένα με ανάμειξη 100 μL μεθανόλης, 100 μL διαλύματος υδροχλωρίου-αιθανόλης (1:1000) και 800 μL διαλύματος υδροχλωρίου-νερού (1:50) και το δεύτερο με ανάμειξη 200 μL διαλύματος υδροχλωρίου-αιθανόλης (1:1000) και 800 μL διαλύματος υδροχλωρίου-νερού (1:50).

Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς

Οι πρότυπες καμπύλες για τους παραπάνω προσδιορισμούς παρασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας διαλύματα σε μεθανόλη του γαλλικού οξέος (25, 50, 75, 100, 150 mg L^{-1}), της κερκετίνης (25, 50, 75, 100, 150 mg L^{-1}) και του 3-Ο-γλυκοζίτης της κυανιδίνης (40, 80, 160, 200, 300 ng mL^{-1}), αντίστοιχα.

7.8.2 Συνολικό περιεχόμενο σε φλαβονειδή

Αρχή της Μεθόδου

Το συνολικό περιεχόμενο σε φλαβονειδή σε επιλεγμένες ελληνικές μπύρες προσδιορίστηκε σύμφωνα με τη φασματοσκοπική μέθοδο χλωριούχου αλουμινίου η οποία περιγράφεται από το Zhishen et al^[124], με μια μικρή τροποποίηση. Σε ένα φιαλίδιο erpendorf αναμιγνύονται 25 μL μπύρας με 300 μL διαλύματος αιθανόλης-νερού (50:50 v/v). Έπειτα προστίθεται 30 μL διαλύματος NaNO_2 5%. Μέτα την επώαση του παραπάνω διαλύματος σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά, προστίθεται 150 μL διαλύματος εξαένυδρου χλωριούχου αργιλίου ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 2% v/v. Αφήνεται ξανά να επωαστεί το διάλυμα σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και στη συνέχεια προστίθενται 200 μL από 1 mol L^{-1} υδροξείδιο του νατρίου (NaOH). Το παραπάνω διάλυμα αραιώθηκε με διάλυμα αιθανόλης-νερού (50:50 v/v) μέχρι

τη χαραγή. Η απορρόφηση του μίγματος μετρήθηκε στα 360 nm με τυφλό αιθανόλης-νερού στο φασματοφωτόμετρο.

Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς

Η κατεχίνη επιλέχθηκε ως πρότυπο και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε ισοδύναμα χιλιοστόγραμμα κατεχίνης ανά λίτρο μπύρας (mg Cat L^{-1}). Τα επίπεδα των ολικής φλαβονοειδών στη μπύρα προσδιορίστηκαν εις τριπλούν.

7.9 Αντιοξειδωτικές δοκιμές

7.9.1 Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας βασιζόμενη στη δέσμευση της 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλο-υδράζυλο ελεύθερης ρίζας (DPPH•)

Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα των αντιοξειδωτικών ουσιών να δεσμεύουν την ελεύθερη ρίζα DPPH•. Η δέσμευση αυτής της σταθερής ελεύθερης ρίζας έχει ως αποτέλεσμα το διάλυμα να αποχρωματίζεται. Η ελάττωση της απορρόφησης μετράται στα 515 nm, με τη βοήθεια φασματοφωτομέτρου διπλής δέσμης.

Αναλυτική Πορεία

Σε φιαλίδια erpendorf προστίθενται 25 μL δείγματος– αφυδατωμένης μπύρας, αναδιαλυμένης σε μεθανόλη, συγκέντρωσης 1 mg mL^{-1} ή μεθανόλης για το λευκό προσδιορισμό και 975 μL DPPH• [Διάλυμα DPPH• σε MeOH (3.9 mg σε 100 mL)]. Ακολουθεί ανάδευση και αφήνονται σε σκοτεινό μέρος για 30 min. Η απορρόφηση μετράται σε $t=0$ min και $t=30$ min στα 515 nm. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mg ισοδύναμα Trolox (ανάλογο της βιταμίνης E) μέσω της πρότυπης καμπύλης.

Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς

Παρασκευάζονται διαλύματα Trolox συγκεντρώσεων 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.2, 1.4, 1.6 mM. Ακολουθεί η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω. Οι μετρήσεις χρησιμοποιούνται για το σχεδιασμό διαγράμματος $\psi=f(x)$, όπου x η ποσότητα του Trolox σε mM και ψ η $\% \Delta A_{515}$, όπου:

$$\% \Delta A_{515} = [(A_{515}^0 - A_{515}^{30}) / A_{515}^0] \times 100$$

7.9.2 Προσδιορισμός αναγωγικής ικανότητας μέσω αναγωγής του Fe^{+3} σε Fe^{+2} (FRAP)

Η δοκιμή FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) μετρά την αντιοξειδωτική δράση όλων των συστατικών του διαλύματος της αντίδρασης που μπορούν να δράσουν αναγωγικά, μετρώντας την αναγωγική τους δύναμη. Η δοκιμή FRAP βασίζεται στη δυνατότητα των συστατικών του δείγματος να ανάγουν το σύμπλοκο TPTZ-Fe(III) σε έγχρωμο (μπλε) σύμπλοκο TPTZ-Fe(II).

Αναλυτική Πορεία

Σε ένα φιαλίδιο erpendorf αναμιγνύονται 50 μL διαλύματος αφυδατωμένου ροφήματος αναδιαλυμένου σε μεθανόλη συγκεντρώσεως 1 mg mL^{-1} , με 50 μL FeCl_3 (3 mM σε 5 mM HCl) ή 50 μL απιονισμένο νερό για την παρασκευή του τυφλού δείγματος. Ακολουθεί καλή ανάδευση και το μίγμα αφήνεται να αντιδράσει για 30 min σε υδατόλουτρο στους 37°C . Στη συνέχεια, προστίθενται 900 μL διαλύματος TPTZ (2,4,6-τριπυριδυλο-s-τριαζίνη, 1 mM σε 0.05 M HCl) και ακολουθεί ανάδευση. Ο Fe^{+2} που έχει προκύψει δημιουργεί έγχρωμο (μπλε) σύμπλοκο με το TPTZ. Το δείγμα παραμένει για 10 min στο σκοτάδι και ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης στα 620nm, με τη βοήθεια φασματοφωτομέτρου διπλής δέσμης. Παράλληλα κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς βιταμίνης C (η βιταμίνη C ανάγει το Fe^{+3} σε Fe^{+2}) και τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ισοδύναμα ασκορβικού οξέος.

Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς

Παρασκευάζονται διαλύματα ασκορβικού οξέος συγκεντρώσεων 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mM. Ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω. Οι μετρήσεις χρησιμοποιούνται για το σχεδιασμό διαγράμματος $\psi=f(x)$, όπου x η ποσότητα του ασκορβικού οξέος (AAE) σε mM και ψ η απορρόφηση στα 620 nm

7.9.3 Μελέτη της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας των δειγμάτων μπίρας στις λιποπρωτεΐνες ορού αίματος

Αρχή της Μεθόδου

Το διάλυμα του θειικού χαλκού προκαλεί οξείδωση των λιποπρωτεϊνών στον ορό. Η ανίχνευσή τους γίνεται με φωτομέτρηση στα 245nm. Καταγράφεται φωτομετρικά η χρονική εξέλιξη της αντίδρασης και το τελικό αποτέλεσμα εκφράζεται ως χρόνος αντίστασης του ορού στην οξείδωση λόγω της δράσης των συστατικών των διαλυτοποιημένων ζύθων στον ορό (Lag Time).

Αναλυτική Πορεία

Αρχικά παρασκευάζουμε το μητρικό διάλυμα CuSO_4 συγκέντρωσης 20 mM. Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμη φιάλη σε θερμοκρασία δωματίου. Σε επόμενο στάδιο, παρασκευάζεται το διάλυμα εργασίας CuSO_4 συγκέντρωσης 200 μM με αραιώση 1:100 του μητρικού διαλύματος CuSO_4 με dH_2O . Ακολούθως, παρασκευάζεται το μίγμα από το διάλυμα εργασίας CuSO_4 και το ρυθμιστικό διάλυμα PBS με τελική συγκέντρωση 10 μM (αραιώση 1:20). Γίνεται αραιώση του ορού (1:12) με διάλυμα PBS. Οι δόσεις που παρασκευάστηκαν και μελετήθηκαν από τα πυκνά διαλύματα των αφεψημάτων ήταν: 2.5, 5, 10, 20, 50, 250, 500, 750, 1000 ng.

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι κοινή και για όλα τα δείγματα μπίρας. Αρχικά, τοποθετούνται στο ειδικό UV 96-wellplate τα 20 μL από το αραιωμένο δείγμα ορού. Έπειτα, τοποθετείται το 1 μL από τα αναδιαλυμένα δείγματα μπίρας και τέλος, προστίθενται τα 230 μL το μίγματος CuSO_4 και PBS. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται μέτρηση της απορρόφησης στο Elisa Reader για 4 τουλάχιστον ώρες (μετρήσεις λαμβάνονται κάθε 2 λεπτά) και σε τελικό στάδιο λαμβάνουμε γραφήματα από τα οποία προκύπτει η μέτρηση του Lag Time (χρόνος αντίστασης ορού στην οξείδωση).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

8.1 Συμπλεκτική ικανότητα ιόντων χαλκού και σταθερά σχηματισμού συμπλόκων

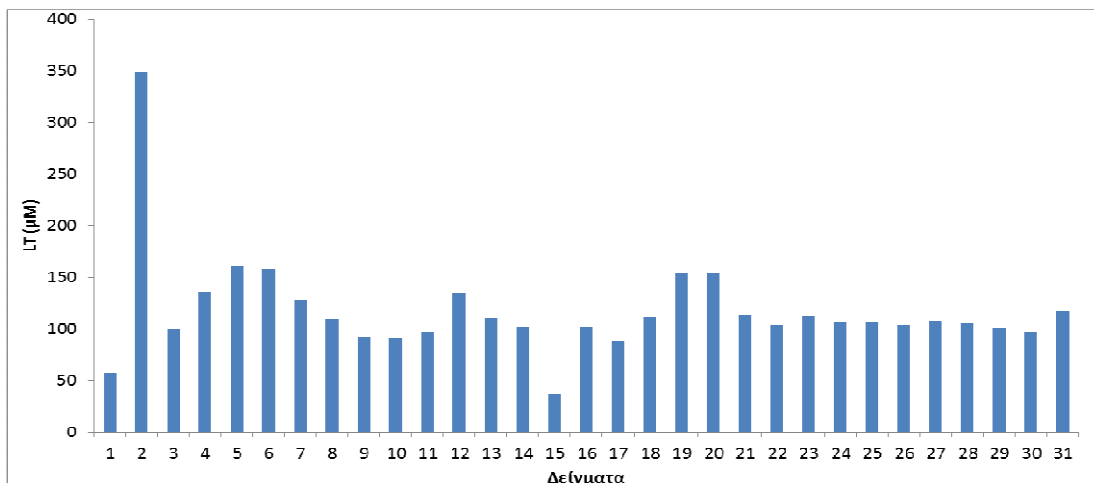
Οι συγκεντρώσεις της L_T παρουσιάζουν σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των διαφόρων ελληνικών ζύθων που μελετήθηκαν με διακύμανση των τιμών από 37.07 έως 348.4 μM . Η υψηλότερη συγκέντρωση συμπλεκτικής ικανότητας ως προς τα ιόντα χαλκού προσδιορίστηκε στο Δείγμα No 2 (348 μM) και η χαμηλότερη στο Δείγμα No 15 (37.07 μM) (πίνακας 8.1, σχήμα 8.1).

Όσον αφορά τη σταθερά σχηματισμού των συμπλόκων χαλκού ($\log K$), οι τιμές της εμφάνισαν σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των δειγμάτων μπύρας, με την τιμή του λογαρίθμου της να κυμαίνεται από 7.01 έως 9.0. Η μέγιστη τιμή της σταθεράς σχηματισμού προσδιορίστηκε στο Δείγμα No 31 και η χαμηλότερη στο Δείγμα No 2 (πίνακας 8.1, σχήμα 8.2).

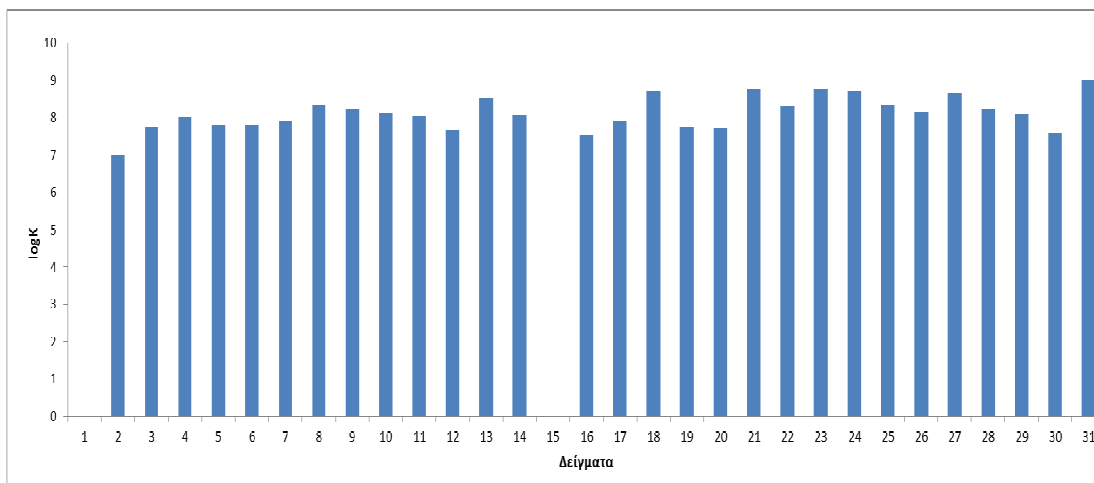
Πίνακας 8.1 Συγκεντρώσεις συμπλεκτικής ικανότητας ιόντων Cu (L_T) και τιμές σταθερών σχηματισμού συμπλόκων Cu ($\log K$)

Δείγμα No	L_T (μM)	$\log K$
1	57.5	δεν υπολογίζεται
2	348	7.01
3	99.6	7.73
4	136	8.03
5	162	7.80
6	158	7.80
7	128	7.93
8	110	8.33
9	93.0	8.25
10	91.0	8.13

Δείγμα Νο	L_T (μM)	$\log K$
11	97.3	8.05
12	134	7.68
13	111	8.52
14	102	8.07
15	37.1	δεν υπολογίζεται
16	102	7.53
17	88.8	7.9
18	112	8.72
19	155	7.74
20	154	7.71
21	114	8.76
22	104	8.30
23	113	8.77
24	107	8.72
25	107	8.34
26	104	8.14
27	108	8.68
28	105	8.24
29	101	8.11
30	96.7	7.59
31	118	9.00



Σχήμα 8.1 : Συμπλεκτική ικανότητα ιόντων χαλκού (L_T) των δειγμάτων



Σχήμα 8.2 : Λογάριθμος της σταθεράς σχηματισμού $\log K$ των δειγμάτων

8.2 Προσδιορισμός ολικού χαλκού στις μπύρες

Οι συγκεντρώσεις ολικού χαλκού διέφεραν αρκετά μεταξύ των τριανταένα δειγμάτων ελληνικής μπύρας που μελετήθηκαν, με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση να καταγράφεται στο Δείγμα Νο 30 ($766.8 \mu\text{g L}^{-1}$) και τη μικρότερη στο Δείγμα Νο 23 ($25.9 \mu\text{g L}^{-1}$) (Πίνακας 8.2, Σχήμα 8.3).

Πίνακας 8.2 Συγκεντρώσεις ολικού χαλκού

Δείγμα	TCu (μM)	TCu ($\mu\text{g L}^{-1}$)
1	0.22	13.8
2	0.81	51.4
3	0.36	23.1
4	<LOD	<LOD
5	0.02	1.0
6	0.36	22.8
7	0.05	3.4
8	0.68	43.4
9	1.44	91.6
10	1.28	81.2
11	1.37	87.0
12	0.08	5.4
13	0.65	41.0
14	0.44	27.7
15	0.54	34.4
16	<LOD	<LOD
17	1.09	69.3
18	1.19	75.8
19	1.21	77.1
20	0.93	59.4
21	0.30	19.3
22	0.23	14.4
23	<LOD	<LOD
24	0.07	4.3

Δείγμα	TCu (μM)	TCu ($\mu\text{g L}^{-1}$)
25	0.70	44.5
26	0.33	21.1
27	<LOD	<LOD
28	0.28	17.9
29	0.79	49.9
30	11.38	723.1
31	0.92	58.4

*LOD=1 $\mu\text{g L}^{-1}$

Το γεγονός ότι σε κανένα από τα δείγματα των ζύθων που εξετάστηκαν οι συγκεντρώσεις του ολικού χαλκού δεν υπερβαίνουν αυτές της L_T αποδεικνύει ότι ο χαλκός που εμπεριέχεται στους ζύθους είναι πλήρως συμπλεγμένος.

8.3 Προσδιορισμός οργανικού άνθρακα στις μπύρες

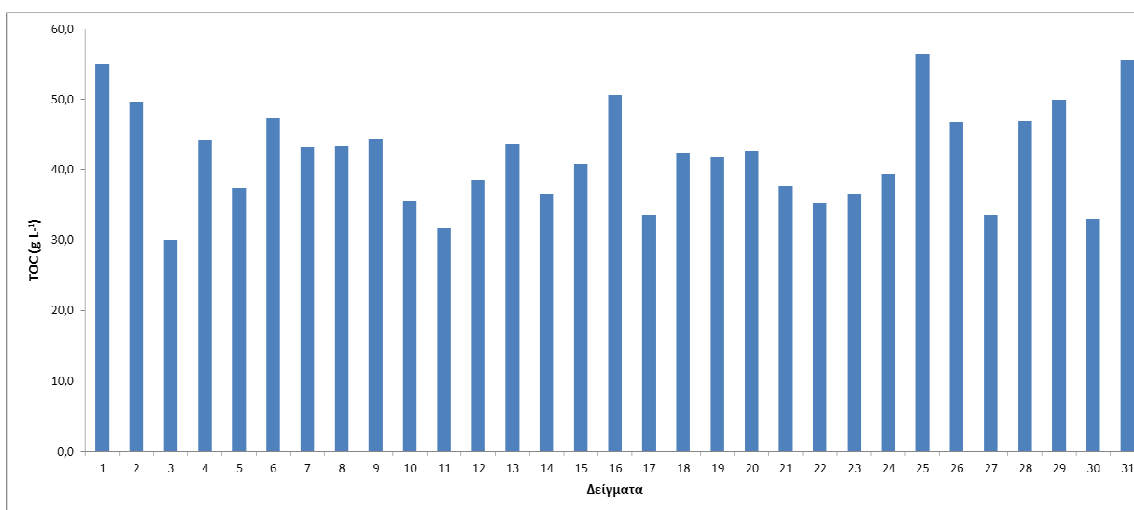
Οι συγκεντρώσεις του ολικού οργανικού άνθρακα στα δείγματα των ζύθων παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.3. Οι τιμές κυμαίνονται από 30.0 έως 56.5 g L^{-1} . Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις προσδιορίστηκαν στο Δείγμα No 25 με συγκέντρωση 56.5 g L^{-1} και στο Δείγμα No 31 με συγκέντρωση 55.6 g L^{-1} και οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις προσδιορίστηκαν στο Δείγμα No 1 με συγκέντρωση 31.6 g L^{-1} και στο Δείγμα No 3 με συγκέντρωση 30.0 g L^{-1} .

Πίνακας 8.3 Συγκεντρώσεις TOC (g L^{-1}).

Δείγμα No	TOC (g L^{-1})
1	55.1
2	49.6
3	30.0
4	44.3
5	37.4

Δείγμα Νο	TOC (g L⁻¹)
6	47.4
7	43.3
8	43.4
9	44.4
10	35.5
11	31.6
12	38.5
13	43.7
14	36.6
15	40.7
16	50.6
17	33.5
18	42.3
19	41.7
20	42.6
21	37.7
22	35.3
23	36.6
24	39.4
25	56.5

Δείγμα Νο	TOC (g L ⁻¹)
26	46.8
27	33.6
28	47.0
29	49.9
30	33.1
31	55.6



Σχήμα 8.3 Συγκέντρωση ολικού οργανικού άνθρακα στις μπίρες

8.4 Προσδιορισμός ολικών σακχάρων στις μπίρες

Η συγκέντρωση των ολικών σακχάρων στις μπίρες κυμαίνεται από 0.82 έως 9.24 g L⁻¹. Η μικρότερη συγκέντρωση σακχάρων μετρήθηκε στο Δείγμα Νο 3 και η μεγαλύτερη στο Δείγμα Νο 24. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα. (Πίνακας 8.4).

Πίνακας 8.4 Συγκέντρωση ολικών σακχάρων στις μύρες

Δείγμα No	CHOs (g L⁻¹)	%CHOs/OC
1	1.18	2.14
2	1.43	2.88
3	0.84	2.73
4	1.62	3.61
5	0.99	2.65
6	1.78	3.76
7	1.31	3.04
8	2.91	6,70
9	1.74	3,91
10	1.40	3.96
11	1.16	3.68
12	1.20	3.12
13	4.97	11.4
14	7.03	19.2
15	3.84	9.43
16	6.35	12.6
17	1.96	5.85
18	5.80	13.7
19	1.72	4.13
20	4.84	11.4
21	6.67	17.7
22	4.52	12.8

Δείγμα No	CHOs (g L ⁻¹)	%CHOs/OC
23	3.74	10.2
24	9.24	23.4
25	6.52	11.5
26	2.17	4.63
27	1.08	3.21
28	6.42	13.7
29	4.00	8.01
30	0.88	2.66
31	6.68	12.0

Στον πίνακα 8.4 φαίνεται επίσης το % ποσοστό των σακχάρων ως προς τον ολικό οργανικό άνθρακα (%CHOs/OC). Το μεγαλύτερο ποσοστό αντιστοιχεί στο Δείγμα No 24 και στο Δείγμα No 14, με τιμές 23.4 και 19.2 %, αντίστοιχα και το μικρότερο στο Δείγμα No 5 και στο Δείγμα No 1 με τιμές 2.65 και 2.14 %, αντίστοιχα.

Παρατηρείται λοιπόν σύμφωνα και με τα όσα έχουν αναφερθεί στην § 3.8 για τα σάκχαρα στις μπίρες ότι η περιεκτικότητά τους σχεδόν συμβαδίζει με τη βιβλιογραφία που υπάρχει. Στον πίνακα 3.2 φαίνεται ότι το σύνολο των σακχάρων κυμαίνεται από 0 έως 11 g L⁻¹ όπως περίπου κυμαίνεται και η περιεκτικότητα σε σάκχαρα και στα δείγματα μπίρας που έχουν μελετηθεί σε αυτή τη διπλωματική εργασία (0.82 έως 9.24 g L⁻¹).

8.5 Συνολικό φαινολικό περιεχόμενο (μέθοδος Folin- Ciocalteu)

Το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο των ελληνικών ζύθων που εξετάστηκαν κυμαίνεται από 196 έως 783 mg GAE L⁻¹. Η μπίρα με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση φαινολικού περιεχομένου βρέθηκε να είναι στο Δείγμα No 1 με συγκέντρωση 783 mg GAE L⁻¹, ακολουθούμενη από το Δείγμα No 14, με

συγκέντρωση 634 mg GAE L⁻¹. Σχετικά χαμηλή συγκέντρωση σε φαιολικό περιεχόμενο σε σχέση με τις υπόλοιπες μπίρες περιείχε το Δείγμα Νο 3 με συγκέντρωση 196 mg GAE L⁻¹ (Πίνακας 8.5).

Πίνακας 8.5 Συνολικό φαιολικό περιεχόμενο των ελληνικών ζύθων, εκφρασμένο σε mg ισοδύναμων γαλλικού οξέος (GAE) ανά λίτρο

Δείγμα Νο	mg GAE L⁻¹ ± Τυπική απόκλιση
1	783 ± 134
2	518 ± 8
3	196 ± 19
4	235 ± 41
5	249 ± 31
6	346 ± 26
7	232 ± 27
8	284 ± 20
9	335 ± 10
10	337 ± 21
11	343 ± 47
12	304 ± 23
13	495 ± 21
14	634 ± 101
15	498 ± 87
16	530 ± 6
17	338 ± 9
18	523 ± 23
19	218 ± 5
20	300 ± 27
21	286 ± 28

Δείγμα Νο	mg GAE L ⁻¹ ± Τυπική απόκλιση
22	216 ± 24
23	291 ± 1
24	299 ± 26
25	436 ± 30
26	278 ± 14
27	211 ± 9
28	552 ± 48
29	346 ± 14
30	286 ± 19
31	393 ± 54

8.6 Αντιοξειδωτική δράση

Εξετάσθηκε η ικανότητα των ζύθων από μικρές ελληνικές ζυθοποιίες να δρουν ως φυσικά αντιοξειδωτικά, μελετώντας την ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH• και της αναγωγής του Fe³⁺ σε Fe²⁺. Το Δείγμα Νο 1 παρουσιάζει τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση (μέση συγκέντρωση eq. Trolox και eq. Ascorbic acid 406.68 mg L⁻¹ και αντίστοιχα 138.32 mg L⁻¹ ενώ το Δείγμα Νο 21 και το Δείγμα Νο 4 παρουσιάζουν μικρότερη αντιοξειδωτική δράση τόσο ως προς την ικανότητά τους να δεσμεύουν την ελεύθερη ρίζα DPPH• όσο και ως προς την αναγωγική τους δύναμη (91.98 mg TE L⁻¹ και 40.46 mg AAE L⁻¹ για τη το Δείγμα Νο 21 και 60.24 mg TE L⁻¹ και 28.59 mg AAE L⁻¹ για το Δείγμα Νο 4). Αναλυτικά αποτελέσματα για όλες τις μπύρες παρατίθενται στον Πίνακα 8.6.

Πίνακας 8.6 Ικανότητα των ζύθων να δεσμεύουν την ελεύθερη ρίζα DPPH·, (εκφρασμένη σε mg ισοδύναμων Trolox (TE) ανά λίτρο) και αναγωγική δύναμη αυτών (εκφρασμένη σε mg ισοδύναμων ασκορβικού οξέος AAE ανά λίτρο).

Δείγμα Νο	mg TE L ⁻¹ ± Τυπική απόκλιση	mg AAE L ⁻¹ ± Τυπική απόκλιση
1	407 ± 2	138 ± 3
2	336 ± 9	82.7 ± 2.1
3	127 ± 8	48.9 ± 15.9
4	60.2 ± 6.2	28.6 ± 1.7
5	176 ± 15	57.3 ± 6.3
6	253 ± 19	65.9 ± 2.2
7	137 ± 5	48.3 ± 5.0
8	184 ± 1	58.5 ± 5.6
9	178 ± 12	64.5 ± 3.4
10	195 ± 19	51.1 ± 4.9
11	189 ± 10	49.4 ± 7.6
12	242 ± 12	65.8 ± 6.8
13	253 ± 11	88.9 ± 8.4
14	300 ± 8	97.3 ± 10.7
15	290 ± 9	83.0 ± 9.4
16	354 ± 14	93.6 ± 7.5
17	234 ± 16	66.8 ± 5.0
18	305 ± 3	90.5 ± 6.9
19	192 ± 6	71.2 ± 6.5
20	190 ± 8	77.9 ± 6.6
21	92.0 ± 3.1	40.5 ± 0.7
22	129 ± 2	44.6 ± 6.8

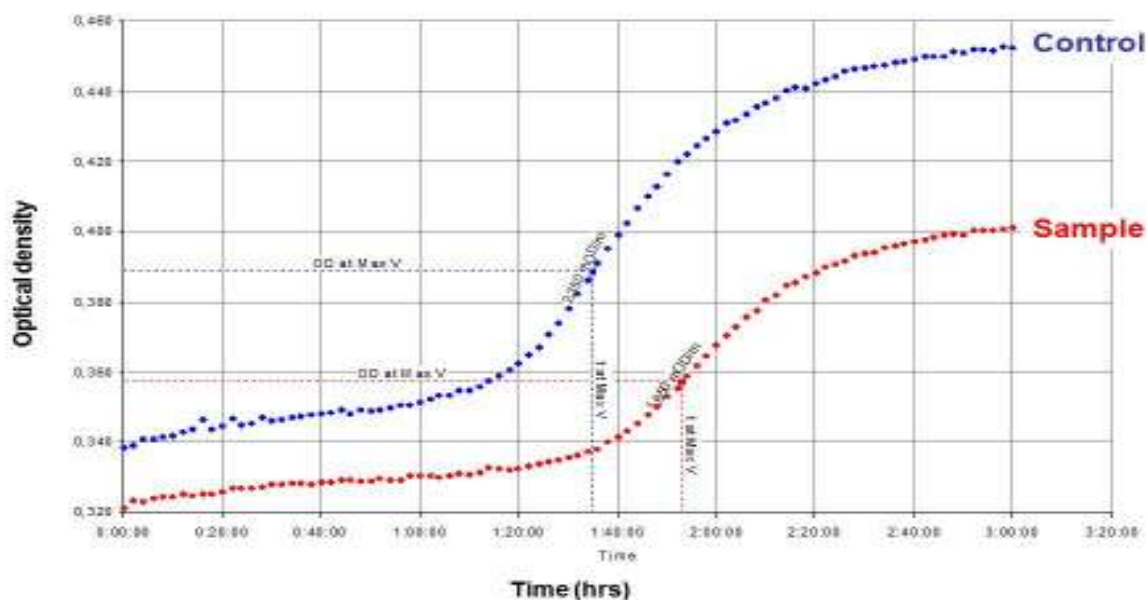
Δείγμα No	mg TE L ⁻¹ ± Τυπική απόκλιση	mg AAE L ⁻¹ ± Τυπική απόκλιση
23	190 ± 6	55.1 ± 7.4
24	184 ± 5	75.6 ± 11.9
25	325 ± 7	84.9 ± 8.8
26	105 ± 4	55.4 ± 8.3
27	120 ± 7	41.9 ± 4.2
28	385 ± 8	89.5 ± 10.9
29	251 ± 6	70.0 ± 9.8
30	197 ± 12	51.7 ± 4.8
31	296 ± 4	69.3 ± 11.3

Όσον αφορά στον προσδιορισμό του χρόνου αντίστασης του ορού του αίματος στην οξειδωση, οι μπύρες έδωσαν ικανοποιητικά αποτελέσματα. Η οξειδωση της LDL παρακολουθήθηκε με συνεχή μέτρηση των παραγόμενων συζυγών διενίων (conjugated diene lipid hydroperoxides, CD) στα 245nm. Η χρονική πορεία της οξειδωσης της LDL παρουσίασε μία φάση κατά την οποία δεν επήλθε οξειδωση (lag phase-time, χρονική υστέρηση), ακολουθούμενη από μία αύξηση της απορρόφησης, λόγω του σχηματισμού CD (propagation phase). Η αντίσταση της LDL στην οξειδωση υπολογίστηκε σε αντιστοιχία με τη διάρκεια της lag phase και το ρυθμό παραγωγής CD κατά την propagation phase. Υψηλότερο χρόνο αντίστασης στην οξειδωση παρουσίασε ο ορός που περιείχε το Δείγμα No 14 (5417 sec) και ακολούθησε εκείνος με το Δείγμα No 1 (4070 sec). Μηδενικό χρόνο αντίστασης στην οξειδωση παρουσίασε ο ορός που περιείχε το Δείγμα No 3, το Δείγμα No 17 και το Δείγμα No 20. (Πίνακας 8.7, Σχήμα 8.4).

Πίνακας 8.7 Χρόνος αντίστασης του ορού αίματος στην οξείδωση (σε sec)

Δείγμα Νο	Lag time (sec)
1	4070
2	2434
3	1911
4	1432
5	0
6	2603
7	686
8	3195
9	1313
9	526
10	211
11	1141
12	2347
13	5417
14	1845
15	971
16	2246
18	2952
19	0
20	1813
21	1172
22	0
23	1106
24	938

Δείγμα No	Lag time (sec)
25	3840
26	90
27	531
28	1244
29	521
30	3398
31	74



Σχήμα 8.4 Κινητική μελέτη της παραγωγής συζυγών διενίων κατά τη διάρκεια της οξειδωσης λιποπρωτεϊνών ανθρώπινου ορού από Cu^{+2} , χωρίς (Control) και με την παρουσία δείγματος μύρας (Sample).

8.7 Συνολικό περιεχόμενο σε φλαβονοειδή

Το συνολικό περιεχόμενο σε φλαβονοειδή των ελληνικών ζύθων που εξετάστηκαν κυμαίνεται από 31.5 έως 408.4 mg Cat L^{-1} . Η μύρα με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση σε φλαβονοειδή βρέθηκε να είναι το Δείγμα No 1 (408.4 mg Cat L^{-1}), ακολουθούμενη από το Δείγμα No 14 (220.5 mg Cat L^{-1}).

Σχετικά χαμηλή συγκέντρωση σε φλαβονοειδή σε σχέση με τις υπόλοιπες μπίρες περιείχε το Δείγμα Νο 4 (31.5 mg Cat L⁻¹). Αναλυτικά τα αποτελέσματα παρατίθενται στον Πίνακα 8.8.

Πίνακας 8.8 Συνολικό περιεχόμενο σε φλαβονοειδή

Δείγμα Νο	mg Cat L⁻¹ ± Τυπική απόκλιση
1	408 ± 42
2	123 ± 14
3	40.0 ± 7.1
4	31.5 ± 5.7
5	77.6 ± 14.2
6	130 ± 24
7	55.0 ± 4.2
8	60.1 ± 3.5
9	145 ± 21
10	98.9 ± 13.2
11	76.3 ± 1.8
12	113 ± 24.8
13	149 ± 9
14	220 ± 7
15	133 ± 28
16	145 ± 7
17	139 ± 2
18	106 ± 18
19	101 ± 9
20	150 ± 21
21	51.5 ± 8.5

Δείγμα Νο	mg Cat L ⁻¹ ± Τυπική απόκλιση
22	56.3 ± 12.4
23	75.1 ± 7.1
24	109 ± 19
25	159 ± 34
26	45.0 ± 3.5
27	53.8 ± 5.3
28	217 ± 30
29	128 ± 11
30	60.1 ± 7.1
31	133 ± 3

8.8 Ταξινόμηση και προσδιορισμός φαινολικού περιεχομένου

Έγινε προσδιορισμός των ανθοκυανίνων, των υδροξυκιναμικών οξέων και των φλαβονολών. Όσο αφορά την περιεκτικότητα σε ανθοκυανίνες η μεγαλύτερη συγκέντρωση προσδιορίστηκε στο Δείγμα Νο 1 (146 μg CyGlcE L⁻¹) ακολουθούμενη από το Δείγμα Νο 14 (127.0 μg CyGlcE L⁻¹). Η μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε υδροξυκιναμικά οξέα προσδιορίστηκε στο Δείγμα Νο 1 (190 mg GAE L⁻¹), ακολουθούμενη από το Δείγμα Νο 25 (112.1 mg GAE L⁻¹) και η χαμηλότερη συγκέντρωση προσδιορίστηκε στο Δείγμα Νο 7 (28.1 mg GAE L⁻¹). Τέλος η μεγαλύτερη συγκέντρωση σε φλαβονόλες προσδιορίστηκε στο Δείγμα Νο 1 (57.24 mg Quercetine L⁻¹) ακολουθούμενη από το Δείγμα Νο 25 (24.20 mg Quercetine L⁻¹) και η χαμηλότερη συγκέντρωση προσδιορίστηκε στο Δείγμα Νο 5 (5.11 mg Quercetine L⁻¹). Αναλυτικά τα αποτελέσματα παρατίθενται στον Πίνακα 8.9.

Πίνακας 8.9 Ταξινόμηση και προσδιορισμός φαινολικού περιεχομένου

Δείγμα Νο	Ανθοκυανίνες ($\mu\text{g GyGlcE L}^{-1}$)	Υδροξυκιναμικά οξέα (mg GAE L^{-1}) \pm Τυπική απόκλιση	Φλαβονόλες ($\text{mg Quercetine L}^{-1}$) \pm Τυπική απόκλιση
1	486	59.3 \pm 3.3	57.2 \pm 6.5
2	3.10	17.9 \pm 0.6	11.9 \pm 1.1
3	<0.4	7.76 \pm 0.91	5.42 \pm 1.49
4	<0.4	6.90 \pm 0.53	5.23 \pm 1.22
5	<0.4	6.76 \pm 0.84	5.11 \pm 1.39
6	27.9	12.7 \pm 1.1	8.42 \pm 1.79
7	<0.4	6.68 \pm 0.63	5.53 \pm 1.33
8	<0.4	9.17 \pm 0.84	6.76 \pm 1.59
9	121	20.9 \pm 1.0	20.2 \pm 2.3
10	58.9	18.8 \pm 0.1	16.4 \pm 1.0
11	27.9	10.5 \pm 0.9	7.39 \pm 1.98
12	9.30	11.7 \pm 1.1	8.60 \pm 1.89
13	9.30	17.3 \pm 1.2	11.6 \pm 2.0
14	127	27.5 \pm 1.4	22.7 \pm 3.0
15	58.9	24.5 \pm 1.8	18.0 \pm 3.0
16	<0.4	20.1 \pm 1.3	13.0 \pm 1.5
17	71.3	17.3 \pm 1.0	15.5 \pm 2.1
18	52.7	31.7 \pm 1.9	21.7 \pm 2.7
19	<0.4	8.87 \pm 0.94	6.00 \pm 1.45
20	83.6	17.8 \pm 1.3	17.0 \pm 2.3
21	<0.4	9.69 \pm 0.85	7.00 \pm 1.43
22	27.9	10.6 \pm 1.3	7.38 \pm 1.80
23	<0.4	10.9 \pm 0.3	7.83 \pm 0.63

Δείγμα Νο	Ανθοκυανίνες ($\mu\text{g GyGlcE L}^{-1}$)	Υδροξυκιναμικά οξέα (mg GAE L^{-1}) \pm Τυπική απόκλιση	Φλαβονόλες ($\text{mg Quercetine L}^{-1}$) \pm Τυπική απόκλιση
24	<0.4	13.2 \pm 1.1	8.78 \pm 1.64
25	27.9	31.0 \pm 7.5	24.2 \pm 8.9
26	<0.4	12.8 \pm 0.8	8.71 \pm 1.38
27	<0.4	7.50 \pm 0.54	6.01 \pm 1.02
28	46.5	23.3 \pm 1.5	16.3 \pm 2.2
29	52.7	19.4 \pm 1.6	14.7 \pm 2.4
30	<0.4	9.39 \pm 1.26	6.34 \pm 1.6
31	15.5	17.4 \pm 1.5	12.0 \pm 1.4

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σχετικά με την ικανότητα των δειγμάτων μπύρας να επιδεικνύουν αντιοξειδωτική δράση, έγιναν οι παρακάτω συσχετίσεις που παρατίθενται στον Πίνακα 9.1. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με χρήση του λογισμικού Statgraphics Centurion XVI (Statpoint Technologies Inc., Warrenton, VA) και περιλαμβάνει (α) ανάλυση απλής παλινδρόμησης (simple regression analysis) και (β) εφαρμογή ιεραρχικής ανάλυσης ομαδοποίησης (cluster analysis) για τον προσδιορισμό των ομοιοτήτων μεταξύ των δειγμάτων. Η ανάλυση συστάδων ή clustering είναι η οργάνωση των δειγμάτων-δεδομένων σε συστάδες (clusters), με βάση κάποιο κριτήριο ομοιότητας. Στοιχεία που ανήκουν στην ίδια ομάδα, παρουσιάζουν μεγαλύτερη ομοιότητα από στοιχεία που ανήκουν σε διαφορετικές ομάδες (Εικόνες 9.1, 9.2).

Από τον παρακάτω πίνακα φαίνεται ότι υπάρχει καλή συσχέτιση μεταξύ του συνολικού φαινολικού περιεχομένου και της αντιοξειδωτικής ικανότητας της μπύρας. Πιο συγκεκριμένα, ο συντελεστής γραμμικής συσχέτισης R ισούται με 0.874 και 0.914 μεταξύ του συνολικού φαινολικού περιεχομένου, της ικανότητας δέσμευσης της DPPH και της αναγωγικής δύναμης αντίστοιχα.

Επίσης από τον παραπάνω πίνακα δεν φαίνεται να υπάρχει καμία συσχέτιση μεταξύ της συμπλεκτικής ικανότητας του χαλκού L_T και της αναγωγικής δράσης (FRAP), του συνολικού φαινολικού περιεχομένου, της ικανότητας δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας του DPPH, του συνολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή και του χρόνου αντίστασης του ορού αίματος στην οξειδωση αφού ο συντελεστής γραμμικής συσχέτισης R είναι ίσος με -0.060, -0.078, 0.038, -0.170 και -0.060 αντίστοιχα.

Επίσης δεν παρατηρήθηκε καμία συσχέτιση μεταξύ της συνολικής συγκέντρωσης των σακχάρων και της αναγωγικής δράσης (FRAP), του συνολικού φαινολικού περιεχομένου, της ικανότητας δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας του DPPH, του συνολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή, του

Πίνακας 9.1 Συσχετίσεις

	<i>FRAP</i>	<i>TPC</i>	<i>DPPH</i> (mgTE/L)	<i>FLAVONOID</i>	<i>SERUM OXID</i>	<i>ANTHO</i>	<i>OH-CINNAM</i>	<i>FLAVONOL</i>	<i>CuCC</i>	<i>CARBO</i>
FRAP	1.000									
TPC	0.914	1.000								
DPPH (mgTE/L)	0.886	0.874	1.000							
FLAVONOID	0.911	0.855	0.794	1.000						
SERUM OXID	<u>0.542</u>	0.595	<u>0.464</u>	<u>0.505</u>	1.000					
ANTHO	0.689	0.656	<u>0.467</u>	0.856	0.442	1.000				
OH-CINNAM	0.889	0.873	0.755	0.897	<u>0.557</u>	0.854	1.000			
FLAVONOL	0.835	0.800	0.657	0.905	<u>0.538</u>	0.932	0.978	1.000		
CuCC	-0.060	-0.078	0.038	-0.170	-0.044	-0.303	-0.257	-0.283	1.000	
CARBO	0.322	0.329	0.314	0.203	0.140	-0.088	0.230	0.117	-0.167	1.000

n=31, N=29

***R*>0.563
p=0.001**

συσχετίσεις σημαντικές σε επίπεδο *p*=0.001 (99.9%)

R>0.457 *p*=0.01

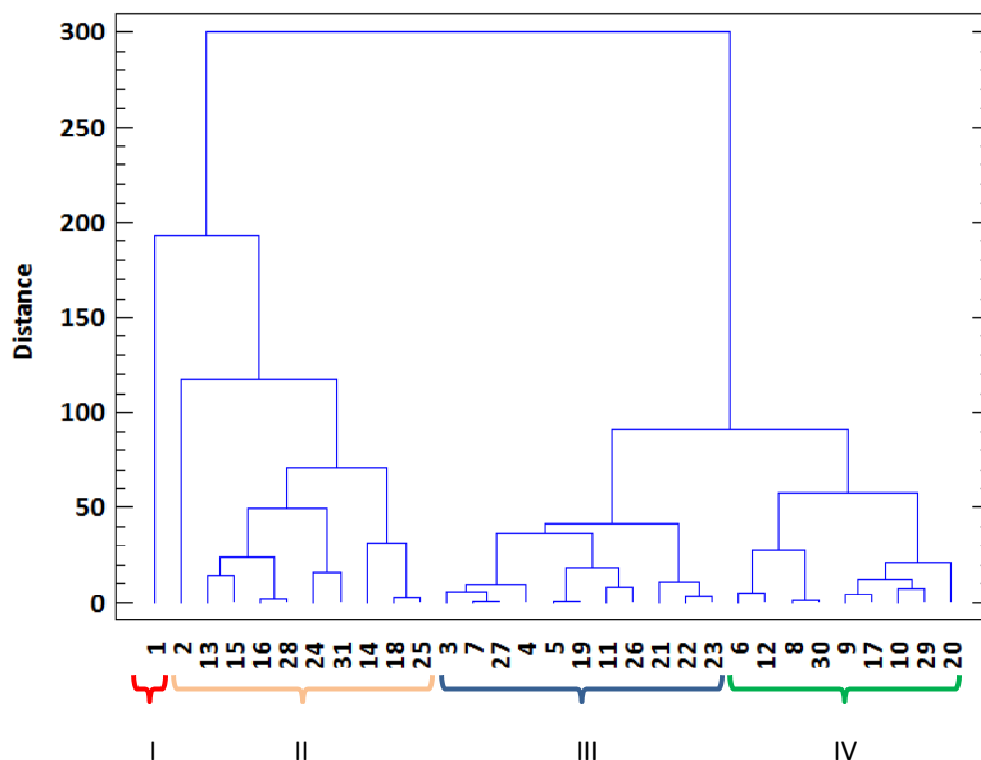
συσχετίσεις σημαντικές σε επίπεδο *p*=0.01 (99%)

χρόνου αντίστασης του ορού αίματος στην οξειδωση του συνολικού περιεχομένου σε ανθοκυανίνες, σε υδροξυκινναμικά και σε φλαβονόλες και της συμπλεκτικής ικανότητας του χαλκού L_T αφού ο συντελεστής γραμμικής συσχέτισης R είναι 0.322, 0.329, 0.314, 0.203, 0.140, -0.088, 0.230, 0.117 και -0.167, αντίστοιχα.

Από τη στατιστική επεξεργασία παρατηρήθηκε επίσης ισχυρή συσχέτιση ($p=0.01$) μεταξύ του χρόνου αντίστασης του ορού αίματος στην οξειδωση και των αντίστοιχων συγκεντρώσεων για το συνολικό φαιολικό περιεχόμενο, την ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας του DPPH και της αναγωγικής δράσης (FRAP).

Παρατηρήθηκε επίσης πολύ ισχυρή συσχέτιση ($p=0.001$) μεταξύ της συγκέντρωσης των ολικής συγκέντρωσης των φλαβονοειδών και της αναγωγικής δράσης (FRAP), του συνολικού φαιολικού περιεχομένου και της ικανότητας δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας του DPPH. Επιπλέον παρατηρήθηκε πολύ ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της ικανότητας δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας του DPPH και της αναγωγικής δράσης (FRAP) και του συνολικού φαιολικού περιεχομένου. Και τέλος πολύ ισχυρή συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ του συνολικού φαιολικού περιεχομένου και της αναγωγικής δράσης (FRAP).

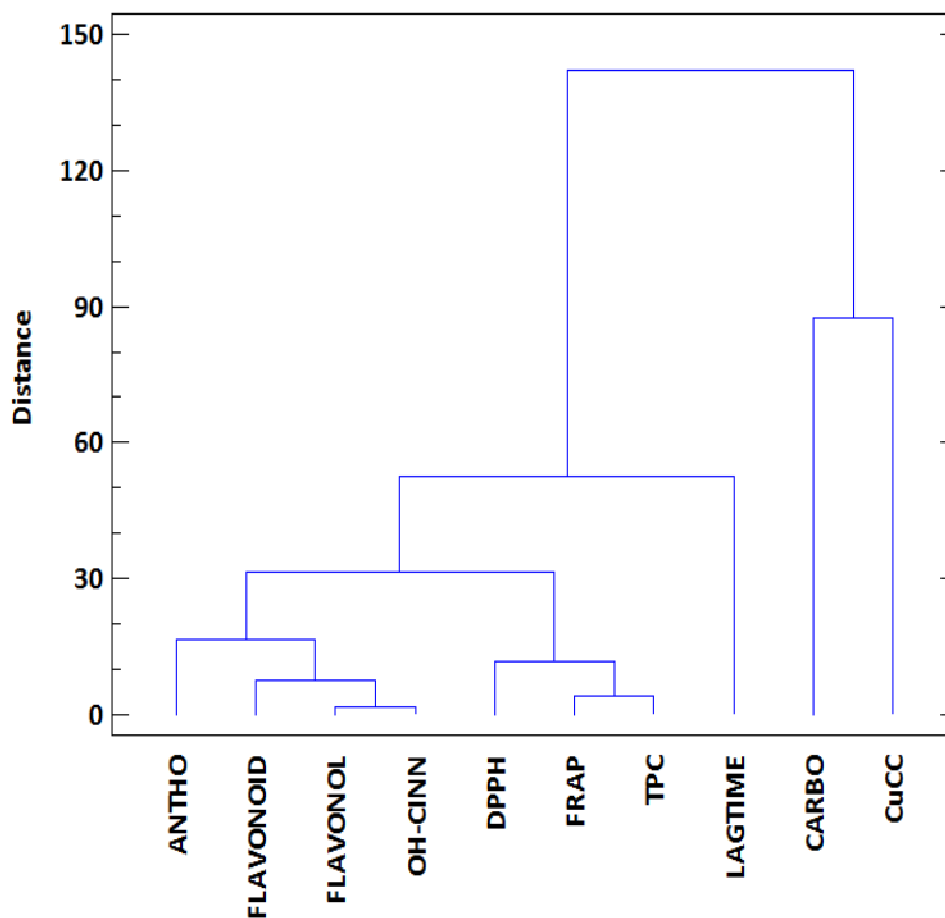
Από την ανάλυση ομαδοποίησης που πραγματοποιήθηκε ως προς τα δείγματα και τις παραμέτρους που χρησιμοποιήθηκαν σχηματίστηκαν 4 ομάδες (clusters). Για εύκολο εντοπισμό διαχωρίζονται με διαφορετικά χρώματα.



Εικόνα 9.1: Ανάλυση ομαδοποίησης (cluster analysis)

Η ομάδα I περιλαμβάνει μία μόνο μπύρα, η No1, η οποία είναι μαύρη μπύρα και ανήκει επίσης στην κατηγορία ζύθων Porter, με ολικό φαινολικό περιεχόμενο $>750 \text{ mg GAE L}^{-1}$. Η ομάδα II περιλαμβάνει μπύρες με ολικό φαινολικό περιεχόμενο $299-634 \text{ mg GAE L}^{-1}$, οι οποίες ανήκουν στην κατηγορία ζύθων Ale. Η ομάδα III περιλαμβάνει μπύρες με ολικό φαινολικό περιεχόμενο $283-347 \text{ mg GAE L}^{-1}$, οι οποίες ανήκουν στην κατηγορία ζύθων Lager με εξαίρεση ένα δείγμα της κατηγορίας αυτής και στην κατηγορία Pilsner με εξαίρεση ένα δείγμα. Η ομάδα IV περιλαμβάνει μπύρες με ολικό φαινολικό περιεχόμενο $196-286 \text{ mg GAE L}^{-1}$ στην οποία ανήκουν οι μαύρες μπύρες, με εξαίρεση δυο δείγματα και αυτές με μέλι.

Στην ανάλυση ομαδοποίησης για τις παραμέτρους που προσδιορίστηκαν παρατηρείται ο σχηματισμός 3 ομάδων (Εικόνα 9.2). Παρατηρείται ότι οι παράμετροι που αφορούν την αντιοξειδωτική ικανότητα της μπύρας σχηματίζουν μια ομάδα, ενώ οι άλλες δύο παράμετροι (τα σάκχαρα και η συμπλεκτική ικανότητα του χαλκού), σχηματίζουν από μια ομάδα η κάθε μία.



Εικόνα 9.2 Ανάλυση ομαδοποίησης (cluster analysis) των παραμέτρων που προσδιορίστηκαν

Όσο αφορά την αντιοξειδωτική δράση των ελληνικών ζύθων μπορούμε να πούμε ότι σε σχέση με μπύρες από την Τσεχία^[126] και την Κίνα^[127] είναι πιο ισχυρή. Οι τιμές Folin-Ciocalteu στα δείγματα από την Τσεχία κυμαίνονται μεταξύ 159.49 και 201.15 mg GAE L⁻¹, σε 40 μπύρες από την Κίνα κυμαίνονται μεταξύ 84.64 και 267.27 mg GAE L⁻¹, ενώ στα ελληνικά δείγματα κυμαίνονται μεταξύ 196 και 783.27 mg GAE L⁻¹.

Όσο αφορά το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο (TPC) τα αποτελέσματα που ελήφθησαν ήταν παρόμοια έως και λίγο υψηλότερα από αυτά που αναφέρουν οι Lugasi^[128] (270-600 mg GAE L⁻¹), Snežana^[129] (328-545 mg GAE L⁻¹) και Piazzon et al^[130] (μέση συγκέντρωση 452 mg GAE L⁻¹) ενώ ήταν υψηλότερα από τα αποτελέσματα των Obruca et al^[131] (156-201 mg GAE L⁻¹), και των Zhao et al^[132,133] (152,01-339,12mg GAE L⁻¹ και 168 ± 41,74 mg GAE L⁻¹).

Η ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH[•] των δειγμάτων μπύρας κυμάνθηκε από $60.24 \pm 6,19$ έως $406.68 \pm 1,93$ mg TE L⁻¹. Συγκριτικά με την βιβλιογραφία, τα αποτελέσματα είναι υψηλότερα από αυτά των Zhao et al^[132,133] ($60.06 - 337.9$ mg TE L⁻¹ και αντίστοιχα 152.67 ± 42.54 mg TE L⁻¹) και του Snežana S.^[129] ($65.07 - 207.74$ mg TE L⁻¹).

Όλες οι μπύρες παρουσίασαν αναγωγική ικανότητα, η οποία κυμάνθηκε μεταξύ 52.47 ± 1.67 έως 172.29 ± 3.02 mg AAE L⁻¹ μπύρας. Συγκριτικά με την βιβλιογραφία τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής ήταν χαμηλότερα από αυτά του Zhao et al^[133] ($121,52 \pm 31,70$ mg AAE L⁻¹).

Οι μπύρες που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία έδωσαν διαφορετικές συγκεντρώσεις ως προς το περιεχόμενο οργανικό υλικό. Για να είναι συγκρίσιμες οι τιμές της συμπλεκτικής ικανότητας που προσδιορίστηκαν με εκείνες δειγμάτων διαφορετικής φύσης, πραγματοποιήθηκε κανονικοποίηση των τιμών L_T των δειγμάτων (Πίνακας 9.2).

Πίνακας 9.2 Κανονικοποιημένες τιμές L_T των δειγμάτων που εξετάστηκαν

Δείγμα No	μmol Cu g⁻¹ C
1	1.04
2	7.02
3	3.32
4	3.07
5	4.32
6	3.33
7	2.97
8	2.54
9	2.10

Δείγμα Νο	μmol Cu g⁻¹ C
10	2.56
11	3.08
12	3.49
13	2.53
14	2.78
15	0.91
16	2.03
17	2.65
18	2.64
19	3.71
20	3.61
21	3.01
22	2.96
23	3.08
24	2.73
25	1.89
26	2.22
27	3.22
28	2.23
29	2.03

Δείγμα Νο	μmol Cu g ⁻¹ C
30	2.92
31	2.12

Τις υψηλότερες κανονικοποιημένες τιμές L_T ως προς το οργανικό υλικό του κάθε δείγματος ($\mu\text{mol Cu g}^{-1} \text{C}$) παρουσίασε το Δείγμα Νο 2 και το Δείγμα Νο 5 με τιμές 7.02 και 4.32 $\mu\text{mol Cu g}^{-1} \text{C}$, αντίστοιχα και τις χαμηλότερες το Δείγμα Νο 1 και το Δείγμα Νο 15 με τιμές 1.04 και 0.91 $\mu\text{mol Cu g}^{-1} \text{C}$, αντίστοιχα.

Σε παρόμοια έρευνα που πραγματοποιήθηκε μελετήθηκε η συμπλεκτική ικανότητα ιόντων χαλκού διαφόρων κρασιών που παρασκευάστηκαν στην περιοχή Ναβάρα της Ισπανίας ^[134]. Στις μπύρες από μικρές ελληνικές ζυθοποιίες η συγκέντρωση συμπλεκτικής ικανότητας ως προς τα ιόντα χαλκού κυμαίνεται μεταξύ 37.07 μM (Δείγμα Νο 15) και 348.4 μM (Δείγμα Νο 1), ενώ οι αντίστοιχες τιμές στα Ισπανικά κρασιά κυμαίνονται σε πολύ χαμηλότερες τιμές από 0.587 μM έως 3.208 μM .

Λόγω της πολύ περιορισμένης αντίστοιχης βιβλιογραφίας, πραγματοποιήθηκε επίσης σύγκριση των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας με εκείνα αντίστοιχων εργασιών στις οποίες μελετήθηκαν η συμπλεκτική ικανότητα ιόντων χαλκού διαφόρων αφεψημάτων που παρασκευάζονται από βότανα της Ελληνικής χλωρίδας ^[135] και ροφημάτων καφέ ^[136].

Στις μπύρες, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η συγκέντρωση συμπλεκτικής ικανότητας ως προς τα ιόντα χαλκού κυμαίνεται μεταξύ 37.07 και 348.4 μM , ενώ στα ροφήματα καφέ μεταξύ 74.6 μM (καφές φίλτρου) και 363.9 μM (ελληνικός καφές «γρήγορης» κατανάλωσης), ενώ οι αντίστοιχες τιμές στα αφεψήματα βοτάνων κυμαίνονται σε χαμηλότερες τιμές, από 8.8 μM (δενδρολίβανο) έως 112.5 (μαντζουράνα).

Επιπλέον, συγκρίνοντας τις τιμές του λόγου L_T/ TOC ($\mu\text{mol Cu/ g C}$) παρατηρούμε πως για την πλειοψηφία των βοτάνων είναι υψηλότερες από

εκείνες των ζύθων και των ροφημάτων καφέ. Στην περίπτωση των ζύθων οι τιμές του λόγου κυμαίνονται μεταξύ 0.91 (ΜαΔείγμα Νο 15) και 7.02 (Δείγμα Νο 2), ενώ οι αντίστοιχες τιμές των ροφημάτων καφέ κυμαίνονται από 28.6 (καφές espresso) και 69.7 (ελληνικός καφές) και των αφεψημάτων των βοτάνων κυμαίνονται από 15.7 (χαμομήλι) έως 128 (μαντζουράνα).

Ένα βότανο όπως η ματζουράνα ($L_T = 112 \mu\text{M}$) ελευθερώνει 878 mg οργανικής ύλης ανά λίτρο δείγματος, μια μπύρα με παρόμοια τιμή συμπλεκτικής ικανότητας όπως είναι το Δείγμα Νο 18 ($L_T = 111.71 \mu\text{M}$) ελευθερώνει 42300 mg οργανικής ύλης ανά λίτρο δείγματος και ένα ρόφημα καφέ όπως ο στιγμιαίος ($L_T = 167.4$) απελευθερώνει 2906.9 mg. Συνεπώς, η οργανική ύλη που προέρχεται από ροφήματα βοτάνων συμπλέκει περισσότερη ποσότητα μετάλλου κατά μέσο όρο απ' ότι όταν προέρχεται από μπύρα ή από καφέ.

Επομένως καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η υψηλή συμπλεκτική ικανότητα της μπύρας οφείλεται στο πλούσιο οργανικό υλικό της και όχι στην εκλεκτικότητά του ως προς το χαλκό, ενώ αντιθέτως τα βότανα εμφανίζουν υψηλότερη συμπλεκτική ικανότητα ως προς ιόντα χαλκού ανά mg οργανικής ύλης.

Συνοψίζοντας, επιπλέον μελέτες πρέπει να πραγματοποιηθούν πάνω στην ικανότητα σύμπλεξης των μετάλλων, από το οργανικό υλικό που εμπεριέχεται στις μπύρες. Η ισχυρή αντιοξειδωτική τους δράση, που οφείλεται στην παρουσία βιοδραστικών οργανικών ουσιών σε συνδυασμό με την ικανότητα μείωσης της βιοδιαθεσιμότητας των τοξικών μετάλλων στον ανθρώπινο οργανισμό καθιστούν τη μπύρα, με την προϋπόθεση ότι καταναλώνεται με μέτρο, σύμμαχο για την ανθρώπινη υγεία.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ - ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ - ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

CD	Conjugated Diene Lipid Hydroperoxides
DME	Dropping Mercury Electrode
DPASV	Differential Pulse Anodic Stripping Voltammetry
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
HDL	High Density Lipoprotein
HMDE	Hanging Mercury Drop Electrode
HMF	Hydroxymethylfurfural
HTCO	High Temperature Catalytic Oxidation
ICP-MS	Inductively coupled plasma mass spectrometry
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LDL	Low Density Lipoprotein
MeCC	Metal Complex Capacity
PBS	Phosphate buffered saline
RNS	Reactive Nitrogen Species
ROS	Reactive Oxygen Species
SMDE	Static Mercury Drop Electrode

TOC	Total Organic Carbon
TPTZ	2,4,6-Tripyridyl-s-Triazine

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Bamforth, C.W. (2002). *Nutritional aspects of beer – A review*. Nutrition Research, 22, 227–237
2. Tafulo, P.A.R., Queiros, R.B.C., Delerue-Matos, M., Sales, M.G.F. (2010). *Control and comparison of the antioxidant capacity of beers*. Food Research International, 43, 1702–1709
3. Wunderlich, S., Back, W. (2009). *Overview of manufacturing beer: Ingredients, process and quality criteria*. In V. R. Preedy (Ed.), *Beer in health and disease prevention*. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 3-17
4. <https://epianalysis.wordpress.com/2012/02/28/alcohol/> (τελευταία πρόσβαση στις 20/5/2015)
5. <http://www.analyst.gr/2015/02/17/panorama-tis-ellinikis-biras-2014/> (τελευταία πρόσβαση στις 20/5/2015)
6. "Life's Little Mysteries.com – When Was Beer Invented?". Life's little mysteries.com. (τελευταία πρόσβαση στις 20/5/2015)
7. Homan, M. M., "Beer". *Britannica.com.; Beer and Its Drinkers: An Ancient Near Eastern Love Story, Near Eastern Archaeology* (2004), Vol. 67, No. 2, 84–95
8. Black, J. A., Cunningham, Graham; Robson, Eleanor (2004). *The literature of ancient Sumer*. Oxford: Oxford University Press
9. Hartman, L. F., Oppenheim, A. L., (1950) *On Beer and Brewing Techniques in Ancient Mesopotamia*. Supplement to the Journal of the American Oriental Society, 10. Retrieved 20 September 2013
10. Nelson, M., *DID ANCIENT GREEKS DRINK BEER?* Phoenix, (2014), 27-46
11. "492 Years of Good Beer: Germans Toast the Anniversary of Their Beer Purity Law". Der Spiegel (2008)

12. <http://el.wikipedia.org/wiki/%CE%9C%CF%80%CF%8D%CF%81%CE%B1> (τελευταία πρόσβαση στις 20/5/2015)
13. Ostergaard, S., Olsson, L., Nielsen, J., (2000) *Metabolic Engineering of Saccharomyce scerevisiae*, Microbiol. Mol. Biol. Rev 64, 34–50
14. Hornsey, I. S. , (1999) *Brewing* , Royal Society of Chemistry, ISBN 0-85404-568-6, 221–222
15. Jackson M., *Beer*, Eyewitness Companion; 30
16. <http://septem.gr/> (τελευταία πρόσβαση στις 25/5/2015)
17. <http://el.wikipedia.org/wiki/%CE%9C%CF%80%CF%8D%CF%81%CE%B1#Ale> (τελευταία πρόσβαση στις 25/5/2015)
18. <http://www.fix-beer.gr/> (τελευταία πρόσβαση στις 25/5/2015)
19. <http://www.athenianbrewery.gr> (τελευταία πρόσβαση στις 25/5/2015)
20. <http://www.mythosbrewery.gr/> (τελευταία πρόσβαση στις 25/5/2015)
21. <http://www.eza.gr> (τελευταία πρόσβαση στις 25/5/2015)
22. <http://www.verginabeer.com> (τελευταία πρόσβαση στις 25/5/2015)
23. <http://www.corfubeer.com> (τελευταία πρόσβαση στις 25/5/2015)
24. <http://www.santorinibrewingcompany.gr> (τελευταία πρόσβαση στις 25/5/2015)
25. <http://volkanbeer.com> (τελευταία πρόσβαση στις 25/5/2015)
26. <http://www.chiosbeer.gr> (τελευταία πρόσβαση στις 25/5/2015)
27. Briggs, D.E., Boulton, C.A., Brookes, P.A., Stevens, R.(2004). *Brewing Science and Practice-Woodhead*, Chapter 19, 662
28. Pollock, J.R.A. (1981). *Brewing Science*, Vol.2, Academic Press London, Chapters 3 & 4

29. Hughes, P.S., Baxter, E.D. (2001). *Beer: Quality, safety and nutritional aspects*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, chapters 1, 3 and 5
30. Bamforth, C.W. (2003). *BEERS, Chemistry of Brewing, Encyclopedia food nutrition* (second edition), 441
31. Bamforth, C.W. (2003). *BEERS, Chemistry of Brewing, Encyclopedia food nutrition* (second edition), 442
32. Bamforth, C.W., Muller, R.E., Walker, M.D. (1993) *Oxygen and oxygen radicals in malting and brewing: a review*. *J Am Soc Brew Chem* 51, 79–88
33. Bamforth, CW (1985b). *The foaming properties of beer*. *J Inst Brew* 91, 370–83
34. McMurrugh, I., Delcour, J.A. (1994) *Wort polyphenols*. *Ferment* 7, 175–82
35. Anness, B.J., Reed, R.J.R. (1985) *Lipids in wort*. *J Inst Brew* 91, 313–17
36. Drost, B.W., Van Eerde, P., Hoekstra, SF., Strating, J. (1971) *Fatty acids and staling of beer*. *Proc Eur Brew Conv Cong*, 451–8.
37. Slaughter, J.C. (1970). *J. Inst. Brew.* 76 22
38. Palamand, S.R. (1969). Hardwick, W.A., Markl, K.S. , *Proc. Ann. Meet. Am. Soc. Brew. Chem.* 54
39. Slaughter, J.C., Uvgaard A.R.A., *J. Inst. Brew.* 77 (1971) 446
40. Bamforth, C. W. (2004). *Beer_ Health and Nutrition*-Wiley-Blackweell
41. Tamara, P., Kondratyuk, T.P., Pezzuto, J.M. (2004). *Natural product polyphenols of relevance to human health*. *Pharm Biol*, 42 (1), 46-63
42. Bamforth, C.W. (2003). *BEERS, Chemistry of Brewing, Encyclopedia food nutrition* (second edition), 445-446

43. Rajendram, R., Preedy, V.R. (2009). *Ethanol in beer: production, absorption and metabolism*. In: Preedy, V.R. (Ed.), *Beer in Health and Disease Prevention*. Elsevier Inc., Burlington, Mass, pp. 431-440
44. Mukamal, K.J., Rimm, E.B. (2008). *Alcohol consumption: risks and benefits*. *Current Atherosclerosis Reports* 10 (6), 536–543
45. Li, J.M., Mukamal, K.J. (2004). *An update on alcohol and atherosclerosis*. *Current Opinion in Lipidology* 15 (6), 673–680
46. Bamforth, C.W., (2002). *Nutritional aspects of beer – a review*. *Nutrition Research* 22 (1/2), 227–237
47. Moore, R.D., Pearson, T.A. (1986). *Moderate alcohol consumption, and coronary heart disease*. A review. *Medicine*;65:242–67
48. Stefanick, M., Legault, C., Tracy R. P., Howard, G., Kessler, C. M., Lucas, D. L. and Bush, T. L. (1995) *Distribution and correlates of plasma fibrinogen in middle aged women-initial findings of the postmenopausal estrogen-progestin interventions (PEPI) study*. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 15, 2085-2093
49. Klatsky, A.L. (1999). *Moderate drinking, and reduced risk of heart disease*. *Alc Res Health*;23:15–23
50. Halpern, M.J., Dahlgren, A.L., Laakso, I., Seppanen-Laakso, T., Dahlgren J., McAnulty P.A. (1998). *Red-wine polyphenols and inhibition of platelet aggregation: possible mechanisms and potential use in health promotion and disease prevention*. *J Int Med Res*;26:171–80
51. Pohorecky, L.A. (1990). *Interaction of alcohol and stress at the cardiovascular level*. *Alcohol*;7:537–41
52. Cooper, T.J. (1994) *Medical considerations of moderate alcohol consumption*. *Proceedings of the 23rd Conv Inst Brew Aust NZ Sect*, 32–7

53. Brenner, H., Rothenbacher, D., Bode, G., Adler, G. (1997) *Relation of smoking and alcohol and coffee consumption to active Helicobacter pylori infection: cross sectional study*. Brit Med J;315:1489–92
54. Olson, R. E. (1979) *Absorption, metabolism and excretion of ethanol*. In *Fermented Food Beverages in Nutrition* C. F. Gastineau , W. J. Darby and T. B. Turner eds ,197 –211 . Academic Press : New York
55. Buday, A. Z. and Denis , G. (1974) *The diuretic effect of beer* . *Brewers Digest* , 49 (6) , 56 – 58
56. Eastmond, C. J., Garton, M., Robins, S. and Riddoch , S. (1995) *The effects of alcoholic beverages on urate metabolism in gout sufferers* . *British Journal of Rheumatology* , 34 ,756 – 759
57. Hirvonen , T. , Pietinen , P. , Virtanen , M. , Albanes , D. and Virtamo , J. (1999) *Nutrient intake and use of beverages and the risk of kidney stones among male smokers* . *American Journal of Epidemiology*,150, 187 – 194
58. Guimerà, A., Gironès, X. Cruz-Sánchez F.F. (2002). *Actualizaci6ns obrelapatología de la enfermedad de Alzheimer* Rev. Esp. Patol., 35 (1), 21–48
59. González-Muñoz MJ, Pena A. (2008). *Role of beer as a possible protective factor in preventing Alzheimer’s disease*. *Food and Chemical Toxicology*
60. Henderson et al. (2000). *In vitro inhibition of human P450 enzymes by prenylated flavonoids from hops, Humulus lupulus*.
61. Miranda , C.L., et al. (1999) *Antiproliferative and cytotoxic effects of prenylated flavonoids from hops (Humuluslupulus) in human cancer cellin* . *Food and Chemical Toxicology*,37,271–285

62. Zava, D. T., Dollbaum, C. M. and Blen, M. (1998) *Estrogen and progesterone bioactivity of foods, herbs, and spices*. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 217, 369 – 378
63. De Keukeleire, D., Milligan, S. R., Kalita, J. G., Pocock, V., De Cooman, L., Heyerick, A., Rong, H. and Roelens, F. (2001) *Prenylated hop flavonoids are key agents in relation to health-beneficial properties of beer*. Proceedings of the European Brewing Convention Congress, Budapest, 82 – 9
64. Arimoto-Kobayashi, S., Sugiyama, C., Harada, N., Takeuchi, M., Takemura, M. and Hayatsu, H. (1999) *Inhibitory effects of beer and other alcoholic beverages on mutagenesis and DNA adduct formation induced by several carcinogens*. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 47, 221 – 230
65. Cervilla J.A., Prince M., Lovestone S., Mann A. (2000). *Long-term predictors of cognitive outcome in a cohort of older people with hypertension*. Brit J Psych;177:66–71
66. Obisesan, T.O., Hirsch, R., Kosoko, O, Carlson, L., Parrott, M. (1998). *Moderate wine consumption is associated with decreased odds of developing age-related macular degeneration in NHANES-1*. J Amer Geriat Soc 46:1–7
67. Nevill, A.M., Holder, R.L., Fentem, P.H., Rayson, M., Marshall, T., Cooke, C., Tuxworth, W. (1997) *Modelling the associations of BMI, physical activity and diet with arterial blood pressure: some results from the Allied Dunbar national fitness survey*. Ann Hum Biol;24:229–47
68. Nogueira F.N., Souza D.N., Nicolau J. (2000). *In vitro approach to evaluate potential harmful effects of beer on health*. J Dent;28:271–6
69. Klaunig J., Wang Z., Pu X., Zhou S. (2011). *Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis*. Toxicology and Applied Pharmacology 254, 86-99

70. Jeong L., Young-Ok S., Xianglin S. (2012). *Oxidative stress and metal carcinogenesis*. Free Radic. Biol. Med. 53: 742-757
71. Valko M., Dieter L., Jan M., Mark C., Mazur M., Tesler J. (2007). *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. The Inter. Jour. Biochem. Cell Biology 39 : 44- 84
72. Goldstein S., Czapski G. (1986) *The role and mechanism of metal ions and their complexes in enhancing damage in biological systems or in protecting these systems from the toxicity of O₂*. Free Radic. Biol. Med. 2: 3-11
73. Salomonsson, A.C., Theander , O. and Aman , P. (1980). Swed. J.Agric. Res. 10 , 11 – 16
74. Nordkvist, E., Salomonsson, A.C. and Aman , P. (1984). J. Sci.FoodAgric. 35 , 657 – 661
75. McMurrrough, I., Madigan, D. and Smyth, M.R. (1996). J. Agric. Food Chem. 44 , 1731 – 1735
76. Nardini , M. and Ghiselli , A. (2004). Food Chem. 84 , 137 – 143
77. Gasowski , B. , Leontowicz , M. , Leontowicz , H. , Katrich , E.,Lojek , A. , Ciz , M. , Trakhtenberg , S. and Gorinstein , S. (2004). J. Nutr. Biochem. 15 , 527 – 533
78. Sanchez-Moreno, C., Larrauri , J.A. and S aura-Calixto , F. (1998). J. Sci. Food Agric. 76 , 270 – 276
79. Villano, D., Fernandez-Pachon, S., Troncoso , A.M. and Garcia-Parrilla , M.C. (2005). Anal. Chim. Acta 538 , 591 – 598
80. Preedy, et al. (2009) *Ethanol in beer: Production, absorption and metabolism*. Beer in health and disease prevention: 429-440

81. Rivero, D., et al. (2005). *Inhibition of Induced DNA Oxidative Damage by Beers: Correlation with the Content of Polyphenols and Melanoidins*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(9): 3637-3642
82. Leubolt, R., Klein, H. (1993). *J. Chromatogr.* 640, 271–277
83. Yen, G.C., Duh, P.D. and Tsai, H.L. (2002). *Food Chem.* 79, 307 – 313
84. Wagner, H.P. and McGarrity, M.J. (1991). *J. Chromatogr.* 546, 119 – 1240
85. Mortimer, Charles E. (1975). *Chemistry: A Conceptual Approach* (3rd ed.) New York: D. Van Nostrand Company//Frank Kreith and Yogi Goswami, eds. (2004). *The CRC Handbook of Mechanical Engineering*, 2nd edition. Boca Raton. 12-2
86. *Metal Stocks in Society: Scientific Synthesis* (2010), International Resource Panel, United Nations Environment Programme.
87. <http://www.geology.upatras.gr/files/shmioseis/koitasmatalogia>
(τελευταία πρόσβαση στις 27/4/2015)
88. Buffle, J., and Van Leeuwen, L. G. M (1992). *Environmental Particles. IUPAC, Environmental Analytical and Physical Chemistry Series, 1*
89. Johnson, M., Larry E., ed. (2008). *"Copper"*. Merck Manual Home Health Handbook. Merck Sharp & Dohme Corp., a subsidiary of Merck & Co., Inc. Retrieved 7 April 2013
90. Lide, D. R., ed. (2005). *CRC Handbook of Chemistry and Physics* (86th ed.). BocaRaton (FL): CRC Press
91. "CSA – Discovery Guides, A Brief History of Copper". CSA Discovery Guides. Retrieved 29 April 2011
92. Hammond, C. R. (2004). *The Elements, in Handbook of Chemistry and Physics* 81st edition. CRC press

93. Vest, Katherine E.; Hashemi, Hayaa F.; Cobine, Paul A. (2013). *"Chapter 12 The Copper Metallome in Prokaryotic Cells"*. In Banci, Lucia (Ed.). *Metallomics and the Cell. Metal Ions in Life Sciences 12*. Springer
94. Vest, Katherine E.; Hashemi, Hayaa F.; Cobine, Paul A. (2013). *"Chapter 13 The Copper Metallome in Eukaryotic Cells"*. In Banci, Lucia (Ed.). *Metallomics and the Cell. Metal Ions in Life Sciences 12*. Springe
95. Schmitz, Christopher (1986). *"The Rise of Big Business in the World, Copper Industry 1870–1930"*. *Economic History Review*. 2 39 (3): 392–410
96. Vasconcelos, M.T.S.D., Leal, M.F.C (1997). *Speciation of Cu, Pb, Cd and Hg in waters of the Oporto coast in Portugal, using pre-concentration in a Chelamine resin column*. *Anal. Chim.Acta*, 353, 189-198
97. Καραβόλτσος Σ. (2002). *Μελέτη του ρόλου των μακροφυκών στις μορφές των μετάλλων στο θαλάσσιο περιβάλλον*. Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Αθηνών
98. Κουτσελίνης Αντ. (1997). «*Τοξικολογία*», Εκδόσεις: Επιστημονικές εκδόσεις "Γρ. Παρισιάνος" Μαρία Γρ. Παρισιάνου, Αθήνα, Τόμος Α
99. Plavsic, M., Krznaric, D., Brannica, M. (1982). *Determination of the apparent copper complexing capacity of seawater by anodic stripping voltametry*. *Marine Chemistry*, 11, 17-31
100. Apte, S.C., Gardner, M.J., Ravenscroft, J.E., Turell, J.A. (1990). *Examination of the range of copper complexing ligands in natural waters using a combination of cathodic stripping voltammetry and computer simulation*. *Anal. Chim. Acta*, 235, 287
101. Brand, L.E., Sunda, W.G., Guillard, R.R.L. (1986). *Reduction in marine phytoplankton reproduction rates by copper and cadmium*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 96, 225-250
102. Coale, K.H., Bruland, K.W. (1988). *Copper complexation in the northeast Pacific*. *Limnol. Oceanogr.*, 33, 1084-1101

103. Plavšić, M., Čosović, B., (1989). *The effect of surface active substances on the electrochemical behaviour of copper ions in chloride solutions and in natural waters*. Water Res., 23, 1545–1553
104. Gordon, Starkebaum; John, M. Harlan (1986). *"Endothelial cell injury due to copper-catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine"*. J. Clin. Invest. 77 (4): 1370–6
105. MCLinder; Wooten, L; Cerveza, P; Cotton, S; Shulze, R; Lomeli, N (1998). *"Copper transport"*. The American Journal of Clinical Nutrition 67 (5): 965S–971S
106. Freedman, J. H., Ciriolo, M., Peisach J., (1989). *"The Role of Glutathione in Copper Metabolism and Toxicity"*, The Journal of Biological Chemistry – 264, (10): 5598-5605
107. Mantoura R.F.C. (1981). *Organo-metallic interactions in natural waters*. In: Marine Organic Chemistry, (Ed.) Duursma, E.K., Dawson, R. Elsevier Oceanography Series 31, Amsterdam
108. Henze, G., (2003). *Introduction to polarography and voltammetry, monograph*. Metrohm Ltd., CH-9101 Herisau, 8.027.5003-2003-08
109. Henze, G, 2001. *Polarographie und Voltammetrie- Grundlagen und Analytische Praxis*. Springer, Verlag, Berlin Heidelberg New York, Translation in english by Metrohm Ltd, Herisau, Switzerland, 2003, 60
110. Χατζηγιάννου, Θ.Π., Κουππάρης, Μ.Α. (2002). *Ενόργανη Ανάλυση*. Ε.Κ.Π.Α. Αθήνα
111. Ευσταθίου, Κ.Η., Χατζηγιάννου, Θ.Π. (1992). *Ενόργανες τεχνικές αναλύσεως, τόμος Α. Εισαγωγή -Ηλεκτροχημικές τεχνικές*. Ε.Κ.Π.Α. Αθήνα
112. Vercauysse, A., (1984). *Evaluation of analytical methods in biological systems: Hazardous metals in human toxicology*, vol.4 part B, Elsevier Science, New York

113. Zoski, Cynthia G. (2007). *Handbook of Electrochemistry*. Elsevier Science
114. Reinmuth, W. H. (1961). "Theory of Stationary Electrode Polarography". *Analytical Chemistry* 33 (12): 1793–1794
115. Skoog, Douglas A.; Donald M. West; F. James Holler (1995). *Fundamentals of Analytical Chemistry* (7th ed.). Harcourt Brace College Publishers
116. Plavšić, M., Krznarić, D., & Branica, M. (1982). *Determination of the apparent copper complexing capacity of seawater by DPASV*. *Marine Chemistry*, 11, 17–31
117. Kissinger, Peter; William R. Heineman (1996). *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry*, Second Edition, Revised and Expanded (2 ed.)
118. Bard, Allen J.; Larry R. Faulkner (2000). *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications* (2 ed.). Wiley
119. Ruzic, I. (1982). *Theoretical aspects of the direct titration of natural waters and its information yield for trace metal speciation*. *Anal. Chim. Acta* 140: 99–113
120. Van De Berg, C. M. G. (1982). *Determination of copper complexation with natural organic ligands in seawater by equilibration with MnO₂. Part 1: Theory; Part 2: Experimental procedures and application to surface seawater*. *Mar. Chem.* 11: 307–342
121. Sugimura, Y., Suzuki, Y., (1988). *A high temperature catalytic oxidation method for the determination of non-volatile dissolved organic carbon in seawater by direct injection of a liquid sample*. *Marine Chemistry* 24.105-131

122. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.k., Rebers, P.A., SmithF., (1956). *Colorimetric method for determination of sugars and related substances*. Analytical Chemistry 28: 350-356
123. Liu, D., Wong, P.T.S., Dutka, B.J., (1973). *Determination of carbohydrate in lake sediment by a modified phenol-sulfuric acid method*. Water Research Pergamon Press 7: 741-746
124. Zhishen, J.; Mengcheng, T.; Jianming, W. (1999). *The determination of flavonoids content in mulberry and scavenging effect on superoxideradicals*. Food Chemistry, 64 (4), 555–559
125. Obied HK, Bedgood DR, Prenzler PD and Robards K, (2008). *Effect of processing conditions, prestorage treatment, and storage conditions on the phenol content and antioxidant activity of olive millwaste*. J Agric Food Chem 56:3925-2932
126. S. Obruča et al. “ A Contribution to Analysis of “Czech Beer” Authenticity” (2009) Czech J. Food Sci. Vol. 27, Special Issue; 323- 326
127. Zhao et al. (2012) Assessment of endogenous antioxidative compounds and antioxidant activities of lager beers
128. Lugasi, A., (2003). *Polyphenol content and antioxidant properties of beer*. Acta Alimentari. **32**(2): p. 181-192.
129. Mitić, S.S., et al., (2014). *Phenolic Profiles and Total Antioxidant Capacity of Marketed Beers in Serbia*. International Journal of Food Properties, **17**(4): p. 908-922
130. Piazzon, A., M. Forte, and M. Nardini, (2010). *Characterization of phenolics content and antioxidant activity of different beer types*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **58**(19): p. 10677-10683
131. Obruca, S., et al., (2009). *A Contribution to Analysis of “ Czech Beer” Authenticity*. Czech Journal of Food Sciences. **27**: p. S323-S326.

132. Zhao, H., et al. (2010). *Phenolic profiles and antioxidant activities of commercial beers*. Food Chemistry. **119**(3): p. 1150-1158.
133. Zhao, H., et al. (2013). *Assessment of endogenous antioxidative compounds and antioxidant activities of lager beers*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2013. **93**(4): p. 910-917
134. Esparza, C. Santamaria, J.M. Garcia-Mina, J.M. Fernandez, (2007). *Complexing capacity profiles of naturally occurring ligands in Tempranillo wines for Cu and Zn. An electroanalytical approach for cupriccassel*.
135. Karavoltsos, S., Plavšic, M., Kalogeropoulos, N., et al. (2014). *Copper complexing properties and physico-chemical characterization of the organic matter in Greek herbal infusions*. Food Chemistry, 160, 53- 60
136. Κωνσταντίνα Γρηγορίου (2004). Ερευνητική Εργασία Διπλώματος Ειδίκευσης: «Μελέτη της δυνατότητας σύμπλεξης με οργανικούς υποκαταστάτες φυτικών προϊόντων: η περίπτωση του χαλκού σε προϊόντα καφέ»