



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

Εργαστήριο Χημείας-Βιοχημείας-Φυσικοχημείας Τροφίμων

Μαυρίκου Γεωργία Μαρία

Πτυχιακή Εργασία

«Αντιοξειδωτικά σε ελληνικές μπίρες»



Τριμελής Επιτροπή

Νικόλαος Καλογερόπουλος
Αναπληρωτής Καθηγητής Χ.Π.
(Επιβλέπων)

Ανδριάννα Καλιώρα
Επίκουρη Καθηγήτρια Χ.Π.

Ελισάβετ Φραγκοπούλου
Επίκουρη Καθηγήτρια

ΑΘΗΝΑ 2015

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε από την Μαυρίκου Γεωργία Μαρία, φοιτήτρια του Τμήματος Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, στο Εργαστήριο Χημείας, Φυσικοχημείας και Βιοχημείας τροφίμων του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Νικόλαου Καλογερόπουλου.

Αρχικά θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον κύριο Καλογερόπουλο για την καθοδήγηση και για τις οδηγίες, γνώσεις, συμβουλές καθώς και για τον πολύτιμο χρόνο που μου παρείχε, για την διεκπεραίωση της παρούσας εργασίας. Το αμείωτο ενδιαφέρον και η φιλική του στάση με βοήθησε να ολοκληρώσω με επιτυχία την πτυχιακή μου μελέτη.

Στην συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Ανδριάννα Καλιώρα, η οποία με βοήθησε να ολοκληρώσω ευχάριστα την πτυχιακή μου μελέτη με τις γνώσεις, την φιλική της στάση και την βοήθεια της στο πειραματικό μέρος.

Επιπλέον θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στην υποψήφια Διδάκτορα Δήμητρα Κογιάννου τόσο για την ενεργή συμμετοχή της όσο και για την υπομονή και τον πολύτιμο χρόνο που αφιέρωσε κατά την εκτέλεση του πειραματικού μέρους. Οι υποδείξεις, οι συμβουλές, η εμπειρία και οι γνώσεις της ήταν πολύτιμες.

Ευχαριστώ επίσης όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου για την συνεργασία του και το Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο για το επίπεδο των σπουδών που μου προσέφερε καθώς και για την διάθεση των ερευνητικών χώρων και την παραχώρηση των οργάνων για την ολοκλήρωση του πειραματικού μέρους.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τους γονείς μου, τα αδέρφια μου για την αγάπη και την συμπαράσταση τους όλα αυτά τα χρόνια καθώς και τους φίλους μου για την ανεκτίμητη υποστήριξη τους.

Περιεχόμενα

Περίληψη	5
Abstract	6
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ^ο	ΕΙΣΑΓΩΓΗ..... 7
1.1 Γενικά.....	7
1.2. Ιστορική αναδρομή	7
1.3 Διατροφική αξία.....	8
1.3.1 Πρώτες Ύλες.....	11
1.3.1.1 Κριθάρι	11
1.3.1.2 Λυκίσκος	11
1.3.1.3 Νερό ζυθοποίησης	12
1.3.1.4 Ζύμες Ζυθοποίησης	12
1.3.2 Άλλες Πρώτες Ύλες που Περιέχουν Άμυλο και Σάκχαρα	12
1.3.3 Σύσταση	13
1.3.4 Είδη μύρας	16
1.4 Παραγωγή Μύρας	20
1.4.1 Παραγωγή Βύνης	20
1.4.2 Παραγωγή μούστου	20
1.4.3 Ζύμωση	21
1.4.4 Ωρίμανση	21
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ^ο	ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ 22
2.1 Γενικά.....	22
2.2 Φυσιολογικές δράσεις πολυφαινολών	28
2.3 Βιοδιαθεσιμότητα πολυφαινολών	28
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ^ο	ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ 30
3.1 Ελεύθερες ρίζες - Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS)	30
3.2 Αντιοξειδωτικά	30
3.3 Η αντιοξειδωτική δράση της μύρας	32
3.4 Οξειδωτικό στρες και μύρα	33
3.5 Μύρα, αλκοόλ και ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία	33
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ^ο	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ..... 35

4.1 Περιγραφή δειγμάτων	35
4.2 Επεξεργασία δειγμάτων	35
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ^ο ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ	39
5.1 Προσδιορισμός πολυφαινόλων	39
5.1.1 Προσδιορισμός του συνολικού φαινολικού περιεχομένου με την μέθοδο Folin-Ciocalteu	39
5.2 Δοκιμές αντιοξειδωτικής δράσης	42
5.2.1 Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας βασιζόμενη στη δέσμευση της 1,1-διφαινύλο-2-πικρυλο-υδράζυλο ελεύθερης ρίζας (DPPH•)	42
5.2.2 Προσδιορισμός αναγωγικής ικανότητας μέσω αναγωγής του Fe^{+3} σε Fe^{+2} (FRAP)	45
5.3 Μελέτη της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας των δειγμάτων μύρας στις λιποπρωτεΐνες του ορού	47
5.3.1 Παραλαβή ορού	47
5.3.2 Πρωτόκολλο οξείδωσης ορού	47
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ^ο ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	49
6.1 Παραλαβή αφυδατωμένης μύρας	49
6.2 Φωτομετρικοί προσδιορισμοί	50
6.2.1 Συνολικό φαινολικό περιεχόμενο (Folin-Ciocalteu)	50
6.3 Αποτελέσματα των Αντιοξειδωτικών τεστ	52
6.3.1 Μέτρηση ικανότητας δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH*	52
6.3.2 Μέτρηση αναγωγικής ικανότητας μέσω της μεθόδου FRAP	54
6.4 Αναστολή της οξείδωσης των λιποπρωτεϊνών του ορού	56
6.5 Συνολικά αποτελέσματα	60
6.6 Στατιστική ανάλυση	61
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 ^ο ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	66
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	68

Περίληψη

Η μπύρα, ή ζύθος, είναι ένα πολύ κοινό αλκοολούχο ποτό με ρίζες από την αρχαία Αίγυπτο και Μεσοποταμία. Παράγεται μέσα από την διαδικασία της ζύμωσης και συναντάται σε πολλές διαφορετικές παραλλαγές και είδη. Κύρια συστατικά της είναι το νερό, η βύνη και ο λυκίσκος. Η μπύρα περιέχει υδατάνθρακες, ανόργανα άλατα (κάλιο, μαγνήσιο), βιταμίνες (νιασίνη, ριβοφλαβίνη, φυλλικό οξύ, κοβαλαμίνη, πυριδοξίνη), αμινοξέα και φαινολικά συστατικά το 70-80 % των οποίων προέρχεται από τη βύνη, και το υπόλοιπο 20-30 % από τον λυκίσκο. Τα φαινολικά συστατικά εμπλέκονται σε μηχανισμούς που δρουν προστατευτικά έναντι διαφόρων παθολογικών καταστάσεων, όπως τα καρδιαγγειακά νοσήματα, οι μικροβιακές λοιμώξεις και ο καρκίνος.

Στην βιβλιογραφία δεν υπάρχουν δεδομένα για το αντιοξειδωτικό περιεχόμενο και τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες ελληνικών μπυρών. Με σκοπό να καλυφθεί αυτό το ερευνητικό κενό προσδιορίστηκαν τα φαινολικά αντιοξειδωτικά και οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες 31 δειγμάτων μπύρας από ελληνικές μικροζυθοποιίες.

Το ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο (TPC) προσδιορίστηκε με την μέθοδο Folin-Ciocalciu και οι συγκεντρώσεις των φαινολικών συστατικών κυμάνθηκαν από $196 \pm 18,6$ έως $783,3 \pm 134,3$ mg Gallic Acid Equivalents (GAE)/L. Η αντιοξειδωτική δράση εκτιμήθηκε με τη μέτρηση της ικανότητας δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH[•] και με την μέτρηση της αναγωγικής δύναμης μέσω της μεθόδου FRAP. Η ικανότητα των δειγμάτων μπύρας να δεσμεύουν την ελεύθερη ρίζα DPPH[•] κυμάνθηκε από $60,2 \pm 6,2$ έως $406,7 \pm 1,9$ mg Trolox Equivalents (TE)/L. Αντίστοιχα οι μπύρες παρουσίασαν αναγωγική ικανότητα, η οποία κυμάνθηκε μεταξύ $52,5 \pm 1,67$ έως $172,3 \pm 3,0$ mg Ascorbic Acid Equivalents (AAE)/ L μπύρας. Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι οι δοκιμές FRAP, TPC και DPPH παρουσίασαν πολύ ισχυρές θετικές γραμμικές συσχετίσεις ($0,874$ έως $0,914$, $p = 0,001$).

Ένα επιπλέον εύρημα της παρούσας μελέτης ήταν ότι η πλειονότητα (>90%) των μπυρών εμφανίζουν αντιαθηρογόνες ιδιότητες, επιμηκύνοντας το χρόνο επαγωγής (lag time) της οξείδωσης των λιποπρωτεϊνών του ορού *in vitro*. Η ικανότητα των δειγμάτων μπύρας να αναστέλλουν την οξείδωση των λιποπρωτεϊνών του ορού εμφάνισε μέτρια έως ισχυρή θετική γραμμική συσχέτιση με τα FRAP, DPPH και TPC ($0,467$ έως $0,601$, $p < 0,05$).

Abstract

Beer is a popular alcoholic beverage with origins from ancient Egypt and Mesopotamia. It is produced through the process of fermentation in many different variations and kinds, its main ingredients being water, malt and hops. Beer contains carbohydrates, minerals (potassium, magnesium), vitamins (niacin, riboflavin, folate, cobalamin, pyroxine), amino acids and phenolic compounds 70-80% of which originate from malt, and the remaining 30-20% originate from hops. Phenolic compounds are considered to have protective role against various pathologies such as cardiovascular diseases, microbial infections and cancer.

In the literature there are no data on the antioxidant content and antioxidant properties of Greek beers. In order to fill this research gap, the determination of phenolic antioxidants and the antioxidant properties of 31 beers produced by Greek microbreweries was undertaken.

Beers' total phenolic content (TPC), determined by the Folin-Ciocalteu assay, varied significantly from $196 \pm 18,6$ to $783,3 \pm 134,3$ mg Gallic Acid Equivalents (GAE)/L. The antioxidant activity of beers was determined by measuring the DPPH free radical scavenging activity, and their reducing power was determined by the ferric reducing (FRAP) assay. All beers exhibited DPPH radical scavenging activity, with values ranging from $60,2 \pm 6,2$ to $406,7 \pm 1,9$ mg Trolox Equivalents (TE)/L. The respective reducing power values ranged from $52,5 \pm 1,67$ to $172,3 \pm 3,0$ mg Ascorbic Acid Equivalents (AAE)/L of beer. Statistical analysis showed that the values of FRAP, TPC and DPPH showed very strong positive linear correlations (0,874 to 0,914, $p = 0,001$).

A further finding of the present study was that the majority ($> 90\%$) of beers have anti-atherogenic properties, prolonging the induction time (lag time) of serum lipoproteins oxidation *in vitro*. The ability of the beer samples to inhibit the oxidation of serum lipoproteins showed moderate to strong positive linear correlations with FRAP, DPPH and TPC (0,467 to 0,601, $p < 0,05$).

1.1 Γενικά

Η μύρα κατέχει την δεύτερη θέση σε κατανάλωση αλκοολούχων ποτών στην Ευρώπη, αντιπροσωπεύοντας το 37% της συνολικής κατανάλωσης αλκοόλ της ΕΕ, σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό για οινοπνευματώδη ποτά. Η μέση κατανάλωση μύρας ανά κάτοικο στην Ευρώπη κατά την περίοδο 2009-2011 ήταν 72,8 L. Η μύρα περιέχει υδατάνθρακες, ανόργανα άλατα (κάλιο, μαγνήσιο) βιταμίνες (νιασίνη, ριβοφλαβίνη, φυλλικό οξύ, κοβαλαμίνη, πυριδοξίνη) και αμινοξέα. Επιπλέον, η μύρα περιέχει φαινολικά συστατικά των οποίων το 70-80 % προέρχεται από βύνη, και το υπόλοιπο 20-30 % προέρχεται από λυκίσκο [1].

1.2. Ιστορική αναδρομή

Τα πρώτα ευρήματα παρασκευής ποτού ζύμωσης από δημητριακά ανακαλύφθηκαν στην Ιερική (Ιορδανία) και χρονολογούνται από το 8000 π.Χ. Οι κάτοικοι της Μεσοποταμίας και της Αιγύπτου υπήρξαν οι μεγαλύτεροι καταναλωτές μύρας στην Αρχαιότητα, την οποία έπιναν χλιαρή. Η μύρα αυτή παρασκευαζόταν από ψίχουλα κρίθινου ψωμιού που μούλιαζαν σε νερό και στην συνέχεια υποβάλλονταν σε ζύμωση μέσα σε χυμό χουρμάδων αρωματισμένο με κύμινο, μυρτιά, πιπερόριζα και μέλι [2].

Στην αρχαία Αίγυπτο, η μύρα και το ψωμί ήταν βασική τροφή για ενήλικες και παιδιά και καταναλώνονταν εξίσου και από τους φτωχούς αλλά και από τους πλούσιους. Κατά την διάρκεια του Μεσαίωνα η μύρα παρέμεινε το πιο κοινό ρόφημα που καταναλώνονταν καθημερινά από όλες τις κοινωνικές τάξεις στις βόρειες και ανατολικές περιοχές της Ευρώπης, όπου η καλλιέργεια των σταφυλιών ήταν δύσκολη ή αδύνατη [3].

Σύμφωνα με τους μελετητές, οι αρχαίοι Έλληνες δεν έπιναν μύρα αλλά χρησιμοποιούσαν ως αποκλειστικό ή τουλάχιστον ως κύριο οινοπνευματώδες ποτό το κρασί. Σύμφωνα με μια θεωρία η οποία όμως δεν έχει αποδειχθεί οι Έλληνες παρασκεύαζαν και καταλάωναν μύρα ενώ επιπλέον βοήθησαν στην διάδοση της παραδοσιακής παραγωγής μύρας της Αιγύπτου στην Ευρώπη [4]. Στην αρχαία Ελλάδα θεωρούσαν ότι η μύρα είναι ποτό των Βαρβάρων [3].

1.3 Διατροφική αξία

Τα αλκοολούχα ποτά όπως η μπίρα παράγονται από διαλύματα που περιέχουν σάκχαρα με αλκοολική ζύμωση. Τα σάκχαρα που μπορούν να υποστούν ζύμωση από τις ζύμες είτε υπάρχουν στην πρώτη ύλη είτε παράγονται μετά από επεξεργασία, με υδρολυτική διάσπαση του αμύλου και των δεξτρινών προς απλά σάκχαρα. Η παρασκευή του ζύθου ή ζυθοποίηση περιλαμβάνει την χρήση βλαστημένου κριθαριού (βύνη), λυκίσκου, ζυμών και νερού. Εκτός από τη βύνη από κριθάρι, σημαντικό ρόλο παίζουν και άλλες πρώτες ύλες που περιέχουν άμυλο ή σάκχαρα. Τέτοιες πρώτες ύλες είναι άλλα είδη βύνης όπως του σιταριού, δημητριακά που δεν έχουν βυνοποιηθεί όπως κριθάρι, σιτάρι, καλαμπόκι και ρύζι και χρησιμοποιούνται ως συμπληρώματα, άμυλο σε σκόνη, προϊόντα αποικοδόμησης του αμύλου και ζυμούμενα σάκχαρα. Η χρήση πρόσθετων πρώτων υλών μπορεί να καταστήσει απαραίτητη εν μέρει τη χρήση παρασκευασμάτων μικροβιακών ενζύμων.

Οι αναζωογονητικές και μεθυστικές ιδιότητες της μπίρας αποδίδονται στην αιθανόλη. Το άρωμα, η γεύση και η πικράδα της οφείλονται στον λυκίσκο, στα προϊόντα που δημιουργούνται κατά την ξήρανση της βύνης σε κλίβανο (φρύξη) και μια πληθώρα αρωματικών ενώσεων που σχηματίζονται κατά την ζύμωση. Η διατροφική της αξία έγκειται στα μη ζυμωθέντα, διαλυτοποιημένα εκχυλίσματα που περιέχει (υδατάνθρακες, πρωτεΐνες), ενώ η αναζωογονητική της επίδραση οφείλεται στο διοξείδιο του άνθρακα, το οποίο αποτελεί βασικό συστατικό.

Μεταξύ των αλκοολούχων ποτών η αντιοξειδωτική δράση του κρασιού έχει μελετηθεί εντατικά για την πιθανή προληπτική δράση κατά της στεφανιαίας νόσου και υπάρχει σημαντικός όγκος μελετών που αποδεικνύουν ότι η μέτρια κατανάλωση κρασιού κατά τη διάρκεια των γευμάτων, χαρακτηριστικό της Μεσογειακής διατροφής, έχει ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία. Ωστόσο, μελέτες που αξιολογούν τα σχετικά οφέλη του κρασιού έναντι της μπίρας και έναντι άλλων οινοπνευματωδών ποτών δείχνουν ότι η μέτρια κατανάλωση οποιουδήποτε αλκοολούχου ποτού συνδέεται με χαμηλότερα ποσοστά καρδιαγγειακών παθήσεων [5]. Από διατροφική άποψη, η μπίρα περιέχει περισσότερη πρωτεΐνη και βιταμίνη Β από το κρασί. Το αντιοξειδωτικό περιεχόμενο της μπίρας είναι ισοδύναμο με εκείνο του λευκού κρασιού, αλλά χαμηλότερο από εκείνο του κόκκινου ενώ τα επί μέρους αντιοξειδωτικά της μπίρας διαφέρουν από αυτά του κρασιού, διότι το κριθάρι και ο λυκίσκος που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή της μπίρας περιέχουν πολυφαινόλες διαφορετικές από εκείνες των σταφυλιών που χρησιμοποιούνται στην οινοποίηση [5]. Η

μπύρα θεωρείται ότι αποτελεί μια καλή πηγή πολυφαινόλων διότι σημαντική ποσότητα αυτών των ενώσεων είναι παρούσες στο κριθάρι, στη βύνη και στον λυκίσκο. Ανάλογα με την ποικιλία το κριθάρι περιέχει 1.2-1.5 g kg⁻¹ πολυφαινόλες [6], ενώ ο φρέσκος λυκίσκος περιέχει περίπου 700 mg kg⁻¹ κερκετίνη και περίπου 550 mg kg⁻¹ καμπερόλη με την μορφή γλυκοζιτών [7].

Στον παρακάτω πίνακα δίνεται η διατροφική ανάλυση της μπίρας σύμφωνα με τους πίνακες της USDA.

Basic Report 14003, Alcoholic beverage, beer, regular, all [a](#)

Report Date: April 18, 2015 10:54 EDT

Nutrient values and weights are for edible portion.

Nutrient	Unit	1 Value Per100 g	1 fl oz 29,7g	1 can 356g
Proximates				
Water	g	91.96	27.31	327.38
Energy	kcal	43	13	153
Protein	g	0.46	0.14	1.64
Total lipid (fat)	g	0.00	0.00	0.00
Carbohydrate, by difference	g	3.55	1.05	12.64
Fiber, total dietary	g	0.0	0.0	0.0
Sugars, total	g	0.00	0.00	0.00
Minerals				
Calcium, Ca	mg	4	1	14
Iron, Fe	mg	0.02	0.01	0.07
Magnesium, Mg	mg	6	2	21
Phosphorus, P	mg	14	4	50
Potassium, K	mg	27	8	96
Sodium, Na	mg	4	1	14
Zinc, Zn	mg	0.01	0.00	0.04
Vitamins				
Vitamin C, total ascorbic acid	mg	0.0	0.0	0.0
Thiamin	mg	0.005	0.001	0.018
Riboflavin	mg	0.025	0.007	0.089
Niacin	mg	0.513	0.152	1.826
Vitamin B-6	mg	0.046	0.014	0.164
Folate, DFE	µg	6	2	21
Vitamin B-12	µg	0.02	0.01	0.07
Vitamin A, RAE	µg	0	0	0
Vitamin A, IU	IU	0	0	0
Vitamin E (alpha-tocopherol)	mg	0.00	0.00	0.00

Nutrient	Unit	1 Value Per100 g	1 fl oz 29,7g	1 can 356g
Vitamin D (D2 + D3)	µg	0.0	0.0	0.0
Vitamin D	IU	0	0	0
Vitamin K (phylloquinone)	µg	0.0	0.0	0.0
Lipids				
Fatty acids, total saturated	g	0.000	0.000	0.000
Fatty acids, total monounsaturated	g	0.000	0.000	0.000
Fatty acids, total polyunsaturated	g	0.000	0.000	0.000
Cholesterol	mg	0	0	0
Other				
Caffeine	mg	0	0	0

Footnotes

^a Proximates include ales, lagers, porters, premium beers and stouts. Other nutrients based on lager samples.

Εικόνα 1.3.1 Διατροφική ανάλυση της μύρας.

1.3.1 Πρώτες Ύλες

1.3.1.1 Κριθάρι

Το κριθάρι είναι η πιο σημαντική πρώτη ύλη που χρησιμοποιείται στην παραγωγή μύρας. Στην Γερμανία χρησιμοποιούνται διάφορες ποικιλίες του ανοιξιιάτικου κριθαριού (spring barley, *Hordeum vulgare convar.distichon*) με εξαιρετικά κατάλληλες ιδιότητες για ζυθοποίηση και βυνοποίηση. Κριθάρι υψηλής ζυθοποιητικής αξίας δίνει άφθονη ποσότητα εκχυλίσματος από την προκύπτουσα βύνη ενώ έχει μεγάλη περιεκτικότητα σε άμυλο αλλά μικρή ποσότητα πρωτεΐνης (9-10%), μεγάλο ποσοστό βλαστικότητας (τουλάχιστον το 95% των κόκκων), μεγάλη ενεργητικότητα βλάστησης και καλή ικανότητα διόγκωσης.

1.3.1.2 Λυκίσκος

Ο λυκίσκος είναι ένα ψηλό, ανθεκτικό, πολυετές, αναρριχώμενο κλήμα, το οποίο είναι πολύ σημαντικό και αναγκαίο συστατικό για την παραγωγή μύρας. Λειτουργεί ως διαυγαστής, επειδή καταβυθίζει τις πρωτεΐνες του ζυθόγλευκους ενώ αλλάζει τον χαρακτήρα του προσδίδοντας χαρακτηριστικό άρωμα και πικρή γεύση. Μαζί με την αιθανόλη και το διοξείδιο του άνθρακα συμβάλλει, λόγω των αντιβιοτικών ιδιοτήτων τους στην σταθερότητα της μύρας. Επιπρόσθετα οι πηκτίνες του λυκίσκου ενισχύουν την ικανότητα αφρισμού της μύρας.

1.3.1.3 Νερό ζυθοποίησης

Το νερό που χρησιμοποιείται για την προετοιμασία του ζυθογλεύκους σε μια ζυθοποιία έχει μεγάλη επίδραση στον χαρακτήρα και την ποιότητα της μύρας. Τα άλατα του νερού μπορούν να αλλάξουν το pH του πολτού και του ζυθογλεύκους. Νερό, με μικρή περιεκτικότητα σε διαλυτά διττανθρακικά άλατα ασβεστίου, μαγνησίου, νατρίου ή καλίου και διαλυτά ανθρακικά ή υδροξείδια είναι κατάλληλο για ελαφριές μύρες με πολύ λυκίσκο όπως η Pilsner, ενώ το αλκαλικό νερό είναι κατάλληλο για σκούρες μύρες, όπως αυτές από το Μόναχο. Σήμερα, οποιοδήποτε νερό μπορεί με κατάλληλη κατεργασία να αποκτήσει τα χαρακτηριστικά που απαιτούνται για κάποιο συγκεκριμένο τύπο μύρας.

1.3.1.4 Ζύμες Ζυθοποίησης

Οι ζύμες ζυθοποίησης είναι αποκλειστικά στελέχη του *Saccharomyces*. Αναγνωρίζονται δύο τύποι : ζύμες ζύμωσης κορυφής για θερμοκρασίες >10°C και βυθοζύμες οι οποίες χρησιμοποιούνται σε θερμοκρασίες μέχρι και 0°C. Οι ζύμες κορυφής, π.χ. *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, ανεβαίνουν στην επιφάνεια κατά την ζύμωση υπό την μορφή μεγάλων συσσωματωμάτων. Ζυμώνουν την ραφινόζη μόνο μερικώς επειδή τους λείπει το ένζυμο μελιβιάση. Οι βυθοζύμες π.χ. *Saccharomyces carlsbergensis* Hansen, καθιζάνουν στον πυθμένα κατά τη ζύμωση και ζυμώνουν πλήρως όλα τα σάκχαρα ακόμα και την ραφινόζη. Υπάρχουν και ζύμες με μεγάλη ζυμωτική ικανότητα, οι οποίες παραμένουν σε αιώρηση για μεγάλο χρονικό διάστημα, προκαλώντας υψηλό ρυθμό ζύμωσης. Ζύμες με χαμηλή ικανότητα ζύμωσης θρομβώνονται γρήγορα και καθιζάνουν στον πυθμένα (υπερθρομβωτικές ζύμες) και επομένως είναι ανίκανες να συνεχίσουν την ζύμωση. Καθαρές καλλιέργειες πολλών στελεχών, που χρησιμοποιούνται σήμερα για ζυθοποίηση, προέρχονται από ένα μοναδικό κύτταρο ζύμης και χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό του ζυθογλεύκους. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι να αχρηστευτεί η ζύμη λόγω κάποιας επιμόλυνσης ή εκφυλισμού. Με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατό να επιλέγονται συνέχεια τα κατάλληλα στελέχη για τον καθορισμένο σκοπό.

1.3.2. Άλλες Πρώτες Ύλες που Περιέχουν Άμυλο και Σάκχαρα

▪ Βύνη σιταριού

Η βύνη σιταριού αναμιγνύεται με βύνη κριθαριού σε αναλογία 40:60 κατά την παρασκευή μύρας ζύμωσης κορυφής

- **Συμπληρώματα (adjuncts)**

Πέρα από την βύνη κριθαριού χρησιμοποιούνται συμπληρωματικές πηγές αμύλου υπό την μορφή μην βυνοποιημένων δημητριακών (adjuncts) με σκοπό την αραιώση του πολτού κατά 15-50%. Τα συμπληρώματα είναι κριθάρι, σιτάρι, καλαμπόκι και ρύζι (σπασμένο ρύζι) υπό την μορφή αδρομερούς αλεύρου ολικής άλεσης, κόκκων, νιφάδων ή αλεύρου.

Τα συμπληρώματα έχουν χαμηλή ενζυμική δραστηριότητα, και επομένως η προσθήκη τους μπορεί να καταστήσει αναγκαία την προσθήκη παρασκευασμάτων μικροβιακών ενζύμων με δραστηριότητα α-αμυλάσης και πρωτεΐνωσης.

Το μη βυνοποιημένο κριθάρι περιέχει περίπου τρεις φορές περισσότερες β-γλυκάνες από το βυνοποιημένο κριθάρι. Για να μειωθεί το ιξώδες του εκχυλίσματος του μη βυνοποιημένου κριθαριού, αποικοδομούνται οι β-γλυκάνες με την βοήθεια του ενζύμου β-γλυκανάση, το οποίο απαντάται σε παρασκευάσματα μικροβιακών ενζύμων.

- **Σιρόπια, Σκόνες Εκχυλισμάτων**

Επειδή η προσθήκη των συμπληρωμάτων μπορεί να οδηγήσει σε ανεπιθύμητες αλλαγές, εκχυλίσματα κριθαριού, σιταριού ή καλαμποκιού κατεργασμένα με ένζυμα ή οξύ έχουν εισαχθεί πρόσφατα υπό την μορφή σιροπιού ή σκόνης. Είναι δυνατή η προσθήκη σιροπιού από κριθάρι μέχρι και σε ποσοστό 45% του ολικού πολτού.

- **Εκχυλίσματα Βύνης, Συμπυκνωμένο Ζυθογλεύκος**

Για την παραγωγή εκχυλισμάτων βύνης χωρίς λυκίσκο ή συμπυκνωμένου ζυθογλεύκους με λυκίσκο, τα συνήθη ζυθογλεύκη, συμπυκνώνονται με εξάχνωση. Τέτοια συμπυκνώματα αραιώνονται πριν την χρήση. Η περιεκτικότητα των πικρών ενώσεων και η τάση τους να προκαλούν θόλωμα μειώνεται σε τέτοια συμπυκνώματα επειδή οι ταννίνες και οι πρωτεΐνες απομακρύνονται κατά το στάδιο της συμπύκνωσης.

- **Σάκχαρα Ζυθοποίησης**

Η σακχαρόζη, το ιμβερτοσάκχαρο και το αμυλοσάκχαρο, προστίθενται στο στάδιο της προσθήκης του λυκίσκου ή πριν την εμφιάλωση της μύρας.

1.3.3. Σύσταση

Υδατάνθρακες

Η περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες είναι περίπου 3-5%, ενώ σε μερικές δυνατές μπίρες ή μπίρες βύνης μπορεί να είναι σημαντικά ψηλότερη. Πέρα από τις δεξτρίνες, τους μονο- και ολιγοσακχαρίτες (μαλτοτριόζη, μαλτόζη, κλπ.) υπάρχουν και πεντοζάνες. Η γλυκερόλη βρίσκεται στην μπίρα συνήθως σε ποσοστό 0,2-0,3%.

Αζωτούχες Ενώσεις

Οι αζωτούχες ενώσεις την μπίρας (0,15-0,75%) προέρχονται κυρίως από τις πρωτεΐνες των πρώτων υλών και από τις ζύμες. Αποτελούνται κυρίως από πρωτεΐνες και υψηλού μοριακού βάρους προϊόντα αποικοδόμησης πρωτεϊνών. Και οι δύο αυτές κατηγορίες ενώσεων είναι υπεύθυνες για το θόλωμα της μπίρας κατά τη ψυχρή αποθήκευση. Τα ελεύθερα αμινοξέα που βρίσκονται στην βύνη βρίσκονται και στην μπίρα. Το γλουταμινικό οξύ θεωρείται ότι πιθανώς συνεισφέρει στην γεύση της μπίρας. Η παρουσία πτητικών αμινών έχει επίσης επιβεβαιωθεί.

Αιθανόλη

Η περιεκτικότητα σε αιθανόλη, η οποία έχει πολύ μεγάλη επίδραση στο άρωμα είναι 1,0-1,5% κατά βάρος για μια χαμηλής ζύμωσης μπίρα, πλούσιας σε εκχύλισμα, 1,5-2,0% για μια αδύναμη ή λεπτή μπίρα, 3,5-4,5% για μια γεμάτη μπίρα και 4,8-5,5 για μια δυνατή μπίρα. Ανώτερες αλκοόλες, όπως η 2-μεθυλο-βουτανόλη, 3-μεθυλο-βουτανόλη, μεθυλοπροπανόλη και 2-φαίνυλο-αιθανόλη, είναι επίσης παρούσες σε πολύ μικρές ποσότητες.

Εκχύλισμα

Τα μη αλκοολούχα συστατικά της μπίρας μπορεί να διαφέρουν σε μεγάλο βαθμό και κυμαίνονται από 2-3% για τις απλές μπίρες μέχρι 8-10% για τις δυνατές μπίρες. Αυτά τα συστατικά είναι τα στερεά της μπίρας και αποτελούνται κατά 80% από υδατάνθρακες, κυρίως δεξτρίνες.

Οξέα

Το διοξείδιο του άνθρακα είναι υπεύθυνο σε μεγάλο βαθμό για την δροσιστική αξία και την σταθερότητα της μύρας. Η περιεκτικότητα CO₂ είναι 0,36-0,44% σε μύρες ζύμωσης πυθμένα, ενώ στην μύρα Weiss η περιεκτικότητα του CO₂ φθάνει μέχρι και το 0,6-0,7%. Περιεκτικότητα CO₂ λιγότερο από 0,2% έχει ως αποτέλεσμα επίπεδες και άτονες μύρες. Το pH της μύρας είναι μεταξύ 4,7 (σκούρα, δυνατή μύρα) και 4,1 (μύρα Weiss).

Ανόργανα συστατικά

Τα ανόργανα συστατικά αποτελούν το 0,3-0,4% της μύρας και συνίστανται κυρίως από κάλιο και φώσφορο. Επίσης υπάρχουν ασβέστιο, μαγνήσιο, σίδηρος, χλώριο, θειικά και πυριτικά άλατα.

Βιταμίνες

Βιταμίνες του συμπλέγματος B (βιταμίνες B₁ και B₂, νικοτινικό οξύ, πυριδοξίνη και παντοθενικό οξύ) βρίσκονται σε διάφορους τύπους μύρας, συχνά σε σημαντικές ποσότητες.

Αρωματικές Ενώσεις

Ενώσεις που έχουν άρωμα ή/και γεύση και συνεισφέρουν στο άρωμα την μύρας. Ο τύπος την μύρας ουσιαστικά καθορίζεται από το είδος των κυρίαρχων αρωματικών και γευστικών ενώσεων. Η πικρή γεύση και ο τόνος του λυκίσκου στις μύρες Pilsner οφείλεται στις σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις ισοχουμουλονίων, χουμουλενίων και μυρκενίου, ενώ οι μεγαλύτερες ποσότητες φουρανεόλης είναι υπεύθυνες για την γεύση καραμέλας στις σκουρόχρωμες μύρες. Οι δευτερεύουσες αρωματικές και γευστικές ενώσεις βρίσκονται στο όριο της οργανοληπτικής αντίληψης. Ωστόσο η συγκέντρωση μερικών αρωματικών ενώσεων μπορεί να αυξηθεί και να φτάσει το όριο ανίχνευσης.

Αφριστικές ουσίες

Οι αφριστικές ιδιότητες της μύρας οφείλονται στις πρωτεΐνες, τους πολυσακχαρίτες και τα πικρά συστατικά. Οι β-γλυκάνες σταθεροποιούν τον αφρό μέσω της ικανότητας τους να αυξάνουν το ιξώδες.

1.3.4. Είδη μύρας

Υπάρχει διάκριση μεταξύ των μυρών με ζύμωση κορυφής και ζύμωση πυθμένα.

Μύρες Ζύμωσης Κορυφής

Επιλεγμένα παραδείγματα γερμανικών μυρών ζύμωσης κορυφής είναι :

- Η Βερολινέζικη Weiss (λευκή) μύρα που ζυθοποιείται από ζυθογλεύκος που περιέχει 7-8% στερεά, από βύνη κριθαριού και σιταριού και εμβολιάζεται κατά την ζύμωση με ζύμες και γαλακτικά βακτήρια.
- Η Βαυαρέζικη Weiss Μύρα που ζυθοποιείται από ελαφρά καπνισμένο ζυθογλεύκος κριθαριού με λίγη βύνη σιταριού και ζυμώνεται μόνο με ζύμες.
- Η μύρα Graetzer που παρασκευάζεται από βύνη σιταριού με καπνιστή γεύση και περιεκτικότητα σε στερεά ζυθογλεύκους (stemwort) 7-8%.
- Η μύρα βύνης ή καραμέλας (malt beer, caramel beer) είναι σκουρόχρωμη, γλυκιά με ελαφριά γεύση λυκίσκου, «γεμάτη» μύρα.
- Οι πικρές μύρες όπως αυτές από την Κολωνία ή το Ντίσελντορφ (Altbier, παλιά μύρα) οι οποίες έχουν έντονη γεύση λυκίσκου και είναι «γεμάτες» μύρες.
- Απλές μύρες ζύμωσης κορυφής (Jungbier, νέα μύρα) ή Frischbier (φρέσκια μύρα) οι οποίες έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε ζυθογλεύκος και συχνά έχουν γλυκανθεί με την προσθήκη γλυκαντικών.
- Braunschweig's mumme, ένα αζύμωτο, χωρίς λυκίσκο εκχύλισμα βύνης και επομένως όχι αληθινή μύρα ούτε και ποτό τύπου μύρας.
- Οι Αγγλικές μύρες έχουν περιεκτικότητα σε ζυθογλεύκος μέχρι 11-13%. Η μύρα Stout είναι πολύ σκουρόχρωμη και πλούσια σε αλκοόλη που παρασκευάζεται από συμπυκνωμένο βρασμένος γλεύκος (μέχρι 25% ζυθογλεύκος, περιεκτικότητα σε αλκοόλη > 6.5%. Περισσότερο ήπιες ποικιλίες Stout είναι γνωστές ως μύρες Porter.
- Η χλωμή ale είναι μια ελαφριά μύρα με πολύ λυκίσκο, ενώ η ήπια ale είναι σκουρόχρωμη με μικρότερη ποσότητα λυκίσκου. Προσθήκη αιθέριων ελαίων από τη ρίζα της ζιγγιβέρας (πιπερόριζα, ginger) αποδίδει ale με γεύση ζιγγιβέρας.
- Οι μύρες ζύμωσης κορυφής από το Βέλγιο, οι οποίες αποθηκεύονται για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα ονομάζονται μύρες Lambic και Faro.

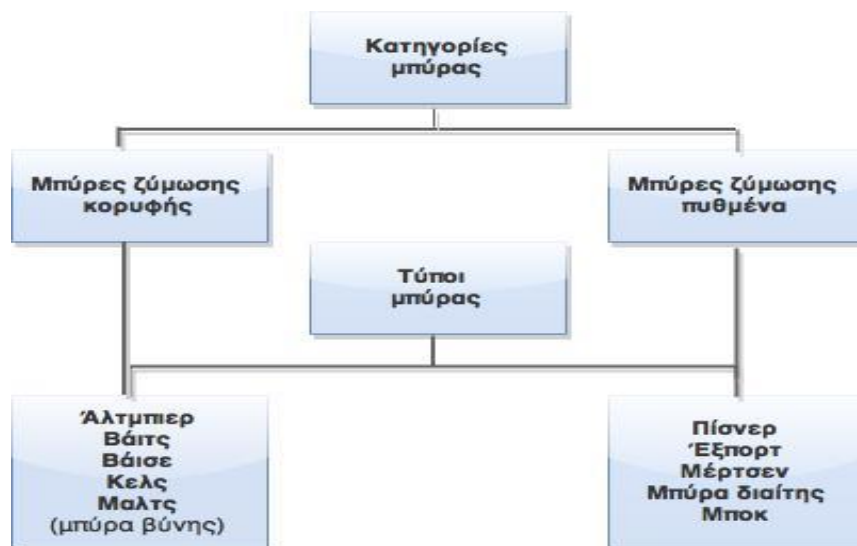
Μπύρες Ζύμωσης Πυθμένα

Αυτές οι μπύρες παρουσιάζουν αυξημένη σταθερότητα κατά την αποθήκευση και ζυθοποιούνται ως ελαφριές, ήπια χρωματισμένες ή σκούρες μπύρες.

Η Pilsner, παράδειγμα ανοιχτόχρωμης μπύρας, έχει συνήθως γεύση λυκίσκου και περιέχει 11.8-12.7% ζυθόγλευκος. Αντίθετα η μπύρα τύπου Dortmunder παρασκευάζεται από πιο συμπυκνωμένο ζυθόγλευκος το οποίο ζυμώνεται για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα και έχει επομένως μεγαλύτερη συγκέντρωση αλκοόλης. Η μπύρα lager (Βόρειο-Γερμανική Lager) είναι παρόμοια με την Dortmunder ως προς την γεύση του λυκίσκου, ενώ η περιεκτικότητα σε ζυθόγλευκος είναι πιο κοντά σε αυτό της μπύρας Pilsner. Οι μπύρες Μονάχου είναι σκουρόχρωμες με ελαφριά γεύση λυκίσκου και περιέχουν 0.5-2% χρωματισμένη βύνη και συχνά λίγη καραμελοποιημένη βύνη. Είναι γλυκές, έχουν χαρακτηριστικό άρωμα βύνης και ζυμώνονται με περιεκτικότητα ζυθόγλευκος 11-14%. Μπύρες με μεγάλη περιεκτικότητα εκχυλίσματος χαρακτηρίζονται ως μπύρες εξαγωγής. Οι παραδοσιακές σκουρόχρωμες μπύρες και οι καινούργιες ανοιχτόχρωμες (special light) μπύρες χαρακτηρίζονται μπύρες Bock (Salvator, Animator κλπ.). Χαρακτηρίζονται και αυτές ως δυνατές μπύρες με περισσότερο από 16% ζυθόγλευκος. Οι σκουρόχρωμες Nuernberg και Kulmbacher μπύρες έχουν ακόμα μεγαλύτερη ποσότητα έγχρωμων εκχυλισμάτων βύνης και επομένως είναι πιο σκούρες από τις μπύρες Μονάχου. Ένα παράδειγμα ήπια χρωματισμένης μπύρας είναι η Maerzen (κατά μέσο όρο 13,8% ζυθόγλευκος). Παράγεται από βύνη Μονάχου όπου παραλείπεται η προσθήκη χρωματισμένης βύνης.

Μπύρες Διαίτης

Οι μπύρες διαίτης παρουσιάζουν υψηλό βαθμό ζύμωσης και δεν περιέχουν σχεδόν καθόλου υδατάνθρακες, οι οποίοι είναι επιβλαβείς για τους διαβητικούς. Παράγονται με ειδικές μεθόδους ζύμωσης και περιέχουν σχετικά μεγάλες ποσότητες αλκοόλης. Στην συνέχεια το ποσοστό της αλκοόλης μειώνεται στα χαρακτηριστικά επίπεδα της κανονικής μπύρας [8].



Εικόνα 1.3.5.1 Κατηγορίες και τύποι μύρας

Οι μύρες διαιρούνται σε δύο κατηγορίες: μύρες ζύμωσης κορυφής και μύρες ζύμωσης πυθμένα. Στις αγγλόφωνες χώρες οι μύρες ζύμωσης πυθμένα ονομάζονται «**Lager**» και οι μύρες ζύμωσης κορυφής «**Ale**». Και από τις δύο κατηγορίες κυκλοφορούν διάφοροι τύποι μύρας στη γερμανική αγορά, όμως αυτές που κυριαρχούν τόσο από απόψεως παραγωγής όσο και από απόψεως πωλήσεων είναι οι μύρες χαμηλής ζύμωσης [9].

Μύρες με Χαμηλό ή Μηδενικό Ποσοστό Αλκοόλης

Η παραγωγή μύρας με χαμηλό ή μηδενικό ποσοστό αλκοόλης είναι δυνατή με την εφαρμογή κατάλληλων τεχνολογικών εφαρμογών, π.χ ανακοπή της ζύμωσης και χρήση ειδικών ζυμών, μείωση της περιεκτικότητας του ζυθογλεύκους και απομάκρυνση της αλκοόλης που σχηματίστηκε (με απόσταξη, υπερφυγοκέντρωση).

Μύρες Εξαγωγής

Αυτές οι μύρες προέρχονται από πολύ διαφορετικά είδη μύρας. Είναι κυρίως παστεριωμένες και έχουν κατεργαστεί επιπλέον με θρομβωτικούς ή προσροφητικούς παράγοντες (ταννίνη, μπεντονίτη) ή με παρασκευάσματα πρωτεολυτικών ενζύμων για την απομάκρυνση των περισσότερων πρωτεϊνών. Τα πρωτεολυτικά ένζυμα διασπούν τα μεγάλα πρωτεϊνικά μόρια σε διαλυτά προϊόντα. Τέτοιες μύρες είναι απαλλαγμένες από θόλωμα κατά την ψυχρή αποθήκευση ακόμα και μετά από παρατεταμένη μεταφορά και ψυχρή αποθήκευση [8].



Εικόνα 1.3.5.2 Είδη μύρας

Ανάλογα με την περιεκτικότητά τους σε μούστο, οι γερμανικές μύρες διαιρούνται σε είδη μύρας. Αυτή η διάκριση αποτελεί τη βάση και για την φορολόγηση κάθε μύρας. Από το ποσοστό του μούστου (επί του συνολικού βάρους) μπορεί να υπολογιστεί η περιεκτικότητα σε αλκοόλ της μύρας, δηλαδή όσο υψηλότερο είναι το ποσοστό του μούστου, τόσο μεγαλύτερη είναι συνήθως και η περιεκτικότητα σε αλκοόλ. Ο μαθηματικός τύπος υπολογισμού είναι :

$$\frac{\text{ποσοστό μούστου}(\text{ποσοστό}\% \text{ του βάρους}) \cdot 4}{10} = \text{κατά προσέγγιση ποσοστό αλκοόλ (\%vol)}$$

Εξαίρεση αποτελούν οι μύρες χωρίς αλκοόλη (το ανώτερο 0.5%vol) και οι μύρες με πολύ λίγο αλκοόλ (ελαφριές μύρες/ μύρες light) στις οποίες είτε διακόπτεται π.χ σε κάποιο ορισμένο στάδιο η διαδικασία της ζύμωσης με αποτέλεσμα να δημιουργείται λιγότερο αλκοόλ είτε αφαιρείται έπειτα το αλκοόλ, όπως συμβαίνει για παράδειγμα και με την μύρα βύνης (μύρα Μαλτς) που έχει ποσοστό μούστου μεν από 7% (άγλυκη) μέχρι και 12-13% (γλυκιά) αλλά ποσοστό αλκοόλ μόνο από 0.5 έως 1.5%vol.

Οι περισσότερες κανονικές μύρες έχουν περιεκτικότητα σε αλκοόλ 5%vol. Στις δυνατές μύρες η περιεκτικότητα σε αλκοόλ κυμαίνεται από 6 έως 9%vol. Στην Γερμανία οι

καταναλωτές μπορούν να επιλέξουν σήμερα ανάμεσα σε σχεδόν 6.000 εγχώριες μάρκες μπίρας.

Ακόμη και για τον ίδιο τύπο μπίρας (π.χ Πίλσνερ), κάθε παραγωγός έχει την δικιά του συνταγή: χρησιμοποιώντας διαφορετικά είδη μαγιάς, διαφορετικές τεχνικές, (νέρωμα της βύνης, διάρκεια διατήρησης) και διάφορα υλικά (ποικιλία λυκίσκου και είδος των προϊόντων λυκίσκου) «βάζει την δικιά του σφραγίδα» στην μπίρα που παράγει [9].

1.4 Παραγωγή Μπίρας

1.4.1 Παραγωγή Βύνης

Το σημαντικότερο συστατικό για την παραγωγή μπίρας είναι η βύνη, δηλαδή κάποιο δημητριακό (κυρίως κριθάρι) που αφού βραχεί αφήνεται να βλαστήσει. Κατά τη βλάστησή του παράγονται δημητριακού ένζυμα. Αυτά χρειάζονται αργότερα για την παρασκευή του μούστου (ζυθογλεύκους). Η διαδικασία βλάστησης διακόπτεται με θέρμανση (φρυγάνισμα) σε ένα ορισμένο στάδιο. Ανάλογα με την θερμοκρασία παράγεται ανοιχτόχρωμη ή πιο σκούρα βύνη, η οποία καθορίζει μαζί με άλλους παράγοντες το χρώμα και το άρωμα του τελικού προϊόντος.

1.4.2 Παραγωγή μούστου

Η βύνη αλέθεται, ανακατεύεται με νερό και θερμαίνεται βάσει συγκεκριμένου πλάνου θερμοκρασίας-χρόνου (μίγμα βύνης και νερού). Η αναλογία βύνης και νερού εξαρτάται από το είδος της μπίρας που θέλει να παρασκευάσει ο παραγωγός. Όσο ζεσταίνεται η βύνη, τα ένζυμα που περιέχονται σε αυτή διασπούν το αδιάλυτο στο νερό άμυλο σε διαλυτά σάκχαρα που μπορούν να ζυμωθούν (κυρίως σάκχαρο βύνης). Παράλληλα διασπώνται και τα υπόλοιπα μεγαλομόρια (πρωτεΐνες) που περιέχονται στους κόκκους του δημητριακού σε διαλυτά, μικρότερα μόρια.

Όταν πλέον όλο το άμυλο έχει μεταβληθεί σε σάκχαρα, ολοκληρώνεται η διαδικασία νερώματος της βύνης και το υγρό με το εκχύλισμα (μούστος μπίρας) διαχωρίζεται από τα στερεά υπολείμματα. Σε ένα μεγάλο καζάνι (κλίβανο) βράζεται το ζυθογλεύκος μαζί με λυκίσκο, που υπάρχει ήδη στο καζάνι, ή με εκχύλισμα λυκίσκου μέχρις ότου, μέσω της εξάτμισης του νερού, η συγκέντρωση των διαλυτών ουσιών που περιέχει να είναι αυτή που απαιτεί το είδος την μπίρας που πρόκειται να παρασκευαστεί (ποσοστό βασικού μούστου).

Ο λυκίσκος δεν δίνει στην μύρα μόνο τη χαρακτηριστική πικρίζουσα γεύση της αλλά επιδρά θετικά και στην διάρκεια συντήρησής της και στο σχηματισμό αφρού.

1.4.3 Ζύμωση

Σε ανοιχτά βαρέλια ή σε κλειστά μεγάλα δοχεία προστίθεται μαγιά στο κρύο πλέον ζυθογλεύκος. Παρασκευάζονται διάφορα είδη μαγιάς ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή διαφόρων κατηγοριών και τύπων μύρας. Για μύρες «χαμηλής ζύμωσης» χρησιμοποιείται η μαγιά που κατακάθεται μετά τη διαδικασία ζύμωσης στον πυθμένα των δοχείων.

Στις μύρες «υψηλής ζύμωσης» η μαγιά μετά τη διαδικασία της ζύμωσης ανεβαίνει προς τα επάνω. Σε αυτές, η ζύμωση του μούστου γίνεται σε υψηλότερες θερμοκρασίες (περίπου 15-25 βαθμούς Κελσίου) και σε συντομότερο χρονικό διάστημα (περίπου 5 ημέρες). Στις μύρες χαμηλής ζύμωσης η ζύμωση γίνεται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (περίπου 5-10 βαθμούς Κελσίου) και γι' αυτό διαρκεί περισσότερο (περίπου 8 ημέρες). Κατά τη ζύμωση τα σάκχαρα που περιέχονται στο ζυθογλεύκος μετατρέπονται σε αλκοόλη, εκτός από ένα μικρό ποσοστό τους. Παράλληλα σχηματίζεται διοξείδιο του άνθρακα, το οποίο είτε αποβάλλεται στην ατμόσφαιρα είτε δεσμεύεται για να χρησιμοποιηθεί αργότερα κάπου αλλού.

1.4.4 Ωρίμανση

Ενώ συνήθως στις μύρες υψηλής ζύμωσης δεν ακολουθεί κάποια ξεχωριστή φάση ωρίμανσης, οι «νεαρές μύρες» χαμηλής ζύμωσης μετά τη ζύμωση μεταφέρονται σε κλειστά δοχεία που είναι εξοπλισμένα με βαλβίδες πίεσης. Εκεί, αναλόγως και του τύπου της μύρας που πρόκειται να παρασκευαστεί, αφήνονται σε θερμοκρασίες κοντά στο μηδέν για διάστημα πολλών εβδομάδων που μπορεί να φτάσουν και τους 4 μήνες προκειμένου να ωριμάσουν (γερμ. Lager = «αποθήκευση»). Γι' αυτό και στο εξωτερικό οι μύρες χαμηλής ζύμωσης ονομάζονται «Lager». Η διαδικασία ωρίμανσης είναι πολύ σημαντική για την ποιότητα της μύρας. Όσο καιρό διατηρείται η μύρα, διαμορφώνεται και ολοκληρώνεται η γεύση της. Από τα υπάρχοντα υπολείμματα σακχάρων ξεκινά μια δεύτερη διαδικασία ζύμωσης. Όμως το διοξείδιο του άνθρακα, που σχηματίζεται, δεν μπορεί σε αυτή τη περίπτωση να διαφύγει, αλλά παραμένει στην μύρα (ανθρακικό οξύ) και ευθύνεται για το δροσιστικό, φρέσκο χαρακτήρα του ποτού. Επιπλέον, κατά το διάστημα διατήρησης φιλτράρονται οι θολωτικές ουσίες (στοιχεία μαγιάς και λευκώματος), ώστε να μην μπορούν αργότερα να δημιουργήσουν αντιαισθητικά θολώματα μέσα στο μπουκάλι.

Με τη βοήθεια διαλυτικών μέσων και μέσω διήθησης απομακρύνονται από την μύρα και οι υπόλοιπες ουσίες που μπορεί να προκαλέσουν θολώματα, και έπειτα γίνεται η εμφιάλωση σε μπουκάλια, μεταλλικά κουτάκια ή βαρέλια. Για να διατηρείται η μύρα μεγαλύτερο διάστημα συνήθως υποβάλλεται σε θερμική επεξεργασία (παστεριώνεται), πράγμα που δεν είναι υποχρεωτικό να αναγράφεται στην ετικέτα αλλά που μπορεί να έχει ως συνέπεια κάποιες ελάχιστες μεταβολές στη γεύση [9].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ

2.1 Γενικά

Ο όρος πολυφαινόλες (polyphenols, PP) χρησιμοποιείται για να περιγράψει ένα ετερογενές σύνολο ενώσεων που χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη ενός ή περισσότερων υδροξυλίων απευθείας συνδεδεμένων σε έναν ή περισσότερους αρωματικούς ή ετεροκυκλικούς δακτυλίους [10]. Τα φυτά αποτελούν άριστη πηγή φαινολικών συστατικών και μάλιστα σε αρκετά μεγάλες συγκεντρώσεις. Σήμερα περισσότερες από 8000 φαινολικές και πολυφαινολικές δομές έχει εξακριβωθεί ότι αποτελούν συστατικά των φυτικών οργανισμών [11].

Στην πλειοψηφία τους οι πολυφαινόλες εμφανίζονται συζευγμένες με υδατάνθρακες μέσω των υδροξυλίων τους. Τα σάκχαρα αυτά μπορεί να είναι μονοσακχαρίτες, δισακχαρίτες ή ολιγοσακχαρίτες. Παραδείγματα τέτοιων σακχάρων είναι η γαλακτόζη, η ξυλόζη, η αραβινόζη, η ραμνόζη, τα γλυκουρονικά και τα γαλακτορονικά οξέα κ.α. Το σάκχαρο που εμφανίζεται συχνότερα είναι η γλυκόζη [10].

Οι πολυφαινόλες είναι αρκετά διαδεδομένες στα φυτικά τρόφιμα (λαχανικά, φρούτα, φυτικά έλαια κ.ά) και στα ποτά (κρασί, μύρα, τσάι, κακάο, καφές κ.ά) και είναι εν μέρει υπεύθυνες για τις διατροφικές τους ιδιότητες. Η στιφή και πικρή γεύση των τροφίμων και των ποτών εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από την περιεκτικότητά τους σε πολυφαινόλες [10].

Οι πολυφαινόλες απαντώνται στους φυτικούς οργανισμούς ως δευτερογενείς μεταβολίτες και διακρίνονται ανάλογα με την προέλευση τους, τη βιολογική τους δράση και τη δομή τους, κυρίως βάσει του αριθμού των φαινολικών τους δακτυλίων και των δομικών ομάδων που είναι συνδεδεμένες σε αυτούς σε [12]

A. φαινολικά οξέα

B. φλαβονοειδή (φλαβόνες, φλαβανόνες, φλαβονόλες, ισοφλαβονοειδή, κατεχίνες, χαλκόνες, ανθοκυανίνες)

Γ. στιλβένια

Δ. κουμαρίνες

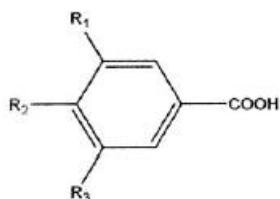
A. Φαινολικά οξέα

Τα φαινολικά οξέα αποτελούν την πιο απλή, συγκριτικά, κατηγορία και συνιστούν το 1/3 των φαινολικών συστατικών που προσλαμβάνει ο άνθρωπος μέσω της διατροφής. Παράγονται από εξειδικευμένα κύτταρα, ενώ οι πρόδρομες ενώσεις για τη βιοσύνθεσή τους είναι η φαινυλαλανίνη και το σικιμικό οξύ από τα οποία και σχηματίζονται μέσω των ομώνυμων βιοσυνθετικών οδών.

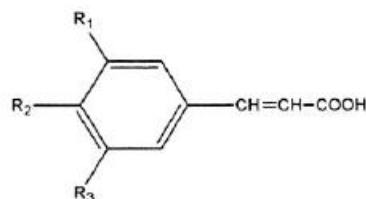
Τα φαινολικά οξέα μπορούν περαιτέρω να κατηγοριοποιηθούν ανάλογα με τη δομή τους σε παράγωγα του βενζοϊκού οξέος (C6-C1) και του κινναμωμικού οξέος (C6-C3). Και οι δύο αυτές κατηγορίες έχουν ως βασικό σκελετό έναν αρωματικό δακτύλιο υποκατεστημένο με μια καρβοξυλική ομάδα (βενζοϊκά οξέα) ή με ένα προπENOϊκό οξύ (κινναμωμικά οξέα) [13, 14]. Επίσης και οι δύο δομές μπορούν να βρεθούν με διαφορετικό βαθμό υδροξυλίωσης ή/και μεθυλίωσης [15].

Τα φαινολικά οξέα μπορεί να βρίσκονται είτε σε ελεύθερη μορφή μέσα στα κύτταρα είτε να σχηματίζουν ενώσεις με άλλα μόρια. Συνήθως σχηματίζουν εστέρες με κινικό οξύ, τρυγικό οξύ ή παράγωγα σακχάρων και καλούνται χλωρογενικά οξέα [13, 16]. Τέλος, η χαρακτηριστική χημική δομή των φαινολικών οξέων τους επιτρέπει να συνδέονται με εστερικούς ή αιθερικούς δεσμούς και να σχηματίζουν διμερείς δομές. Για παράδειγμα η λιγνίνη σχηματίζεται από την ένωση δυο μορίων κινναμωμικού οξέος [11]. Δομές μερικών φαινολικών οξέων παρουσιάζονται στην Εικόνα 2.1

(a) Benzoic acid



(b) Cinnamic acid

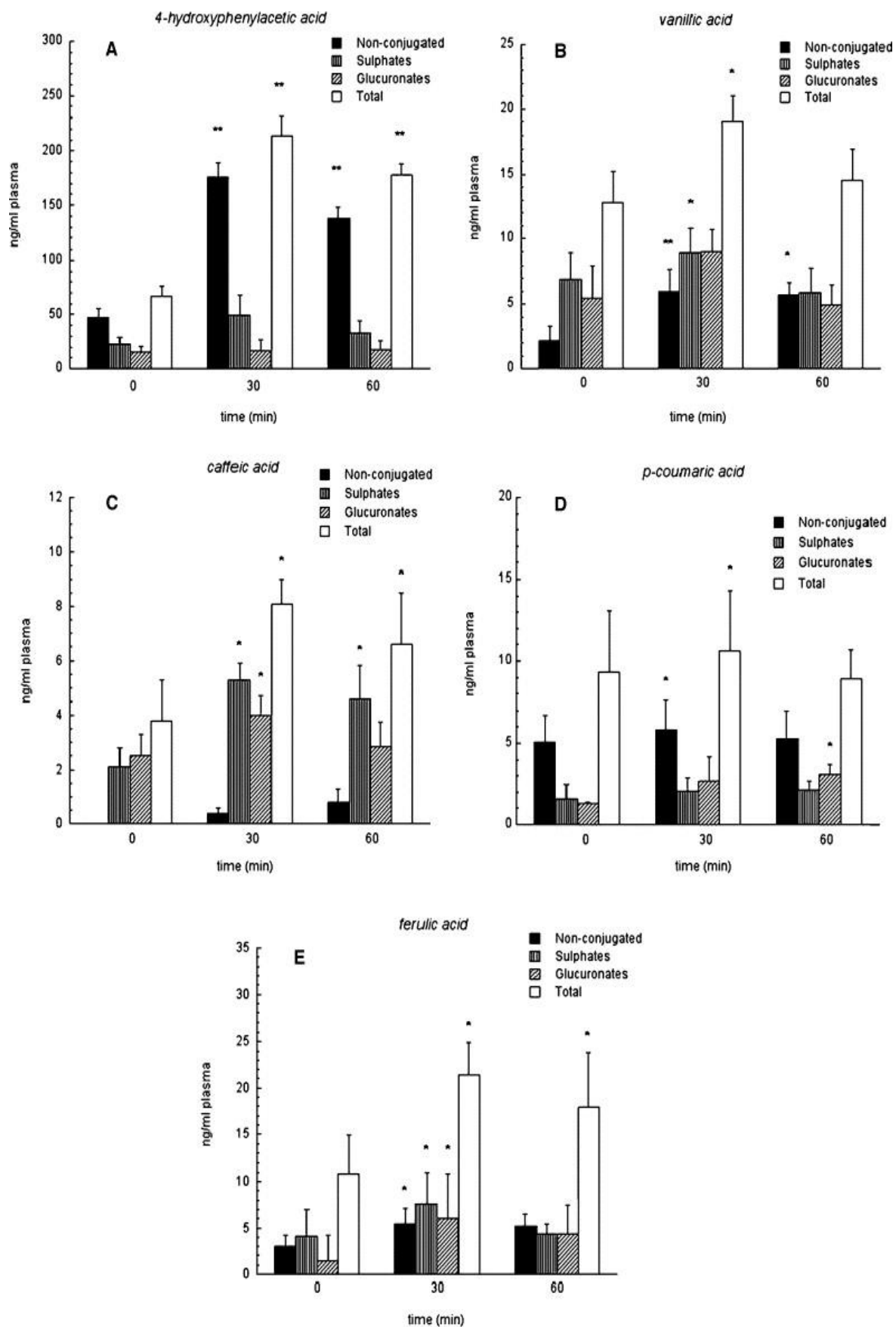


Benzoic acid Derivatives	Substitutions		
	R ₁	R ₂	R ₃
p-Hydroxybenzoic	H	OH	H
Protocatechuic	H	OH	OH
Vannilic	CH ₃ O	OH	H
Syringic	CH ₃ O	OH	CH ₃ O
Gallic	OH	OH	OH

Cinnamic acid Derivatives	Substitutions		
	R ₁	R ₂	R ₃
p-Coumaric	H	OH	H
Caffeic	OH	OH	H
Ferulic	CH ₃ O	OH	H
Sinapic	CH ₃ O	OH	CH ₃ O

Εικόνα 2.1 Δομές φαινολικών οξέων α) βενζοϊκό οξύ και παράγωγά του, β) κινναμωμικό οξύ και παράγωγά του.

Η μύρα περιέχει σημαντικές ποσότητες φαινολικών ενώσεων που συμβάλλουν στην συνολική αντιοξειδωτική δράση του προϊόντος. Τα φαινολικά οξέα φερουλικό, καφεϊκό και σιναπικό είναι παρόντα στις μύρες κυρίως σε συζευγμένες μορφές ενώ τα *p*-υδροξυφαινυλοξικό οξύ και *p*-κουμαρικό οξύ υπάρχουν κυρίως σε ελεύθερη μορφή. Το βανιλικό οξύ είναι παρόν εξίσου ως ελεύθερο και ως συζευγμένο. Τα φαινολικά οξέα της μύρας απορροφώνται από τη γαστρεντερική οδό και ανιχνεύονται στο αίμα, μετά από τον μεταβολισμό υπό μορφή γλυκουρονικών και σουλφονικών παραγώγων. Μετά την χορήγηση μύρας έχει παρατηρηθεί σημαντική αύξηση των ελεύθερων και των συζευγμένων μορφών φαινολικών οξέων στο ανθρώπινο πλάσμα, με μέγιστη απορρόφηση στα 30 λεπτά, όπως παρουσιάζονται στην παρακάτω Εικόνα 2.2 [17].



Εικόνα 2.2

B. Φλαβονοειδή

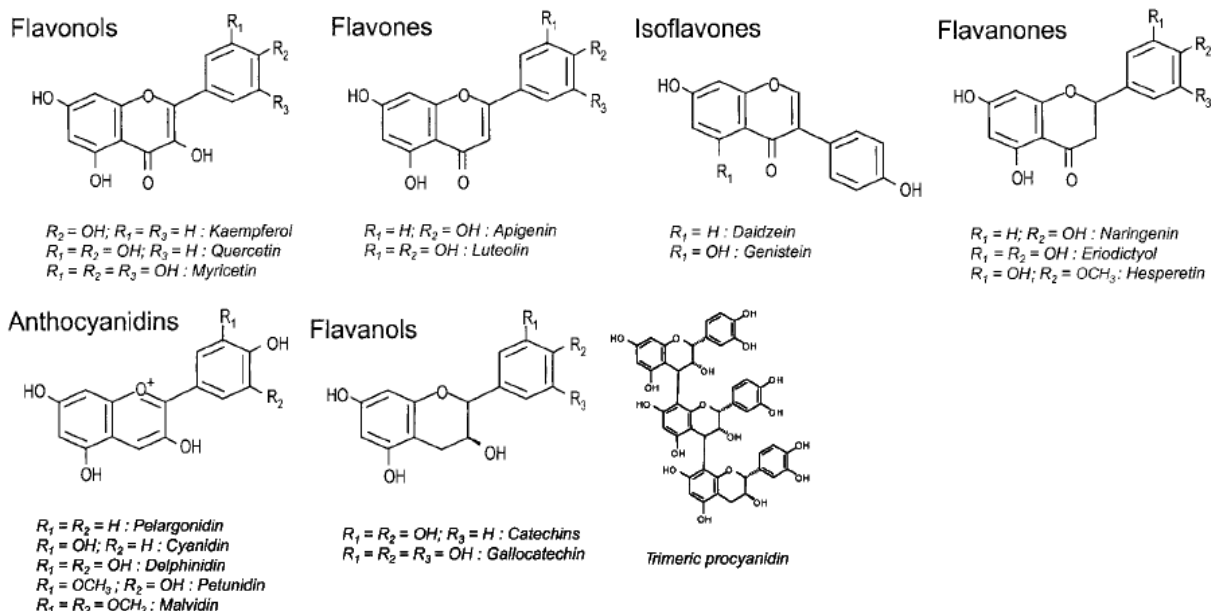
Τα φλαβονοειδή είναι μια μεγάλη κατηγορία πολυφαινολικών ενώσεων που παράγονται από πολλούς φυτικούς οργανισμούς. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί πάνω από 4000 τέτοιες ενώσεις. Αρχικά τα φλαβονοειδή είχαν καταταχθεί στις βιταμίνες με την ονομασία βιταμίνη P ή βιταμίνη C2 καθώς παρατηρήθηκε ότι προστατεύουν την βιταμίνη C από την οξείδωση. Ωστόσο, βλέποντας ότι δεν έχουν τις ιδιότητες των βιταμινών, καθώς η έλλειψη αυτών δεν προκαλούσε συμπτώματα παρόμοια με αυτά της ανεπάρκειας βιταμινών, τα κατέταξαν στην κατηγορία των πολυφαινολών [18].

Οι ενώσεις αυτές έχουν παρόμοιο βασικό δομικό σκελετό. Συγκεκριμένα, αποτελούνται από δυο αρωματικούς δακτυλίους (A και B), οι οποίοι ενώνονται μεταξύ τους με τρία άτομα άνθρακα προς ένα οξυγονωμένο ετεροκυκλικό δακτύλιο (C) [13, 19]. Ανάλογα με τη χημική τους δομή τα φλαβονοειδή διακρίνονται σε φλαβονόλες, φλαβόνες, φλαβονόνες, ισοφλαβονοειδή, φλαβανόλες, που περιλαμβάνουν τις κατεχίνες και τις προανθοκυανιδίνες και ανθοκυανίνες [18, 20]. Τα ισοφλαβονοειδή, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα φλαβονοειδή τα οποία έχουν τον B φαινολικό δακτύλιο στη θέση 2 του ετεροκυκλικού δακτυλίου, έχουν το B φαινολικό δακτύλιο στη θέση 3 [18]. Τα πολυμερή παράγωγά τους ονομάζονται ταννίνες και χωρίζονται σε δύο κατηγορίες ανάλογα με τη δομή τους, τις συμπυκνωμένες και τις υδρολυμένες ταννίνες. Οι συμπυκνωμένες ταννίνες είναι πολυμερή των φλαβονοειδών και οι υδρολυμένες περιλαμβάνουν το γαλλικό οξύ [21]. Στην Εικόνα 2.3 παρουσιάζονται οι βασικές δομές των φλαβονοειδών και οι υποκατηγορίες τους.

Τα φλαβονοειδή, όπως και τα φαινολικά οξέα, απαντούν σε ελεύθερη μορφή αλλά μπορούν να σχηματίζουν ενώσεις και με άλλες ουσίες. Αποτέλεσμα αυτού είναι να βρίσκονται είτε ως γλυκοζυλιωμένα παράγωγα με απλούς υδατάνθρακες, όπως γλυκόζη, ραμνόζη ή/και γαλακτόζη, αραβινόζη, ξυλόζη (φλαβονόλες), αλλά και με δισακχαρίτες (φλαβανόνες, ισοφλαβόνες). Τέλος, οι φλαβόνες συνήθως απαντούν ως εστέρες με μόρια λουτεολίνης ή απιγενίνης [20].

Επιπλέον, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι, οι ισοφλαβόνες, αν και δεν είναι στεροειδή, έχουν παρόμοια δομή με τα οιστρογόνα. Συγκεκριμένα, στις θέσεις 4 και 7 έχουν ως υποκαταστάτη το OH, όπως και το μόριο της οιστραδιόλης. Το γεγονός αυτό τους προσδίδει

ψευδοορμονικές ιδιότητες [22]. Γι'αυτό το λόγο χαρακτηρίζονται ως διφαινολικά οιστρογόνα [23].



Εικόνα 2.3 Δομές και υποκατηγορίες φλαβονοειδών

Η μύρα περιέχει μια ποικιλία πολυφαινολών που είναι σημαντική για τη χημική σταθερότητα της, και περιλαμβάνουν πρενυλιωμένα φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα, απλές φαινόλες, φλαβανόλες, υδροξυκουμαρίνες, φλαβόνες [24] προανθοκυανιδίνες, ταννίνες, και αμινο-φαινολικές ενώσεις [25]. Τα φλαβονοειδή και ταννίνες έχουν μελετηθεί κυρίως μέχρι σήμερα για τις φυσιολογικές τους ιδιότητες. Τα φλαβονοειδή αναφέρονται συνήθως ως αντιοξειδωτικά, λόγω των οξειδοαναγωγικών διατήτων τους, που τους επιτρέπουν να ενεργούν ως αναγωγικά μέσα, ως δότες υδρογόνου και ως καταστολείς ελευθέρων ριζών (μονήρους) οξυγόνου. Ως εκ τούτου, μπορούν να αποτρέψουν ασθένειες που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες, όπως ο καρκίνος, τα καρδιαγγειακά νοσήματα, τα αυτοάνοσα νοσήματα και ασθένειες που σχετίζονται με την ηλικία [26]. Οι ταννίνες έχουν αναφερθεί ότι έχουν αντικαρκινικές, αντιμεταλλαξογόνες και αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Τέλος έχει αναφερθεί ότι αναστέλλουν την ανάπτυξη των μυκήτων, των βακτηρίων και των ιών [27].

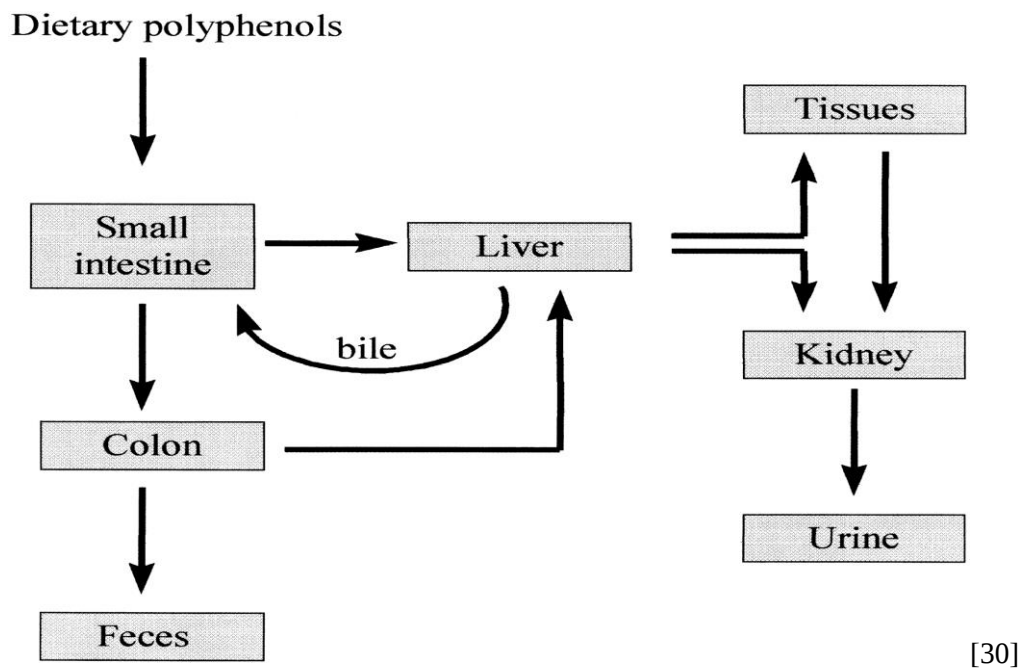
2.2 Φυσιολογικές δράσεις πολυφαινόλων

Οι κύριοι προστατευτικοί μηχανισμοί στους οποίους εμπλέκονται οι PP συνοψίζονται στα παρακάτω [10] :

- **Αντιοξειδωτική δράση.** Έχουν την ικανότητα να λειτουργούν ως «δεσμευτές» ελευθέρων ριζών γεγονός το οποίο τις καθιστά ιδιαίτερα σημαντικές για την πρόληψη διάφορων παθολογικών καταστάσεων όπως του καρκίνου και των καρδιαγγειακών παθήσεων. Για παράδειγμα, αναστέλλουν την οξείδωση της LDL, της οποίας η οξειδωμένη μορφή εμπλέκεται στο σχηματισμό αθηρωματικής πλάκας [28].
- **Επίδραση στην πέψη των μακροθρεπτικών συστατικών.** Σε μεγαλύτερο βαθμό οι εκτενώς πολυμερισμένες ταννίνες συνδέονται και καταβυθίζουν πρωτεΐνες (μεταξύ αυτών πρωτεΐνες και υδρολυτικά ένζυμα που εμπλέκονται στην πέψη λιπών και υδατανθράκων) με αποτέλεσμα τη καθυστέρηση της απορρόφησης τους.
- **Επίδραση στην απορρόφηση μεταλλικών κατιόντων.** Τα φλαβονοειδή κυρίως, παρεμποδίζουν την απορρόφηση ιόντων που συμβάλλουν στη δημιουργία ελεύθερων ριζών (Fe, Cu, Zn, Na, Al) μέσω του σχηματισμού σταθερών συμπλόκων.
- **Μείωση των επιπέδων σακχάρου και χοληστερόλης στο αίμα.** Κυρίως από ταννίνες και πολυφαινόλες του ελαιολάδου.
- **Προστασία επιθηλιακών κυττάρων του αναπνευστικού συστήματος.**
- **Αύξηση των επιπέδων της HDL και μείωση αυτών της LDL.** Δράση που αποδίδεται κυρίως στις ταννίνες.
- **Αντικαρκινική δράση.** Προάγουν την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων στο παχύ έντερο. Οι κατεχίνες του τσαγιού έχουν δείξει τη μεγαλύτερη αντικαρκινική δράση.
- **Αντιμικροβιακή και αντιβακτηριακή δράση.**
- **Αντιαλλεργικές ιδιότητες.** Παρεμπόδιση συσσώρευσης αιμοπεταλίων.
- **Αγγειοδιασταλτική δράση.** Διαμέσου της παραγωγής ενδοκυτταρικού NO.
- **Προστασία του DNA από ενδοκυτταρικές προσβολές.**

2.3 Βιοδιαθεσιμότητα πολυφαινολών

Η βιολογική δράση των πολυφαινολών εξαρτάται από τη βιοδιαθεσιμότητά τους. Το κατά πόσον θα απορροφηθεί και θα μεταβολιστεί μία πολυφαινόλη από τον οργανισμό εξαρτάται από παράγοντες όπως η χημική δομή (επηρεάζεται από το βαθμό γλυκοζυλίωσης / ακυλίωσης), η βασική δομή (βενζολικός ή φλαβονοειδικός πυρήνας), η σύζευξη με άλλες πολυφαινόλες, σάκχαρα και οξέα, το μοριακό βάρος, ο βαθμός πολυμερισμού και η υδατοδιαλυτότητα των πολυφαινολών [10]. Οι πολυφαινόλες που απορροφώνται, μεταβολίζονται στο συκώτι και εκκρίνονται στη χολή και φτάνουν στο κόλον με διαφορετική χημική μορφή, όπως γλυκουρονικά παράγωγα, ενώ οι πολυφαινόλες που δεν απορροφώνται στο στομάχι ή στο λεπτό έντερο, μεταφέρονται στο κόλον χωρίς να μεταβληθεί η χημική δομή τους. Το κόλον έχει σημαντική μικροχλωρίδα, η οποία έχει πιθανές καταλυτικές και υδρολυτικές ιδιότητες για διάσπαση των πολυφαινολών σε απλούστερες ενώσεις, όπως φαινολικά οξέα [29].



Εικόνα 2.3.1 Πιθανά μονοπάτια που ακολουθούν οι πολυφαινόλες που έχουν καταναλωθεί από ανθρώπους.

3.1 Ελεύθερες ρίζες - Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS)

Οι ελεύθερες ρίζες είναι μόρια τα οποία παράγονται στον ανθρώπινο οργανισμό μέσα από διάφορα μονοπάτια του μεταβολισμού των κυττάρων. Οι ελεύθερες ρίζες που περιέχουν οξυγόνο ονομάζονται δραστικές μορφές οξυγόνου. Σχηματίζονται στον οργανισμό κατά την έκθεση σε περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως π.χ. αιθαλομίχλη, όζον, χημικά, αλλά και φάρμακα, καθώς επίσης κατά τη διάρκεια φυσιολογικών λειτουργιών όπως η άμυνα του οργανισμού έναντι μικροβίων και άλλων ξένων ουσιών [31]. Η δράση τους έχει συσχετισθεί με την εμφάνιση σημαντικών ασθενειών που μαστίζουν το Δυτικό Κόσμο όπως καρκίνος, καρδιαγγειακά νοσήματα και νευρολογικές παθήσεις [32]. Ο όρος ελεύθερη ρίζα αντιπροσωπεύει ένα άτομο ή ένα μόριο το οποίο έχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Εξαιτίας αυτής της ασταθούς κατάστασης, οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν μεταξύ τους ή με άλλες ενώσεις έτσι ώστε τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια να σχηματίσουν ζεύγος ηλεκτρονίων. Ως εκ τούτου είναι εν δυνάμει πολύ δραστικά μόρια και μπορούν να εκφυλίσουν κυτταρικά μόρια όπως λιπίδια, πρωτεΐνες ακόμα και το ανθρώπινο γονιδίωμα (DNA) δημιουργώντας παθολογικές καταστάσεις [33].

3.2 Αντιοξειδωτικά

Αντιοξειδωτικά ονομάζονται οι ουσίες οι οποίες προστατεύουν τον οργανισμό από τις επιβλαβείς δράσεις των ενεργών μορφών οξυγόνου και των ελεύθερων ριζών [34]. Ο ανθρώπινος οργανισμός διαθέτει ορισμένες ουσίες, οι οποίες λειτουργούν ως αντιοξειδωτικά. Οι ουσίες αυτές είναι τα ένζυμα καταλάση, υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και δισμουτάση. Εκτός των ενδογενών αντιοξειδωτικών, σημαντικές ποσότητες αντιοξειδωτικών προσλαμβάνονται και μέσω της διατροφής, κυρίως μέσω της κατανάλωσης φρούτων, λαχανικών και αρωματικών φυτών που περιέχουν ουσίες με αντιοξειδωτική δράση όπως βιταμίνες, καροτενοειδή και πολυφαινόλες. Πολλές μελέτες έχουν αναδείξει πως η αυξημένη κατανάλωση φρούτων, λαχανικών και βοτάνων πλούσιων σε αντιοξειδωτικά σχετίζεται με μειωμένη εμφάνιση διαφόρων μορφών καρκίνου, προστασία από καρδιαγγειακές παθήσεις και μείωση εμφάνισης ασθενειών σχετιζομένων με την ηλικία [31].

Όσον αφορά τις πολυφαινόλες, η αντιοξειδωτική τους δράση οφείλεται στην ικανότητα τους να:

- *δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες,*
- *είναι δότες ατόμων υδρογόνου ή*
- *δότες ηλεκτρονίων,*
- *δημιουργούν χηλικά σύμπλοκα με μεταλλικά κατιόντα* [35]
- *αναστέλλουν τη δράση οξειδωτικών ενζύμων* (οξειδάση της ξανθίνης, πρωτεϊνική κινάση C, κυκλοοξυγονάση, λιποοξυγονάση, NADH οξειδάση) [36]
- *επάγουν τη δράση ενδογενών αντιοξειδωτικών ενζύμων.* Ορισμένες πολυφαινόλες επάγουν ένζυμα της φάσης II του μεταβολισμού, όπως η τρανσφεράση της γλουταθειόνης, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η απέκκριση οξειδωτικών παραγόντων από τον οργανισμό, ή άλλα αντιοξειδωτικά ένζυμα, όπως η μεταλλοθειονίνη ή το κυτόχρωμα P450 [37]
- *προστατεύουν εξωγενή αντιοξειδωτικά,* όπως τις βιταμίνες E και C, το β-καροτένιο, το λυκοπένιο κ.α..

Οι περισσότερες από τις πολυφαινόλες με αντιοξειδωτική δράση λειτουργούν ως τερματιστές της αλυσιδωτής αντίδρασης των ελευθέρων ριζών χάρη στην ικανότητά τους να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες. Ο μηχανισμός δέσμευσης των ελευθέρων ριζών από τις πολυφαινόλες πραγματοποιείται με δύο τρόπους, πιο συγκεκριμένα μέσω μιας άμεσης διαδικασίας μεταφοράς υδρογόνου και μέσω μιας συζευγμένης μεταφοράς πρωτονίου και ηλεκτρονίου.



Όπου, PPH = πολυφαινόλες

$R^{\bullet}$ = δραστική ελεύθερη ρίζα [υπεροξειδικό ανιόν ($O_2^{\bullet}$), υδροξυλική ρίζα ($HO^{\bullet}$)] [38]

$PP^{\bullet}$ = φαινοξυ-ρίζα, ελεύθερη ρίζα πολυφαινόλης

3.3 Η αντιοξειδωτική δράση της μύρας

Η μύρα είναι ένα πολύπλοκο μείγμα στο οποίο έχουν ανιχνευθεί περισσότερες από 400 διαφορετικές ενώσεις, ανάμεσα στα οποία και φυσικά αντιοξειδωτικά όπως πολυφαινόλες και φαινολικά οξέα [39].

Τα αντιοξειδωτικά της μύρας προέρχονται κυρίως από το κριθάρι και το λυκίσκο. Η αντιοξειδωτική δύναμη της μύρας επηρεάζεται από το αντιοξειδωτικό περιεχόμενο των συστατικών και τις μεταβολές κατά την διάρκεια της διαδικασίας της ζυθοποίησης, τη θερμοκρασία και το pH κατά την πολτοποίηση, κατά τον βρασμό και τις ποικιλίες λυκίσκου που προστίθενται κατά τον βρασμό του ζυθογλεύκου και κατά τη ζύμωση. Τα κύρια αντιοξειδωτικά συστατικά στην μύρα είναι φαινολικές ενώσεις και ουσίες που σχηματίζονται κατά την αντίδραση Maillard. Επιπλέον κάποια πρόσθετα (π.χ βιταμίνη C) που χρησιμοποιούνται στην μύρα μπορεί επίσης να συνεισφέρουν στην αντιοξειδωτική της ικανότητα.

Η αντίδραση Maillard είναι πολύ κοινή στα προϊόντα τροφίμων. Στην περίπτωση της μύρας, οι ενώσεις Maillard αρχικά σχηματίζονται κατά την διαδικασία της πολτοποίησης και στην συνέχεια κατά την εξαγωγή και τις διαδικασίες βρασμού. Οι ενώσεις αυτές και οι ιδιαίτερα οι μελανοϊδίνες επηρεάζουν το χρώμα, το άρωμα και την γεύση χαρακτηρίζοντας κάποιους ιδιαίτερους τύπους μύρας, και φυσικά επηρεάζουν την αντιοξειδωτική ικανότητα της μύρας [40]. Οι μαύρες μύρες είναι φανερό ότι περιέχουν περισσότερες από αυτές τις ενώσεις που είναι υπεύθυνες για το χαρακτηριστικό χρώμα, από ότι οι lager ή οι μύρες χωρίς αλκοόλ [41].

Οι φαινολικές ενώσεις παίζουν έναν ρόλο κλειδί ως αντιοξειδωτικά εξαιτίας της παρουσίας ενός υδροξυλικού υποκαταστάτη και της αρωματικής τους δομής, η οποία τους επιτρέπει να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες. Η σχέση μεταξύ των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων και του συνολικού φαινολικού περιεχομένου έχουν επιβεβαιωθεί σε πολλές μελέτες για το κρασί και την μύρα [25].

Η ιδέα ότι τα φαινολικά οξέα μπορεί να είναι η πιο σημαντική ομάδα των φαινολικών αντιοξειδωτικών των τροφίμων υποστηρίζεται από έναν σημαντικό αριθμό άρθρων που αποδεικνύουν ότι αυτές οι ενώσεις δεν υποβαθμίζονται στον γαστρεντερικό σωλήνα του ανθρώπου πριν την απορρόφηση [17]. Η μύρα επιπλέον περιέχει φλαβονοειδή όπως η κατεχίνη, η επικατεχίνη, η κερκετίνη, οι οποίες προέρχονται από τα εξωτερικά στρώματα

της βύνης και των λυκίσκων [42]. Η αντιοξειδωτική ικανότητα της μύρας προέρχεται τόσο από τις επιμέρους βιοδραστικές ενώσεις όσο και από την συνεργιστική δράση μεταξύ τους, από τα ιχνοστοιχεία, τα μέταλλα και άλλα συστατικά των τροφίμων [40].

3.4 Οξειδωτικό στρες και μύρα

Ως οξειδωτικό στρες χαρακτηρίζεται η ανισορροπία μεταξύ παραγωγής ελευθέρων ριζών και δραστικών μεταβολιτών που ονομάζονται οξειδωτικοί παράγοντες ή δραστικές ενώσεις 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 ομοιότητα του οργανισμού με αποτέλεσμα την ανάπτυξη ασθενειών [43].

Το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται στην παθολογία πολλών ασθενειών, όπως στην αθηροσκλήρωση, στον διαβήτη, σε νευροεκφυλιστικές νόσους, στη γήρανση και στον καρκίνο. Τα διαιτητικά αντιοξειδωτικά ίσως να μπορούν να παρέχουν προστασία έναντι ασθενειών που σχετίζονται με το στρες. Τα ποτά αντιπροσωπεύουν σημαντικό κλάσμα των διατροφικά προσλαμβανόμενων αντιοξειδωτικών στην Μεσογειακή διατροφή [44]. Ο καφές είναι ο κύριος συντελεστής, ακολουθούμενος από το κόκκινο κρασί, χυμούς φρούτων, τσάι και μύρα. Ανάμεσα στα διατροφικά προσλαμβανόμενα αντιοξειδωτικά, τα πιο άφθονα είναι τα φαινολικά.

3.5 Μύρα, αλκοόλ και ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία

Η μύρα είναι ένα κοινό ποτό, σχετικά πλούσιο σε φαινολικές ενώσεις, με μέτρια αντιοξειδωτική δράση και με χαμηλή περιεκτικότητα αιθανόλης. Ήπια έως μέτρια κατανάλωση αλκοόλ σχετίζεται με ευεργετικές επιδράσεις στην καρδιαγγειακή υγεία [5, 45-48]. Η πλειοψηφία των πιο πρόσφατων μεγάλων πληθυσμιακών μελετών έχουν καταγράψει ότι η μέτρια κατανάλωση αλκοόλ, από 1 έως 3 ποτά ημερησίως, σχετίζεται με 30-40% μειωμένο κίνδυνο για εκδήλωση στεφανιαίας νόσου. Η σχέση μεταξύ της κατανάλωσης αλκοόλ και της καρδιαγγειακής νόσου δεν είναι γραμμική αλλά έχει μορφή «U» ή «J» με τα υψηλότερα ποσοστά θνησιμότητας να βρίσκονται ανάμεσα σε αυτούς που απείχαν καθώς και σε αυτούς που έπιναν περισσότερα από 6 ποτά την ημέρα [5]. Η αιθανόλη, εκτός από την άμεση επίδραση στην συσσώρευση των αιμοπεταλίων, τον μεταβολισμό της HDL και την

ινωδόλυση (όλα εμπλέκονται στην παθογένεση των καρδιαγγειακών νοσημάτων) θα μπορούσε να παίζει σημαντικό ρόλο στην απορρόφηση των φαινολικών ενώσεων [49].

Οι ευνοϊκές για την υγεία επιδράσεις του κρασιού έχουν αποδοθεί μεταξύ άλλων, σε διαφορετικές πολυφαινολικές ενώσεις. Ωστόσο, αυτές ή παρόμοιες ενώσεις βρίσκονται επίσης σε άλλα αλκοολούχα ποτά όπως η μύρα. Επομένως δεν υπάρχει ‘σωστό’ ή ‘λάθος’ ποτό, αλλά μόνο ‘σωστές’ ή ‘λάθος’ συνήθειες κατανάλωσης οινοπνεύματος σχετικά με την ποσότητα, την συχνότητα κατανάλωσης και συνοδευτικά του τρόπου ζωής αλλά και του διατροφικού μοτίβου [5]. Σύμφωνα με τα επιστημονικά αποτελέσματα της τελευταίας δεκαετίας, φαίνεται να είναι αποδεκτό ότι η μέτρια κατανάλωση αλκοόλ , 2-3 μονάδες/ημέρα για έναν υγιή άντρα και 1-2 μονάδες/ημέρα για μία υγιή γυναίκα (1 μονάδα= 12γρ αλκοόλ) , δεν μπορεί να επικριθεί είτε ιατρικά ή κοινωνικά. Λαμβάνοντας υπόψη τις παρατηρήσεις αυτές η μύρα όταν εντάσσεται σε μια καλά ισορροπημένη διατροφή, μπορεί να θεωρηθεί ως καλή πηγή αντιοξειδωτικών η οποία επιπλέον λόγω της χαμηλότερης περιεκτικότητας σε αλκοόλ προκαλεί λιγότερες επιβλαβείς επιδράσεις στην υγεία [50].

4.1 Περιγραφή δειγμάτων

Μελετήθηκαν 31 είδη μύρας τα οποία προέρχονταν από Ελληνικές μικροζυθοποιίες από διάφορες περιοχές της Ελλάδας όπως Χίος, Σαντορίνη, Ρόδος, Τήνος, Κέρκυρα, Θεσσαλία, Φθιώτιδα και Εύβοια.

4.2 Επεξεργασία δειγμάτων

Αρχικά, 100 mL δείγματος τοποθετήθηκαν σε λουτρό υπερήχων Elmasonic S 60 για την απομάκρυνση του διοξειδίου του άνθρακα (CO_2). Στην συνέχεια τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε ειδικό περιστροφικό εξατμιστήρα (Rotary Evaporator) για την απομάκρυνση της αλκοόλης (αιθανόλης). Στο τέλος αυτής της κατεργασίας τα δείγματα είχαν συμπυκνωθεί περίπου στο μισό του αρχικού τους όγκου. Έπειτα τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε προζυγισμένα πλαστικά δοχεία, καταψύχθηκαν σε βαθιά ψύξη (-80°C) και στην συνέχεια λυοφιλώθηκαν και μετά το πέρας της λυοφιλίωσης ζυγίστηκαν ξανά (Πίνακας 4.2).

Λυοφιλίωση

Υλικά-Όργανα

- Συσκευή λυοφιλίωσης
- Ζυγός ακριβείας
- Δείγματα μύρας

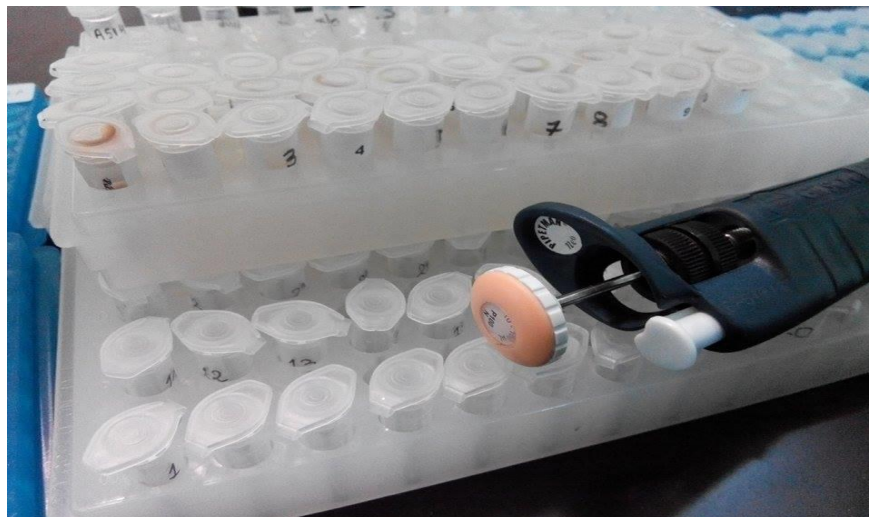
Αναλυτική πορεία

Η λυοφιλίωση είναι μία μέθοδος αφυδάτωσης των τροφίμων σε ήπιες συνθήκες, που ελαχιστοποιεί τον κίνδυνο καταστροφής των ευαίσθητων συστατικών του δείγματος. Πλεονεκτεί των υπόλοιπων μεθόδων αφυδάτωσης καθώς δεν καταστρέφει τα θρεπτικά συστατικά του τροφίμου, διατηρεί σε σημαντικό βαθμό τα πτητικά αρωματικά συστατικά του, συντηρεί καλύτερα τα χαρακτηριστικά της δομής και εμφάνισης του, καθώς η

συρρίκνωση είναι αμελητέα. Επιπλέον, κατά την επεξεργασία αυτή τα δείγματα δεν αφρίζουν, δεν σκληραίνουν, δεν οξειδώνονται και δεν υφίσταται καμία μεταβολή η μικροβιοχλωρίδα τους. Η μέθοδος της ξήρανσης των τροφίμων με λυοφιλίωση, συνίσταται στην κατάψυξη του υπό ξήρανση υλικού και κατόπιν εξάχνωση του σχηματισθέντος πάγου μέσα στο κατεψυγμένο υλικό, ώστε να προκύψει το αφυδατωμένο προϊόν. Η κλίση της τάσης των ατμών που είναι απαραίτητη για την εξάχνωση, επιτυγχάνεται με την διατήρηση ορισμένης ολικής πίεσης στον θάλαμο της ξήρανσης. Οι δημιουργούμενοι υδρατμοί απάγονται με ένα σύστημα συμπύκνωσης (ψυχρή παγίδα). Η πίεση του θαλάμου ξήρανσης ήταν μικρότερη του 1 mbar και η θερμοκρασία στην ψυχρή παγίδα -50°C. Η όλη διαδικασία διήρκησε 72 ώρες.

Συντήρηση των δειγμάτων

Τα λυοφιλωμένα δείγματα μυρών μεταφέρθηκαν σε σωλήνες Falcon, σφραγίστηκαν με parafilm και φυλάχθηκαν σε βαθιά ψύξη (- 40 °C) μέχρι να αναλυθούν. Παράλληλα φυλάχθηκαν σε ψύξη (4 °C) δείγματα μυρών χωρίς να λυοφιλωθούν.



Εικόνα 4.2 Αναδιαλυμένα δείγματα αφυδατωμένων μυρών προς ανάλυση

Πίνακας 4.2 Βάρη ξηρού υπολείμματος μυρών (g)

ΔΕΙΓΜΑ	Απόβαρο (g)	Μικτό βάρος με ξηρό υπόλειμμα (g)	ξηρό υπόλειμμα (g)	ξηρό υπόλειμμα (g/ 100 mL)
1A	13,5234	18,9237	5,4003	6,7504
1B	13,6649	18,7424	5,0775	6,3469
2A	13,5341	18,0675	4,5334	5,6668
2B	13,5471	18,9617	5,4146	6,7683
3A	13,5203	15,6557	2,1354	2,6693
3B	13,6239	15,7958	2,1719	2,7149
4A	13,5500	17,7152	4,1652	2,6033
5B	13,6492	16,2943	2,6451	3,3064
6A	13,6365	17,9902	4,3537	5,4421
6B	13,6066	17,0062	3,3996	4,2495
7A	13,5944	17,205	3,6106	4,5133
7B	13,5482	15,0604	1,5122	1,8903
8A	13,4972	18,2295	4,7323	5,9154
8A+	13,8149	18,0091	4,1942	5,2428
9A	13,7060	17,3172	3,6112	4,5140
9B	13,6475	18,0948	4,4473	5,5591
10A	13,6013	17,8834	4,2821	5,3526
10B	13,7937	18,4049	4,6112	5,7640
11A	13,6007	16,9647	3,3640	4,2050
11B	13,7556	16,5269	2,7713	3,4641
12A	13,6426	17,0617	3,4191	4,2739
12B	13,7706	16,9712	3,2006	4,0008
13A	13,6791	17,2589	3,5798	4,4748
13B	13,5849	17,1302	3,5453	4,4316
14A	13,7726	17,5276	3,7550	4,6938
14B	13,6355	17,1780	3,5425	4,4281
15A	13,5417	17,5712	4,0295	5,0369
15B	13,5853	17,6274	4,0421	5,0526
16A	13,5472	21,1456	7,5984	4,7490
17A	13,5981	15,5696	1,9715	2,4644
17B	13,5812	16,3279	2,7467	3,4334
18A	13,5550	17,5622	4,0072	5,0090
18B	13,5464	17,7021	4,1557	5,1946
19B	16,1332	2,4097	3,0121	3,1928
19C	16,5391	2,6987	3,3734	
20A	18,7411	5,1095	6,3869	5,1201
20C	16,4904	3,0826	3,8533	

21C	13,6864	16,5351	2,8487	3,5609
22A	13,6067	16,6062	2,9995	3,7494
22B	13,7361	16,2883	2,5522	3,1903
23A	13,6426	16,2270	2,5844	3,2305
23B	13,8451	16,6193	2,7742	3,4678
24A	13,6803	16,8921	3,2118	4,0148
24B	13,5197	17,1872	3,6675	4,5844
25A	13,7645	18,9088	5,1443	6,4304
25B	13,6184	18,4413	4,8229	6,0286
26A	13,6369	17,3500	3,7131	4,6414
26B	13,5715	16,7879	3,2164	4,0205
27A	13,5694	16,1965	2,6271	3,2839
27B	13,5614	15,7994	2,2380	2,7975
28A	13,815	18,3452	4,5302	5,6628
28B	13,8416	19,1249	5,2833	6,6041
29A	13,5172	19,0921	5,5749	6,9686
29B	13,6610	17,9787	4,3177	5,3971
30A	13,4526	16,8840	3,4314	4,2893
30B	13,518	16,5795	3,0615	3,8269
31A	13,5568	19,4564	5,8996	7,3745
31B	13,5276	19,5417	6,0141	7,5176

5.1 Προσδιορισμός πολυφαινολών

5.1.1 Προσδιορισμός του συνολικού φαινολικού περιεχομένου με την μέθοδο Folin-Ciocalteu

Αντιδραστήρια-Όργανα

Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (FC, 2N)

Κορεσμένο διάλυμα Na₂CO₃ (20% w/v)

Απιονισμένο νερό

Αναδευτήρας Vortex

Φωτόμετρο ELISA (ELISA reader) (750nm)

Αναλυτικός ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών

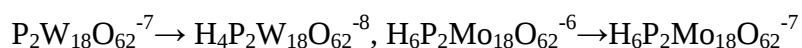
Φιαλίδια Eppendorf, χωρητικότητας 1,5mL

Αυτόματες πιπέττες (10-1000μL), tips

96-well plate UV (πολυστυρενικά τρυβλία των 96 βοθρίων) Γαλλικό οξύ (Gallic acid, GA)

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος βασίζεται σε οξειδοαναγωγική αντίδραση με την οποία προσδιορίζεται το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο χωρίς να γίνεται διάκριση μεταξύ μονομερών, διμερών και πολυμερών φαινολικών συστατικών. Το FC 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 (750nm). Η αλκαλικότητα ρυθμίζεται με κορεσμένο διάλυμα Na₂CO₃ (20% w/v) που αφενός δε διαταράσσει την σταθερότητα του FC και του

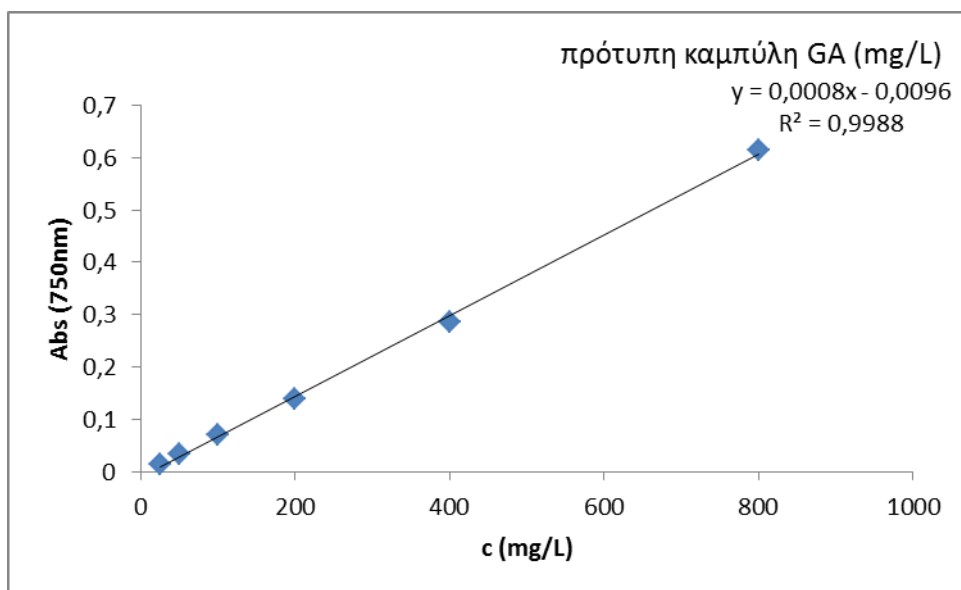
προϊόντος της αντίδρασης, αφετέρου αποτελεί προϋπόθεση παρουσίας των φαινολικών ιόντων.

Αναλυτική Πορεία

Σε φιαλίδιο Eppendorf τοποθετούνται 790μL απιονισμένου νερού και έπειτα 10μL δείγματος αφυδατωμένης μύρας, αναδιαλυμένης με απιονισμένο νερό. Για την παρασκευή του τυφλού δείγματος χρησιμοποιείται απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια, προστίθενται 50μL αντιδραστηρίου FC. Ακολουθεί ανάδευση, ενώ μετά το πέρας 1min προστίθενται 150μL κορεσμένου διαλύματος Na_2CO_3 (20% w/v). Το μίγμα ανακινείται εκ νέου και φυλάσσεται σε σκοτεινό μέρος, για 120min, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το προϊόν της αντίδρασης φωτομετρείται στα 750nm ως προς το τυφλό 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 (GA) συγκεντρώσεων 25, 50, 100, 200, 400, 600, 800mg/L. Ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω. Οι μετρήσεις χρησιμοποιούνται για το σχεδιασμό διαγράμματος $\psi=f(x)$, όπου x η ποσότητα του GA σε mg/L και ψ η απορρόφηση στα 750nm. Οι μετρήσεις της απορρόφησης στα 750 nm χρησιμοποιούνται για το σχεδιασμό πρότυπης καμπύλης αναφοράς (Διάγραμμα 5.1.1).



Διάγραμμα 5.1.1 Πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος (Gallic acid- GA) $\mu\text{g/mL}$.

Παρατηρήσεις

- Το αντιδραστήριο Folin Ciocalteu πρέπει να μείνει εκτός ψυγείου 1 ώρα πριν την χρήση του και να παραμένει στο σκοτάδι, καθώς είναι ιδιαίτερα φωτοευαίσθητο και οξειδώνεται εύκολα.
- Το διάλυμα ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3 , 20% w/v), παρασκευάζεται μια ημέρα πριν την εκτέλεση του προσδιορισμού.
- Το τελικό προϊόν της αντίδρασης αναμένουμε να έχει χρώμα από μπλε ανοιχτό έως μπλε σκούρο.



Εικόνα 5.1.1 Αναδιαλυμένα δείγματα αφυδατωμένης μύρας κατά τον προσδιορισμό του συνολικού φαινολικού περιεχομένου με την μέθοδο Folin-Ciocalteu.

Επιπλέον έγινε προσπάθεια προσδιορισμού των απλών φαινολών στα δείγματα μύρας με αέρια χρωματογραφία υπό μορφή σιλυλαιθέρων (μετά από αντίδραση σιλυλίωσης) (α) σε υδατικά διαλύματα των αφυδατωμένων δειγμάτων μύρας, και (β) σε εκχυλίσματα των αφυδατωμένων δειγμάτων με οξικό αιθυλεστέρα. Και στις δύο περιπτώσεις δεν κατέστη δυνατός ο προσδιορισμός των απλών φαινολικών ενώσεων λόγω της σημαντικής παρουσίας σακχάρων τα οποία παρεμποδίζουν τον προσδιορισμό.

5.2 Δοκιμές αντιοξειδωτικής δράσης

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

Αντιδραστήρια-Όργανα

Διάλυμα DPPH• σε MeOH (3,9mg σε 100 mL)

MeOH

Φωτόμετρο ELISA (ELISA reader) 515nm

Λουτρό υπερήχων

Αναδευτήρας Vortex

Φιαλίδια Eppendorf, χωρητικότητας 1,5mL

96-well plate UV (πολυστυρενικά τρυβλία των 96 βοθρίων)

Αυτόματες πιπέττες (10-1000μL), tips

Αρχή μεθόδου

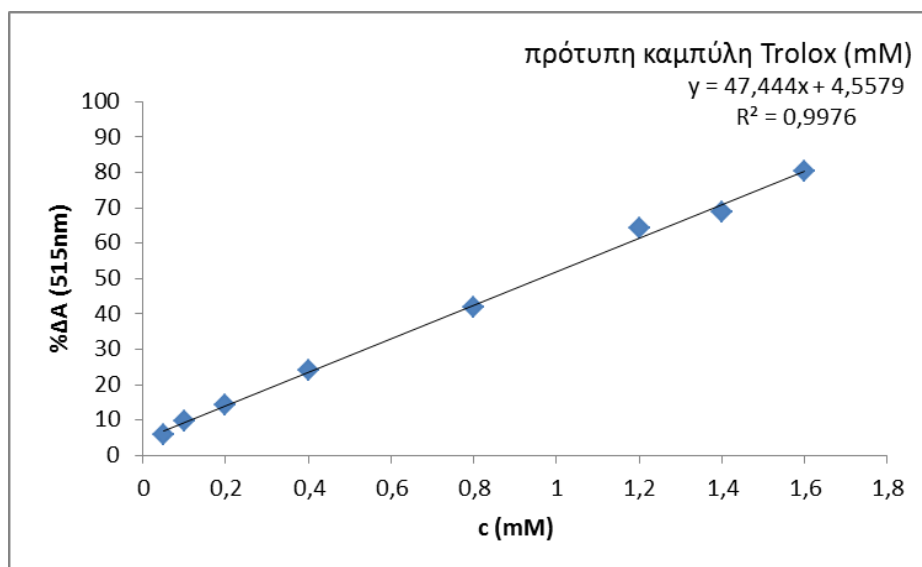
Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα των αντιοξειδωτικών ουσιών να δεσμεύουν την ελεύθερη ρίζα DPPH[•]. Η δέσμευση αυτής της σταθερής ελεύθερης ρίζας έχει ως αποτέλεσμα το διάλυμα να αποχρωματίζεται. Η ελάττωση της απορρόφησης μετράται στα 515nm.

Αναλυτική Πορεία

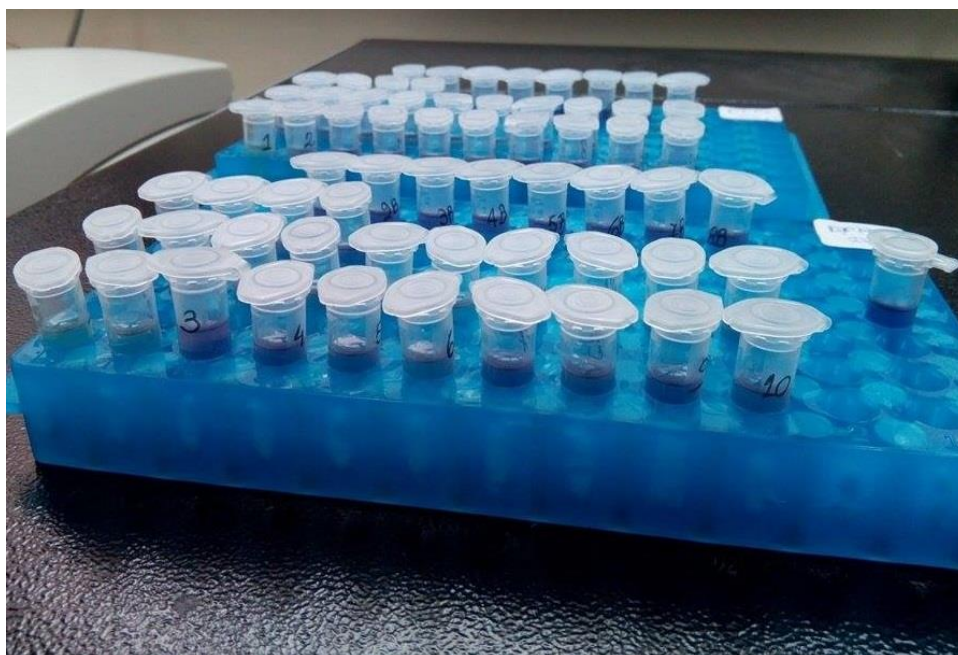
Σε φιαλίδια Eppendorf προστίθενται 25 μL δείγματος –αφυδατωμένου ροφήματος, αναδιαλυμένου σε μεθανόλη- συγκέντρωσης 2mg/mL ή μεθανόλης για το λευκό προσδιορισμό και 975μL DPPH[•]. Ακολουθεί ανάδευση και αφήνονται σε σκοτεινό μέρος για 30min. Η απορρόφηση μετράται σε t=0min και t=30min στα 515nm. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ισοδύναμα Trolox (ανάλογο της βιταμίνης E) μέσω της πρότυπης καμπύλης.

Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς

Για την αξιολόγηση των μετρήσεων της απορρόφησης κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη αναφοράς με Trolox (υδατοδιαλυτό ανάλογο της Βιταμίνης E) και τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ισοδύναμα Trolox (Trolox equivalents). Παρασκευάζονται διαλύματα Trolox συγκεντρώσεων 0,05, 0,1, 0,2, 0,4, 0,8, 1,2, 1,4, 1,6mM. Ακολουθείται 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 % ΔA_{515} , όπου $\% \Delta A_{515} = [(A_{515}^0 - A_{515}^{30}) / A_{515}^0] \times 100$.



Διάγραμμα 5.2.1 Καμπύλη αναφοράς της απορρόφησης σε συνάρτηση με τα ισοδύναμα Trolox (mM).



Εικόνα 5.2.1 Δείγματα μύρας κατά την εκτίμηση της ικανότητας δέσμευσης της 1,1-διφαινύλο-2-πικρυλο-υδράζυλο ελεύθερης ρίζας (DPPH•)

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

Αντιδραστήρια-Όργανα

FeCl_3 , (3 mM σε 5 mM HCl)]

TPTZ [(2, 4, 6-tripyridyl-s-triazine), (2, 4, 6-τριπυριδυλο-s-τριαζίνη)] 1mM σε 0,05M HCl

Απιονισμένο νερό

Φωτόμετρο ELISA (ELISA reader) 620nm

Υδατόλουτρο

Αναδευτήρας Vortex

Αυτόματες πιπέττες (100-1000μL), tips

Φιαλίδια Eppendorf, χωρητικότητας 1,5mL

96-well plate UV (πολυστυρενικά τρυβλία των 96 βοθρίων)

Αρχή μεθόδου

Η δοκιμή FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) εκτιμά την αντιοξειδωτική δράση όλων των συστατικών του διαλύματος 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

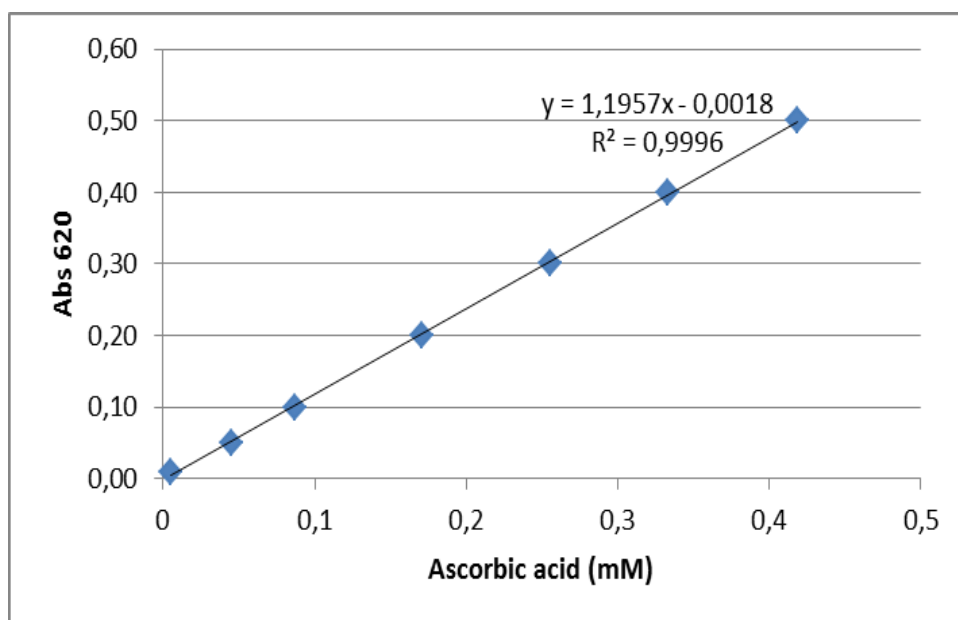
Σε ένα φιαλίδιο Eppendorf αναμιγνύονται 50μl διαλύματος αφυδατωμένου ροφήματος αναδιαλυμένου σε μεθανόλη, κατάλληλα αραιωμένου, με 50μL FeCl_3 (3mM σε 5mM HCl) ή 50μL απιονισμένο νερό για τη παρασκευή του λευκού δείγματος. Ακολουθεί καλή ανάδευση και το μίγμα αφήνεται να αντιδράσει για 30min σε υδατόλουτρο στους 37°C. Στη συνέχεια, προστίθενται 900μL διαλύματος TPTZ και ακολουθεί ανάδευση. Ο Fe^{+2} που έχει προκύψει δημιουργεί έγχρωμο (μπλε) σύμπλοκο με το TPTZ. Το δείγμα παραμένει για 10min στο σκοτάδι και ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης στα 620nm. Παράλληλα κατασκευάζεται

καμπύλη αναφοράς βιταμίνης C (η βιταμίνη C ανάγει το Fe^{3+} σε Fe^{2+}) και τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ισοδύναμα ασκορβικού οξέος (AAE, ascorbic acid equivalents).



Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς

Παρασκευάζονται διαλύματα ασκορβικού οξέος συγκεντρώσεων 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5mM. Ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω. Οι μετρήσεις χρησιμοποιούνται για το σχεδιασμό διαγράμματος $\psi=f(x)$, όπου x η ποσότητα του ασκορβικού οξέος σε mM και ψ η απορρόφηση στα 620nm.



Διάγραμμα 5.2.2 Πρότυπη καμπύλη ασκορβικού οξέος σε mM

5.3 Μελέτη της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας των δειγμάτων μύρας στις λιποπρωτεΐνες του ορού

5.3.1 Παραλαβή ορού

Αντιδραστήρια- Όργανα

Falcon χωρίς ηπαρίνη

Φυγόκεντρος

Αναλυτική Πορεία

Πραγματοποιείται αιμοληψία από υγιείς εθελοντές 22-50 ετών. Το αίμα (5mL) καθιζάνει μόνο του (τα έμμορφα συστατικά του καθιζάνουν) για 30min περίπου ενώ στη συνέχεια πραγματοποιείται φυγοκέντρωση για 10min στις 3000rpm και στους 20° C.

5.3.2 Πρωτόκολλο οξείδωσης ορού

Αντιδραστήρια- Όργανα

Ένυδρος Θεϊκός Χαλκός ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, MW= 249,68)

Απεσταγμένο Νερό (dH_2O)

Δοκιμαστικός σωλήνας 5mL

Ρυθμιστικό Διάλυμα PBS

96-well plate UV (πολυστυρενικά τρυβλία των 96 βοθρίων)

Διάλυμα ορού

Φωτόμετρο ELISA (ELISA reader) – 245nm

Αρχή της Μεθόδου

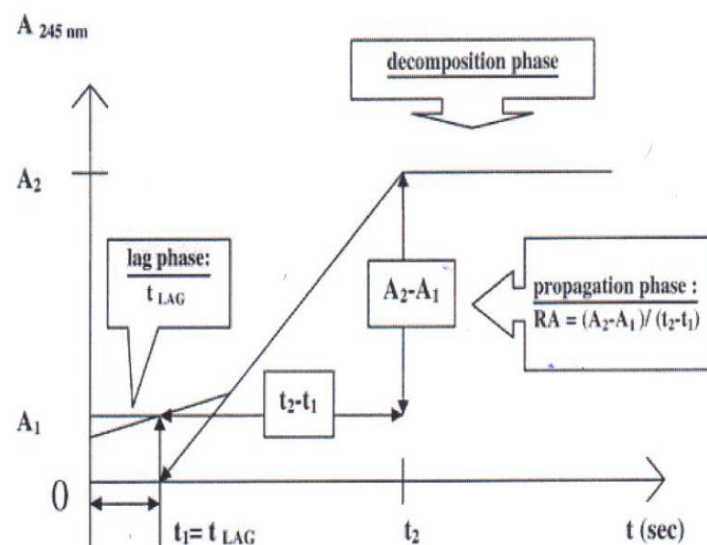
Το διάλυμα του θειικού χαλκού προκαλεί οξείδωση των λιποπρωτεϊνών στον ορό. Η ανίχνευση των προϊόντων οξείδωσης (συζυγή διένια) γίνεται με φωτομέτρηση στα 245nm. Καταγράφεται φωτομετρικά η χρονική εξέλιξη της αντίδρασης και το τελικό αποτέλεσμα

εκφράζεται ως χρόνος αντίστασης του ορού στην οξείδωση λόγω της δράσης των συστατικών των δειγμάτων μύρας στον ορό (LagTime).

Αναλυτική Πορεία

Αρχικά παρασκευάζουμε το μητρικό διάλυμα CuSO_4 συγκέντρωσης 20mM. Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμη φιάλη σε θερμοκρασία δωματίου. Σε επόμενο στάδιο, παρασκευάζεται το διάλυμα εργασίας CuSO_4 συγκέντρωσης 200μM με αραίωση 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 10μM (αραίωση 1:20). Γίνεται αραίωση του ορού (1:12) με διάλυμα PBS. Οι δόσεις που παρασκευάστηκαν και μελετήθηκαν από τα πυκνά διαλύματα των αφεψημάτων ήταν: 2,5 ng, 5 ng, 10 ng, 20 ng, 50 ng, 250 ng, 500 ng, 750 ng, 1000 ng.

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι κοινή για όλα τα δείγματα μύρας. Αρχικά τοποθετούνται στο ειδικό UV 96-well plate 20μL από το αραιωμένο δείγμα ορού. Έπειτα, τοποθετείται 1μL από τα αναδιαλυμένα δείγματα μύρας και τέλος προστίθενται 230μL του 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 LagTime (χρόνος αντίστασης ορού στην οξείδωση).



Kinetics of copper-induced oxidation of serum lipids in vitro.

t_{LAG} represents the concentration of serum antioxidants.

RA represents the transformation of polyunsaturated fatty acids to lipid hydroperoxides (conjugated dienes).

A = absorbance, t = time

6.1 Παραλαβή αφυδατωμένης μύρας

Η παραλαβή του στερεού υπολείμματος πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο της λυοφιλίωσης και η απόδοση σε στερεό υπόλειμμα που υπολογίστηκε παρουσιάζεται στον Πίνακα 6.1

Πίνακας 6.1 Απόδοση σε στερεό υπόλειμμα

No	Στερεό υπόλειμμα (g/100mL)	Στερεό υπόλειμμα (mg/mL)	Δείγμα για αναλύσεις (mg). Διάλυση σε 1mL H ₂ O
1	6,5486	65,49	66,2
2	6,2175	62,18	64,8
3	2,6921	26,92	26,6
4	2,6033	26,03	26,0
5	3,3064	33,06	33,1
6	4,8458	48,46	48,5
7	3,2018	32,02	32,4
8	5,5791	55,79	56,6
9	5,0366	50,37	51,2
10	5,5583	55,58	55,8
11	3,8346	38,35	38,2
12	4,1373	41,37	42,0
13	4,4532	44,53	44,9
14	4,5609	45,61	48,4
15	5,0448	50,45	50,2
16	4,7490	47,49	47,7
17	2,9489	29,49	29,0
18	5,1018	51,02	52,0
19	3,1928	31,93	32,2
20	5,1201	51,20	51,0
21	3,9521	39,52	40,1
22	3,4698	34,70	34,7
23	3,3491	33,49	34,6
24	4,2996	43,00	43,2
25	6,2295	62,30	62,7
26	4,3309	43,31	43,2
27	3,0407	30,41	30,3
28	6,1334	61,33	61,3
29	6,1829	61,83	61,6
30	4,0581	40,58	41,0
31	7,4461	74,46	75,5
Mean		45,56	
SD		12,62	
Max		74,46	
Min		26,03	

Από τις τιμές του Πίνακα 6.1 προκύπτει ότι η απόδοση σε στερεό υπόλειμμα κυμάνθηκε από 25,03 έως 74,46 mg/mL, με μέσο όρο τα 45,56 mg/mL. Η μύρα Νο 4 είχε την μικρότερη απόδοση σε στερεό υπόλειμμα (26,03 mg/mL) ενώ η μύρα Νο 31 την μεγαλύτερη (74,46 mg/mL).

Για τις μετρήσεις που ακολούθησαν, έγινε ανασύσταση των δειγμάτων μύρας με διαλυτοποίηση σε 1 mL απεσταγμένο H₂O των ποσοτήτων (mg) από τα ξηρά δείγματα που δίνονται στην τρίτη στήλη.

6.2 Φωτομετρικοί προσδιορισμοί

6.2.1 Συνολικό φαινολικό περιεχόμενο (Folin-Ciocalteu)

Η μύρα θεωρείται ως μία από τις κύριες διατροφικές πηγές φαινολικών ενώσεων, οι περισσότερες των οποίων προέρχονται από τις πρώτες ύλες της ζυθοποιίας (βύνη και λυκίσκος) και η παρουσία τους στη μύρα παίζει κρίσιμο ρόλο στο χρώμα και τις οργανοληπτικές ιδιότητες της μύρας.

Στα 31 προϊόντα της Ελληνικής μικροζυθοποιίας προσδιορίστηκε το ολικό φαινολικό περιεχόμενο χρησιμοποιώντας την φωτομετρική μέθοδο Folin-Ciocalteu και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.2.1. εκφραζόμενα σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος (mg GAE/L). Όλα τα δείγματα περιείχαν σημαντικές ποσότητες φαινολικών ενώσεων, που κυμάνθηκαν από $196 \pm 18,55$ έως $783,27 \pm 134,30$ mg GAE/ L με μέσο όρο $364,23 \pm 30,73$ mg GAE/ L. Η μύρα με την μεγαλύτερη συγκέντρωση φαινολικών ήταν με διαφορά από τις υπόλοιπες, η Νο 1 με $783,27 \pm 134,30$ mg GAE/ L, ενώ η μύρα με την χαμηλότερη συγκέντρωση πολυφαινολών ήταν η Νο 3 με $196,00 \pm 18,55$ mg GAE/ L.

Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν ήταν παρόμοια έως και λίγο υψηλότερα από αυτά που αναφέρουν οι Lugasi^[50] (270-600 mg GAE/ L), Snežana^[51] (328,22-545,32 mg GAE/ L) και Piazzon et al^[52] (μέση συγκέντρωση 452 mg GAE/ L) ενώ ήταν υψηλότερα από τα αποτελέσματα των Obruca et al^[53] (156,49-201,15 mg GAE/ L) και των Zhao et al^[25, 54] (152,01-339,12mg GAE/ L και $168 \pm 41,74$ mg GAE/L).

Πίνακας 6.2.1 Συνολικό φαινολικό περιεχόμενο (TPC) εκφραζόμενο σε mg ισοδυνάμων γαλλικού οξέος (GAE)

No	TPC (mg GAE/L)
1	783,27 ± 134,30
2	518,12 ± 8,38
3	196,00 ± 18,55
4	234,68 ± 40,66
5	249,32 ± 30,74
6	345,76 ± 25,48
7	231,77 ± 26,91
8	283,69 ± 19,87
9	335,03 ± 10,30
10	337,07 ± 20,64
11	342,69 ± 47,07
12	303,65 ± 22,91
13	494,62 ± 20,68
14	633,82 ± 101,29
15	498,03 ± 87,42
16	530,00 ± 6,33
17	338,34 ± 9,39
18	522,63 ± 23,10
19	217,59 ± 5,15
20	300,46 ± 27,43
21	286,50 ± 27,51
22	216,49 ± 24,01
23	290,66 ± 0,91
24	299,15 ± 25,58
25	435,76 ± 29,97
26	277,91 ± 13,49
27	210,95 ± 9,39
28	552,04 ± 47,99
29	346,31 ± 14,14
30	285,60 ± 19,00
31	393,13 ± 53,96
Mean	364,23
SD	140.24
Max	783,27
Min	196,00

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, το ολικό φαινολικό περιεχόμενο των μπυρών της ελληνική μικροζυθοποιίας είναι παρόμοιο ή λίγο υψηλότερο από εκείνο των

λευκών κρασιών αλλά σημαντικά χαμηλότερο από εκείνο των ερυθρών οίνων. Σημειώνεται ότι τα λευκά κρασιά περιέχουν φαινολικές ενώσεις σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται μεταξύ 250-600 mg/L ενώ τα κόκκινα κρασιά περιέχουν 1000-4000 mg/L (Lugasi 2001).

6.3 Αποτελέσματα των Αντιοξειδωτικών τεστ

6.3.1 Μέτρηση ικανότητας δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH*

Όλες οι μύτερες της μελέτης παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση, καθώς φαίνεται να περιέχουν συστατικά που έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν την ελεύθερη ρίζα DPPH* και να λειτουργούν ως δότες ηλεκτρονίων, όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα. Η ικανότητα των μυρών να λειτουργούν ως δότες υδρογόνου είναι ένδειξη πρωτοταγούς αντιοξειδωτικής δράσης. Τα πρωτοταγή αντιοξειδωτικά είναι αυτά τα οποία που μπορούν να διακόψουν τις αλυσιδωτές αντιδράσεις της οξείδωσης, παρέχοντας άτομα υδρογόνου σε ελεύθερες ρίζες, και πιο συγκεκριμένα σε ρίζες λιποειδικών υδροϋπεροξειδίων, οι οποίες είναι οι κυρίως υπεύθυνες για την αυτοοξείδωση των λιποειδών. Αυτή η μετατροπή των ελευθέρων ριζών σε σταθερά προϊόντα αναστέλλει την φάση διάδοσης της υπεροξείδωσης των λιπιδίων . Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 6.3.1 οι μύτερες της παρούσας εργασίας επηρεάζουν σημαντικά τον αποχρωματισμό της ελεύθερης ρίζας DPPH* ενώ η μέτρηση της ικανότητας δέσμευσης εκφράζεται σε mg ισοδυνάμων Trolox (TE).

Η ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH* των δειγμάτων μύρας κυμάνθηκε από $60,24 \pm 6,19$ έως $406,68 \pm 1,93$ mg TE/L ενώ ο μέσος όρος ήταν $221,88 \pm 8,28$ mg TE/L. Συγκεκριμένα η μύρα No1 παρουσιάζει την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση με $406,68 \pm 1,93$ mg TE/L ενώ η No3 την μικρότερη με $60,24 \pm 6,19$ mg TE/L.

Συγκριτικά με την βιβλιογραφία, τα αποτελέσματα είναι υψηλότερα από αυτά που αναφέρουν οι Zhao et al (2010, 2013) ^[25,54] ($60,06 - 337,89$ mg TE/L και αντίστοιχα $152,67 \pm 42,54$ mg TE /L) και ο Snežana^[51] ($65,07 - 207,74$ mg TE/L).

Πίνακας 6.3.1 Μέτρηση ικανότητας δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH• εκφραζόμενη σε mg ισοδυνάμων Trolox (TE)

ΚΩΔ	Ικανότητα δέσμευσης DPPH• (mgTE/L)
1	406,68 ± 1,93
2	336,08 ± 9,29
3	127,01 ± 7,74
4	60,24 ± 6,19
5	176,27 ± 14,71
6	252,89 ± 19,35
7	137,41 ± 5,03
8	184,48 ± 1,16
9	178,46 ± 12,38
10	194,88 ± 19,35
11	188,86 ± 9,67
12	241,94 ± 11,61
13	253,44 ± 11,22
14	299,96 ± 7,74
15	290,11 ± 8,51
16	354,14 ± 14,32
17	233,73 ± 16,64
18	304,88 ± 3,48
19	191,59 ± 6,19
20	190,50 ± 7,74
21	91,98 ± 3,10
22	128,65 ± 1,93
23	189,73 ± 5,65
24	184,48 ± 5,03
25	325,13 ± 6,97
26	105,12 ± 3,87
27	120,44 ± 6,97
28	385,33 ± 7,74
29	251,25 ± 5,80
30	197,06 ± 11,61
31	295,58 ± 3,87
Mean	221,88
SD	88.01
Max	406,68
Min	60,24

6.3.2 Μέτρηση αναγωγικής ικανότητας μέσω της μεθόδου FRAP

Επιπλέον πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις για τον προσδιορισμό την αναγωγικής ικανότητας μέσω αναγωγής του Fe^{+3} σε Fe^{+2} (FRAP) εκφραζόμενη σε mg ασκορβικού οξέος (AAE). Η αναγωγική δύναμη θεωρείται δείκτης δευτεροταγούς αντιοξειδωτικής δράσης. Δευτεροταγή αντιοξειδωτικά είναι τα αντιοξειδωτικά που δρουν προληπτικά και μπορούν να αποτρέψουν την έναρξη των αλυσιδωτών αντιδράσεων που οδηγούν στην υπεροξείδωση των λιπιδίων, ή μπορούν να αντιδράσουν με τα προϊόντα της υπεροξείδωσης των λιπιδίων αδρανοποιώντας τα. Αυτή η μετατροπή οδηγεί σε πιο σταθερές καταστάσεις, με λιγότερες ελεύθερες ρίζες και λιγότερο επιβλαβή προϊόντα. Στον Πίνακα 6.3.2 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων, όπου φαίνεται ότι όλες οι μύρες παρουσίασαν αναγωγική ικανότητα, η οποία κυμάνθηκε μεταξύ $52,47 \pm 1,67$ έως $172,29 \pm 3,02$ mg AAE/ L μύρας ενώ ο μέσος όρος ήταν $95,75$ mg AAE/ L. Η μύρα No1 καταλαμβάνει την πρώτη θέση με μεγάλη διαφορά από τις υπόλοιπες, με $172,29 \pm 3,02$ mg AAE/ L ενώ η μύρα No3 παρουσιάζει την χαμηλότερη αναγωγική ικανότητα με $52,47 \pm 1,67$ mg AAE/ L.

Συγκριτικά με την βιβλιογραφία τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής ήταν χαμηλότερα από αυτά του Zhao et al [54] ($121,52 \pm 31,70$ mg AAE/L).

Πίνακας 6.3.2 Μέτρηση αναγωγικής ικανότητας των δειγμάτων μύρας εκφραζόμενη σε mg ασκορβικού οξέος (AAE)

ΚΩΔ	FRAP (mg AAE/L)
1	172,29 ± 3,02
2	118,05 ± 2,08
3	75,75 ± 15,84
4	52,47 ± 1,67
5	78,11 ± 6,25
6	98,01 ± 2,19
7	64,85 ± 5,00
8	85,78 ± 5,63
9	106,70 ± 3,44
10	88,13 ± 4,90
11	75,31 ± 7,61
12	91,52 ± 6,77
13	116,28 ± 8,44
14	127,34 ± 10,73
15	112,60 ± 9,38
16	123,80 ± 7,50
17	93,00 ± 5,00
18	113,93 ± 6,88
19	90,34 ± 6,46
20	104,05 ± 6,57
21	68,53 ± 0,73
22	73,40 ± 6,77
23	73,25 ± 7,40
24	97,57 ± 11,88
25	117,76 ± 8,75
26	88,13 ± 8,34
27	62,64 ± 4,17
28	124,24 ± 10,94
29	94,32 ± 9,80
30	78,55 ± 4,79
31	101,69 ± 11,26
Mean	95,75
SD	24.54
Max	172,29
Min	52,47

6.4 Αναστολή της οξείδωσης των λιποπρωτεϊνών του ορού

Η LDL είναι ο κύριος μεταφορέας χοληστερόλης στους ιστούς και εμπλέκεται στην απόθεση χοληστερόλης στο ενδοθήλιο, οδηγώντας στο σχηματισμό αθηρωματικής πλάκας, η οποία μακροχρόνια οδηγεί σε καρδιαγγειακά νοσήματα. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η οξειδωμένη LDL, η οποία πιθανώς προκύπτει από την ανεπαρκή πρόσληψη αντιοξειδωτικών, φαίνεται να ενισχύει τη δημιουργία αφρωδών κυττάρων στην αθηρωματική πλάκα, με αποτέλεσμα να αυξάνεται ο κίνδυνος για καρδιαγγειακά νοσήματα [55].

Η οξείδωση της LDL παρακολουθήθηκε φωτομετρικά με καταγραφή της απορρόφησης των παραγομένων συζυγών διενίων (conjugated diene lipid hydroperoxides, CD) στα 245 nm. Η χρονική πορεία της οξείδωσης της LDL παρουσιάζει αρχικά μία φάση κατά την οποία δεν επέρχεται οξείδωση (lag phase-time, χρονική υστέρηση) λόγω της παρουσίας των αντιοξειδωτικών του δείγματος, ακολουθούμενη από μία αύξηση της απορρόφησης, λόγω του σχηματισμού CD (propagation phase) όταν εξαντληθούν τα αντιοξειδωτικά. Η αντίσταση της LDL στην οξείδωση υπολογίστηκε σε αντιστοιχία με τη διάρκεια της lag phase και το ρυθμό παραγωγής CD κατά την propagation phase. Η χρονική υστέρηση καθορίστηκε γραφικά ως το σημείο τομής των εφαπτομένων των τμημάτων της καμπύλης που αντιπροσωπεύουν την lag και την propagation phase (σημείο στο οποίο άρχισε να αυξάνεται η απορρόφηση). Η μέτρηση περιλαμβάνει την εύρεση του lag time σε δείγματα ορού (control) και σε δείγματα στα οποία έχουν προστεθεί επιπλέον και μπύρες (sample). Εάν η παρουσία των δειγμάτων προκαλέσει αύξηση του χρόνου επαγωγής σε σχέση με αυτόν του control, θεωρούμε ότι το δείγμα αναστέλλει την οξείδωση της LDL και η δράση του θα είναι ανάλογη της επιμήκυνσης του χρόνου επαγωγής. Η μέθοδος έχει χρησιμοποιηθεί σε κλινικές μελέτες που αναφέρουν ότι ο χρόνος υστέρησης των CD είναι μέτρο της οξείδωσης της LDL, η οποία σχετίζεται με τη στεφανιαία νόσο [56]. Στον Πίνακα 6.4 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της επιμήκυνσης του χρόνου επώασης (Lag time) σε σχέση με τα δείγματα αναφοράς (control), εκφραζόμενα σε sec.

Πίνακας 6.4 Αναστολή της οξείδωσης των λιποπρωτεϊνών του ορού σε sec

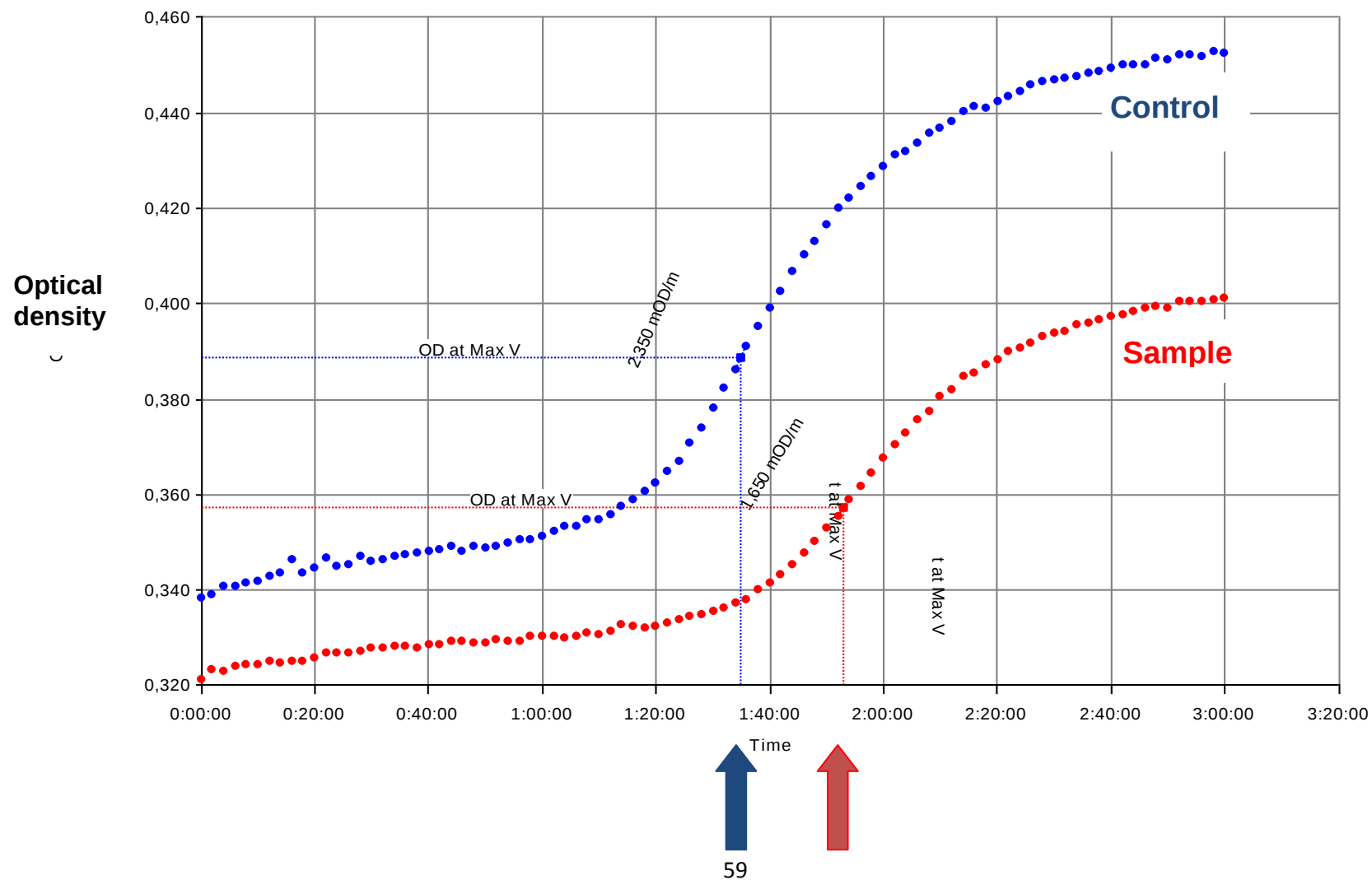
ΚΩΔ	Επιμήκυνση χρόνου επαγωγής (lag time, sec)
1	4070
2	2434
3	1911
4	1432
5	0
6	2603
7	686
8	3195
9	1313
10	526
11	211
12	1141
13	2347
14	5417
15	1845
16	971
17	2246
18	2952
19	0
20	1813
21	1172
22	0
23	1106
24	938
25	3840
26	90
27	531
28	1244
29	521
30	3398
31	74
Mean	1614
SD	1371
Max	5417
Min	0

Σύμφωνα με τα δεδομένα του Πίνακα 6.4 οι περισσότερες μύτερες παρουσιάζουν προστατευτική δράση έναντι της οξείδωσης της LDL εκτός από τα δείγματα No5, No19, και No22 που δεν προκάλεσαν αναστολή. Η επιμήκυνση του lag time κυμάνθηκε μεταξύ 0-5417 sec. Την μεγαλύτερη αναστολή οξείδωσης των λιποπρωτεϊνών του ορού την προκάλεσε η

μπύρα No14 με 5417 sec (1 ώρα και 30 λεπτά) ενώ ο μέσος όρος της επιμήκυνσης του χρόνου επώασης ήταν 1614 sec, δηλαδή ≈ 27 λεπτά.

Στο Σχήμα 6.4 παρουσιάζεται διαγραμματικά η καταγραφή από το ELISA reader των απορροφήσεων και ο υπολογισμός από το λογισμικό του οργάνου των χρόνων επαγωγής ορού (control) και ορού στον οποίο έχει προστεθεί δείγμα μπίρας (sample).

Σχήμα 6.4: Κινητική μελέτη της παραγωγής συζυγών διενίων κατά τη διάρκεια της οξείδωσης λιποπρωτεϊνών ανθρώπινου ορού από Cu^{+2} , χωρίς (Control) και με την παρουσία (Sample) δείγματος μύρας



6.5 Συνολικά αποτελέσματα

Πίνακας 6.5 Σύνολο αποτελεσμάτων για τα 31 δείγματα μυρών

ΚΩΔ	FRAP (mg AAE/L)	TPC ή FC (mg GAE/L)	DPPH (mgTE/L)	Επιμήκυνση χρόνου επαγωγής (lag time, sec)
1	172,29 ± 3,02	783,27 ± 134,30	406,68 ± 1,93	4070
2	118,05 ± 2,08	518,12 ± 8,38	336,08 ± 9,29	2434
3	75,75 ± 15,84	196,00 ± 18,55	127,01 ± 7,74	1911
4	52,47 ± 1,67	234,68 ± 40,66	60,24 ± 6,19	1432
5	78,11 ± 6,25	249,32 ± 30,74	176,27 ± 14,71	0
6	98,01 ± 2,19	345,76 ± 25,48	252,89 ± 19,35	2603
7	64,85 ± 5,00	231,77 ± 26,91	137,41 ± 5,03	686
8	85,78 ± 5,63	283,69 ± 19,87	184,48 ± 1,16	3195
9	106,70 ± 3,44	335,03 ± 10,30	178,46 ± 12,38	1313
10	88,13 ± 4,90	337,07 ± 20,64	194,88 ± 19,35	526
11	75,31 ± 7,61	342,69 ± 47,07	188,86 ± 9,67	211
12	91,52 ± 6,77	303,65 ± 22,91	241,94 ± 11,61	1141
13	116,28 ± 8,44	494,62 ± 20,68	253,44 ± 11,22	2347
14	127,34 ± 10,73	633,82 ± 101,29	299,96 ± 7,74	5417
15	112,60 ± 9,38	498,03 ± 87,42	290,11 ± 8,51	1845
16	123,80 ± 7,50	530,00 ± 6,33	354,14 ± 14,32	971
17	93,00 ± 5,00	338,34 ± 9,39	233,73 ± 16,64	2246
18	113,93 ± 6,88	522,63 ± 23,10	304,88 ± 3,48	2952
19	90,34 ± 6,46	217,59 ± 5,15	191,59 ± 6,19	0
20	104,05 ± 6,57	300,46 ± 27,43	190,50 ± 7,74	1813
21	68,53 ± 0,73	286,50 ± 27,51	91,98 ± 3,10	1172
22	73,40 ± 6,77	216,49 ± 24,01	128,65 ± 1,93	0
23	73,25 ± 7,40	290,66 ± 0,91	189,73 ± 5,65	1106
24	97,57 ± 11,88	299,15 ± 25,58	184,48 ± 5,03	938
25	117,76 ± 8,75	435,76 ± 29,97	325,13 ± 6,97	3840
26	88,13 ± 8,34	277,91 ± 13,49	105,12 ± 3,87	90
27	62,64 ± 4,17	210,95 ± 9,39	120,44 ± 6,97	531
28	124,24 ± 10,94	552,04 ± 47,99	385,33 ± 7,74	1244
29	94,32 ± 9,80	346,31 ± 14,14	251,25 ± 5,80	521
30	78,55 ± 4,79	285,60 ± 19,00	197,06 ± 11,61	3398
31	101,69 ± 11,26	393,13 ± 53,96	295,58 ± 3,87	74
Mean± SD	95,75 ± 24.54	364,23 ± 140.24	221,88 ± 88.01	1615±1371

6.6 Στατιστική ανάλυση

Για την περαιτέρω κατανόηση της σχέσης μεταξύ των αντιοξειδωτικών δοκιμασιών αξιολόγησης και των αντιοξειδωτικών ενώσεων στην μύρα, έγινε ανάλυση συσχέτισης Pearson. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 6.6, τα DPPH, FRAP, TPC και Total Serum oxidisability παρουσίασαν θετικές γραμμικές συσχετίσεις μεταξύ τους (συντελεστές συσχέτισης από 0,467 έως 0,914, $p < 0,05$) γεγονός που αποδεικνύει ότι τα συνολικά αποτελέσματα της αξιολόγησης της αντιοξειδωτικής δράσης για τα 31 δείγματα μυρών, χρησιμοποιώντας αυτές τις τέσσερις δοκιμασίες, ήταν συνεπή παρόλο που εμπλέκονται διάφοροι μηχανισμοί αντίδρασης. Πιο συγκεκριμένα, τα FRAP, TPC και DPPH παρουσίασαν πολύ ισχυρές θετικές γραμμικές συσχετίσεις (0,874 έως 0,914, $p = 0,001$), ενώ το Total Serum Oxidisability παρουσίασε μέτρια έως ισχυρή θετική γραμμική συσχέτιση με τα FRAP, DPPH και TPC (0,467 έως 0,601, $p < 0,05$).

Πίνακας 6.6 Συσχετίσεις μεταξύ των αποτελεσμάτων των μεθόδων προσδιορισμού πολυφαινολών και αντιοξειδωτικής δράσης μυρών

Correlations	FRAP (mg AAE/L)	TPC (mg GAE/L)	DPPH (mgTE/L)	TotSerOxidis (sec)
FRAP (mg AAE/L)	1,000			
TPC (mg GAE/L)	0,914	1,000		
DPPH (mgTE/L)	0,886	0,874	1,000	
TotSerOxidis-Control (sec)	0,540	0,601	0,467	1,000

$n=31, N=29$

$R>0.563 \ p=0.001$

$R>0.457 \ p=0.01$

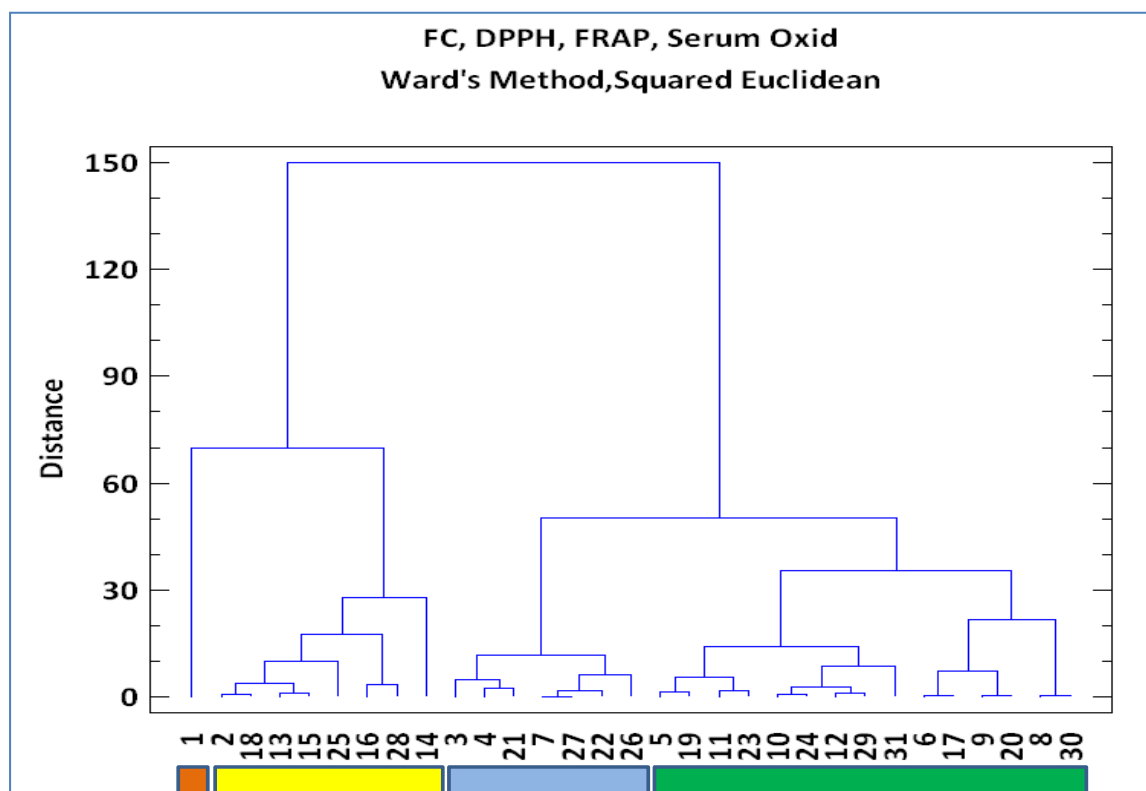
συσχετίσεις σημαντικές σε επίπεδο $p=0.001$ (99.9%)

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

Επιπλέον στα αποτελέσματα έγινε ανάλυση ομαδοποίησης (cluster analysis) με εφαρμογή ιεραρχικής μεθόδου, για τον προσδιορισμό των ομοιοτήτων μεταξύ των δειγμάτων. Η ανάλυση συστάδων ή clustering είναι η οργάνωση μιας συλλογής από δείγματα-δεδομένα σε συστάδες (clusters), με βάση κάποιο μέτρο ομοιότητας.

Στοιχεία που ανήκουν στην ίδια ομάδα, παρουσιάζουν μεγαλύτερη ομοιότητα από στοιχεία που ανήκουν σε διαφορετικές ομάδες. Η ανάλυση ομαδοποίησης πραγματοποιήθηκε στα δείγματα μύρας που αναλύθηκαν και οδήγησε στον σχηματισμό 4 ομάδων (clusters), που παρουσιάζονται στην Εικόνα 6.5α

Εικόνα 6.5α Ανάλυση ομαδοποίησης (cluster analysis) των δειγμάτων μύρας



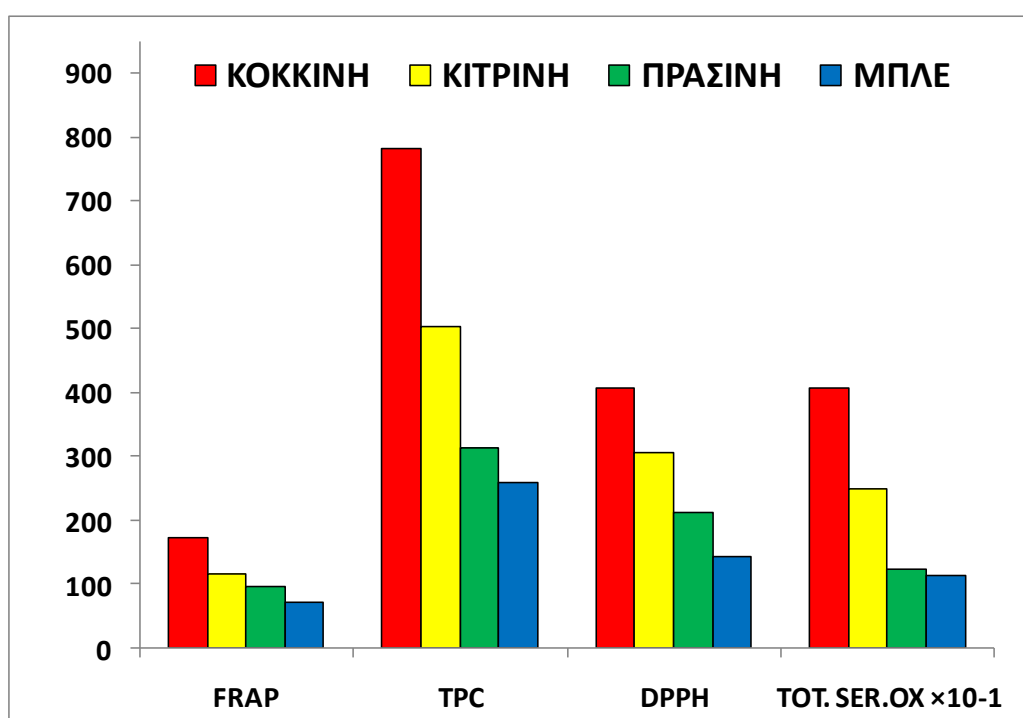
Για εύκολο εντοπισμό οι 4 ομάδες (clusters) διαχωρίζονται με διαφορετικά χρώματα.

- Μία μόνο μύρα, η No1, με ολικό φαινολικό περιεχόμενο >750mg GAE/L
- Μπύρες με ολικό φαινολικό περιεχόμενο 494-634 mg GAE/L
- Μπύρες με ολικό φαινολικό περιεχόμενο 218-393 mg GAE/L
- Μπύρες στην πλειονότητα με ολικό φαινολικό περιεχόμενο 196-277 mg GAE/L

Παρατηρούμε ότι τα δείγματα που ανήκουν στις 4 ομάδες ακολουθούν παρόμοια κατάταξη ως προς τις τιμές των αποτελεσμάτων για FC, DPPH, FRAP και total serum oxidisability: κόκκινο>κίτρινο>πράσινο>μπλε όπως φαίνεται στον Πίνακα 6.7α και την Εικόνα 6.6.

Πίνακας 6.7α Μέσος όρος τιμών για τις 4 ομάδες (clusters) που σχηματίστηκαν από την ανάλυση ομαδοποίησης

ΟΜΑΔΑ (cluster)	FRAP (mg AAE/L)	TPC (mg GAE/L)	DPPH (mg TE/L)	TOTAL SER.OXID (sec)
ΚΟΚΚΙΝΗ	172,29	783,27	406,68	4070
ΚΙΤΡΙΝΗ	116,43	503,26	307,41	2484,94
ΠΡΑΣΙΝΗ	95,96	313,71	213,3	1233,44
ΜΠΛΕ	73,06	258,86	142,27	1144,33



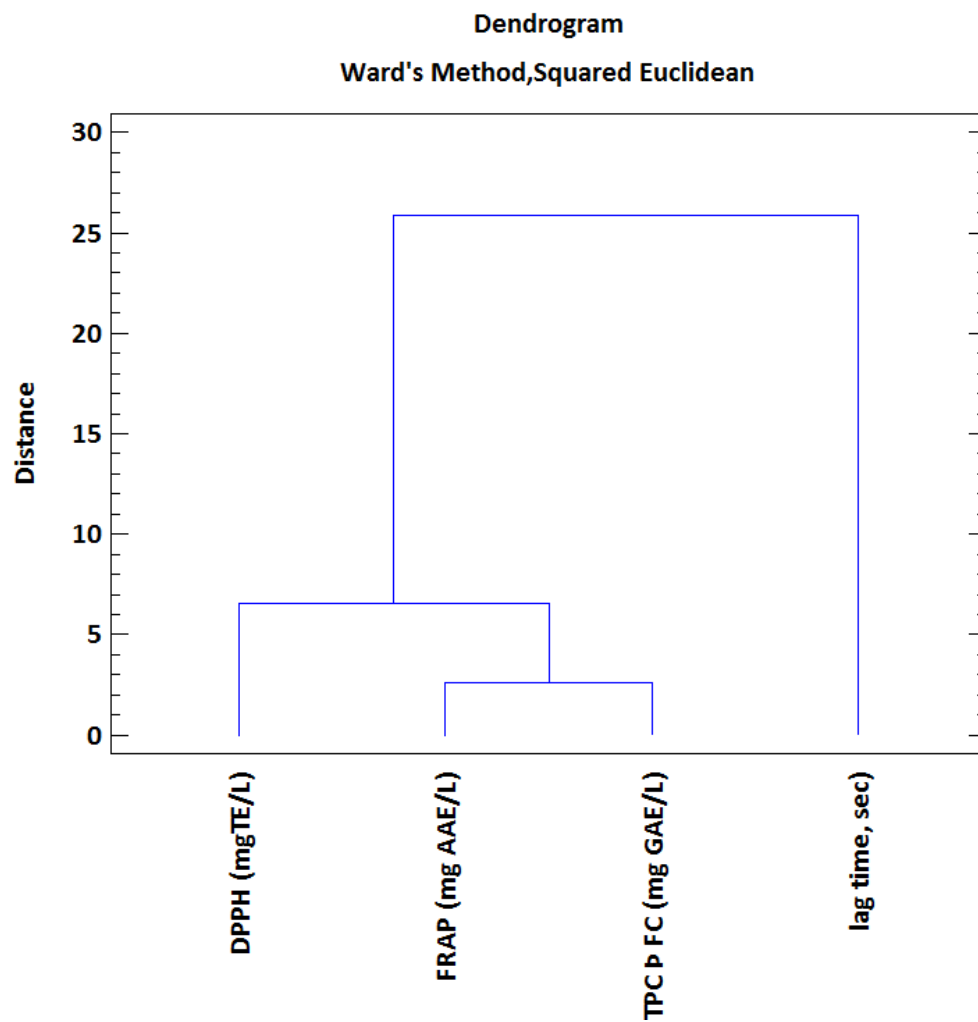
ΕΙΚΟΝΑ 6.6. Μέσος όρος τιμών για τις 4 ομάδες (clusters) που σχηματίστηκαν από την ανάλυση ομαδοποίησης

Πίνακας 6.7β. Εύρος τιμών (ελάχιστο-μέγιστο) για τις 4 ομάδες (clusters) που σχηματίστηκαν από την ανάλυση ομαδοποίησης

ΟΜΑΔΑ (cluster)	FRAP (mg AAE/L)	TPC (mg GAE/L)	DPPH (mg TE/L)	TOTAL SER.OXID (sec)
ΚΟΚΚΙΝΗ	172,29	783,27	406,68	4070
ΚΙΤΡΙΝΗ	101,69-127,34	393,13-633,82	253,44-354,14	74-5417
ΠΡΑΣΙΝΗ	88,13-106,7	217,59-346,31	178,46-252,89	0-2603
ΜΠΛΕ	52,47-88,13	196-342,69	60,24-197,06	0-3398

Επιπλέον πραγματοποιήθηκε ανάλυση ομαδοποίησης ως προς τις μεταβλητές DPPH, FRAP, TPC, Lag Time και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 6.7. Τα αποτελέσματα είναι σε συμφωνία με αυτά της γραμμικής συσχέτισης, αφού οι παράμετροι FRAP, DPPH και TPC σχηματίζουν μια ομάδα, ενώ η αντιοξειδωτική ικανότητα του ορού διαχωρίζεται, σχηματίζοντας μια δεύτερη ομάδα.

Εικόνα 6.7 Ανάλυση ομαδοποίησης (cluster analysis) των παραμέτρων που προσδιορίσθηκαν στις μπύρες



Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν το αντιοξειδωτικό περιεχόμενο και αντιοξειδωτικές ιδιότητες 31 μυρών, που παράγονται από ελληνικές μικροζυθοποιίες σε διάφορες περιοχές της Ελλάδας όπως Χίος, Σαντορίνη, Ρόδος, Τήνος, Κέρκυρα, Θεσσαλία, Φθιώτιδα και Εύβοια. Το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο (TPC) εκτιμήθηκε με την μέθοδο Folin-Ciocalteu. Όλα τα δείγματα περιείχαν σημαντικές ποσότητες φαινολικών ενώσεων που κυμάνθηκαν από $196,0 \pm 18,6$ έως $783,3 \pm 134,3$ mg GAE/L με μέσο όρο $364,2 \pm 30,7$ mg GAE/ L. Η αντιοξειδωτική δράση των δειγμάτων μελετήθηκε με δύο δοκιμές: ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH• και μέτρηση της αναγωγικής δύναμης μέσω της μεθόδου FRAP. Η ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH• των δειγμάτων μύρας κυμάνθηκε από $60,2 \pm 6,2$ έως $406,7 \pm 1,9$ mg TE/L ενώ ο μέσος όρος ήταν $221,9 \pm 8,3$ mg TE/L. Αντίστοιχα οι μύρες παρουσίασαν αναγωγική ικανότητα, η οποία κυμάνθηκε μεταξύ $52,5 \pm 1,7$ έως $172,3 \pm 3,0$ mg AAE/ L μύρας ενώ ο μέσος όρος ήταν $95,8$ mg AAE/ L. Η αντιοξειδωτική ικανότητα των μυρών φάνηκε να βρίσκεται σε άμεση συσχέτιση με το φαινολικό περιεχόμενο τους και πιο συγκεκριμένα, τα FRAP, TPC και DPPH παρουσίασαν πολύ ισχυρές θετικές γραμμικές συσχετίσεις ($0,874$ έως $0,914$, $p = 0,001$). Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας είναι, σε γενικές γραμμές, σε συμφωνία με την βιβλιογραφία.

Επιπλέον πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της δυνατότητας των μυρών να αναστέλλουν την οξείδωση των λιποπρωτεϊνών του ορού (lag time). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η πλειοψηφία ($> 90\%$) των μυρών παρουσίασαν προστατευτική δράση έναντι της οξείδωσης της LDL, επομένως οι μύρες παρουσιάζουν αντιαθηρογόνο δράση. Στατιστικά, η επιμήκυνση του χρόνου επώασης (lag time) της οξείδωσης των λιποπρωτεϊνών, παρουσίασε μέτρια έως ισχυρή θετική γραμμική συσχέτιση με τα FRAP, DPPH και TPC ($0,467$ έως $0,601$, $p < 0,05$).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα επιστημονικών μελετών της τελευταίας δεκαετίας, φαίνεται να είναι αποδεκτό ότι η μέτρια κατανάλωση αλκοόλ, 2-3 μονάδες/ ημέρα για έναν υγιή άντρα και 1-2 μονάδες/ημέρα για μία υγιή γυναίκα (1 μονάδα= 12γρ αλκοόλ) , δεν μπορεί να επικριθεί είτε ιατρικά ή κοινωνικά. Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, η μύρα μπορεί να θεωρηθεί ως καλή πηγή

αντιοξειδωτικών η οποία επιπλέον λόγω της σχετικά χαμηλής περιεκτικότητας σε αλκοόλ προκαλεί λιγότερες επιβλαβείς επιδράσεις στην υγεία.

Η μελέτη αυτή αποτελεί ένα πρώτο βήμα για τον προσδιορισμό των αντιοξειδωτικών και των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων σε μπύρες από ελληνικές μικροζυθοποιίες.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. De Keukeleire, D., *Fundamentals of beer and hop chemistry*. Química Nova, 2000. **23**: 108-112.
2. LAROUSSE *Γαστρονομία*: εκδόσεις Ι.Φλώρος. 597.
3. PlvO, I. and I. LjEk, *Beer and wine in antiquity: beneficial remedy or punishment imposed by the Gods?* 2012.
4. Nelson, M., *Did ancient Greeks drink beer?* Phoenix, 2014. **68**(1/2): 27-46.
5. Denke, M.A., *Nutritional and health benefits of beer*. The American Journal of the Medical Sciences, 2000. **320**(5): 320-326.
6. Madigan, D., I. McMurrough, and M.R. Smyth, *Determination of proanthocyanidins and catechins in beer and barley by high-performance liquid chromatography with dual-electrode electrochemical detection*. Analyst, 1994. **119**(5): 863-868.
7. Herrmann, K., *On the occurrence of flavonol and flavone glycosides in vegetables*. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung, 1988. **186**(1): 1-5.
8. H-D.Belitz, W.Grosch, and P.Schieberle, *Χημεία τροφίμων*. 3η έκδοση ed2006: Εκδόσεις Τζιόλα. 1431-1456.
9. Lobbert, et al., *Τρόφιμα Είδη Ποιότητα Εμπόριο* 2010: Ιων/Ευρωπαϊκές Τεχνολογικές Εκδόσεις. 294-295.
10. Χίου, *Σημειώσεις φροντιστηρίου Φυσικοχημείας και Βιοχημείας τροφίμων, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο*, Αθήνα 2003.
11. Kondratyuk, T. and J.M. Pezzuto, *Natural product polyphenols of relevance to human health*. Pharmaceutical Biology, 2004. **42**(s1): 46-63.
12. Tsao, R., *Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols*. Nutrients, 2010. **2**(12): 1231-1246.
13. Liu, R.H., *Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action*. The Journal of Nutrition, 2004. **134**(12): 3479S-3485S.
14. Bravo, L., *Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance*. Nutrition Reviews, 1998. **56**(11): 317-333.
15. Tomás-Barberán, F.A. and M.N. Clifford, *Dietary hydroxybenzoic acid derivatives—nature, occurrence and dietary burden*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2000. **80**(7): 1024-1032.
16. Cheynier, V., *Polyphenols in foods are more complex than often thought*. The American Journal of Clinical Nutrition, 2005. **81**(1): 223S-229S.
17. Nardini, M., et al., *Phenolic acids from beer are absorbed and extensively metabolized in humans*. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2006. **17**(1): 14-22.
18. Hollman, C., *Bioavailability of flavonoids*. European Journal of Clinical Nutrition, 1997. **51 Suppl 1**: S66-9.
19. Ross, J.A. and C.M. Kasum, *Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety*. Annual Review of Nutrition, 2002. **22**: 19-34.
20. Manach, C., et al., *Polyphenols: food sources and bioavailability*. The American Journal of Clinical Nutrition, 2004. **79**(5): 727-47.
21. Vinson, J.A., *Flavonoids in foods as in vitro and in vivo antioxidants*. Advances in Experimental Medicine and Biology, 1998. **439**: 151-164.
22. Cassidy, A., B. Hanley, and R.M. Lamuela-Raventos, *Isoflavones, lignans and stilbenes—origins, metabolism and potential importance to human health*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2000. **80**(7): 1044-1062.

23. Zheng, Y., et al., *Rapid gut transit time and slow fecal isoflavone disappearance phenotype are associated with greater genistein bioavailability in women*. Journal of Nutrition, 2003. **133**(10): 3110-3116.
24. Gerloff, A., M.V. Singer, and Feick, *Beer and its non-alcoholic compounds: role in pancreatic exocrine secretion, alcoholic pancreatitis and pancreatic carcinoma*. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2010. **7**(3): 1093-1104.
25. Zhao, H., et al., *Phenolic profiles and antioxidant activities of commercial beers*. Food Chemistry, 2010. **119**(3): 1150-1158.
26. Vassallo, N., *Polyphenols and Health*. 2008, New York , USA: Nova Science Publisher Inc.
27. Chung, K.-T., C.-I. Wei, and M.G. Johnson, *Are tannins a double-edged sword in biology and health?* Trends in Food Science & Technology, 1998. **9**(4): 168-175.
28. Καλιώρα, *Μελέτη της βιολογικής συμπεριφοράς φυσικών προϊόντων και παραγώγων τους ως προς την ικανότητα τροποποίησης της LDL, in vitro. Διατροφική προσέγγιση. Διδακτορική διατριβή. Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, 2003.*
29. Tapiero, H., et al., *Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies?* Biomed Pharmacother, 2002. **56**(4): 200-7.
30. Scalbert, A. and G. Williamson, *Dietary intake and bioavailability of polyphenols*. Journal of Nutrition, 2000. **130**(8S Suppl): 2073S-85S.
31. Gropper, et al., *Διατροφή και μεταβολισμός 2*(2008): Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ Πασχαλίδης.
32. Halliwell, B., *Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence?* The Lancet, 1994. **344**(8924): 721-724.
33. Valko, M., et al., *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2007. **39**(1): 44-84.
34. Mendelson, *Food Nutrition and Diet Therapy* , 11th Edition(2004): W.B Saunders Company.
35. Amarowicz, R., et al., *Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies*. Food Chemistry, 2004. **84**(4): 551-562.
36. Park, E.J. and J.M. Pezzuto, *Botanicals in cancer chemoprevention*. Cancer and Metastasis Reviews, 2002. **21**(3-4): 231-255.
37. Han, X., T. Shen, and H. Lou, *Dietary polyphenols and their biological significance*. International Journal of Molecular Sciences, 2007. **8**(9): 950-988.
38. Robards, K., et al., *Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits*. Food Chemistry, 1999. **66**(4): 401-436.
39. Dabina, I., et al., *Bioactive Compounds in Latvian Beer*. Proceedings of the Latvia University of Agriculture, 2013. **30**(1): 35-42.
40. Preedy, et al., *Ethanol in beer: Production, absorption and metabolism*. In *Beer In Health and Disease Prevention*, 2009: 429-440.
41. Rivero, D., et al., *Inhibition of Induced DNA Oxidative Damage by Beers: Correlation with the Content of Polyphenols and Melanoidins*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. **53**(9): 3637-3642.
42. Gasowski, B., et al., *The influence of beer with different antioxidant potential on plasma lipids, plasma antioxidant capacity, and bile excretion of rats fed*

- cholesterol-containing and cholesterol-free diets*. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2004. **15**(9): 527-533.
43. Ďuračková, Z., *Some current insights into oxidative stress*. Physiological Research, 2010. **59**: 459-469.
 44. Pulido, R., M. Hernandez-Garcia, and F. Saura-Calixto, *Contribution of beverages to the intake of lipophilic and hydrophilic antioxidants in the Spanish diet*. European Journal of Clinical Nutrition, 2003. **57**(10): 1275-1282.
 45. Gronbaek, M., et al., *Mortality associated with moderate intakes of wine, beer, or spirits*. British Medical Journal, 1995. **310**(6988): 1165-1169.
 46. Kannel, W.B. and R.C. Ellison, *Alcohol and coronary heart disease: the evidence for a protective effect*. Clinica Chimica Acta, 1996. **246**(1): 59-76.
 47. Hoffmeister, H., et al., *The relationship between alcohol consumption, health indicators and mortality in the German population*. International Journal of Epidemiology, 1999. **28**(6): 1066-1072.
 48. Nanchahal, K., W.D. Ashton, and D.A. Wood, *Alcohol consumption, metabolic cardiovascular risk factors and hypertension in women*. International Journal of Epidemiology, 2000. **29**(1): 57-64.
 49. Ghiselli, A., et al., *Beer increases plasma antioxidant capacity in humans*. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2000. **11**(2): 76-80.
 50. Lugasi, A., *Polyphenol content and antioxidant properties of beer*. Acta Alimentaria, 2003. **32**(2): 181-192.
 51. Mitić, S.S., et al., *Phenolic Profiles and Total Antioxidant Capacity of Marketed Beers in Serbia*. International Journal of Food Properties, 2014. **17**(4): 908-922.
 52. Piazzon, A., M. Forte, and M. Nardini, *Characterization of phenolics content and antioxidant activity of different beer types*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010. **58**(19): 10677-10683.
 53. Obruca, S., et al., *A Contribution to Analysis of "Czech Beer" Authenticity*. Czech Journal of Food Sciences, 2009. **27**: S323-S326.
 54. Zhao, H., et al., *Assessment of endogenous antioxidative compounds and antioxidant activities of lager beers*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2013. **93**(4): 910-917.
 55. Andrikopoulos, N.K., et al., *Biological activity of some naturally occurring resins, gums and pigments against in vitro LDL oxidation*. Phytotherapy Research, 2003. **17**(5): 501-507.
 56. Halevy D., Thiery J., Nagel D., Arnold S., Erdmann E., Höfling B., Cremer P., Seidel. D. *Increased oxidation of LDL in patients with coronary artery disease is independent from dietary vitamins E and C*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 1997, **17**: 1432-1437.